

KARIN JULIANE PELIZZARO ROCHA

“Modulação da agressividade do câncer de pâncreas, estudo *in vitro*”

**CAMPINAS
2013**

UNIVERSIDADE ESTADUAL DE CAMPINAS

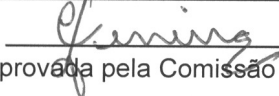
INSTITUTO DE BIOLOGIA

KARIN JULIANE PELIZZARO ROCHA

“Modulação da agