



UNIVERSIDADE FEDERAL DE PERNAMBUCO
Centro de Biociências
Programa de Pós-Graduação em Inovação Terapêutica

MICHAEL WILLIAMES LEAL QUIRINO

**AVALIAÇÃO DE NOVAS ESTRATÉGIAS TERAPÊUTICAS PARA O
TRATAMENTO DE CÉLULAS LEUCÊMICAS RESISTENTES A INIBIDORES DE
TOPOISOMERASES**

**RECIFE-PERNAMBUCO
2016**

MICHAEL WILLIAMES LEAL QUIRINO

**AVALIAÇÃO DE NOVAS ESTRATÉGIAS TERAPÊUTICAS PARA TRATAMENTO
DE CÉLULAS LEUCÊMICAS RESISTENTES A INIBIDORES DE
TOPOISOMERASES**

**Dissertação apresentada à Universidade
Federal de Pernambuco, como parte das
exigências do Programa de Pós-Graduação em
Inovação Terapêutica, para a obtenção do
Título de Magister Scientiae.**

**Orientador: Prof. Dr. Moacyr Jesus Barreto
de Melo Rêgo**

Co-orientador: Prof. Dr. Ivan da Rocha Pitta

RECIFE-PERNAMBUCO

2016

Catálogo na fonte
Elaine Barroso
CRB 1728

Quirino, Michael Willames Leal

Avaliação de novas estratégias terapêuticas para o tratamento de células leucêmicas resistentes a inibidores de topoisomerasas / Michael Willames Leal Quirino- Recife: O Autor, 2016.

77 folhas: il., fig., tab.

Orientador: Moacyr Jesus Barreto de Melo Rego

Coorientador: Ivan da Rocha Pitta

Dissertação (mestrado) – Universidade Federal de Pernambuco.

Centro de Biociências. Inovação Terapêutica, 2016.

Inclui referências

1. Câncer- quimioterapia 2. Leucemia 3. Resistência a drogas I. Rego, Moacyr Jesus Barreto de Melo (orientador) II. Pitta, Ivan da Rocha (coorientador) III. Título

615.58

CDD (22.ed.)

UFPE/CB-2017-222

**UNIVERSIDADE FEDERAL DE PERNAMBUCO
CENTRO DE BIOCÊNCIAS
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM INOVAÇÃO TERAPÊUTICA**

REITOR

Prof. Dr. Anísio Brasileiro de Freitas Dourado

VICE-REITORA

Profa. Dra. Florisbela de Arruda Câmara e Siqueira Camos

PRÓ-REITOR PARA ASSUNTOS DE PESQUISA E PÓS-GRADUAÇÃO

Prof. Dr. Ernani Rodrigues de Carvalho Neto

DIRETORA DO CENTRO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS

Profa. Dra. Maria Eduarda Lacerda de Larrazába

VICE- DIRETORA DO CENTRO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS

Profa. Dra. Oliane Maria Correia Magalhães

**COORDENADORA DO PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO
EM INOVAÇÃO TERAPÊUTICA**

Profa. Dra. Maira Galdino da Rocha Pitta

**VICE- COORDENADOR DO PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO
EM INOVAÇÃO TERAPÊUTICA**

Prof. Dr. Luiz Alberto Lira Soares

FOLHA DE APROVAÇÃO

QUIRINO, MICHAEL WILLIAMES LEAL

AVALIAÇÃO DE NOVAS ESTRATÉGIAS TERAPÊUTICAS PARA O TRATAMENTO DE CÉLULAS LEUCÊMICAS RESISTENTES A INIBIDORES DE TOPOISOMERASES

Dissertação apresentada a Universidade Federal de Pernambuco, para obtenção do título de Mestre em Inovação Terapêutica.

Aprovada em Recife, 15 de março de 2016.

BANCA EXAMINADORA

Prof. Dr. Moacyr Jesus Barreto de Melo Rêgo

Instituição: UFPE- Departamento de Bioquímica

Assinatura:_____

Dr. Mardonny Bruno de Chagas

Instituição: Núcleo de Pesquisa em Inovação Terapêutica

Assinatura:_____

Prof(a). Dra. Maira Galdino da Rocha Pitta

Instituição: UFPE-Departamento de Bioquímica

Assinatura:_____

AGRADECIMENTOS

Agradeço a Deus, pelo dom da vida e pela sabedoria que procuro empregar da melhor forma possível.

Ao meu pai Roberto e a minha mãe Vandira pela dedicação e amor na criação de mim e de meus irmãos. A Meus irmãos, David, Bárbara e Roberta. A minha noiva Nathália Lima por me apoiar nas decisões e pela paciência às horas de lazer dedicadas ao laboratório, todos são encorajadores, essenciais durante minha formação acadêmica e humana.

Ao Prof. Dr. Moacyr Jesus Barreto de Melo Rêgo, por sua dedicação, companheirismo e por acreditar no sucesso de seus alunos, assim como pelo seu empenho em tornar a ciência em algo simples e prazeroso.

A todos do grupo do Linat, Nupit-SG e toda família Pitta por contribuir no desenvolvimento técnico e científico na UFPE e por proporcionar a inserção de jovens interessados em contribuir no desenvolvimento da ciência e da nação.

Minha gratidão aos meus amigos Edso Henrique, Héctor Dayvson e Taciano França pelo companheirismo e amizade.

Aos amigos de todas as horas Mardonny Chagas, Flaviana Alves, Thuanny Marina, Lidiane Vasconcelos, Wanessa Sena, Helena Neta, e Valécia de Cassia pela grandiosa contribuição no desenvolvimento deste projeto e por todos os momentos dentro e fora do laboratório.

QUIRINO, M. W. L. Avaliação de novas estratégias terapêuticas para tratamento de células leucêmicas resistentes a inibidores de topoisomerases. 2015. Dissertação. Universidade Federal de Pernambuco, Recife, Pernambuco, Brasil.

RESUMO

Os inibidores de topoisomerase se destacam entre os quimioterápicos usados na clínica, sendo capazes de interferir em processos vitais, como a transcrição e a replicação celular. Entretanto, muitos cânceres tornaram-se resistentes a esses inibidores, sendo cada vez mais necessário a busca de novos agentes anticâncer ou novas abordagens terapêuticas. Este trabalho teve como objetivo testar novas abordagens terapêuticas em células leucêmicas resistentes a inibidores de topoisomerase, a partir da avaliação da atividade antineoplásica de derivados tiofênicos e do uso de inibidores de N-glicosilação, afim de sensibilizar células tumorais ao tratamento. Inicialmente, foi utilizado o método de redução de redução do MTT para avaliar a citotoxicidade dos cinco derivados tiofênicos (SB-68, SB-30, SB-44, SB-83 e SB-200) junto a Células Mononucleares do Sangue periférico (PBMC), células tumorais HL-60 e células com perfil multidroga resistente HL60/MX1, bem como determinar o IC₅₀ dos inibidores de topoisomerase (etoposídeo, bisantreno, amsacrina e camptotecina) e a dose máxima não citotóxica dos inibidores de N-glicosilação (miglustato e tunicamicina). Modificações na progressão do ciclo celular, atividade de caspase 3/7 e a atividade de transportadores ABC foram avaliados por citometria de fluxo. Nas condições de associação a administração da tunicamicina foi realizada 24h antes do tratamento como inibidores de topoisomerase e o miglustato foi adicionado simultaneamente aos inibidores. Por fim ensaios de inibição de topoisomerase II foram realizados. Os derivados tiofênicos SB-83 e SB-200 maior citotoxicidade em células HL60/MX1 (IC₅₀ = 7.94 e 9.36 μ M, respectivamente) e índice de seletividade maior que 3. Todos os derivados tiofênicos não foram capazes de induzir modificações no ciclo celular e na atividade de caspase 3/7, indicando que outros mecanismos de morte estão envolvidos na citotoxicidade dos SBs em HL60/MX1. Foi observado a atividade ABCC1 em HL60/MX1, muito embora sua ativação não altere o efeito citotóxico dos SB-200 e SB-83. A inibição da atividade de topoisomerase II foi observada em SB-83 (50 e 100 μ M) e SB-200 (100 μ M). A sensibilização com miglustato a 1 μ M não alterou o efeito citotóxico dos inibidores de topoisomerase em HL60/MX1. Por outro lado, a sensibilização com tunicamicina se mostrou eficaz em aumentar a atividade citotóxica do bisantreno, sendo mais efetiva que a utilização do bloqueador de ABCC1. Ademais, SB-83 e SB-200 apresentam-se como grandes

candidatos para o tratamento de leucemias agudas resistentes, bem como o uso de tunicamicina associada aos inibidores de topoisomerase. Entretanto, outros estudos são requeridos para avaliar o efeito de outras condições de sensibilização e para elucidar os mecanismos de indução de morte celular destes derivados tiofênicos.

Palavras-chave: Câncer. Resistência. Benzotiofênicos.

QUIRINO, M. Evaluation of sensitizing effect of N-glycosylation inhibitors in chemotherapy-resistant leukemia cells by topoisomerase inhibitors. 2015. Dissertation. Federal University of Pernambuco, Recife, Pernambuco, Brazil.

ABSTRACT

Among chemotherapeutic agents used in clinical settings, topoisomerase inhibitors are one of the most important because they act directly interfering in cellular vital processes, such as transcription and replication. However, many cancer types have become resistant to treatment with these molecules, being necessary the search for more effective anticancer compounds or therapies. This study aimed to test two novel therapeutic approaches in leukemia cells resistant to topoisomerase inhibitors: evaluating anticancer activity of new thiophene derivatives and sensitizing cells resistant to topoisomerase inhibitors using N-glycosylation inhibitors. For this purpose, cytotoxicity assays were performed in multi-drug resistant cell lines HL-60/MX1 and CCRF-CEM/C2 in order to initially determine IC_{50} values of novel thiophene derivatives. SB-83 showed the best value ($IC_{50} = 7.94 \pm 2.26 \mu M$). Then were evaluated IC_{50} values of topoisomerase inhibitors currently used in clinical. In addition, optimal sensitizing concentrations of N-glycosylation inhibitors are being determined. Two new thiophene derivatives showed better cytotoxic activity when compared to topoisomerase inhibitors, and also a promising selectivity index. However, further assays need to be repeated and performed in order to achieve the main objective of this study.

Keywords: Thiophene derivatives. Cancer. Resistance. Benzothiophenes.

LISTA DE FIGURAS

Figura 01: Ilustração demonstrando as principais características do câncer. Hallmarks do câncer.	16	
Figura 02: Esquema de maturação hematopoiética.	17	
Figura 03: Esquema demonstrando a biossíntese do oligossacarídeo precursor e seus três principais núcleos de formação dos N-glicanos.	20	
Figura 04: Estruturas moleculares da tunicamicina, Deoxinojirimicina e da Castanospermina.	21	
Figura 05: Estrutura da N-butyl-Deoxynojirimycin (Miglustate).	23	
Figura 06: Esquema representativo da resposta a proteínas mal formadas (UPR) e os seus três sensores PERK, IREI1 e ATF6.	25	
Figura 07: Estrutura do tiofeno.	26	
Artigo 1		
Figura 01: Effects of SBs on cell cycle progression of HL-60/MX1 cells after 48 hours of treatment.	48	
Figura 02: Effects of SBs on caspase -3/7 activation in HL-60/MX-1 cells.	48	
Figura 03: Fluorescence intensity (log) of HL-60 and HL-60/MX1 cell lines in the presence of ABCB1 (A and B) and ABCC1 (C and D) inhibitors.	49	
Figura 04: Semi-quantitative analysis of SB-83 and SB-200 on pOHT-1 DNA plasmid relaxation by human topoisomerase II.	50	
Artigo 2: Assessment of possible effects of glycosylation inhibitors in leukemic cells resistant to chemotherapy with topoisomerase inhibitors.....		53
Figura 01: Effects of Tunicamycin on cell viability of peripheral blood mononuclear cells (A) and HL-60/MX1(B) cell line	59	
Figura 02: Effects of NB-DNJ on cell viability of peripheral blood mononuclear cells (A) and HL-60/MX1 cell line (B).....	60	

LISTA DE TABELAS

Tabela 01: Principais tipos de tumores que levaram a morte em 2012, segundo a Organização Mundial da Saúde. 14

Tabela 02: Identificação e estrutura química dos novos derivados tiofênicos. 29

Artigo 1

Tabela 01: Synthesis and chemical structures of SBs. 47

Tabela 02: IC₅₀ values (μM) and selectivity index (SI) of SBs compounds in PBMC and resistant acute leukemia cells. 47

Tabela 03: Percentage of HL-60/MX1 cell death and cells in Sub-G0, G0/G1 and S/G2/M phases after treatment with SB-200, SB-83 and SB-44 (incubated or not previously with MK571). 47

Artigo 2

Tabela 01: Concentration of a topoisomerase inhibitors that is required for 50% inhibition in vitro of HL60/MX1 cells.....58

Tabela 02: Percentage of HL60/MX1 death cells and in the phases of the cell cycle after treatment with tunicamycin, etoposide, amsacrine, and preincubated with or not MK571.....59

LISTA DE ABREVIACES E SIGLAS

CO2 - Gs carbnico.

DMSO - Dimetilsulfxico.

DNA - cido desoxirribonucleico

G0 - Intervalo celular 0

G1 - Intervalo celular 1

G2 - Intervalo celular 2

IC50 - Concentração inibitria de 50%

INCA– Instituto Nacional do Câncer

LPSF - Laboratrio de Síntese e Planejamento de Fármacos

M - Mitose

MTT - do inglês 3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difenil brometo de tetrazolina)

OMS - Organizao Mundial de Saúde

p - Significância estatística

PBMC - Células mononucleares do sangue periférico

PBS - Tampão Salino Fosfato

PI - Iodeto de Propdeo

UV – Ultra-violeta

RE – Retículo Endoplasmático

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO.....	12
2 REVISÃO DA LITERATURA.....	14
2.1 O câncer.....	14
2.2 Leucemias.....	16
2.3 Transportadores ABC.....	18
2.4 Glicosilação e a N-glicosilação.....	19
2.5 Inibidores de N-glicosilação.....	20
2.6 A Tunicamicina e o Miglustato.....	22
2.7 Estresse de retículo endoplasmático.....	23
2.8 O tiofeno e seus derivados.....	26
3 OBJETIVOS.....	28
3.1 Objetivos Gerais.....	28
3.2 Objetivos Específicos.....	28
4 MATERIAIS E MÉTODOS.....	29
4.1 Cultura de células.....	29
4.2 Derivados tiofênicos e agentes sensibilizantes.....	29
4.3 Testes de Citotoxicidade.....	30
4.4 Ensaio de sensibilidade.....	30
4.5 Avaliação do ciclo celular.....	31
4.6 Avaliação de morte celular pela clivagem das caspases 3/7.....	31
4.7 Caracterização da atividade dos transportados ABCB1 e ABCC1.....	32
4.8 Envolvimento dos transportados ABC no efeito das drogas investigadas.....	32
4.9 Ensaio de inibição de topoisomerase II.....	33
5 RESULTADOS.....	34
Artigo 1- HYBRID INDOLE-THIOPHENE DERIVATIVES AS A THERAPEUTIC STRATEGY IN RESISTENT ACUTE LEUKEMIA CELLS.....	35
Artigo 2- ASSSSIMENT OF POSSIBLE EFECTS OF GLYCOSYLATION INHIBITORS IN LEUKEMIC CELLS RESISTANT TO CHEMOTHERAPY WITH TOPOISOMERASE INHIBITORS.....	51
6 DISCUSSÃO GERAL.....	61
7 CONCLUSÕES.....	64
REFERÊNCIAS.....	65

1 INTRODUÇÃO

O câncer corresponde a um conjunto de mais de 200 doenças cujo início é marcado pelo surgimento de células, com acentuado crescimento descontrolado e desordenado, desencadeado por diversos fatores biológicos, químicos, físicos e ambientais (GUSTERSON & STEIN, 2012; TSIFTSOGLU et al., 2003).

Após seu surgimento, o câncer cresce localmente podendo infiltrar-se nos tecidos adjacentes, adentrar no endotélio vascular, quando enfim passa para os vasos onde eventualmente irá se estabelecer em tecidos distantes do sítio primário do tumor. Nesse momento são originados os tumores secundários, que têm sua progressão mediada principalmente por resposta inflamatória crônica e crescem de forma exacerbada, tornando o hospedeiro cada vez mais debilitado, levando-o muitas vezes ao óbito (PHILIP et al., 2004).

Várias formas de tratamento são empregadas no combate ao câncer, dentre elas está a quimioterapia, que geralmente utiliza agentes citostáticos que atuam impossibilitando a progressão do ciclo celular e consequentemente induzindo a apoptose. O grande limitador na ampla utilização dos quimioterápicos refere-se à alta citotoxicidade e baixa seletividade, o que contribui para o surgimento de vários efeitos colaterais (REGULSKA et al., 2012).

Devido à alta progressão no seu desenvolvimento e a alta incidência no mundo, existe uma busca constante de moléculas e alternativas inovadoras que buscam reduzir a concentração de medicamentos administrados no paciente, reduzindo a toxicidade e elevando a eficiência no tratamento (HILEMAN, 2004). Nesse contexto, a utilização associada de medicamentos que possam agir em diferentes vias de sobrevivência das células tumorais torna-se de extrema relevância. Entre essas moléculas estão os derivados tiofênicos, compostos que possuem amplo poder farmacológico, pois mimetizam estruturas biológicas (SAKER & NAHAR, 2009). Em vista disso muitos derivados tiofênicos têm sido sintetizados e empregados como agentes antitumorais (DALLEMAGNE et al. 2003). Ademais, as acridinas e seus derivados também são exemplos de moléculas que podem ser utilizadas em poliquimioterapia. Isso ocorre devido sua alta capacidade de intercalar-se ao DNA e bloquear as enzimas topoisomerase I e II, impedindo o processo de divisão celular e, por consequência, a progressão do tumor (MOUKHARSKAYA & VERSCHRAEGEN, 2012). No entanto, existem muitos tumores na prática clínica que se tornam resistentes a esse bloqueio, anulando o efeito terapêutico de medicamentos que possuem esse sítio de ação (LAGE, 2008).

Uma estratégia terapêutica explorada é a utilização de uma molécula que visa potencializar a ação de uma segunda molécula (DORNELES, 2008). Dentre os agentes que

podem ser utilizados como potenciais sensibilizantes estão os inibidores de N-glicosilação como a tunicamicina, que causa estresse do retículo endoplasmático ao bloquear o processo de N-glicosilação de proteínas, tornando as células tumorais mais sensíveis à ação de outras drogas (LU et al, 2004; PHILIP et al, 2004; ALMEIDA et al, 2005; FAN et al ,2013).

Desta forma, o presente projeto propõe-se em aplicar duas novas abordagens terapêuticas, a primeira utilizando novos agentes e a segunda tornando sensíveis as células resistentes a quimioterápicos inibidores de topoisomerase, através da aplicação de inibidores de N-glicosilação, bem como o entendimento do seu mecanismo de ação.

2 REVISÃO DA LITERATURA

2.1 O câncer

O câncer é um grande problema de saúde que ocorre no mundo inteiro. Atualmente, é a segunda principal causa de morte nos Estados Unidos da América (EUA) e segundo projeções de estudiosos analistas, espera-se que o número de mortes por câncer seja ainda maior nos próximos cinco anos, ultrapassando a mortalidade por doenças cardíacas (SIEGEL, 2015). Em 2012, 8 milhões e 200 mil mortes foram confirmadas com diagnóstico de câncer (Tabela 1) (Iarc, Globocan 2012).

Tabela 1: Principais tipos de tumores que levaram a morte em 2012, segundo a Organização Mundial da Saúde (2015).

Câncer	Mortalidade em 2012
Pulmão	1,59 milhões
Fígado	745 mil
Estômago	723 mil
Colorretal	694 mil
Mama	521 mil
Esôfago	400 mil

O câncer é uma doença caracterizada por crescimento descontrolado e disseminação de células. Pode acometer qualquer tecido, envolvendo, na maioria dos casos, o tecido circundante com eventual presença de metástases. As metástases são a principal causa de morte por câncer (World Health Organization, 2015). Muitos tipos de neoplasias podem ser prevenidas, evitando a exposição a fatores de risco comuns, tais como o fumo do tabaco. Além disso, boa parte dos tumores malignos pode ser curada, por cirurgia, radioterapia ou quimioterapia, especialmente se forem detectados precocemente (World Health Organization, 2015).

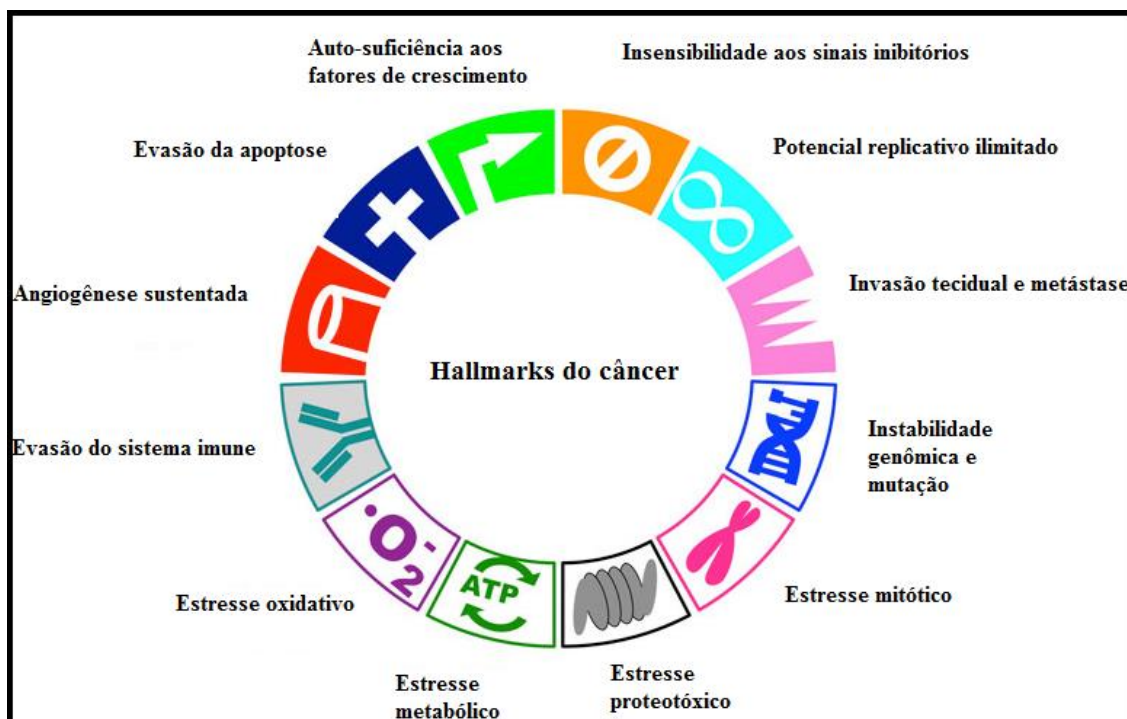
O tumor maligno surge a partir de uma única célula. A transformação de uma célula normal numa célula tumoral é um processo de múltiplos passos, tipicamente uma progressão de uma lesão pré-cancerosa até o tumor maligno (World Cancer Report, 2014). Essas mudanças podem resultar da interação entre fatores genéticos de uma pessoa e três categorias de agentes

externos. Estes podem ser carcinógenos físicos, tais como raio ultravioleta e radiação ionizante; produtos químicos cancerígenos, como o amianto, componentes da fumaça do tabaco, a aflatoxina, um contaminante de alimentos e arsênio, um contaminante de água potável; e os carcinógenos biológicos, tais como infecções de certos vírus, bactérias ou parasitas (World Cancer Report, 2014; World Health Organization, 2015).

Essa doença possui capacidades biológicas que são importantes para seu desenvolvimento, progressão e resistência a múltiplas drogas. Essas características são conhecidas como “hallmarks of cancer”. Os *hallmarks* foram descritos e organizados para reduzir a complexidade da doença neoplásica (Figura 1). Eles podem ser divididos em seis capacidades principais, sinalização proliferativa, fuga dos supressores tumorais, resistência à morte celular, imortalidade replicativa, indução da angiogênese e invasão e metástase (HANAHAHAN & WEINBERG, 2000; LEMMON & SCHLESSINGER, 2010). Recentemente, foram incluídos mais dois *hallmarks*, a reprogramação do metabolismo energético e a evasão da destruição pelo sistema imune (HANAHAHAN & WEINBERG, 2011).

Entretanto, a ideia de enumerar *hallmarks* é bastante limitada quando se trata de entender a biologia do câncer, visto que, o tumor propriamente dito é muito mais do que uma massa de células em constante crescimento. Muito embora as células neoplásicas cresçam em um ambiente constituído por células não transformadas, o estroma, essas células participam ativamente no processo de tumorigênese. Dessa forma, para compreender esses tecidos complexos de células distintas, é preciso conhecer o “microambiente tumoral” (BHOWMICK et al., 2004; CHENG et al., 2008; HANAHAHAN & WEINBERG, 2011).

Figura 01: Ilustração demonstrando as principais características do câncer. Hallmarks do câncer.

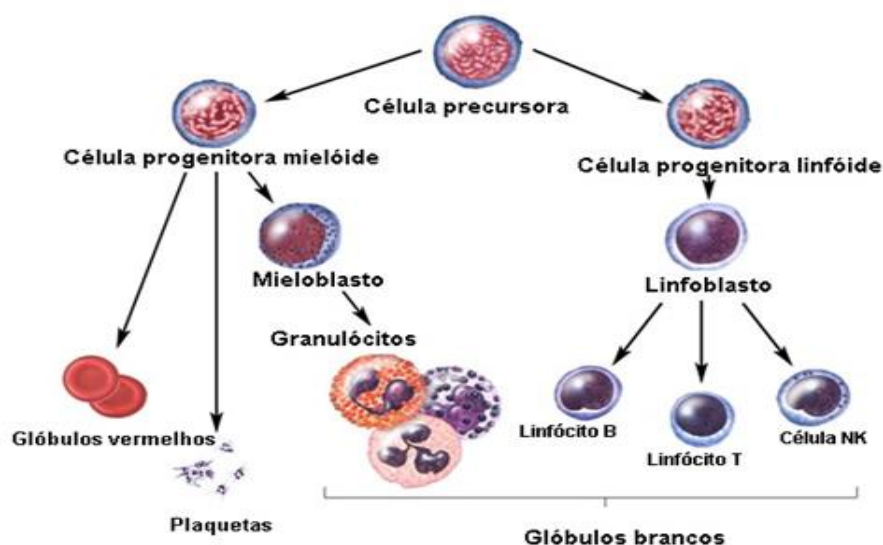


Fonte adaptada: Hanahan et. al., 2011.

2.2 Leucemias

Dentre os tipos de câncer mais incidentes encontram-se as leucemias. As Leucemias caracterizam-se por serem doenças proliferativas de curso progressivo em células progenitoras do tecido hematopoiético (Figura 2). Sua principal característica é o acúmulo de células anormais na medula óssea, que crescem à custa das células sanguíneas normais e acabam por substituí-las, levando à deficiência e finalmente à falência da medula. Estas células são quase sempre liberadas no sangue e infiltram órgãos como o baço, o timo desta liberação varia com o estágio da doença e com o tipo da leucemia (INCA, 2016). Depois de instalada, a doença progride rapidamente, exigindo que o tratamento seja iniciado imediatamente após o diagnóstico e a classificação da leucemia.

Figura 02. Esquema de maturação hematopoiética.



Fonte: Adaptado de <http://www.cancer.gov/images/cdr/live/CDR553603-750.jpg>.

A classificação das leucemias é feita levando em conta dois parâmetros: sua célula progenitora afetada, em mielóide e linfóide. E de acordo com a velocidade de divisão dessas células em leucemia crônica, quando essa divisão é mais lenta e as células envolvidas são mais parecidas com a célula normal. E leucemia aguda, quando de progressão rápida e afeta as células jovens ainda não completamente formadas (chamados blastos). Estas células não preservam suas funções e afetam de forma importante a capacidade de defesa do organismo (DEL VECHIO et al., 2004; ZAGO, 2013). As leucemias agudas são alvos de muitas pesquisas, pois apresentam uma taxa de sobrevivência reservada, pois sem tratamento, 95% dos pacientes portadores de leucemia aguda morrerão em até um ano após o diagnóstico (SILVEIRA & ARRAES, 2008).

O Instituto Nacional do Câncer (INCA) estima para esse ano um total de 10.070 novos casos, sendo 5.540 homens e 4.530 mulheres. O tratamento das leucemias é feito basicamente por quimioterapia. Vários esquemas podem ser utilizados, a escolha do protocolo a ser usado depende do tipo, diagnóstico, da idade e da estratificação de risco de cada paciente mais na maioria das vezes na prática clínica se faz associação de mais de um fármaco. (CAZÉ et al, 2010). Alguns impedimentos comuns causados durante os tratamentos utilizados atualmente culminam em profunda mielosupressão, má resposta terapêutica e desenvolvimento de resistência às drogas administradas (NARASIMHAN et al, 2015). Isso aponta a necessidade de novas estratégias terapêuticas para o tratamento dessas células que adquirem resistência.

2.3 Transportadores ABC

Os transportadores ABC (ATP-binding cassette), são uma superfamília de proteínas de membrana, presente em bactérias, fungos, plantas e animais responsáveis pelo transporte de moléculas através das membranas celulares, desde íons, a pequenas e grandes moléculas, como açúcares, lipídeos, aminoácidos, peptídeos, proteínas e antibióticos. Essas proteínas são importantíssimas para o crescimento das plantas, transporte de nutrientes, desintoxicação celular, homeostase lipídica, defesa antiviral transdução de sinal e apresentação de antígenos. Possuem grande importância clínica, pois garantem que fungos, bactérias e parasitas resistam ao tratamento com fármacos. Nas células tumorais esses transportadores são superexpressos e garantem que essas células resistam a diferentes quimioterapias (C.F. HIGGINS, 1992; V.G. LEWIS, et al. 2012).

De uma forma geral eles possuem uma arquitetura básica que compreende pelo menos dois domínios intracelulares de ligação a nucleotídeos, que fornecem energia via ligação e hidrólise de ATP e dois domínios transmembranares, que formam a via de permeação transmembrana (J. KANG, et al. 2010). Em bactérias e plantas eles atuam como importadores e exportadores, nos demais apenas como exportadores de moléculas. A variação da atividade dos transportadores ABC pode ocorrer devido a interações medicamentosas, polimorfismo genético ou superexpressão que por sua vez é principal causa de falha ao tratamento (KERB R, 2006).

Duas proteínas, P-gp (MDR-1, ABCB1) e MRP-1 (ABCC1) tornaram-se conhecidas por serem capazes de bombear uma ampla gama de fármacos de câncer mais vulgarmente utilizados e a sua superexpressão correlaciona-se amplamente com características de resposta negativa ao tratamento. (ROBERT O'CONNOR, 2007). A P-gp (MDR-1, ABCB1), foi inicialmente descrita em 1976 e caracterizada como uma bomba de efluxo, por ser capaz de remover uma grande quantidade de xenobióticos do interior da célula, essa bomba é capaz de transportar uma vasta seleção de fármacos, sua superexpressão, é relacionada a respostas negativas ao tratamento. De acordo com as interações, os agentes quimioterápicos podem ser classificados em três grupos principais: substrato, inibidores e moduladores (CHEN et al., 2012).

O transportador, MRP-1 (ABCC1) descrito em 1992 também como uma bomba de efluxo, também bombeia uma importante gama de quimioterápicos citotóxicos em células tumorais e pode conferir resistência a doxorrubicina, metotrexato, daunorrubicina, vincristina, etoposide e outros antineoplásicos, o MRP-1, também é conhecido na literatura por ser altamente expresso

em leucemias, carcinoma esofágico e câncer de pulmão de células não pequenas (HEGEDUS T, et al. 2002; TIWARI AK, et al. 2010).

2.4 Glicosilação e a N-glicosilação

Existem diversas formas de estruturas glicosiladas, entre estas, estão as glicoproteínas e os glicolipídeos. Essas estruturas desempenham papéis importantíssimos em diversos processos biológicos. Todas as etapas envolvidas na formação desses glicoconjugados ocorrem no retículo endoplasmático (RE) e no complexo de golgi. A síntese desses glicanos é resultado da ação de diversas enzimas responsáveis pelo seqüenciamento e conjugação dessas estruturas (WARMALD et al.1999; K. MUTA et al. 2013).

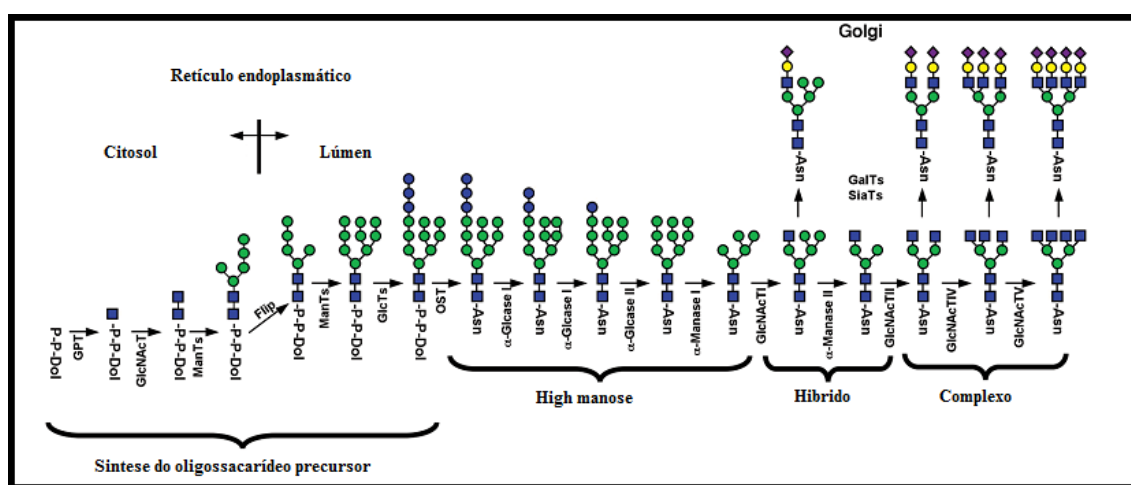
Em eucariotos, as proteínas glicosiladas desempenham funções específicas e essenciais nas células, essas funções estão envolvidas em uma grande gama de processos célula-célula e célula-matriz. A glicosilação ocorre em mais de 50% de todas as proteínas humanas, tanto para proteínas secretadas quanto da matriz extracelular. (NOTHAFT et al. 2012; DALZIEL M, et al. 2014). Dada sua importância no microambiente, algumas glicoformas também desempenham papéis cruciais, como o reconhecimento imune, ou em processos patológicos, como o desenvolvimento do câncer (NOTHAFT et al. 2012; DALZIEL M, et al. 2014).

De forma geral a glicosilação pode ser dividida em dois tipos, a O-glicosilação, quando o açúcar é ligado covalentemente à hidroxila da serina ou treonina e a N-glicosilação, na qual os N-glicanos são ligados covalentemente, pela oligosacariltransferase (OST) ao grupo amina da asparagina (JONES et al. 2005).

Na N-glicosilação ocorre à formação de um oligossacarídeo precursor, esse oligossacarídeo está ligado a um transportador lipídico, o dolicol. Esta é indicada como a primeira etapa da N-glicosilação e compreende a formação do núcleo de açúcar na porção citoplasmática do retículo endoplasmático (RE), a partir da adição da N-acetilglucosamina-P ao dolicol fosfato que está ancorado em sua membrana. (BROWN et al. 2007). Posteriormente são adicionados outros monossacarídeos a cadeia principal. Este núcleo de açúcar consiste em dois resíduos de N-acetilglicosamina e cinco manoses. Em seguida esta cadeia é translocada pela oligosacariltransferase (OST) para o lúmen do RE. Na sequência, esse núcleo de açúcar é ativado através da adição de quatro resíduos de manose e três resíduos de glicose, por fim esta cadeia é translocada pela oligosacariltransferase (OST) para a porção N-terminal de um resíduo de asparagina da proteína alvo. Asn-x-(Ser/Thr), onde X pode ser qualquer aminoácido com

exceção da prolina (JONES et al. 2005). À medida que a proteína é enovelada ocorrem ações de α -manosíases e α -glicosíases, a fim de remover seus respectivos açúcares. Todo este processo chega ao fim quando o dolicol pirofosfato é hidrolisado para dolicol fosfato, permitindo assim que a proteína cumpra sua função dentro ou fora da célula e ocorra a adição de novos monômeros de açúcar ao dolicol fosfato (Figura 3) (VARKI et al. 2009). O processo de N-glicosilação é essencial na mediação da adesão celular, migração, proliferação, sobrevivência e diferenciação (SCHWARZ e AEBI, 2011).

Figura 03: Esquema demonstrando a biossíntese do oligossacarídeo precursor e seus três principais núcleos de formação dos N-glicanos



Entretanto, nem sempre esse processo ocorre de forma perfeita e uma sequência de erros na produção de proteínas, especialmente as glicosiladas, pode produzir acúmulo destas e por sua vez produzir o que é conhecido como estresse de retículo endoplasmático (MANDIC, A. et al. 2003).

2.5 Inibidores de N-glicosilação

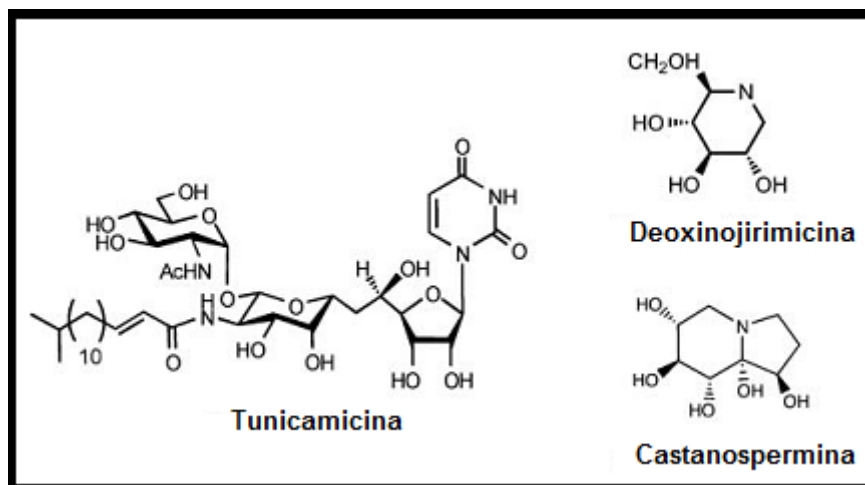
Existe um grande número de inibidores de N-glicosilação descritos na literatura. Estes podem ser separados em três classes principais de acordo com seu mecanismo e local de ação: os açúcares modificados, os antibióticos e os inibidores de processamento. A grande maioria atua nas etapas iniciais da biossíntese dos N-glicanos (BROWN et al., 2007; AEBI et al. 2009).

Os inibidores monossacarídeos (2-deoxy-glicose, 4-fluoro-Man e 2-fluoro-Glc, 4-fluoro-Glc, 2-fluoro-Man) são análogos estruturais dos monossacarídeos que existem naturalmente. Quando adicionado a cadeia glicídica, o processamento das cadeias é

comprometido. Sua utilização é limitada por causa da sua baixa especificidade (BROWN JR. et al. 2007).

Além destes, existem diversos antibióticos que inibem a biossíntese do oligossacarídeo ligado ao dolicol fosfato. Entre eles estão a tunicamicina, que atua em três etapas do processo de *N*-glicosilação. Inicialmente inibe de forma forte e competitiva a ação da enzima fosfotransferase, bloqueando a transferência de *N*-acetilglicosamina-1-fosfato (GlcN-Ac-P) da uridina difosfato-*N*-acetilglucosamina ao dolicol fosfato. Esse fato ocorre devido à sua semelhança ao açúcar doador de nucleotídeos. Outros antibióticos que atuam no mesmo sítio de ação incluem a Amfomicina, Showdomicina e Diumicina (Figura 3) (KEAN & WEI, 1998; BREIER et al., 2013).

Figura 04: Estruturas moleculares da tunicamicina, Deoxinojirimicina e da Castanospermina.



A tunicamicina também atua na etapa de incorporação do *N*-glicano recém-formado a asparagina das proteínas alvo. Nessa etapa do processo de *N*-glicosilação, ela bloqueia a ação da enzima oligosacariltransferase (Andresen et al. 2012). Ademais, a tunicamicina impede que a enzima GlcNAc-1-fosfato-transferase adicione resíduos terminais de glicose à glicoproteína recém-formada (KRAMER et al., 1995; PRICE & TSVETANOVA, 2007).

O terceiro grupo de inibidores de *N*-glicosilação são os inibidores de enzimas de processamento, como as α -glicosidases I e II e as α -manosidases I e II. Vários alcalóides de plantas exercem essa função; estes possuem anéis poli-hidroxilados comuns que mimetizam a orientação dos grupos hidroxilas dos substratos naturais (ASANO et al., 2000; WOJTOWICZ et al., 2012). A Castanospermina e a Deoximannojirimicina são exemplos de inibidores dessas enzimas (BROWN et al., 2007).

2.6 A Tunicamicina e o Miglustato

A tunicamicina é um antibiótico comercial que inibe a enzima oligosacariltransferase e impede a formação de proteínas *N*-ligadas. Além de causar estresse de retículo endoplasmático, a inibição da *N*-glicosilação também impede a ativação de tirosinas cinases do receptor de superfície celular (SCHOONTHAL, 2013). Segundo estudo feito por Contessa e colaboradores em 2010, tumores humanos xenoenxertados em camundongos tratados com tunicamicina tiveram baixa expressão de EGFR, o que resultou na redução do crescimento tumoral.

O efeito citotóxico da tunicamicina se refere principalmente à sua capacidade em induzir apoptose nas células neoplásicas (MOLINARI et al., 2002; VARKI et al., 2009; QUIRINO, 2014) e baseando-se principalmente na apoptose induzida por estresse de RE, com liberação prévia do citocromo *c* pela mitocôndria e ativação das caspases (URRA et al., 2013).

Hiss e colaboradores (2007) mostraram que a tunicamicina aumenta a toxicidade de fármacos anticâncer em células de cistoadenocarcinoma multirresistente de ovário humano, reduzindo significativamente o IC50 para doxorrubicina e vincristina. A tunicamicina também reduziu o IC50 da cisplatina em células de carcinoma de cabeça e pescoço humanos *in vitro* e em um modelo murino resistente à cisplatina (NODA et al. 1999).

Os efeitos induzidos pela tunicamicina sobre drogas associadas podem ser dependentes do tipo celular e dos diferentes transportadores de efluxo de drogas (BERETTA et al., 2010).

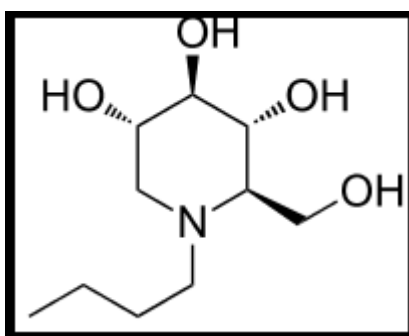
Diversos estudos realizados *in vitro* e *in vivo* relatam as propriedades quimiossensibilizantes promissoras da tunicamicina. Entretanto, são necessários mais estudos de caracterização sobre o potencial anticancerígeno da tunicamicina, visto que *in vivo* este antibiótico pode causar elevada toxicidade sistêmica (LEE et al., 2012; HOU et al., 2013).

Apesar disso, um estudo mostrou que a tunicamicina causou estresse de RE na vasculatura do tumor, sem causar insuficiência sistêmica ou dos órgãos, em um modelo de xenoenxerto de câncer de mama em camundongos (BANERJEE et al., 2001).

O Miglustato (*N*-butil-Deoxinojirimicina) é um iminoaçúcar de primeira geração (Figura 5), que inibe uma série de enzimas envolvidas no metabolismo de glicoconjugado e glicano (SULTANA et al., 2015). Inicialmente este foi testado em humanos como agente anti-viral em pacientes com HIV, entretanto não foi encontrado efeito terapêutico e produziu graves efeitos gastrointestinais (BROWN et al., 2007). Atualmente é comercializado para o tratamento da doença de Goucher tipo I e doença de Niemann-Pick tipo C. Os imonoaçúcares são alcalóides

poliidroxilados que mimetizam a estrutura de monossacarídeos, são empregados como inibidores de enzimas de glicoprocessamento, e atuam também no tratamento de diabetes e infecções virais (AFARINKIA & BAHAR 2005).

Figura 05: Estrutura da N-butil-Deoxinojirimicina (Miglustate).



Sua ação está relacionada com a inibição de uma glicosil transferase, a glicosilceramida sintase, cuja função é adicionar glicose a ceramida e formar glicolipídeos. O miglustato também inibe a ação das α -glicosidases I e II (RUDD et al., 1993). Os iminoaçúcares são conhecidos por inibirem ambas as enzimas (ZOU W.,2005).

Um estudo feito por Guerrero e Landish em 2003 mostra que o miglustato reduziu o crescimento de tumores cerebrais em camundongos.

2.7 Estresse de retículo endoplasmático

Em geral todas as células são capazes de responder de forma eficiente ao estresse de retículo endoplasmático. Entretanto, o estresse crônico gerado por uma diversidade de fatores por muitas vezes conduz a célula à apoptose (MORI, 2000; TABAS et al., 2011).

Alterações em vias essenciais para homeostasia celular, tais como, estresse oxidativo, alterações nos níveis de cálcio, aumento na síntese protéica e aumento na síntese de proteínas malformadas perturbam a função e contribuem para o desenvolvimento do estresse de retículo endoplasmático (YOSHIDA, 2007; RON et al., 2007). Todos estes fatores induzem ao comprometimento na capacidade de enovelamento de proteínas pelo RE, levando ao acúmulo de proteínas mal enoveladas e prejudicando seu transporte para o complexo de Golgi (SANDRA et al., 2009).

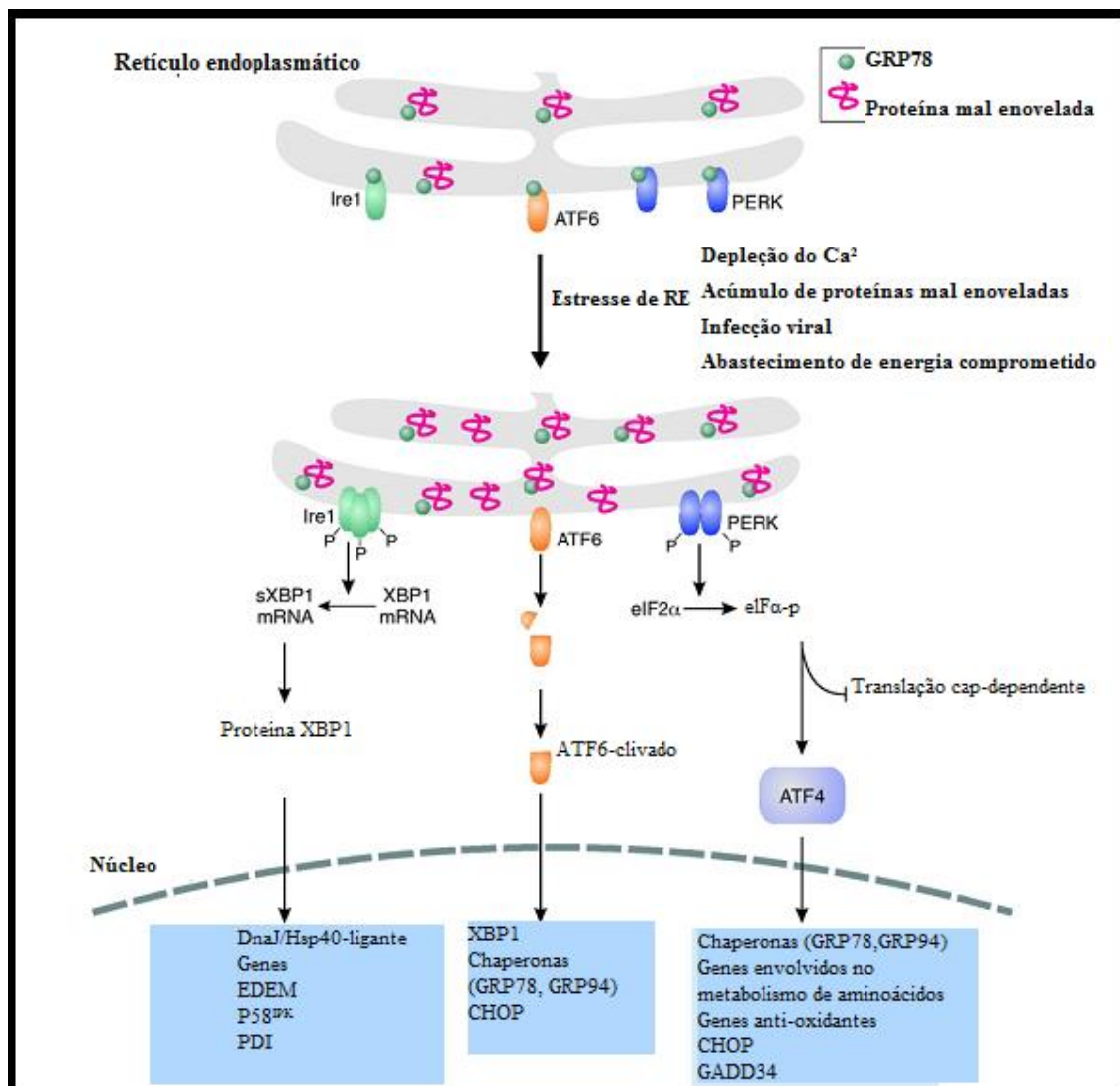
O RE possui uma grande concentração de uma classe de proteínas denominadas de chaperonas, que atuam facilitando o enovelamento correto das proteínas. Muitas destas chaperonas são Ca^{2+} dependentes (BOYCE & YUAN, 2006).

O aumento da expressão de chaperonas no RE tem sido associado à resistência aos agentes quimioterápicos (REDDY et al. 2003). Assim as células tumorais apresentam baixo nível de estresse de RE, pois possuem uma proteção expressiva através da resposta à proteína malformada (UPR), que por sua vez representa papel fundamental na tumorigênese (So et al., 2009). Entre essas chaperonas está o GRP78, proteína reguladora de glicose de 78 kDa (Ron et al., 2007).

Nos eucariotos multicelulares, existem três proteínas responsáveis em detectar o estresse de RE: IREI1 (enzima que requer inositol 1), ATF6 (Fator de transcrição 6) e PERK (Cinase do RE pancreático). Em condições normais, o GRP78/Bip está ligado a IREI1, ATF6 e PERK, impedindo a translocação destas proteínas de membrana do RE para o citoplasma (Lee, 2002). Após o estresse de RE, o acúmulo de proteínas deformadas sequestra o Bip, dissociando-o das proteínas de resposta ao estresse. Então ocorre a ativação de ATF-6 e IREI1, que inicia a transcrição de genes através da ativação de XBP1 (Proteína 1 ligante do domínio X). Por fim, PERK se autofosforila e fosforila eIF α , e induz a tradução de ATF4 (Fator de ativação de transcrição 4). Essa via regula a expressão de genes de resposta ao estresse anti-oxidativo e a expressão de genes que codificam proteínas com funções pró-apoptóticas. Todos esses fatores desencadeiam na expressão de uma variedade de genes relacionados com a resposta ao estresse (MALHOTRA & KAUFMAN, 2007; SHONTHAL, 2013).

Quando estas são ativadas é dado início a uma cascata de sinalização, que tem por função corrigir o distúrbio causador do estresse (RON et al., 2007). Toda essa resposta bioquímica representa sinais referidos como “estresse de retículo endoplasmático” ou resposta à proteína malformada (UPR), que por sua vez representa um risco às células vivas (Figura 4) (LEE, 2002; KADOWAKI et al., 2004).

Figura 06: Esquema representativo da resposta a proteínas mal formadas (UPR) e os seus três sensores, PERK, IRE1 e ATF6.



Com a resposta ao estresse, a célula encerra a síntese de proteínas e inicia aparatos de adaptação ao acúmulo de proteínas. Esta aumenta a capacidade de enovelamento através da expressão de proteínas chaperonas e induz a degradação de proteínas mal formadas (RUTKOWSKI & KAUFMAN, 2004). Através de um processo denominado de “Degradação Assistida pelo RE” (ERAD), as proteínas deformadas são translocadas do lúmen de RE para serem degradadas no citosol, onde são ubiquitinadas e degradadas por proteossomas, evitando assim o acúmulo excessivo. Porém, uma via secundária também pode ser ativada, a autofagia, que funciona como uma resposta secundária ao estresse na tentativa de aliviar a célula do perigo iminente da apoptose, causado pelo acúmulo de proteínas deformadas que excedem a capacidade do RE (BERNALES et al., 2006).

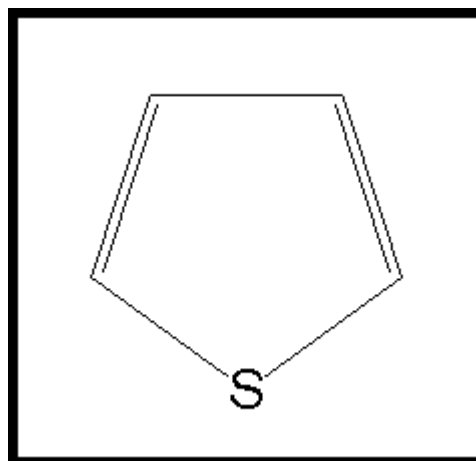
A autofagia consiste em um processo onde macromoléculas celulares e componentes de organelas que são sequestrados para vesículas, que são entregues aos lisossomos para serem degradados e/ou reciclados como substratos bioenergéticos (MIZUSHIMA et al., 2011).

Além das condições normais que podem levar ao estresse de RE, existem as formas induzidas, podendo ser provocadas por compostos de ocorrência natural ou sintéticos. Esses compostos têm sido amplamente estudados e desenvolvidos desde a última década, especialmente porque as células normais não possuem um sistema de defesa de estresse de RE tão cronicamente ativo como nas células tumorais, o que representa um importante alvo terapêutico (HEALY et al., 2009; SCHONTHAL, 2013).

2.8 O tiofeno e seus derivados

O tiofeno é um anel heterocíclico e aromático que possui o enxofre como heteroátomo (Figura 6). Este anel participa da composição natural do carvão, é um metabólito secundário de algumas plantas da família Asteracea e é também metabólito de alguns fungos (MARGL et. al., 2002; CRNKOVIC, 2004).

Figura 07: Estrutura do tiofeno.



Fonte: Próprio autor.

Existem alguns fármacos comerciais que possuem esse anel na sua estrutura, como é o caso do anti-hipertensivo Eprosartan. Entre as principais atividades farmacológicas dos derivados tiofênicos é possível citar ações anti-hipertensivas, antidepressiva, antifúngica, antiparasitária (MELO et al., 2006). Os compostos heterocíclicos apresentam grande importância na medicina e nos sistemas biológicos (SAKER & NAHAR, 2009).

Em vista disso, muitos derivados tiofênicos têm sido constituídos e empregados como agentes antitumorais (OLIVEIRA., 2010; KOJIMA et al., 2015).

Um estudo realizado por Dallemagne e colaboradores (2003) com 22 derivados tiofênicos em 60 linhagens tumorais, sete destes apresentaram efeitos citotóxicos, principalmente nas linhagens de leucemia. Romagnoli e colaboradores em 2010 realizaram um estudo semelhante, também com derivados tiofênicos, e observaram que o composto 2-(3',4',5'-trimetoxibenzoil)-3-(4'-etoxifenil)-benzo[*b*]tiofeno apresentou potente atividade antiproliferativa e apoptótica em quatro linhagens (Jurkat, HeLa, K562 e HL-60).

3 OBJETIVOS

3.1 Objetivos Gerais

Desenvolver novas abordagens terapêuticas para o tratamento de células leucêmicas resistentes ao tratamento com inibidores de topoisomerases.

3.2 Objetivos Específicos

- Avaliar a citostaticidade e citotoxicidade de novos derivados benzotiofênicos frente à linhagem resistente HL60-MX1, bem como sua seletividade frente a células normais;
- Determinar a dose sensibilizante ideal dos inibidores de N-glicosilação frente à linhagem HL60-MX1 resistente a inibidores de topoisomerase;
- Caracterizar a atividade dos transportadores ABCB1 e ABCC1 nas linhagens HL60 e MX1;
- Avaliar o efeito da inibição dos transportadores ABCB1 e ABCC1 sobre a atividade dos derivados tiofênicos nas linhagens HL-60 e HL-60/MX1.

4 MATERIAIS E MÉTODOS

4.1 Cultura de células

Foram utilizadas as linhagens HL-60 (Leucemia aguda) e HL-60/MX1 (Leucemia aguda resistente a mitoxantrona) obtidas da *American Type Cell Culture* (ATCC®, USA). As células foram cultivadas em meio RPMI-1640 (Gibco®) contendo 10 % Soro Fetal Bovino (Gibco®) inativado a 56°C por 1h, adicionou-se também 3g/litro de Bicarbonato de Sódio (Sigma-Aldrich®) e 1% de Penicilina/Estreptomicina (Gibco®). Para manutenção do meio as células foram centrifugadas por 7 minutos a 1500 rpm e distribuídas em concentração média de 1.10^4 células/ml em garrafas contendo meio novo.

4.2 Derivados tiofênicos e agentes sensibilizantes

Os derivados tiofênicos foram sintetizados e fornecidos pelo Laboratório de Planejamento e Síntese de Fármacos (LPSF/UFPE) (Tabela 2). Todos os compostos foram caracterizados e tiveram suas estruturas confirmadas por RMN ^1H e ^{13}C (MENDONÇA-JUNIOR et al, 2011). Os agentes sensibilizantes, Tunicamicina e Miglustat foram obtidos da Sigma-Aldrich® (USA).

Tabela 2: Identificação e estrutura química dos novos derivados tiofênicos.

Composto	n	R	R'
SB-68	3		-
SB-30	1		H
SB-44	3		H
SB-83	2		5-Bromine
SB-200	3		5-Bromine

4.3 Testes de Citotoxicidade

Para avaliar a citotoxicidade, foi utilizado o método de redução do MTT, que consiste em uma análise colorimétrica baseada na conversão do sal 3-(4,5-dimetil-2-tiazol)-2,5-difenil-2-H-brometo de tetrazolium (MTT) em azul de formazan, a partir de enzimas mitocondriais presentes somente nas células metabolicamente ativas. As células foram plaqueadas na concentração de 1.10^4 células/100 μ l e incubadas por 24 horas, em seguida foram adicionados os compostos a serem testados.

Os compostos LPSF/SB-30, SB-44, SB-68, SB-83 e SB-200, bem como os inibidores de N-glicosilação (Tunicamicina e Miglustat) foram diluídos em concentrações que variaram de 10 η M a 100 μ M, a fim de estabelecer o IC₅₀ e a concentração sensibilizante dos inibidores. Foi utilizado DMSO (0,1 e 0,2 %) como controle veículo e poços contendo apenas células controle negativo. Após a adição dos compostos, as placas foram incubadas por 72 horas em estufa a 5% de CO₂ e a 37°C. Ao término deste período, foram adicionados 20 μ L de MTT e as placas foram novamente incubadas. Ao fim de três horas, foi aplicado 130 μ L de SDS a 20%, cuja função é solubilizar os cristais que foram formados pelas células viáveis. A absorbância foi lida após o período de 24 horas no espectrofotômetro de placa ELx808 Microplate Reader (Biotek®, EUA) a 570 nm. A viabilidade foi calculada através da razão da absorbância dos compostos pela absorbância do DMSO com o objetivo excluir a atividade citotóxica do solvente nos poços que tiveram adição dos compostos.

4.4 Ensaios de sensibilidade

Para avaliar a seletividade dos compostos foram realizados ensaios de redução do MTT junto a células mononucleares de sangue periférico (PBMCs). Essas células foram obtidas de pessoas não fumantes, saudáveis, livres de uso de medicamentos e todos assinaram um termo de consentimento livre e esclarecido (TCLE). Este estudo foi aprovado pelo comitê de ética da UFPE (CEP-CCS 528/11).

Após a obtenção do IC₅₀, decidiu-se avaliar o Índice de Seletividade. Este índice indica a seletividade de um composto entre uma linhagem normal e uma neoplásica, o que por sua vez permite discernir sobre seu uso potencial em testes clínicos. Esse índice corresponde à razão entre IC₅₀ de cada composto em uma linhagem de células normais e em uma linhagem neoplásica, ($IS = IC_{50} \text{ cél. normais} / IC_{50} \text{ cél. neoplásicas}$). O resultado dessa divisão indica quantas vezes esse composto é mais ativo na linhagem tumoral do que na linhagem normal. O

índice de seletividade é considerado bom quando são obtidos valores acima de três (BÉZIVIN, 2003).

Para determinação da concentração de composto necessária para 50% de inibição *in vitro* (IC₅₀) foram realizados três ensaios independentes de redução do MTT. O IC₅₀ de cada ensaio foi calculado com o auxílio do OriginPro 8 (Originlab Corporation®, EUA).

4.5 Avaliação do ciclo celular

O iodeto de propídio (PI) se incorpora estequiometricamente ao DNA, permitindo a quantificação relativa do conteúdo de DNA de uma população de células. Deste modo, os processos de morte e ciclo celular foram avaliados pela incorporação de iodeto de propídio (PI) ao DNA. Para tal, aproximadamente, 5×10^5 células foram semeadas em placas de seis poços. Após 24 h foram adicionados os compostos LPSF/SB-44, 83 e 200 nas concentrações de seus respectivos IC₅₀. Ao final de 48h, as células foram lavadas com PBS 1x gelado, fixadas em etanol 70% e mantidas em freezer -30°C por no mínimo 2h ou no máximo 20 dias. Células sem tratamento e tratadas com amsacrina foram utilizadas como controle negativo e positivo, respectivamente. As amostras com etanol 70% foram centrifugadas (2800 RPM durante 5 minutos). Em seguida, foram lavadas com PBS 1x gelado e centrifugadas novamente. Por fim, as amostras foram incubadas com solução PI (5 mg/mL)/RNAse (100 mg/mL) por 30 minutos na ausência de luz. Após o período de incubação, as amostras foram admitidas no aparelho de citometria de fluxo BD Accuriä C6 flow cytometry (BD Biociences®, EUA) e avaliadas no software BD CSampler (BD Biociences®, EUA).

4.6 Avaliação de morte celular pela clivagem das caspases 3/7

As células HL-60/MX1 foram semeadas em placas de 6 poços na concentração de 5×10^5 por poço e incubadas à 37 °C sob atmosfera úmida contendo 5% de CO₂ por 24 horas. Em seguida, as células foram tratadas na concentração do IC₅₀ com os compostos LPSF/SB-83, 44 and 200. Após 48 horas, as células foram lavadas com PBS, centrifugadas a 1500 rpm por 7 min e ressuspensas em meio completo. Posteriormente foram marcadas com o reagente Cell Event® Caspase 3/7 Green por 30 minutos e incubadas à 37 °C a 5% de CO₂. Em seguida, as células foram marcadas com SYTOX® AADvanced durante 5 minutos para marcar as células necróticas. As amostras foram admitidas citômetro ATTUNE (Applied Biosystems®, EUA) e os resultados foram analisados utilizando o software Flowjo Single Cell Analysis®.

4.7 Caracterização da atividade dos transportadores ABCB1 e ABCC1

A atividade relacionada aos transportadores ABCB1 e ABCC1 foi investigada nas linhagens de células tumorais sensíveis ao tratamento (HL60) e resistentes (MX1). Para estes ensaios as células foram suspensas na concentração de 2×10^5 cels /mL em meio RPMI sob temperatura ambiente, e, submetidas ao ensaio de efluxo com o substrato fluorescente rodamina 123 (Sigma, St. Louis, EUA).

As células em placa de cultura estéril foram incubadas com rodamina 123 por 30 minutos (ABCC1) ou 10 minutos (ABCB1) na presença ou ausência de inibidor específico de ABCC1 (10 μ M - MK571, Sigma, St. Louis) ou de ABCB1 (10 μ M – Reversin 205, Sigma, St. Louis) ao abrigo da luz.

O acúmulo intracelular de rodamina 123 é inversamente proporcional à atividade de transportadores ABC, os quais atuam como bombas de efluxo celular. Por conseguinte, a elevação da intensidade de fluorescência registrada na presença do inibidor específico de proteína ABC indica a perda da atividade de efluxo da proteína modulada. Desta forma, a atividade destes transportadores foi mensurada através da proporção obtida entre a média da intensidade de fluorescência da amostra contendo rodamina 123 na presença do inibidor específico de proteína ABC sobre a média da intensidade de fluorescência da amostra que contém apenas rodamina 123 (HUET et al 1998; SILVA et al, 2003; DAFLON-YUNES et al, 2013).

As intensidades de fluorescência das amostras foram adquiridas por citometria de fluxo com o citômetro *BD Accuri® C6 – BD Bioscience* e analisadas com *BD Accuri C6 software*. As células foram analisadas a partir de dispersão frontal (FSC) e dispersão lateral em *gate* dirigido para a população alvo. Adicionalmente, a viabilidade celular foi confirmada através de marcação com PI.

4.8 Envolvimento dos transportadores ABC no efeito das drogas investigadas

Para a investigação acerca do envolvimento dos transportadores ABC no efeito das drogas estudadas, as células foram submetidas a condições de cultivo na presença ou ausência de inibidores dos transportadores ABC (os quais foram adicionados 30 minutos antes da adição das demais drogas avaliadas).

As células previamente incubadas ou não com os inibidores de transportadores ABC (reversina 205, bloqueador de ABCB1 ou MK571, bloqueador de ABCC1, ambos na concentração de 10 μ M) foram adicionalmente tratadas com tunicamicina, etoposídeo,

amsacrina, SB44, SB83 ou SB200, nas concentrações ótimas estabelecidas em ensaios prévios. Seguidas 24 horas de incubação, as células foram submetidas à marcação com PI para a avaliação do ciclo celular, conforme descrito anteriormente.

4.9 Ensaio de inibição de topoisomerase II

A fim de se avaliar a capacidade dos LPSF/SB-83 e SB-200 de inibir a atividade catalítica das topoisomerasas II, foi utilizado o kit de inibição de topoisomerase II (TopoGEN®, EUA) e os ensaios foram realizados segundo as recomendações do fabricante. Foram utilizados 125 ng de DNA plasmidial super helicoidizado, incubados junto a 5 unidades de topoisomerase II humana recombinante (TopoGEN®, EUA) na presença e ausência dos compostos (50 e 100 μ M). DMSO (0,2%) foi utilizado como controle veículo e 50 μ M de etoposídeo como controle positivo. As reações foram incubadas em banho maria por 30 minutos e, em seguida, terminadas pela adição de SDS a 1%. Foi adicionado 50 μ g/mL de proteinase K por 30 minutos a 37°C e o DNA super helicoidizado, assim como os seus topoisômeros, foram extraídos com clorofórmio:álcool isoamílico (24:1).

Uma vez extraído, o DNA foi submetido a uma eletroforese em gel de agarose a 1%, realizada na ausência de brometo de etídeo. As cubas eletroforéticas foram submetidas a 2 volt/cm por aproximadamente 50 minutos, utilizando Tris acetato de EDTA (TAE) como tampão de corrida. Ao final, os géis foram corados com 0,5 μ g/mL de brometo de etídeo durante 15 minutos, descorados por 15 minutos em água e visualizados sob luz UV no AlphaImager® MINI system. Os experimentos foram realizados em duplicata e uma análise quantitativa das bandas de DNA foi realizada com auxílio do ImageJ® software 1.49.

5 RESULTADOS

Artigo 1 –

HYBRID INDOLE-THIOPHENE DERIVATIVES AS A THERAPEUTIC STRATEGY IN RESISTANT ACUTE LEUKEMIA CELLS

**Michael Williams Leal Quirino¹, Lidiane Vasconcelos do Nascimento Carvalho¹,
Flaviana Alves dos Santos¹, Wanessa Layssa Batista de Sena¹, Thuanny Maryna dos
Santos¹, Helena Lima da Silva Neta¹, Tiago Bento de Oliveira¹, Ivan da Rocha Pitta¹,
Maria do Carmo Alves de Lima¹, Maira Galdino da Rocha Pitta¹, Francisco Jaime
Bezerra Mendonça Junior², Moacyr Jesus Barreto de Melo Rêgo¹**

¹*Federal University of Pernambuco. Research Group in Therapeutic Innovation, 50670-910, Recife, PE, Brazil;*

²*State University of Paraíba, Biological Sciences Department, Laboratory of Synthesis and Vectorization of Molecules, 58071-160, João Pessoa, PB, Brazil;*

Corresponding author:

Moacyr Jesus Barreto de Melo Rêgo

Rua Tereza Mélia, s/n, Cidade Universitária, UFPE Cidade Universitária/50670-901. Recife, PE- Brazil.

Email: moacyr.rego@gmail.com

ABSTRACT

Acute leukemias are diseases described as disorders of hematopoietic stem cells, with the accumulation of immature cells. Despite advances in treatment, it is necessary to search novel therapeutic strategies due to its mortality rate. Thus, the present study aimed to evaluate the antitumor activity of five thiophene derivatives (SB-68, SB-30, SB-44, SB-83 and SB-200). Cytotoxicity assays were performed in Peripheral Blood Mononuclear Cells (PBMC) and resistant acute leukemia cell line (HL-60/MX1) by MTT method. Changes in cell cycle progression, caspase -3 and -7 activity and ABC transporters activity were assessed by flow cytometry. Moreover, topoisomerase II activity assays were performed. SB-83, SB-200 and SB-44 exhibited great cytotoxicity in HL-60/MX-1 cell line (IC_{50} = 7.94, 9.36 and 14.48 μ M, respectively). SB-83 and SB-200 presented selectivity index higher than 3, showing its

selectivity potential. Treatment with these derivatives had no effects in cell cycle progression and caspase 3 and 7 activity, indicating that other cell death mechanisms are activated by SBs in HL-60/MX1 cells. ABCC1 transporter is activated only in resistant cell line HL-60/MX1, but its activation is not capable to affect SB-200 and SB-83 cytotoxic effects in this cell line. Topoisomerase II activity was inhibited after treatment with SB-83 (50 and 100 μ M) and SB-200 (100 μ M). Taken together, results suggest the potential of SB-83 and SB-200 for resistant acute leukemia therapy.

Keywords: cancer; therapeutic innovation; cytotoxicity; topoisomerase II inhibition

1 Introduction

Acute leukemias are disorders of hematopoietic stem cells, characterized by the accumulation of immature cells called blasts (Passequé et al., 2003; Narasimhan et al., 2015). In 2016, 26,540 new cases of acute leukemia are expected to occur only in the United States (Siegel et al., 2016). Despite advances in treatment over the past few years, half of the young adults and approximately 90% of older patients with acute leukemia still die of their disease (Bodet-Milin et al., 2016).

Cellular drug resistance remains a major concern in cancer therapy and it is also associated to acute leukemia treatments (Ma et al., 2016). Chemotherapy resistance usually results from increased expression of ATP-binding cassette (ABC) drug transporters (Gromicho et al., 2016). Overexpression of these transporters is associated with treatment response in acute leukemia patients, with lower relapse-free survival and poor outcome (Bartholomae et al., 2016). Thus, it is necessary to search more effective therapeutic approaches.

2-Amino-thiophenes (2-AT) are a versatile class of sulfur-containing heterocyclic compounds in which a simple molecular framework is able to provide ligands for diverse receptors (Gramec et al., 2014). Several reports confirm that small substitutions in the thiophene core afford compounds with different biological and pharmacological properties, including anti-nociceptive (Oliveira et al., 2009), anticonvulsant (Kulandasamy et al., 2009), adenosine A1 receptor allosteric enhancers (Aurelio et al., 2009) and anxiolytic activity (Fortes et al., 2013). These structures also exhibit promising activity against microorganisms, with antibacterial (Bondok et al., 2010), antifungal (Scotti et al., 2012), and antiprotozoal (Gerpe et al., 2009; Takahashi et al., 2011) properties.

Among the compounds that have been recently identified as potential antitumor agents, 2-amino-thiophene derivatives are particularly interesting (El-Sharkawy et al., 2012; Meyer et al., 2005). Romagnoli and collaborators publish studies with 2-AT active compounds at submicromolar and/or nanomolar concentrations: inhibitors of tubulin polymerization and their effects on cell cycle (Romagnoli et al., 2010; Romagnoli et al., 2014) and with cytostatic activity in several T-cell lymphoma, prostate cancer, kidney carcinoma and hepatoma cell lines (Balzarini et al., 2014).

In a study made by our group, it was observed a potent antitumor activity *in vitro* of 2-AT against different cancer cell lines (HT29, NCI H-292 and HEP). The compound 2-[(1*H*-indol-2-yl-methylidene)amino]-5,6,7,8-tetrahydro-4*H*-cyclohepta[*b*]thiophene-3-carbonitrile (SB-44) was the most active compound, inhibiting more than 97% of growth of three cancer cell lines evaluated (Souza et al., 2012).

Here, we described the antitumor activity in resistant acute leukemia cells of five 2-Amino-thiophene (2-AT) derivatives: quinolin-8-yl-methylidene)-amino]-5,6,7,8-tetrahydro-4*H*-cyclohepta [b]tiofen-3-carbonitrile (SB-68), 2-[(1*H*-indol-2-ylmethylene)-amino]-5,6-dihydro-cyclopenta[*b*]thiophene-3-carbonitrile (SB-30), (1*H*-Indol-3-ylmethylene)-(5-6,7,8-4*H*-cyclohepta[*b*]tiofen-2-yl)-amine (SB-44), 2-[(5-bromo-1*H*-indol-2-ylmethylene)-amino]-4,5,6,7-tetrahydro-benzo[*b*]thiophene-3-carbonitrile (SB-83) and 5-Bromo-1*H*-Indol-3-ylmethylene)-(5,6,7,8-tetrahydro-4*H*-cyclohepta[*b*]tiofen-2-yl)-amine (SB-200). Cytotoxic effects were screened *in vitro* in resistant leukemia cells and also in human peripheral blood mononuclear cells. Caspases-3 and -7 activity, cell cycle progression and ABC transporters assays were evaluated by flow cytometry and topoisomerase II inhibition assays were performed in order to elucidate the mechanism of action by which 2-AT derivatives induces cell death.

2 Experimental

2.1 Chemistry. 2-Amino-thiophene derivatives (SB-30, SB-44, SB-68, SB-83 and SB-200) were synthesized in Laboratory of Synthesis and Vectorization of Molecules (UFPB), as previously described in Mendonça-Junior and collaborators (2011). Scheme 1 shows the chemical structure of compounds. The structures were confirmed by ¹H and ¹³C NMR. The compound was initially dissolved in dimethyl sulfoxide (DMSO) (Sigma-Aldrich®, USA).

2.2 Cell culture conditions. HL-60 (acute leukemia) and HL-60/MX1 (acute leukemia mitoxantrone resistant) were obtained from American Type Cell Culture (ATCC®, USA). Cells

were cultured in RPMI-1640 medium (Gibco®, UK) supplemented with 10% fetal bovine serum (Gibco®, UK), 10 mM HEPES (Gibco®, UK), 200 U/mL streptomycin and penicillin (Gibco®, UK) and incubated in a humid atmosphere of 5% CO₂ at 37°C.

2.3 Cytotoxicity assay. HL-60/MX1 cells were plated at a density of 1×10^4 cells (100 μ L)/well in 96-well plates. After 24 hours, cells were treated with the compounds SB-30, SB-44, SB-68, SB-83 and SB-200 at different concentrations (10 μ M to 100 μ M) for 72 hours at 37°C with 5% CO₂. Amsacrine (Sigma-Aldrich®, USA) was used as a positive control. Control groups received the same amount of DMSO (0,1%). At the end of 72 h of incubation 20 μ L of (3-(4,5-dimethylthiazol-2-)-2,5-diphenyltetrazolium bromide (MTT) at 5 mg/mL were added in each well and, three hours later, 130 μ L of 20% SDS. The absorbance was measured 24 hours later using ELx808 Microplate Reader (Biotek®, USA) at a wavelength of 570 nm. Experiments were performed three independent times in triplicate.

2.4 Selectivity assay. Peripheral blood mononuclear cells (PBMC) were obtained from whole heparinized blood of healthy non-smoking donors (n=3). All volunteers signed a consent form and the study was approved by Human Research Ethics Committee from Federal University of Pernambuco (CEP-CCS 528/11). Cells isolation was made using a density-gradient centrifugation method over Ficoll-Paque PLUS (GE Healthcare®, UK). PBMCs were counted in a Neubauer chamber, and viability was determined by the trypan blue exclusion method. Cells were only used when viability was >98%. At the end of the process, cell pellet was resuspended in RPMI-1640 medium supplemented with 10% fetal bovine serum (Gibco®, UK), 10 mM HEPES (Gibco®, UK) and 200 U/mL streptomycin and penicillin (Gibco®, UK). Cells were seeded in 96-well plates (5×10^5 cells per well) and treated with SB-30, SB-44, SB-68, SB-83 and SB-200 (1-100 μ M) for 48 hours. After incubation, steps were performed as previously described at item 2.3. Selectivity index (SI) was calculated by the ratio of IC₅₀ normal cells (PBMC) to the IC₅₀ tumor cells (human cancer cells), according to Islam et al (2016). Compounds with high selectivity have SI value > 3.

2.5 Cell cycle progression assay. Cells were seeded in 6-well plates (5×10^5 cells/well), incubated overnight and then treated with SB-44, 83 and 200 at their respective IC₅₀ concentrations for 48 hours. Cells without treatment and treated with Amsacrine were used as controls. After incubation, cells were washed with PBS and fixed with 70% ethanol overnight at -20°C. Before the analysis, cells were incubated with PI (5 mg/mL)/RNase A (100mg/mL)

for 30 minutes in the dark. Cells were analyzed using BD Accuri C6 flow cytometry (BD Biosciences®, USA). Two experiments were performed in duplicate.

2.6 Analysis of cell death by cleavage of caspase 3/7. HL-60/MX1 cells were cultured 5×10^5 -well in 6-well plates and incubated at 37 °C in a humid atmosphere of 5% CO₂ for 24 hours. After that, cells were treated with SB-83, 44 and 200 compounds at IC₅₀ value for 48 hours and then washed 2x with PBS. Subsequently they were resuspended in complete medium and staining with CellEvent® Caspase 3/7 Green reagent (Life Technologies®, EUA) and incubated for 30 minutes in a humid atmosphere of 5% CO₂ at 37 °C. Subsequently, cells were incubated with SYTOX® AADvanced for 5 minutes to stain necrotic cells. After, cells were evaluated using an Attune cytometer (Applied Biosystems®, EUA) and analyzed using the Flowjo Single Cell Analysis Software®. Two experiments independents were performed.

2.7 ABC transporters activity assay. ABC transporters activity was evaluated through rhodamine 123 efflux assay, as previously described in Daflon-Yunes, et al (2013). Rhodamine 123 – Rho123 (Sigma, St. Louis, USA) is a fluorescent ABC transporters substrate and its intracellular accumulation is inversely proportional to ABC transporters activity. HL-60 and HL-60/MX1 cells were incubated with 200 ng/mL Rho123 for 30 minutes (ABCC1) or 10 minutes (ABCB1) in the presence or absence of inhibitors of transporters ABCB1 (10 µM – Reversin 205, Sigma, St. Louis) or ABCC1 (10 µM - MK571, Sigma, St. Louis). Cells were analyzed through FSC and SSC gated in target population and cell viability was confirmed by PI staining. All samples were submitted to flow cytometry with a cytometer BD Accuri® C6 - BD Bioscience and analyzed with *BD Accuri C6 software*.

2.8 ABC transporters involvement in drugs effects. For the investigation of the ABCC1 involvement on drugs effect, HL-60/MX1 cells were cultured in the presence or absence of ABC transporters inhibitors. Preincubated cells (30 minutes) with or without MK571 (10µM) were additionally treated with SB-44, SB-83 and SB-200 for 24 hours. After incubation, cells were subjected to staining with PI for cell cycle assays, as described at item 2.7.

2.9 Topoisomerase II inhibition assay. Inhibitory effects of SB-83 and SB-200 on topoisomerase II activity were measured using Human Topoisomerase II assay kit (TopoGEN®, USA). Supercoiled plasmid DNA pOHT-1 was incubated with human topo II (5 units) in the presence or absence of SB-83 and SB-200 (50 and 100 µM). DMSO (0,2%) was used as vehicle control and etoposide (50 µM) as positive control. Reactions were terminated

with 1% SDS and digested with proteinase K. DNA was extracted with chloroform:isoamyl alcohol (24:1). Agarose gel (1%) electrophoresis was performed in the absence of ethidium bromide. Gels were run at 2 volt/cm for 50 minutes in Tris-acetate-EDTA (TAE) buffer and stained with 0,5 µg/mL of ethidium bromide for 15 minutes and destain for 15 minutes in water after run and photographed under UV light. Quantitative analysis of gel bands was performed using ImageJ program (Version 1.49). Two independent experiments were performed.

2.10 Statistical analysis. IC₅₀ values and their 95% confidence intervals were obtained by nonlinear regression with OriginPro program (Version 8.0). GraphPad Prism® 6 software was used to perform statistical analysis by Student's t-test and differences were considered significant when $p < 0,05$.

3 Results

3.1 Selectivity and cytotoxicity assays

Cytotoxicity assays performed in neoplastic cells showed that, except for SB-30, all compounds exhibited toxicity in HL-60/MX1 (resistant acute leukemia cells). SB-83 and SB-200 had the best IC₅₀ values (7.94 and 9.36 µM, respectively) (Table 2).

In order to determinate the selectivity of SBs, toxicity assays was also performed in Peripheral Blood Mononuclear Cells (PBMC). SB-30 and SB-68 presented no toxicity against PBMC (IC₅₀ > 100µM). However, they had the lowest SI values. Table 2 shows that SB-83 and SB-200 presented SI values higher than 3, indicating its selective potential (SI = 4.26 and 3.61, respectively).

3.2 Cell cycle progression assays

Effects on cell cycle progression of HL-60/MX1 cells after treatment with 2-Amino-Thiophene derivatives SB-44, SB-83 and SB-200 were evaluated by flow cytometry. After 48 hours of treatment, none of tested compounds induced cell cycle alterations when compared to untreated control (Figure 1).

3.3 Caspases -3 and -7 activity assays

Caspases -3 and -7 activation was evaluated by flow cytometry in resistant acute leukemia cells after 48 hours treatment with SB-44, SB-83 and SB-200. As shown in Figure 2,

none of tested compounds significantly induces alterations in the percentage of necrotic, caspase 3 and 7 activated and double positive cells when compared to untreated control.

3.4 ABC transporters activity assays

HL-60 and HL-60/MX1 cell lines were treated with ABCB1 and ABCC1 transporters inhibitors (reversin 205 and MK571, respectively) in order to evaluate the change in fluorescent intensity of rhodamine 123 according to the activity of ABC transporters. Both cell lines treated with reversin 205 did not exhibited increase in fluorescence intensity (Figure 3A and 3B). However, unlike HL-60 cells (Figure 3C), HL-60/MX1 cells treated with MK571 showed an increased of fluorescence intensity (Figure 3D) when compared to control (cells treated with rhodamine 123 in the absence of MK571), indicating activity of ABCC1 transporter in this cell line. Additionally, it was not observed cell damages during incubation time and cell viability was confirmed through PI staining.

After characterization of ABCC1 activity in HL-60/MX1 cell line, it was investigated the influence of this transporter in SB-200, SB-44 and SB-83 effects. Our preliminary data suggest that previous treatment with MK571 did not affect SB-200 and 83 response, with no significant alterations in the percentage of dead cells or Sub-G0, G0/G1 and S/G2/M phase. However, cells previous treated with MK571 and cultured in the presence of SB-44 presented an increase of cell death when compared to cells treated only with SB-44 (Table 3).

3.5 Topoisomerase II inhibition assays

In order to evaluate the effect of SB-83 and SB-200 on DNA relaxation, plasmid DNA pOHT-1 was incubated with the compounds (50 and 100 μ M) and human topoisomerase II. SB-44 effects were not evaluated due to its SI value less than 3 and its association to ABCC1 transporter. Results indicate topoisomerase II activity inhibition by both compounds. SB-83 significantly reduced relaxed DNA at concentrations of 50 and 100 μ M ($p=0,0156$ and $0,0067$, respectively) and SB-200 significantly reduced relaxed DNA only at concentration of 100 μ M ($p=0,0381$) when compared to vehicle control (DMSO 0,2%) (Figure 4).

4 Discussion

The present work demonstrates the evaluation of antineoplastic activity *in vitro* of five 2-amino-thiophene derivatives (SB-30, SB-44, SB-68, SB-83 and SB-200) in resistant acute

leukemia cells. Studied compounds were previously synthesized and have shown potential for mycosis (Mendonça-Junior et al., 2011; Scotti et al., 2012), microbial infections (Scotti et al., 2014) and SNC disorders (Fortes et al., 2013) treatments.

Due to the constant need to discover new agents more effective and less toxic than currently drugs used in cancer treatment, synthetic and natural compounds have been extensively evaluated as antitumor agents (Narasimhan et al., 2015). In our study, SB-83, SB-200 and SB-44 derivatives exhibit high cytotoxicity activity, while SB-68 presented low cytotoxicity and SB-30 had no activity in HL-60/MX-1 cells (resistant acute leukemia). Antineoplastic effects of thiophene derivatives are already reported, including cytotoxicity in distinct type of leukemia, such as HL-60 (acute leukemia), Jurkat (acute T cell leukemia), K562 (chronic myelogenous leukemia) and Molt-4 (acute lymphoblastic leukemia) (Romagnoli et al., 2010; Romagnoli et al., 2014). Romagnoli and collaborators (2016) synthesized some novel thiophene derivatives capable to inhibit STAT5 (Signal Transducer and Activator of Transcription 5), an important protein involved in the progression of acute myeloid leukemia. Therefore, thiophene derivatives demonstrate potential for the development of novel therapies against leukemia.

Subsequent assays were performed in order to elucidate the mechanism of action by which SB-44, SB-83 and SB-200 induces cell. SBs derivatives are not capable to affect cell cycle progression or the percentage of necrotic and caspase-3/7 activated cells, indicating that other death mechanisms besides necrosis and apoptosis are activated after treatment. SB-83 and SB-200 exhibited Topoisomerase II inhibitory activity, significantly reducing relaxed DNA levels when compared to vehicle control (DMSO 0,2%). Topoisomerases II are nuclear enzymes that play essential role in a number of genetic processes, including DNA replication (Nitiss, 2009). They have been major targets for medicinal and chemotherapeutic agents since the identification of Amsacrine in 1984 (Vann et al., 2016). Current antineoplastic agents, such as etoposide and doxorubicin, used in treatment of different types of cancer (including hematological malignances) have topoisomerase II as a molecular target (Larsen et al., 2003). Some of them can sensitize cancer cells to non-apoptotic cell deaths, such as necroptosis (Moriwaki et al., 2015).

Drug transporters are overexpressed in the majority of resistant cell lines and cell lines from all levels of resistance had increased expression of more than one drug transporter (Gromicho et al., 2016). ABCC1 is an important and well-known member of ABC transporters family that encodes MRP1 (multidrug resistance protein 1) (Cole, 2014). MRP1 transports a wide range of therapeutic agents as well as diverse physiological substrates and plays an

important role in the development of drug resistance (Munoz et al., 2007). Our results indicate that drug resistance observed in HL-60/MX1 is related to ABCC1 transporter activity, since it was not detected in non-resistant cell line HL-60. Moreover, treatment with SB-44 and MK571 (an inhibitor of ABCC1 transporter) significantly increased cell death when compared to cells treated only with SB-44, indicating that ABCC1 transporter is involved in this compound efflux. Expression of ABCC1 transporter is documented in a range of solid and hematological cancers and, in some cases, is correlated with negative response to treatment and disease outcome (Deeley & Cole, 2006). Since treatment with MK571 did not change SB-200 and 83 response in HL-60/MX1, probably their cytotoxic activity is not affected by ABCC1 activation. Thus, these derivatives are interesting candidates for treatment of resistant cancers that express ABCC1 transporter, evading this resistance-related mechanism.

5 Conclusions

Thiophene derivatives 2-[(5-bromo-1H-indol-2ylmethylene)-amino]-4,5,6,7-tetrahydro-benzo[b]thiophene-3-carbonitrile (SB-83) and 5-Bromo-1*H*-Indol-3-ylmethylene)-(5,6,7,8-tetrahydro-4*H*-ciclohepta[b]tiofen-2-il)-amine (SB-200) exhibited selectivity potential and antineoplastic effects *in vitro* in HL-60/MX-1 cells. SB-83 and SB-200 are capable to inhibit topoisomerase II activity and its cytotoxicity potential does not seem to be affected by drug efflux promoted by ABCC1 transporter. Thus, these thiophene compounds are potent candidates for the development of new effective therapies against acute leukemia treatment.

6 Acknowledgments

We would like to thank the Brazilian National Research Council (CNPq), the Research Foundation of Pernambuco State (FACEPE), National Institute for Science and Technology in Pharmaceutical Innovation (INCT_if) and CAPES for student fellowships.

7 Conflict of interest

The authors declare no conflict of interest.

8 References

Aurelio L, Valant C, Figler H, Flynn BL, Linden J, Sexton PM, Christopoulos A, Scammells, PJ. 3- and 6-Substituted 2-amino-4,5,6,7-tetrahydrothieno[2,3-*c*]pyridines as A1 adenosine receptor allosteric modulators and antagonists, *Bioorg Med Chem* 2009; **17**: 7353–61.

Balzarini J, Thomas J, Liekens S, Noppen S, Dehaen W, Romagnoli, R. 2-aminothiophene-3-carboxylic acid ester derivatives as novel highly selective cytostatic agentes, *Invest New Drugs* 2014; **32**: 200–210.

Bartholomae S, Gruhn B, Debatin K-M, Zimmermann M, Creutzig U, Reinhardt D, Steinbach D. Coexpression of Multiple ABC-Transporters is Strongly Associated with Treatment Response in Childhood Acute Myeloid Leukemia 2016; **63**(2): 242-247.

Bodet-Milin C et al. Radioimmunotherapy for treatment of acute leukemia, *Semin Nucl Med*, 2016; **46**: 135-146.

Bondock S, Fadaly W, Metwally MA. Synthesis and antimicrobial activity of some new thiazole, thiophene and pyrazole derivatives containing benzothiazole moiety. *Eur J Med Chem* 2010; **45**: 3692–701.

Cole, SP. Targeting multidrug resistance protein 1 (MRP1, ABBC1): past, present and future. *Annu. Rev. Pharmacol. Toxicol.* 2014; **54**: 6.1-6.23.

Daflon-Yunes, N.; Pinto-Silva, F. E.; Vidal, R. S. Novis, B. F.; Berguetti, T.; Lopes, R.R.S. Polycarpo, C.; Rumjanek, V. M. Characterization of a multidrug-resistant chronic myeloid leukemia cell line presenting multiple resistance mechanisms. *Mol Cell Biochem*, 383:123–135, 2013.

De Oliveira TB. Síntese, determinação estrutural e avaliação biológica de derivados hidrazínicos e tiazolidínicos tiofênicos. **2013**. PhD thesis. Post Graduation Program in Inovação Terapêutica. Universidade Federal de Pernambuco, UFPE, Brasil.

Deeley, RG. Cole SPC. Substrate recognition and transport by multidrug resistance protein 1 (ABCC1). *FEBS Letters* 2006; **580**: 1103-1111.

El-Sharkawy KA, El-Sehrawi HM, Ibrahim RA. The Reaction of 2-Amino-4,5,6,7-tetrahydrobenzo[b]thiophenes with Benzoyl-Isothiocyanate: Synthesis of Annulated Thiophene Derivatives and Their Antitumor Evaluations. *Int J Org Chem* 2012; **2**: 126-134

Fortes AC, Almeida AAC, Mendonça-Júnior FJB, Freitas RM, Soares-Sobrinho JL, De La Roca Soares MF. Anxiolytic properties of new chemical entity, 5TIO1. *Neurochem Res* 2013; **38**: 726–31.

Gerpe A, Álvarez G, Benítez D, Boiani L, Quiroga M, Hernández P, Sortino M, Zacchino S, González M, Cerecetto H. 5-Nitrofuranes and 5-nitrothiophenes with anti-trypanosoma cruzi activity and ability to accumulate squalene. *Bioorganic Med Chem* 2009; **17**: 7500–9.

Gramec D, Peterlin Mašič L, Sollner Dolenc M. Bioactivation potential of thiophene-containing drugs. *Chem Res Toxicol* 2014.

Huang Y, Dömling A. The Gewald multicomponent reaction. *Mol Divers* 2011; **15**: 3–33.

Huet, S.; Marie J.P.; Gualde, N.; Robert, J. Reference method for detection of P-gp mediated multi-drug resistance in human hematological malignancies: a method validated by the laboratories of the French Drug Resistance Network. *Cytometry*, 34:248–56, 1998.

Gromicho M, Rueff J, Rodrigues AS. Dynamics of Expression of Drug Transporters: Methods for Appraisal 2016; **1395**: 75-85.

Kulandasamy R, Adhikari AV, Stables JP. Synthesis and anticonvulsant activity of some new bishydrazones derived from 3,4-dipropoxythiophene. *Eur J Med Chem* 2009; **44**: 3672–9.

Larsen AK, Escargueil AE, Skladanowski A. Catalytic topoisomerase II inhibitors in cancer therapy. *Pharmacology & Therapeutics* 2003. **99**: 167-181.

Ma JJ, Chen Y, Yu L. Research Progress on Drug-resistance of Acute Lymphoblastic Leukemia. *Journal of Experimental Hematology* 2016; **24**(1): 261-265.

Mendonça-Junior FJB, Lima-Neto RG, Oliveira TG, Lima MCA, Pitta IR, Galdino SL, Cruz RMD, Araújo RSA, Neves RP. Synthesis and evaluation of the antifungal activity of 2-(substituted-amino)-4,5-dialkyl-thiophene-3-carbonitrile derivatives. *Lat Am J Pharm* 2011 **30**: 1492–1499

Meyer R, Brink S, Van Rensburg CEJ, Jooné GK, Görls H, Lotz S. Synthesis, characterization and antitumor properties of titanocene derivatives with thiophene containing ligands. *J Organomet Chem* 2005; **690**: 117–25.

Mohareb RM, Abdallah AE, Helal MH, Shaloof SM. Synthesis and structure elucidation of some novel thiophene and benzothiophene derivatives as cytotoxic agents. *Acta Pharm.* 2016; **66**(1): 53-68.

Moriwaki K, Bertin J, Gough PJ, Orlowski GM, Chan FKM. Differential roles of RIPK1 and RIPK3 in TNF-induced necroptosis and chemotherapeutic agent-induced cell death. *Cell Death and Disease* 2015; **6**.

Munoz M, Henderson M, Haber M, Norris M. Role of the MRP1/ABCC1 multidrug transporter protein in cancer. *IUBMB Life* 2007; **59**: 752-757.

Narasimhan K, Lee YM, Lim TK, Port SA, Han J-H, Chen C-S, Lin Q. Genistein exerts anti-leukemic effects on genetically different acute myeloid leukemia cell lines by inhibiting protein synthesis and cell proliferation while inducing apoptosis – molecular insights from an iTRAQ™ quantitative proteomics study. *Oncoscience* 2015; **2**(2): 111-124.

Nitiss, JL. Targeting DNA topoisomerase II in cancer chemotherapy. *Nat Rev Cancer* 2009; **9**(5): 338-350.

Oliveira RA, Savegnago L, Jesse CR, Menezes PH, Molander GA, Nogueira CW. Toxicological investigation and antinociceptive property of potassium thiophene-3-trifluoroborate. *Basic Clin Pharmacol Toxicol* 2009; **104**: 448–54.

Passequé E, Jamieson CH, Ailles LE, Weissman IL. Normal and leukemic hematopoiesis: are leukemias a stem cell disorder or a reacquisition of stem cell characteristics? *Proc Natl Acad Sci USA* 2003; **100**: 11842-11849.

Romagnoli R, Baraldi PG, Lopez-Cara C, Salvador MK, Preti D, Tabrizi MA, Balzarini J, Nussbaumer P, Bassetto M, Brancale A, Fu XH, Yang-Gao, Li J, Zhang SZ, Hamel E, Bortolozzi R, Basso G, Viola G. Design, synthesis and biological evaluation of 3,5-disubstituted 2-amino thiophene derivatives as a novel class of antitumor agents. *Bioorg Med Chem* 2014; **22**(18): 5097-109.

Romagnoli R, Baraldi PG, Lopez-Cara C, Hamel E, Basso G, Bortolozzi R, Viola G. Synthesis and biological evaluation of 2-(3',4',5'-trimethoxybenzoyl)-3-aryl/arylaminobenzo[b]thiophene derivatives as a novel class of antiproliferative agents. *Eur J Med Chem* 2010; **45**(12): 5781-91.

Romagnoli R, Baraldi PG, Prencipe F, Lopez-Cara C, Rondanin R, Simoni D, Hamel E, Grimaudo S, Pipitone RM, Meli M, Tolomeo M. Novel imioacetamido benzoheterocyclic

derivatives with potent antileukemic activity are inhibitors of STAT5 phosphorylation. *Eur J Med Chem* 2016; 108: 39-52.

Scotti L, Oliveira Lima EO, da Silva MS, Ishiki H, Lima IO, Pereira FO, Mendonça Junior FJB, Scotti MT. Docking and PLS Studies on a Set of Thiophenes RNA Polymerase Inhibitors Against *Staphylococcus aureus*. *Curr Top Med. Chem* 2014, 14: 64-80.

Scotti L, Scotti MT, De Oliveira Lima E, da Silva MS, de Lima, MCA, Pitta IR, de Moura RO, de Oliveira JGB, da Cruz RMD, Medonça Junior FJB. Experimental methodologies and evaluations of computer-aided drug design methodologies applied to a series of 2-aminothiophene derivatives with antifungal activities. *Molecules* 2012; **17**: 2298–315.

Siegel RL, Miller KD, Jemal A. Cancer Statistics, 2016. *CA Cancer J Clin* 2016; **66**: 7-30.

Silva, K. L.; Vasconcelos, F. C.; Marques-Santos, L. F.; Kwee, J. K.; Maia, R. C. CPT-11-induced cell death in leukemic cells is not affected by the MDR phenotype. *Leukemia Research*, 27: 243–251, 2003.

Souza BCC, Oliveira TB, Aquino TM, De Lima MCS, Pitta IR, Galdino SL, Lima EO, Gonçalves-Silva T, Militão GCG, Scotti L, Scotti MT, Mendonça-Jr FJB. Preliminary antifungal and cytotoxic evaluation of synthetic cycloalkyl[b]thiophene derivatives with PLS-DA analysis. *Acta Pharm* 2012; **62**: 221–36.

Souza BCC, Oliveira TB, Aquino TM, De Lima MCS, Pitta IR, Galdino SL, Lima EO, Gonçalves-Silva T, Militão GCG, Scotti L, Scotti MT, Mendonça-Jr FJB. Preliminary antifungal and cytotoxic evaluation of synthetic cycloalkyl[b]thiophene derivatives with PLS-DA analysis. *Acta Pharm* 2012; **62**: 221–36.

Takahashi HT, Novello CR, Ueda-Nakamura T, Filho BPD, De Mello JCP, Nakamura CV. Thiophene derivatives with antileishmanial activity isolated from aerial parts of *Porophyllum ruderale* (Jacq.) Cass. *Molecules* 2011; **16**: 3469–78.

Vann, KR. Ergün Y, Zencir S, Oncuoglu S, Osheroff N, Topcu Z. Inhibition of human DNA topoisomerase II α by two novel ellipticine derivatives. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* 2016.

Table 1. Synthesis and chemical structures of SBs.

Compound	n	R	R'
SB-68	3		-
SB-30	1		H
SB-44	3		H
SB-83	2		5-Bromine
SB-200	3		5-Bromine

Reaction scheme showing the synthesis of SBs. The starting materials are a cyclic ketone (cyclopentanone derivative) and a dicyanomethane derivative. The reaction proceeds in two steps: 1) Reaction with Morfoline in EtOH at room temperature (rt) to form a thienothiopyran intermediate. 2) Reaction with an aldehyde (RCHO) in EtOH under reflux to form the final SB compound with an imine group.

Table 2. IC₅₀ values (μM) and selectivity index (SI) of SBs compounds in PBMC and resistant acute leukemia cells.

	SB-30	SB-68	SB-200	SB-44	SB-83
PBMC	>100	>100	33,84	37,61	33,82
HL-60/MX1	>100	68,02±14,28	9,36	14,48±1,73	7,94±2,26
SI*	>1	>1,47	3,61	2,6	4,26

*SI (selectivity index) = IC₅₀ normal cells/IC₅₀ tumor cells

Table 3. Percentage of HL-60/MX1 cell death and cells in Sub-G0, G0/G1 and S/G2/M phases after treatment with SB-200, SB-83 and SB-44 (incubated or not previously with MK571). Treatment with MK571 and SB-44 simultaneously increased cell death when compared to cells treated only with SB-44 (NTC = non-treated cells; MK571 = inhibitor of ABCC1 transporter).

Condições	Morte (%)	subG0 (%)	G0/G1 (%)	S/G2/M (%)
NT	7,5 (± 0,42)	10,15 (± 3,20)	54,05 (±6,55)	37,8 (±6,34)
MK571	16,55 (± 3,88)	17,6 (±2,96)	58,1 (± 8,06)	24,1 (±6,78)
SB200	19,5 (±3,11)	18,1 (±9,75)	50,85 (±4,03)	30,3 (±6,92)
SB200 + MK571	18,8 (±17,96)	20,9 (±17,96)	49,2 (±4,80)	30,15 (±13,08)

SB83	18,75 ($\pm 2,05$)	17,2 ($\pm 7,77$)	55,75 ($\pm 4,59$)	27,15($\pm 3,18$)
SB83+MK571	17,4 ($\pm 16,40$)	17,35 ($\pm 14,91$)	49,3($\pm 4,66$)	32,05($\pm 9,12$)
SB44	20,55 ($\pm 3,60$)	21,2 ($\pm 6,64$)	49,75 ($\pm 4,17$)	28,2 ($\pm 3,67$)
SB44+MK571	29,4 ($\pm 16,68$)	30,35 ($\pm 17,46$)	45,7($\pm 18,10$)	24,7($\pm 1,27$)

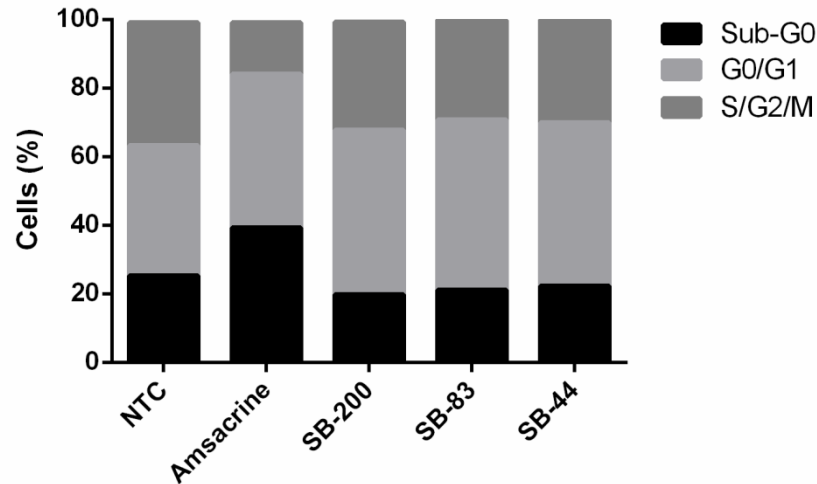


Figure 1. Effects of SBs on cell cycle progression of HL-60/MX1 cells after 48 hours of treatment. None of tested compounds induced alterations in cell cycle when compared to untreated control. (NTC = non-treated cells)

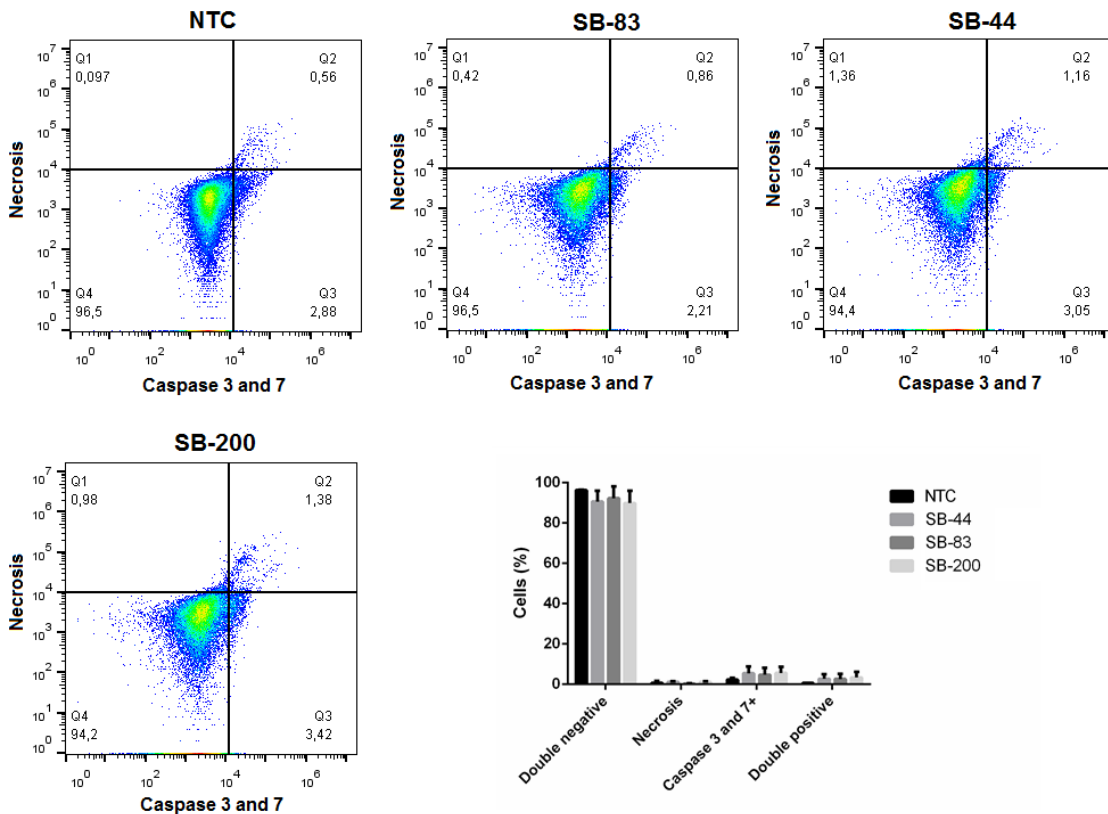


Figure 2. Effects of SBs on caspase -3/7 activation in HL-60/MX-1 cells. Treatment with SB-83, SB-44 and SB-200 for 48 hours did not significantly change the percentage of necrotic, caspase -3 and 7 activated and double positive cells when compared to untreated control. (NTC = non-treated cells)

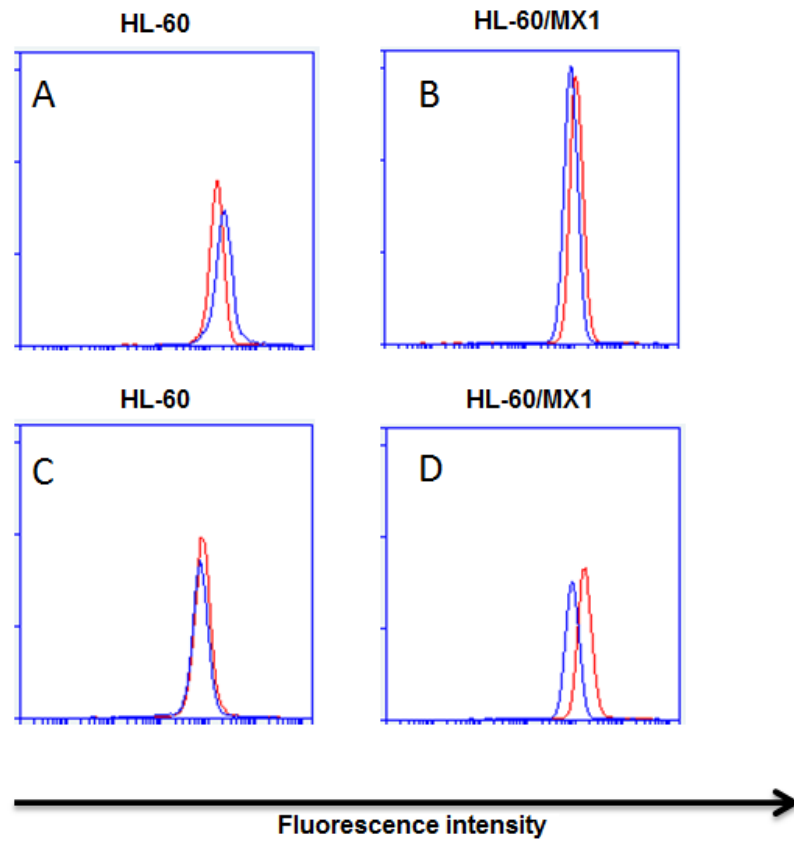


Figure 3. Fluorescence intensity (log) of HL-60 and HL-60/MX1 cell lines in the presence of ABCB1 (A and B) and ABCC1 (C and D) inhibitors. Fluorescence intensity of cell lines in the presence of specific inhibitors of ABC transporters is shown in red, while the fluorescence intensity in the absence of the respective inhibitor is exhibited in blue. Results indicate ABCB1 transporter activity only in HL-60/MX1 cell line (D).

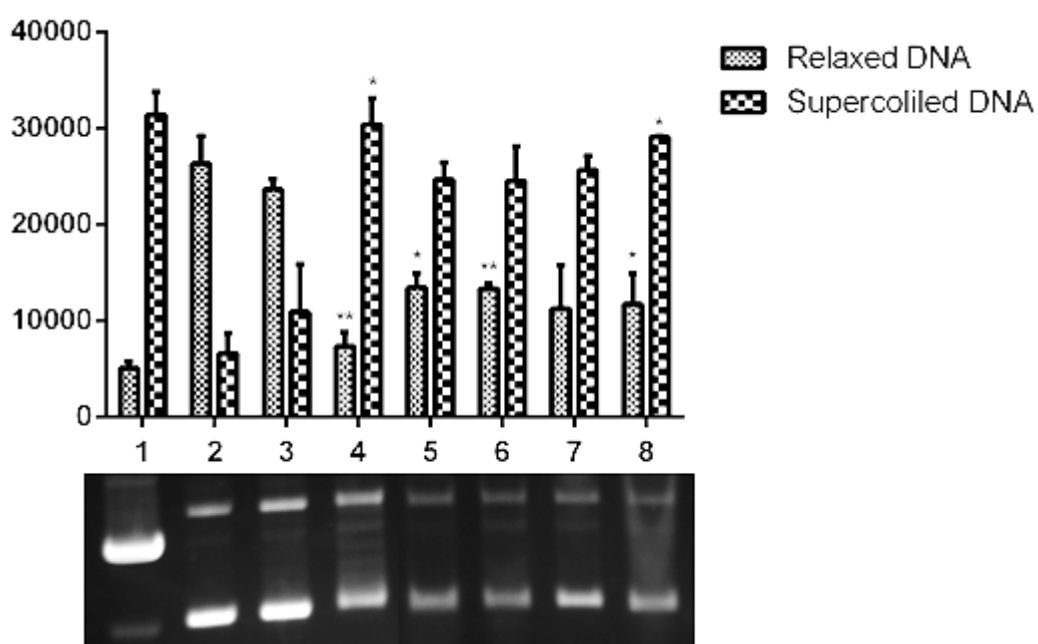


Figure 4. Semi-quantitative analysis of SB-83 and SB-200 on pOHT-1 DNA plasmid relaxation by human topoisomerase II. SB-83 (50 and 100 μ M) and SB-200 (100 μ M) significantly reduced relaxed DNA when compared to vehicle control (DMSO 0,2%), indicating topoisomerase II inhibition. [1 - DNA pOHT-1; 2- DNA pOHT-1 + topo II; 3- DNA pOHT-1 + topo II + DMSO 0,2%; 4- DNA pOHT-1 + topo II + Etoposide 50 μ M; 5-6- DNA pOHT-1 + topo II + SB-83 50 and 100 μ M, respectively; 7-8- DNA pOHT-1 + topo II + SB-200 50 and 100 μ M, respectively] * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$

Artigo 2 –

ASSESSMENT OF POSSIBLE EFFECTS OF GLYCOSYLATION INHIBITORS IN LEUKEMIC CELLS RESISTANT TO CHEMOTHERAPY WITH TOPOISOMERASE INHIBITORS

Michael Williames Leal Quirino¹, Flaviana Alves dos Santos¹, Valécia de Cássia Mendonça da Costa ¹, Lidiane Vasconcelos do Nascimento Carvalho¹, Helena Lima da Silva Neta¹, Ivan da Rocha Pitta², Maira Galdino da Rocha Pitta¹, Moacyr Jesus Barreto de Melo Rêgo¹

1. Federal University of Pernambuco. Laboratory of Immunomodulation and New Therapeutic Approaches, 50670-910, Recife, PE, Brazil;

2. Federal University of Pernambuco. Laboratory of Planning and Synthesis of Drugs, 50670-910, Recife, PE, Brazil;

Corresponding author:

Moacyr Jesus Barreto de Melo Rêgo

Rua Tereza Mélia, s/n, Cidade Universitária, UFPE Cidade Universitária/50670-901. Recife, PE- Brazil.

Email: moacyr.rego@gmail.com

ABSTRACT

The development of the phenotype resistant to chemotherapy is a major cause of death in patients with acute leukemia. In this sense the present study aimed to assess whether the glycosylation inhibitors n-butyldeoxynojirimycin (NB-DNJ) and Tunicamycin are able to sensitize resistant cells to treatment with topoisomerase inhibitors. Initially, the working doses of the compounds to be tested were established. Topoisomerase inhibitors were evaluated on their IC₅₀ and N-glycosylation inhibitors in the maximum dose that did not cause cell toxicity. The administration of tunicamycin was performed 24 hours before the treatment with the topoisomerase inhibitors. However, for the NB-DNJ the administration was simultaneously. Our results showed that NB-DNJ at 1 μ M was not efficient in sensitizing MX1-HL60 cells to treatment with topoisomerase inhibitors. Moreover, tunicamycin was able to sensitize leukemic cells to treatment with bisantrene being more effective than ABCB1 blocker MK571. Other studies are being developed to evaluate if the pretreatment with NB-DNJ and the simultaneous treatment with tunicamycin can sensitize cells HL60/MX1 to treatment with topoisomerase inhibitors.

Keywords: Tunicamycin, Etoposide, n-butyldeoxynojirimycin.

1 Introduction

Leukemias are diseases resulting of monoclonal abnormality that occurs in a progenitor cell of hematopoietic system. If the neoplastic progression was rapid and affect young not yet fully formed cells, it is then acute leukemia. Although the incidence of acute leukemia be smaller than most epitelaais neoplasms, mortality rate of acute leukemia appears among the highest (Bodet-Milin et al., 2016; Siegel et al., 2016). Much of the mortality of this malignancy is associated with the development of resistance to chemotherapy by neoplastic cells (Ma et al., 2016).

Chemotherapy resistance usually results from increased expression of ABC family drug transporters as ABCB1 and ABCC1(Gromicho et al., 2016). Overexpression of these transporters is associated with treatment response in acute leukemia patients, with lower relapse-free survival and poor outcome (Bartholomae et al., 2016). In this sense not only new direct inhibitors of the pump activity need to be developed, as well as therapeutic strategies that alter their functions (Hiss et al., 2007).. N-glycosylation inhibitors have been studied because they have great ability to alter the metabolism of neoplastic cell leading to death or sensitizing it to other chemotherapeutics (Wojtowicz et al., 2012).

Tunicamycin is a nucleotide antibiotic isolated for the first time from *Streptomyces lysosuperificus* in 1973. It is the most frequently applied inhibitor of N-glycosylation, by inhibition of dolichol phosphate GlcNac-1-P transferase, enzyme that catalyzes the first step in protein glycosylation (Price & Tsvetanova, 2007). The cytotoxic effect of tunicamycin on cells induced apoptosis also in neoplastic cells (Wojtowicz et al., 2012). Tunicamycin is able to suppress P-glycoprotein (a member of ABC transporters family) activity with subsequent accumulation of cytostatic drugs in the cells (Kramer et al., 1995). Its combination synergistically with several anticancer drugs is capable to enhance their toxicity in multidrug-resistant human ovarian cells (Hiss et al., 2007).

N-butyl-deoxynojirimycin - NB-DNJ is the active principle of a drug used in clinical for treatment of Gaucher disease, a esfingolipidiose characterized by a specific deficiency in β -glucocerebrosidase enzyme, which results in the abnormal accumulation of glucosylceramide in the lysosome (Brian et al., 2013). The mechanism of action of NB-DNJ is based on substrate deprivation, this iminosugar is analogous D-glucose, and acts by inhibiting glucosylceramide synthase (Butters et al, 2005), the enzyme responsible for the first step in the synthesis of most glycosphingolipids (GSL) (Tirelli, 2005). Therefore, this study aimed to analyze the NB-DNJ

and tunicamycin can act as sensitizing agents in acute leukemia cells resistant to treatment with topoisomerase inhibitors.

2 Experimental

2.1 Cell cultures. HL-60/MX1 (acute leucemia resistant cell line) were obtained from American Type Cell Culture (ATCC®, USA). Cells were cultured in RPMI-1640 medium (Gibco®, UK) supplemented with 10% fetal bovine serum (Gibco®, UK), 10 mM HEPES (Gibco®, UK), 200 U/mL streptomycin and penicillin (Gibco®, UK) and incubated in a humid atmosphere of 5% CO₂ at 37°C.

2.2 Cytotoxicity assay. HL-60/MX1 cells were plated at a density of 1×10^4 cells/well in 96-well plates in order to establish the work concentrations of glycosylation and topoisomerase inhibitors. Then, all inhibitors were tested for 72 hours at 37°C with 5% CO₂. Control groups received the same final amount of DMSO (0,1%). At the end of 72 h of incubation 20mL of (3-(4,5-dimethylthiazol-2-)-2,5-diphenyltetrazolium bromide (MTT) at 5 mg/mL were added in each well and, three hours later, 130 mL of 20% SDS. The absorbance was measured 24 hours later using ELx808 Microplate Reader (Biotek®, USA) at a wavelength of 570 nm. Experiments were performed three independent times in triplicate.

2.3 Peripheral blood mononuclear cells toxicity assay. Peripheral blood mononuclear cells (PBMC) were obtained from whole heparinized blood of healthy non-smoking donors (n=5). All volunteers signed a consent form and the study was approved by Human Research Ethics Committee from Federal University of Pernambuco (CEP-CCS 528/11). Cells isolation was made using a density-gradient centrifugation method over Ficoll-Paque PLUS (GE Healthcare®, UK). PBMCs were counted in a Neubauer chamber, and viability was determined by the trypan blue exclusion method. Cells were only used when viability was >98%. Then, cells were resuspended in RPMI-1640 medium supplemented with 10% fetal bovine serum (Gibco®, UK), 10 mM HEPES (Gibco®, UK) and 200 U/mL streptomycin and penicillin (Gibco®, UK). After seeded in 96-well plates (5×10^5 / well) they were submitted to the therapeutic strategies describe before.

2.4 Analysis of cell death by flow cytometer. HL-60/MX1 cells were plated at a density of 1×10^4 cells/well in 96-well plates. After 24 hours, therapeutic strategies were established. In the first one, cells were pre-treated with tunicamycin 24h before the incubation with topo inhibitors, for 48h more. In the seconde onde NB-DNJ treatment **was Concomitant** to the topo inhibitors for 72 hours at 37°C with 5% CO₂. After, cells were incubated with Propidium Iodide (PI) solution and evaluated using an Acur cytometer (BC Biociencia®, EUA)

2.5 ABC transporters involvement in drugs effects. In a previous study of our group it was characterized that the HL60 / MX1 cell takes the ABCC1 system over the ABCB1. Because of that our functional test was facing the ABCC1 pump. For the investigation of the ABCC1 involvement on drugs effect, HL-60/MX1 cells were cultured in the presence or absence of ABC transporters inhibitors. Preincubated cells (30 minutes) with or without ABC transporter inhibitor (MK571, ABCC1 blocking, at 10 μ M) were additionally treated with tunicamycin for 24 hours. All samples were submitted to flow cytometry with a cytometer BD Accuri® C6 - BD Bioscience and analyzed with BD Accuri C6 software.

3 Results

3.1 Determining IC₅₀s of topoisomerase inhibitors

To sensitize the HL60/MX1 cell lineage to topoisomerase inhibitors it was necessary to calculate the IC₅₀ of each one of the inhibitors. Among these, we use a topoisomerase I inhibitor (camptothecin) and three topoisomerase II inhibitors (amsacrine, bisantrene, and etoposide). For camptothecin, doses between 150-350 η M were very toxic, reducing the viability of zero at all. So in the following assay the concentrations were reduced to 10 η M; 25 η M and 50 η M and the IC₅₀ was obtained (30 $\pm$ 1,6nM). Topoisomerase II inhibitors, in general, were evaluated between 0,5 μ M to 50 μ M. Thus it was possible to find its IC₅₀ values (Table 1).

3.2 Establishment of working doses of glycosylation inhibitors

After setting the IC₅₀ of topoisomerase inhibitors, we establish the sensitization dose of the glycosylation inhibitor. Importantly, tunicamycin and miglustat were used in order to allow the multidrug resistant tumor cells respond to the action of the topoisomerase inhibitors even at low concentrations. We also tested tunicamycin toxicity in human peripheral blood cells aiming to avoid the use of toxic doses to healthy cells. Cytotoxicity tests with tunicamycin in PBMCs reveals non-toxic concentrations between 19 and 570 η M. (Figure 1A). To establish the optimal concentration of tunicamycin in neoplastic cells were treated with tunicamycin at 10 η M; 50 η M; 75 η M; 150 η M; 250 η M and 350 η M. However, even at low doses as 10 η M only 60% of the cells remained viable. (Figure 1B). On the other hand Miglustat tested concentrations ranged between 150 η M and 5 μ M and showed no significant toxicity in both, PBMC and HL60-MX1 cells (Figure 2). In this sense we use tunicamycin at 30nM and NB-DJN at 1 μ M in subsequent tests.

3.3 Assessment of glycosylation inhibitors

Simultaneous treatment with NB-DNJ topoisomerase inhibitors were performed only twice and showed no increase in cell toxicity (Figure 3A). On the other hand, pretreatment with tunicamycin increased cell death of bisantrene treated cells (Figure 3B). The same pattern was not observed for the other inhibitors. In order to understand how tunicamycin is acting in cells resists we did a ABCC1 activity assay. Interestingly, it was observed that tunicamycin was more efficient in sensitizing HL60/MX1 to bisantrene treatment than ABCC1 blocker MK571 (Table 2).

4 Discussion

Cancer is a public health problem because not rarely patients develop resistance to therapy. Neoplastic cells that escape the induction therapy is one of the main causes of relapse. Those cells that are more adapted or resistant to treatment resulting in relapsing disease often associated with poor prognosis (Stäubert, 2015). Since the development of drug resistance remains a major obstacle to the successful chemotherapy, various agents have been targets in the search for multidrug resistance inhibitor drug (MDR), or new strategies that block its activity (Foroughinia et al 2008).

Our study used two therapeutic approaches to sensitize resistant cells to treatment with topoisomerase inhibitors. In the first NB-DNJ it was administered simultaneously with the glycosylation inhibitor. There was no sensitizing effect in time and at the doses tested. The action of NB-DNJ can be dependent on the type of neoplastic cell. In brain cancer cell lines, EPEN and CT-2A, NB-DNJ had inhibitory effect both in vitro and in vivo. The drug reduced to 50% of the cells in EPEN, and 48% for CT-2A in vitro, without affecting the viability of normal cells. But the in vivo effect was 55% for EPEN and 72% for CT-2A. NB-DNJ also shows the effect of ganglioside lines EPEN and CT-2A, decreasing by 56% and 39% respectively (Ranes et al, 2001). With high power depletion gangliosides in neuroblastoma cell lines, NB-DNJ can depletion approximately 85% of ganglioside GM1 type (Dijkhuis et al, 2006).

Our second approach was based on therapeutic pretreatment of cells with tunicamycin resistant. Tunicamycin is a natural antibiotic capable of inducing apoptosis via endoplasmic reticulum stress (Varki et al. 2009; Molinari et al. 2002). Our results of cell death and ABCC1 activity show that tunicamycin was able to sensitize HL60/MX1 cells to treatment with etoposide. Many studies on literature show the sensitizing effect of tunicamycin on different tumor types like breast cancer and Leukemia (Han et al, 2015 and Huang et al, 2009). In an in vivo study, Mihailidou and colleagues (2015) showed that acute treatment with tunicamycin in

mice induces the protein unfold response and suppresses of p21 with anti-apoptotic activity. In this study it was observed that the tunicamycin sensitized heterotopic xenograft models of liver and lung cancer to treatment with doxorubicin. Our studies need to be repeated to confirm reproducibility. Furthermore the pretreatment assay with NB-DBJ and simultaneously treatment with tunicamycin are underway.

5 Conflicting Interests

The authors declare that there are no conflicts of interest.

6 Acknowledgments

The authors are thankful to CNPq (Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico, Brasil), the CAPES (Fundação Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Ensino Superior), the INCT_IF (Instituto Nacional de Ciência e Tecnologia para Inovação Farmacêutica) for their support of the joint research program.

7 References

Barth BM1, Shanmugavelandy SS, Tzelosky DM, Kester M, Morad SA, Cabot MC. Gaucher's disease and cancer: a sphingolipid perspective. *Crit Rev Oncog*. 2013;18(3):221-34.

Bartholomae S, Gruhn B, Debatin K-M, Zimmermann M, Creutzig U, Reinhardt D, Steinbach D. Coexpression of Multiple ABC-Transporters is Strongly Associated with Treatment Response in Childhood Acute Myeloid Leukemia 2016; 63(2): 242-247.

Bodet-Milin C et al. Radioimmunotherapy for treatment of acute leukemia, *Semin Nucl Med*, 2016; 46: 135-146.

Butters TD, Dwek RA, Platt FM. Imino sugar inhibitors for treating the lysosomal glycosphingolipidoses. *Glycobiology*. 2005 Oct;15(10):43R-52R.

Dijkhuis, Anne-Jan, Karin Klappe, Willem Kamps, Hannie Sietsma, and Jan Willem Kok1. Gangliosides do not affect ABC transporter function in human neuroblastoma cells. *Journal of Lipid Research* Volume 47, 2006.

Foroughinia F, Javidnia K, Amirghofran Z, Mehdipour A, Miri R. Design and synthesis of new symmetrical derivatives of dihydropyridine containing a pyridyl group on the 3, 5-positions and

evaluation of their cytotoxic and multidrug resistance reversal activity. *J Pharm Pharmacol*. 2008 Nov;60(11):1481-9.

Fuster MM, Esko JD. The sweet and sour of cancer: glycans as novel therapeutic targets. *Nat Rev Cancer*, v. 5, n. 7, p. 526-542, 2005.

Gromicho M, Rueff J, Rodrigues AS. Dynamics of Expression of Drug Transporters: Methods for Appraisal 2016; 1395: 75-85.

Han X, Zhang X, Li H, Huang S, Zhang S, Wang F, Shi Y. Tunicamycin enhances the antitumor activity of trastuzumab on breast cancer in vitro and in vivo. *Oncotarget*. 2015 Nov 17;6(36):38912-25. doi: 10.18632/oncotarget.5334

Hiss DC¹, Gabriels GA, Folb PI. Combination of tunicamycin with anticancer drugs synergistically enhances their toxicity in multidrug-resistant human ovarian cystadenocarcinoma cells. *Cancer Cell Int*. 2007 Apr 18;7:5.

Huang WC¹, Lin YS, Chen CL, Wang CY, Chiu WH, Lin CF. Glycogen synthase kinase-3 β mediates endoplasmic reticulum stress-induced lysosomal apoptosis in leukemia. *J Pharmacol Exp Ther*. 2009 May;329(2):524-31

Kolter T, Sandhoff K. Principles of lysosomal membrane digestion: stimulation of sphingolipid degradation by sphingolipid activator proteins and anionic lysosomal lipids. *Annu Rev Cell Dev Biol*. 2005;21:81-103.

Kramer R, Weber TK, Arceci R, Ramchurren N, Kastriakis WV, Steele G Jr, Summerhayes IC. Inhibition of N-linked glycosylation of P-glycoprotein by tunicamycin results in a reduced multidrug resistance phenotype. *Br J Cancer*. 1995 Apr;71(4):670-5.

Ma JJ, Chen Y, Yu L. Research Progress on Drug-resistance of Acute Lymphoblastic Leukemia. *Journal of Experimental Hematology* 2016; 24(1): 261-265.

Mihailidou C, Chatzistamou I, Papavassiliou AG, Kiaris H. Improvement of chemotherapeutic drug efficacy by endoplasmic reticulum stress. *Endocr Relat Cancer*. 2015 Apr;22(2):229-38. doi: 10.1530/ERC-15-0019. Epub 2015 Feb 10.

Molinari A, Calcabrini A, Meschini S, Stringaro A, Crateri P, Toccaceli L, Marra M, Colone M, Cianfriglia M, Arancia G. Subcellular detection and localization of the drug transporter P-glycoprotein in cultured tumor cells. *Curr Protein Pept Sci*, v. 3, n.6, p.653-670, 2002.

Price NP, Tsvetanova B. Biosynthesis of the tunicamycins: a review. *J Antibiot (Tokyo)*. 2007 Aug;60(8):485-91.

Ranes MK1, El-Abbadi M, Manfredi MG, Mukherjee P, Platt FM, Seyfried TN. N - butyldeoxynojirimycin reduces growth and ganglioside content of experimental mouse brain tumours. *Br J Cancer*. 2001 Apr 20;84(8):1107-14.

Siegel RL, Miller KD, Jemal A. Cancer Statistics, 2016. *CA Cancer J Clin* 2016; 66: 7-30.

Stäubert C, Bhuiyan H, Lindahl A, Broom OJ, Zhu Y, Islam S, Linnarsson S, Lehtiö J, Nordström A. Rewired metabolism in drug-resistant leukemia cells: a metabolic switch hallmarked by reduced dependence on exogenous glutamine. *J Biol Chem*. 2015 Mar 27;290(13):8348-59.

Varki A, Kannagi R, Toole BP. Glycosylation Changes in Cancer. In: Varki A, Cummings RD, Esko JD, Freeze HH, Stanley P, Bertozzi CR, Hart GW, Etzler ME, editors. *Essentials of Glycobiology*. 2a ed. New York: Cold Spring Harbor Laboratory Press, cap. 44, 2009

Wojtowicz K, Szaflarski W, Januchowski R, Zawierucha P, Nowicki M, Zabel M. Inhibitors of N-glycosylation as a potential tool for analysis of the mechanism of action and cellular localisation of glycoprotein P. *Acta Biochim Pol*. 2012;59(4):445-50

Table 01: Concentration of a topoisomerase inhibitors that is required for 50% inhibition in vitro of HL60/MX1 cells.

	IC ₅₀ (μM) – HL60-MX1	
Etoposide	6,55±1,12	μM
Amsacrine	3,02	μM
Bisantrene	1,23±0,057	μM
Camptotecin	0,030±0,0016	μM

Table 02: Percentage of HL60/MX1 death cells and in the phases of the cell cycle after treatment with tunicamycin, etoposide, amsacrine, and preincubated with or not MK571. The results represent the mean and standard deviation of two experiments conducted independently.

Condition	Death cells (%)	subG0 (%)	G0/G1	
			(%)	S/G2/M (%)
NT	7,5(± 0,42)	7,7 (± 0,84)	54,4(±4,80)	37,8(±4,52)
TUNICA	8,05 (± 4,87)	8,8 (±3,11)	57,35 (±4,73)	33,9(±7,35)
MK571	16,55 (± 3,88)	17,6 (± 2,96)	58,1(±8,06)	24,1(±6,78)
TUNICA+ETOP	35,25(±41,79	18,675(±17,78		31,075(±7,88
O	)	)	49,37(±26,20)	)
MK571 +		20,975(±24,14	60,395(±21,92	19,205(±1,13
ETOPO	5,8 (±2,26)	)	)	)
TUNICA +	31,75(±35,70			
AMSA	)	32,5(± 35,77)	56,55(±21,70)	10,6(±13,29)
	45,75 (±			13,67(±10,28
MK571 + AMSA	5,58)	40,88(±0,73)	44,77(±11,63)	)

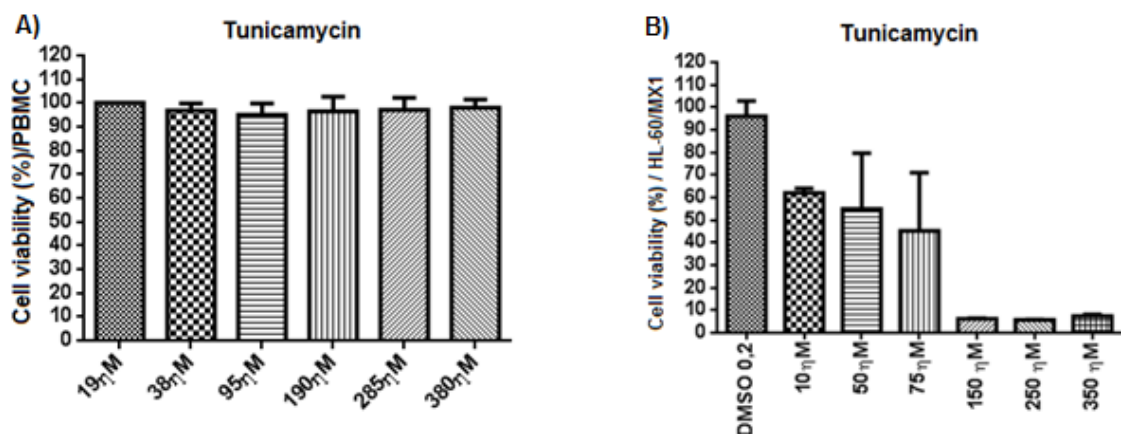


Figure 1. Effects of Tunicamycin on cell viability of peripheral blood mononuclear cells (A) and HL-60/MX1 (B) cell line.

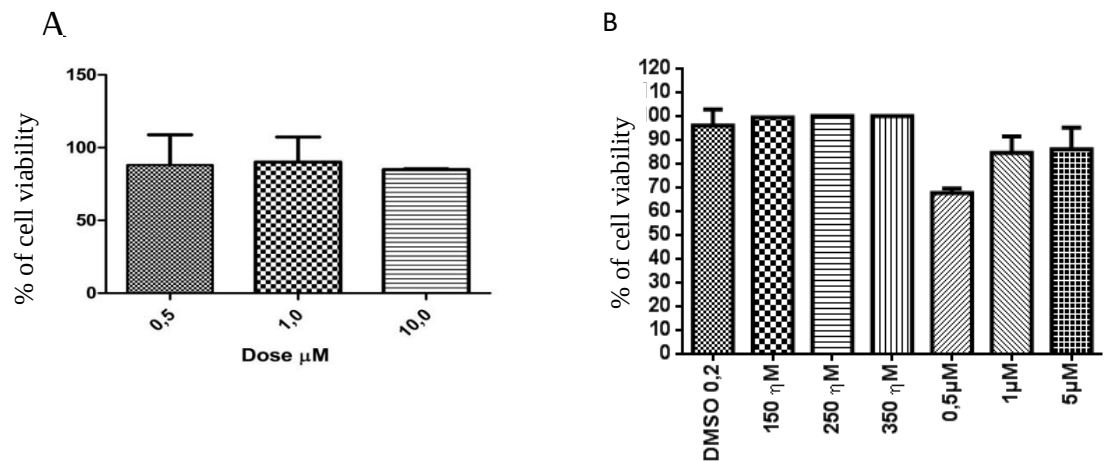


Figure 2. Effects of NB-DNJ on cell viability of peripheral blood mononuclear cells (A) and HL-60/MX1 cell line (B).

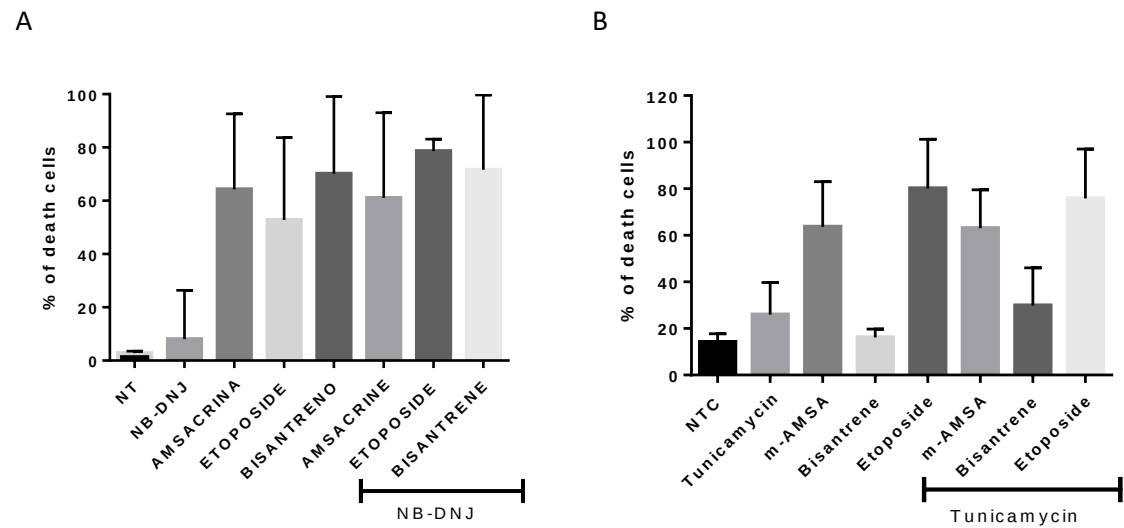


Figure 3. Effects Concomitant administration of NB-DNJ with topoisoemerase inhibitors (A) and 24h pretreatment of tunicamycin followed by topoisoemerase inhibitors for more 48h (B) on HL-60/MX1 cell line.

6. DISCUSSÃO GERAL

Este trabalho originou dois artigos utilizando cinco derivados tiofênicos e dois inibidores de N-glicosilação. No primeiro artigo nos propomos a avaliar se a linhagem HL60-MX1 apresentava atividade dos transportadores ABCB1 e ABCC1, como também identificar se um dos derivados tiofênicos era substrato desses transportados, influenciando ou não na sua atividade anticâncer.

A partir do conhecimento da grande capacidade adaptativa e resistência ao tratamento, nos propomos a utilizar inibidores de N-glicosilação, um processo importantíssimo para progressão do câncer, como estratégia na tentativa de melhorar a atividade dos agentes quimioterápicos inibidores de topoisomerase, como também dos derivados tiofênicos.

A princípio avaliamos a atividade antineoplásica *in vitro* de cinco derivados de 2-amino-tiofeno (SB-30, SB-44, SB-68, SB-83 e SB-200) em células resistentes de leucemia aguda. Os compostos estudados foram previamente sintetizados e demonstraram potencial para tratamento de micoses (Merck et al., 2011), infecções microbianas (Scotti et al., 2014) e distúrbios no SNC (Fortes et al., 2013).

Existe uma necessidade constante em desenvolver novos agentes mais efetivos e menos tóxicos, pois os agentes quimioterápicos utilizados atualmente agredem o sistema fisiológico como um todo, configurados com baixa seletividade. (Narasimhan et al., 2015). Três dos derivados utilizados, SB-83, SB-200 e SB-44, apresentaram efetiva atividade citotóxica na linhagem HL/60MX1. Os derivados SB-30 e SB-68 não tiveram atividade na linhagem estudada.

A atividade antineoplásicos dos derivados do tiofeno já foram relatados, incluindo citotoxicidade em leucemia de tipo distinto, como HL-60 (leucemia aguda), Jurkat (leucemia aguda de células T), K562 (leucemia mielóide crônica) e Molt-4 (leucemia linfoblástica aguda) (Romagnoli et al., 2010, Romagnoli et al., 2014).

Romagnoli e colaboradores (2016) também sintetizaram alguns novos derivados de tiofeno capazes de inibir STAT5 (Signal Transducer e Activator of Transcription 5), uma proteína importante que está envolvida na progressão da leucemia mielóide aguda. Portanto, os derivados de tiofeno demonstram potencial para o desenvolvimento de novas terapias contra a leucemia.

Para elucidar por qual mecanismo de ação os derivados SB-44, SB-83 e SB-200 induzem as células a morte, os resultados indicaram que estes derivados não são capazes de afetar a progressão do ciclo celular ou a percentagem de células em necrose como também não

alteram a expressão de caspase-3/7, indicando portanto que outros mecanismos de morte além da necrose e apoptose são ativados após o tratamento. Os SB-83 e SB-200 exibiram atividade inibidora de Topoisomerase II, reduzindo significativamente os níveis de DNA relaxados quando comparados com o veículo controle (DMSO 0,2%).

Enzimas Topoisomerases II são nucleares e desempenham papel essencial em vários processos genéticos, incluindo a replicação do DNA (Nitiss, 2009). Eles têm sido alvos principais para agentes medicinais e quimioterápicos desde a identificação da Amsacrina em 1984 (Vann et al., 2016). Os agentes antineoplásicos atuais, tais como o etoposido e a doxorubicina, utilizados no tratamento de diferentes tipos de câncer (incluindo malignidades hematológicas) têm topoisomerase II como alvo molecular (Larsen et al., 2003). Alguns deles podem sensibilizar células cancerosas para mortes de células não apoptóticas, como a necroptose (Moriwaki et al., 2015).

Proteínas transportadoras são sobre expressas na maioria das linhagens de células resistentes, o que resulta em maior transporte do fármaco anticâncer para o exterior da célula, gerando maior resistência a quimioterapia (Gromicho et al., 2016). Como visto o ABCC1 é um membro importante e bem conhecido da família de transportadores ABC que codifica MRP1 (proteína de resistência a múltiplos fármacos 1) (Cole, 2014). MRP1 transporta uma vasta gama de agentes terapêuticos, bem como diversos substratos fisiológicos e desempenha um papel importante no desenvolvimento da resistência aos medicamentos (Munoz et al., 2007).

Nossos resultados indicam que a resistência aos fármacos observada em HL-60 / MX1 pode estar relacionada com a atividade do transportador ABCC1, pois esse mesmo transportador não foi detectado na linha HL-60 tida como não resistente. Confirmando esse fato, após tratamento com SB-44 e MK571 (um inibidor do transportador ABCC1) a morte celular aumentou significativamente, quando comparado com células tratadas apenas com SB-44, indicando que o transportador ABCC1 está envolvido no efluxo do composto. A expressão do transportador ABCC1 foi registrada numa gama de cânceres sólidos e hematológicos e, em alguns casos, está correlacionada com uma resposta negativa ao tratamento e ao resultado da doença (Deeley & Cole, 2006).

Em contrapartida ao ocorrido com o SB-44 o tratamento com MK571 não alterou a resposta SB-200 e 83 em HL-60 / MX1, provavelmente a sua atividade citotóxica não é afetada pela ativação de ABCC1. Assim, estes derivados são candidatos interessantes para o tratamento de cancros resistentes que expressam transportador ABCC1, evitando este mecanismo relacionado com a resistência.

Dada a grande importância do câncer como um problema de saúde mundial, a pesquisa em torno desse eixo não se resume a desenvolvimento de novos fármacos, como também da necessidade de novas abordagens terapêuticas.

Nosso estudo utilizou duas abordagens terapêuticas para sensibilizar as células resistentes ao tratamento com inibidores da topoisomerase. No primeiro, o NB-DNJ administrou-se simultaneamente com o inibidor de topoisomerase. Não houve efeito sensibilizante no tempo e nas doses testadas. A ação de NB-DNJ pode ser dependente do tipo de célula neoplásica. O NB-DNJ mostra atividade anticâncer nas linhagens EPEN e CT-2A, diminuindo em 56% e 39% respectivamente (Ranes et al, 2001). Atuando na depleção de gangliosídeos em linhagens celulares de neuroblastoma, o NB-DNJ pode esgotar aproximadamente 85% do tipo gangliosídeo GM1 (Dijkhuis et al, 2006).

Nossa segunda abordagem foi baseada no pré-tratamento terapêutico de células com tunicamicina na linhagem HL60/MX1. A tunicamicina é um antibiótico natural capaz de induzir a apoptose através do estresse do retículo endoplasmático (Varki et al 2009, Molinari et al., 2002). Nossos resultados de morte celular e atividade de ABCC1 mostram que a tunicamicina foi capaz de sensibilizar células HL60 / MX1 ao tratamento com etoposide. Muitos estudos na literatura apresentam o efeito sensibilizante da tunicamicina sobre diferentes tipos de tumor como câncer de mama e leucemia, essa atividade sensibilizante se dá através da inibição do processo de N-glicosilação e essas células respondem ao tratamento com quimioterápico (Han et al, 2015 e Huang et al, 2009).

Em um estudo in vivo, Mihailidou et al. (2015) mostraram que o tratamento com tunicamicina em camundongos induz a resposta da proteína desdobrada e suprime a p21 com atividade anti-apoptótica. Neste estudo foi observado que a tunicamicina sensibilizou os modelos de xenoinxerto heterotópico de câncer de fígado e pulmão para o tratamento com doxorubicina. Nossos estudos precisam ser repetidos para confirmar a reprodutibilidade. Além disso, o ensaio de pré-tratamento com NB-DNJ e tratamento simultâneo com tunicamicina estão em curso.

7 CONCLUSÕES

- Foram encontrados dois derivados com promissora atividade antineoplásica LPSF/SB200 e LPSF/SB83;
- O índice de seletividade do LPSF/SB200 foi de 3,61 vezes mais citotóxico a linhagem HL60-MX1 do que ao controle normal (PBMCs); e o LPSF/SB83 apresentou padrão de seletividade ainda maior, de 4,25 vezes mais citotóxico a linhagem tumoral, HL60-MX1, do que ao controle normal.
- Para os ensaios de inibição da N-glicosilação foram estabelecidas a concentração de 30 η M para tunicamicina e 1 μ M para o miglustat.
- A pré-tratamento com tunicamicina influenciou no aumento da atividade do bisantreno frente à linhagem HL60-MX1.
- Nos ensaios de caracterização para os transportadores ABC a linhagem HL60-MX1, indicou atividade para o transportador ABCC1, que possivelmente é um de seus mecanismos de resistência.
- Dos três novos derivados tiofênicos, o LPSF/SB44 foi o único que demonstrou ser substrato do transportador ABCC1, os derivados LPSF/SB200 e LPSF/SB83 não indicaram sofrer influência quando a atividade desse transportador foi modulada.

REFERÊNCIAS

Aebi M, Bernasconi R, Clerc S, Molinari M. N-glycan structures: recognition and processing in the ER. **Trends Biochem Sci**, v. 35, n. 2, p. 74-82, 2010.

Afarinkia, K.; Bhahar, A. A.Recentadvanceds In The Chemistry Of Azapyranose Sugars. **Tetrahedron:Assymmetry**, v. 16, N.7, p. 1239-1287, 2005.

ALMEIDA, R.N.; Oliveira, T. M. L. Triagem farmacológica comportamental. **Psicofarmacologia: fundamentos práticos**, 1ª ED. Rio de Janeiro: Guanabara koogan. Cap. 11, 2006, p. 131-137.

Almeida, V.L.; Leitão, A.; Reina, L.C.B.; Montanari, C.A.; Donnici, C.L. Câncer e agentes antineoplásicos ciclo-celular específicos e ciclo-celular não específicos que interagem com o DNA: uma introdução. **Química nova**, v. 28, n. 1, 2005, p. 118-129.

Andresen L, Skovbakke SL, Persson G, Hagemann-Jensen M, Hansen KA, Jensen H, Skov S., 2-Deoxy d-glucose prevents cell surface expression of NKG2D ligands through inhibition of n-linked glycosylation. **J Immunol**, n. 188, n. 4, p. 1847–1855, 2012.

Asano, N., Nash, R.J., Molyneux, R.J., And Fleet, G.W.J. Sugarmimic Glycosidase Inhibitors: Natural Occurrence, Biological Activityand Prospects For Therapeutic Application.Tetrahedron: **Asymmetry**, v. 11, p. 1645-1680, 2000.

Banerjee A, Lang Jy, Hung Mc, Sengupta K, Banerjee Sk, Baksi K, Et Al. Unfolded Protein Response Is Required In Nu/Nu Mice Microvasculature Fortreating Breast Tumor With Tunicamycin. **J Biolchem**, v. 19 n. 286, p. 29127-29138, 2011.

Barros, F. W. A. Silva, T. G. Galdino-Pitta, M. R. Bezerra, D. P. Costa-Lotufo, L. V. Moraes, M. O, Pessoa, C. Moura, M. A. F. B. Abreu, F. C. Lima, M. C. A. Galdino, S. L. Pitta, I. R. Goulart, M. O. F. Synthesis and cytotoxic activity of new acridine-thiazolidine derivatives. **Bioorganic & Medicinal Chemistry**, v. 20, n.11, p. 3533 – 3539, 2012.

Bender, Eric Developing world: Global warning. **Nature**, v. 509 n. 7502, p. S64-S65, 2014.

Beretta GI, Benedetti V, Cossa G, Assaraf YG, Bram E, Gatti L, Et Al. Increased levels And Defective Glycosylation Of Mrps In Ovarian Carcinoma Cells Resistant To Oxaliplatin. **Biochempharmacol**, v. 79, p. 1108–1117, 2010.

Bernales S, McDonald KL, Walter P. Autophagy counterbalances endoplasmic reticulum expansion during the unfolded protein response. **PLoS Biol**, n. 4, p. 12, 2006.

Bézivin C, Tomasi S, Lohézic-Le Dévéhat F, Boustie J. Cytotoxic activity of some lichen extracts on murine and human cancer cell lines. **Phytomedicine**. v. 10, n.7, p.499-503, 2003.

Bhowmick NA, Neilson EG, Moses HL. Stromal fibroblasts in cancer initiation and progression. **Nature**. v. 432, n.7015, p.332-337, 2004.

Boyce M, Yuan J. Cellular response to endoplasmic reticulum stress: a matter of life or death. **Cell Death Differ**, v. 13, n. 3, p. 363-73, 2006.

Breier, A.; Gibalova, L.; Seres, M. et al. New Insight into P-Glycoprotein as a Drug Target. **Anti-Cancer Agents in Medicinal Chemistry**, 13: 159-170, 2013.

Brown Jr, Crawford Be, Esko Jd. Glycan Antagonists And Inhibitors: A Fount For Drug Discovery. **Crit Rev Biochemmolbiol**, v. 42, n. 6, p. 481-515, 2007.

C.F. Higgins, ABC transporters: from microorganisms to man, Annu. **Rev. Cell Biol**. V. 8, p. 67–113, 1992.

CAZÉ MO, BUENO D, SANTOS MEF. Estudo referencial de um protocolo quimioterápico para leucemia linfocítica aguda infantil. **Rev HCPA**, 30(1):5-12, 2010.

Chen L, Li Y, Yu H,. Computational models for predicting substrates or inhibitors of P-glycoprotein. **Drug Discov Today**, v. 17, p. 343-351, 2012.

Cheng N, Chytil A, Shyr Y, Joly A, Moses HL. Transforming growth factor-beta signaling-deficient fibroblasts enhance hepatocyte growth factor signaling in mammary carcinoma cells to promote scattering and invasion. **Mol Cancer Res.** 2008 v.6, n. 10, p. 1521-1533.

Contessa Jn, Bhojani Ms, Freeze Hh, Ross Bd, Rehemtulla A, Lawrence Ts. Molecular Imaging Of N-Linked Glycosylation Suggests Glycan Biosynthesis Is a Novel Target For Cancer Therapy. **Clin Cancer Res** v.16, n. 12 p. 3205–3214, 2010.

Crnkovic,P.M; Polito, L.M.; Filho, C.G.S; Milioli,F.E; Pagliuso, J.D. O Efeito Da Granulometria Na Decrepitação Durante A Decomposição Térmica De Calcários E Carvão. **Química. Nova**, v. 27, n.1, 2004.

Da Rocha Junior LF, Rêgo MJ, Cavalcanti MB, Pereira MC, Pitta MG, de Oliveira PS, Gonçalves SM, Duarte AL, de Lima Mdo C, Pitta Ida R, Pitta MG. Synthesis of a novel thiazolidinedione and evaluation of its modulatory effect on IFN- γ , IL-6, IL-17A, and IL-22 production in PBMCs from rheumatoid arthritis patients. **Biomed Res Int**, 2013.

Dalemagne, P.; Khanh, L.P.; Alsai''di, A.; Varlet, I.; Collot, V.; Paille, M.Bureau, R .; Rault, S. Synthesis And Biological Evaluation Of Five-Membered Heterocycles Fused To Cyclopenta[C]Thiopene As New Antitumor Agents. **Bioorganic & Medicinal Chemistry**, v. 11, p. 1161-1167, 2003.

Dalziel M, Crispin M, Scanlan Cn, Zitzmann N, Dwek Ra. Emerging Principles For the Therapeutic Exploitation Of Glycosylation. **Science**, v.24, n. 6166, p. 343-370, 2014.

De Oliveira, Luciana Maria Dorneles. Resposta diferencial ao estresse de retículo endoplasmático em modelo de melanoma murino: **implicações para quimiossensibilização**. São Paulo, 2010. 89p. Mestrado (Dissertação de mestrado em oncologia) - Fundação de Amparo à Pesquisa do estado de São Paulo, São Paulo, SP, 2010.

De Oliveira, Tiago Bento. **Novas Tiazolidinadionas**: Síntese, caracterização estrutural, modelagem molecular e avaliação da Atividade antiinflamatória. Pernambuco, 2010. 80p. Mestrado (Dissertação de mestrado em ciências farmacêuticas) - Universidade Federal de Pernambuco – Recife, PE, UFPE, 2010.

Del Vecchio L, Brando B, Lanza F, Ortolani C, Pizzolo G, Semenzato G, Basso G. Recommended reporting format for flow cytometry diagnosis of acute leukemia. **Haematologica**. 2004;89:594-8.

Fan L, Song B, Sun G, Ma T, Zhong F, Wei W. Endoplasmic reticulum stress-induced resistance to doxorubicin is reversed by paeonol treatment in human hepatocellular carcinoma cells. **PLoS One**, v. 8, n. 5, 2013.

Ferlay J, Soerjomataram I, Dikshit R, Eser S, Mathers C, Rebelo M, Parkin DM, Forman D, Bray F. Cancer incidence and mortality worldwide: sources, methods and major patterns in Globocan 2012. **Int J Cancer**. v. 136, n. 5, p. E359-E386, 2015.

Fuster MM, Esko JD. The sweet and sour of cancer: glycans as novel therapeutic targets. **Nat Rev Cancer**, v. 5, n. 7, p. 526-542, 2005.

Guerrea, M. And Ladisch, S. N-Butyldeoxynojirimycin Inhibits Murine Melanoma Cell Ganglioside Metabolism And Delays Tumor Onset. **Cancer Lett**, v. 201, p. 31- 40, 2003.
GUSTERSON, B. A.; STEIN, T. Human breast development. *Seminars in Cell and Developmental Biology* v. 23, n. 5, p. 567–573 , 2012.

Hanahan D, Weinberg RA. The hallmarks of cancer. **Cell**. v. 100, n. 1, p. 57-70, 2000.

Healy Sj, Gorman Am, Mousavi-Shafaei P, Gupta S, Samali A. Targeting Theendoplasmic Reticulum-Stress Response As An Anticancer Strategy. **Eurjpharmacol**, v. 625, n. 3 p. 234-246, 2009.

Hegedus T, Orfi L, Seprodi A, Varadi A, Sarkadi B, Keri G. Interaction of tyrosine kinase inhibitors with the human multidrug transporter proteins, MDR1 and MRP1. **Biochim Biophys Acta**, v. 1587. p. 318–325, 2002.

Hileman EO, Liu J, Albitar M, Keating MJ, Huang P. Intrinsic oxidative stress in cancer cells: a biochemical basis for therapeutic selectivity. **Cancer Chemother Pharmacol**, v. 53, n. 3, p. 209-219, 2004.

Hiss D, Gabriels G, Jacobs P, Folb P. Tunicamycin Potentiates Drug Cytotoxicity and Vincristine Retention In Multidrug Resistant Cell Lines. **Eur J Cancer**, v. 32, p. 2164-2172, 1996.

Hou H, Sun H, Lu P, Ge C, Zhang L, Li H, Zhao F, Tian H, Zhang L, Chen T, Yao M, Li J. Tunicamycin potentiates cisplatin anticancer efficacy through the DPAGT1/Akt/ABCG2 pathway in mouse Xenograft models of human hepatocellular carcinoma. **Mol Cancer Ther**, v. 12, n. 12, p. 2874-2884, 2013.

Hsu JI, Chiang PC, Guh JH. Tunicamycin Induces Resistance To Camptothecin and Etoposide In Human Hepatocellular Carcinoma Cells: Role Of Cell-Cycle Arrest And Grp78. **Naunyn-Schmiedeberg's Arch Pharmacol**, v. 380, n. 5, p. 373-382, 2009.

J. Kang, J.-U. Hwang, M. Lee, Y.-Y. Kim, S.M. Assmann, E. Martinoia, Y. Lee, PDR-type ABC transporter mediates cellular uptake of the phytohormone abscisic acid, **Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.** v.107, p. 2355–2360, 2010.

Jones, J., Krag, S.S., and Betenbaugh, M.J. Controlling N-linked glycan site occupancy. **Biochim. Biophys Acta**, v.1726, n. 2, p.121–137, 2005.

Kadowaki, H.; Nishitoh, H.; Ichijo, H. Survival and apoptosis signals in ER stress: the role of protein kinases. **J. Chem. Neuroanat.**, v. 28, n. 1-2, p. 93-100, 2004.

Kean, E.L., And Wei, Z. Stimulation As Well As Inhibition By Antibiotics Of The Formation Of GlcNAc-Lipids Of The Dolichol Pathway. **Glycoconj J** v.15, n.4, p. 405- 414, 1998.

Kelleher DJ, Gilmore R. An Evolving View Of The Eukaryotic Oligosaccharyltransferase. **Glycobiology**, n. 16, n. 4, p. 47r-62r, 2006.

Kerb R. Implications of genetic polymorphisms in drug transporters for pharmacotherapy. **Cancer Lett**, v. 234. p. 4-33, 2006.

KOJIMA N, SUGA Y, MATSUMOTO T, et al. Synthesis of dansyl-labeled probe of thiophene analogue of annonaceous acetogenins for visualization of cell distribution and growth inhibitory

activity toward human cancer cell lines. **Bioorganic & Medicinal Chemistry**. 23, 1276-1283, 2015.

Kramer R, Weber TK, Arceci R, Ramchurren N, Kastrinakis WV, Steele G Jr, Summerhayes IC. Inhibition of N-linked glycosylation of P glycoprotein by tunicamycin results in a reduced multidrug resistance phenotype. **Br J Cancer**, v. 71 n. 4,p. 670-675, 1995.

Kyotaka Muta, Tatsukifukami, Miki Nakajima, Tsuyoshi Yokoi, N-Glycosylation During Translation Is Essential For Human Arylacetamide Deacetylase Enzyme Activity. **Biochemical Pharmacology**, v. 87, n. 2, p. 352-359, 2014.

Lage H. An overview of cancer multidrug resistance: a still unsolved problem. **Cell Mol Life Sci**, v. 65, n. 20, p. 3145-3167, 2008.

Lee Js, Zheng Z, Mendez R, Ha Sw, Xie Y, Zhang K. Pharmacologic Er Stressinduces Non-Alcoholic Steatohepatitis In An Animal Model. **Toxicol Lett**, v. 21, p. 29–38, 2012.

Lee, K., Tirasophon, W., Shen, X., Michalak, M., Prywes, R., Okada, T., Ire1-Mediated Unconventional Mrna Splicing And S2p-Mediated Atf6 Cleavage Merge To Regulate Xbp1 In Signaling The Unfolded Protein Response. **Genes Dev**, n. 16, p. 452–466, 2002.

Lemmon MA, Schlessinger J. Cell signaling by receptor tyrosine kinases. **Cell**, v. 141, n.7, p. 1117-1134, 2010.

Lu PD, Jousse C, Marciniak SJ, Zhang Y, Novoa I, Scheuner D, Kaufman RJ, Ron D, Harding HP. Cytoprotection by pre-emptive conditional phosphorylation of translation initiation factor 2. **Embo J**. v. 23n. 1, p. 169-179, 2004.

M. R. Wormald, R. A. Dwek, Glycoproteins: Glycan Presentationand Protein-Fold Stability. **Structure**, v. 7, n. 99, p. R155 – R160, 1999.

Malhotra JD, Kaufman RJ. The endoplasmic reticulum and the unfolded protein response. **Semin Cell Dev Biol**, v. 18, n. 6, p.716-731. 2007

Mandic, A., Hansson, J., Linder, S., Shoshan, M.C. Cisplatin Induces Endoplasmic Reticulum Stress And Nucleus-Independent Apoptotic Signaling. **J. Biol. Chem**, v. 278, n.11, p. 9100–9106, 2003.

Margl, L., Tei, A., Gyurján, I., Wink, Z.M. Glc And Glc-Ms Analysis Of Thiophene Derivatives In Plants And In Vitro Cultures Of *Tagetespatula* L. (Asteraceae). **Naturforsch**, v. 57, p. 63, 2002.

Melo, J.O.F.; Donnici, C.L.;Augusti, R.; Ferreira, V.F. 1.2.3-Triazolic Heterocycles: History, Preparations, Applications And Pharmacological Activities. **Química Nova**, v. 29, n. 3, p. 569-579, 2006.

Mizushima N, Yoshimori T, Ohsumi Y. The role of Atg proteins in autophagosome formation. **Annu Rev Cell Dev Biol**, n. 27, p. 107-132, 2011.

Molinari A, Calcabrini A, Meschini S, Stringaro A, Crateri P, Toccaceli L, Marra M, Colone M, Cianfriglia M, Arancia G. Subcellular detection and localization of the drug transporter P-glycoprotein in cultured tumor cells. **Curr Protein Pept Sci**, v. 3, n.6, p.653-670, 2002.

Mori K. Tripartite management of unfolded proteins in the endoplasmic reticulum. **Cell**, v. 101, n. 5, p. 451-454, 2000.

MOUKHARSKAYA, J., VERSCHRAEGEN, C. Topoisomerase 1 inhibitors and cancer therapy. **Hematol. Oncol. Clin.** North Am. 26, 507–525. 2012.

NARASIMHAN K, LEE YM, LIM TK. Genistein exerts anti-leukemic effects on genetically diferente acute myeloid leukemia cell lines by inhibiting protein synthesis and cell proliferation while inducing apoptosis – molecular insights from an iTRAQ™ quantitative proteomics study. **Oncoscience**. 2(2), 111-124, 2015

Noda, S. Fujieda, M. Seki, N. Tanaka, H. Sunaga, T. Ohtsubo, H. Tsuzuki, G-K Fan And H. Saito. Inhibition of N-linked glycosylation by tunicamycin enhances sensitivity to cisplatin in human head-and-neck carcinoma cells. **International Journal of Cancer**, v. 80, n. 2, p. 279-284, 1999.

Nothaft H, Scott Ne, Vinogradov E, Liu X, Hu R, Beadle B, Fodor C, Miller Wg, Li J, Cordwell Sj, Szymanski Cm. Diversity In The Protein N-Glycosylation pathways Within The Campylobacter Genus. **Mol Cell Proteomics**, v. 11, p. 1203-1219, 2012.

Opdenakker G, Rudd Pm, Ponting Cp, Dwek Ra Concepts And Principles Of Glycobiology. **Faseb J**, v. 7, n. 14, p. 1330–1337, 1993.

P. Ferreira, J. L. F. da Silva, M. T. Duarte, M. F. M. da Piedade, M. P. Robalo, S. G. Harjivan, C. Marzano, V. Gandin, and M. M. Marques. Synthesis and Characterization of New Organometallic Benzo[b]thiophene Derivatives with Potential Antitumor Properties. **Organometallics**, v. 28, n. 18, 5412-5423, 2009.

Philip M, Rowley DA, Schreiber H. Inflammation as a tumor promoter in cancer induction. **Semin Cancer Biol**, v. 14, n. 6, p. 433-439, 2004.

Price, N. P. J; Tsvetanova, B. Biosynthesis of the Tunicamycins: A Review. **The Journal of Antibiotics**, 60: 485-491, 2007.

Quirino, M.W.L., Avaliação do efeito quimiossensibilizante e/ou aditivo da inibição de n-glicosilação em células de câncer tratadas com amsacrina: **Implicações da quimiossensibilização**. Pernambuco, 2014. 48p. Monografia (Monografia de graduação em biomedicina) - Universidade Federal de Pernambuco, Recife, PE, 2014.

Robert O'connor. The Pharmacology of Cancer Resistance. **Anticancer Research**, v. 27, p.1267-1272, 2007.

Romagnoli R.; Baraldi P.G.; Carrion M.D.; Cruz-Lopez O.; Tolomeo M.;Grimaudo S.; Di Cristina A.; Pipitone M.R.; Balzarini J.; Brancale A.;Hamel E. Substituted 2-(3',4',5'-trimethoxybenzoyl)-benzo[b]thiophene derivatives as potent tubulin polymerization inhibitors. **Bioorg Med Chem**, v. 14, p. 5114-5122, 2010.

Ron, D. & Walter, P. Signal Integration In The Endoplasmic Reticulum Unfolded Protein Response. **Nat. Rev. Mol. Cell Biol**, v. 8, n. 7, p. 519-529, 2007.

Rutkowski DT, Kaufman RJ. A trip to the ER: coping with stress. **Trends Cell Biol.** 2004, v. 14, n. 1, p. 20-28.

Saker, S.D.; Nahar, L. Compostos heterocíclicos e seus derivados. In: Química Para Estudantes De Farmácia: Química Geral, Orgânica E De Produtos Naturais, **Ed. Guanabara Koogan**, p.121-129, 2009.

Sandra JM Healy, Adrienne M Gorman, Parisa Mousavi-Shafaei, Sanjeev Gupta, Afshin Samali, Targeting the endoplasmic reticulum-stress response as an anticancer strategy. **European journal of pharmacology**, v. 625, n. (1-3), p. 234-246, 2009.

Schönthal Ah. Endoplasmic Reticulum Stress And Autophagy As Targets For Cancer Therapy. **Cancer Lett**, v. 275, n. 2 p.163–169, 2009.

Schönthal Ah. Pharmacological Targeting Of Endoplasmic Reticulum Stress Signaling In Cancer. **Biochempharmacol**, v. 85, n.5, p. 653-66, 2013.

Schwarz, F. and Aebersold M. Mechanisms and principles of N-linked protein glycosylation. **Current Opinion in Structural Biology**, v. 21, n. 5, p. 576-582, 2011.

Siegel, Rebecca L. Miller, Kimberly D. Jemal, Ahmedin. Cancer statistics, 2015. **CA: A Cancer Journal for Clinicians**, v. 65, n. 1, p. 1542-4863, 2015.

Silveira, N. A.; Arraes, S. M. A. A. A imunofenotipagem no diagnóstico diferencial das leucemias agudas: uma revisão. **Arq Mudi**, 12(1):5-14, 2008.

So, A.Y., De La Fuente, E., Walter, P., Shuman, M., Bernales, S. The Unfolded Proteinresponse During Prostate Cancer Development. **Cancer Metastasis Rev**, v. 28, n. 2, p. 219–223, 2009.

Stefani, H.A. Introdução À Química De Compostos Heterocíclicos, **Ed. Guanabara Koogan**, p. 66-74, 2009.

Sultana Saki, Truong Nhu Y., Vieira Douglas B., et al. Characterization of the Zebrafish Homolog of β -Glucosidase 2: A Target of the Drug Miglustat. **Zebrafish**. Doi:10.1089/zeb.2015.1152.2016.

Tabas I, Ron D. Integrating The Mechanisms Of Apoptosis Induced By Endoplasmicreticulum Stress. **Nat Cell Biol**, v.13, n.3, n. 184-190, 2011.

Tiwari AK, Sodani K, Dai CL, Ashby CR Jr. Chen ZS. Revisiting the ABCs of Multidrug Resistance in Cancer Chemotherapy. **Curr Pharm Biotechnol**, v. 12. p. 570-594, 2011.

Tsiftoglou AS, Pappas IS, Vizirianakis IS. Mechanisms involved in the induced differentiation of leukemia cells. **Pharmacol Ther**. v. 100, n. 3, p.257-290, 2003.

Urta H, Dufey E, Lisbona F, Rojas-Rivera D, Hetz C. When ER stress reaches a dead end. **Biochim Biophys Acta**, v. 1833, n. 12, p. 3507-3517, 2013.

V.G. Lewis, M.P. Ween, C.A. McDevitt, The role of ATPbinding cassette transporters in bacterial pathogenicity, **Protoplasma**, v. 249. p.919–942, 2012.

Varki A, Kannagi R, Toole BP. Glycosylation Changes in Cancer. In: Varki A, Cummings RD, Esko JD, Freeze HH, Stanley P, Bertozzi CR, Hart GW, Etzler ME, editors. **Essentials of Glycobiology**. 2a ed. New York: Cold Spring Harbor Laboratory Press, cap. 44, 2009

Wojtowicz K, Szaflarski W, Januchowski R, Zawierucha P, Nowicki M, Zabel M. Inhibitors of N-glycosylation as a potential tool for analysis of the mechanism of action and cellular localisation of glycoprotein P. **Acta Biochim Pol**, v. 59 n. 4,p. 445-450, 2012.

Yoshida H. ER stress and diseases. **FEBS J**. v. 274, n. 3, p. 630-658, 2007.

Zhang Lj, Li Zq, Yang Yp, Li Xw, Ji Jf. Tunicamycin Suppresses Cisplatininduced Hepg2 Cell Apoptosis Via Enhancing P53 Protein Nuclear Export. **Molcell Biochem**, v. 327, n. 2, p. 171-182, 2009.

Zou W. C-Glycosides And Aza-C-Glycosides As Potential Glycosidase And Glycosyltransferase Inhibitors. **Curr Top Med Chem**, v. 5, n. 14, p. 1363-1391, 2005.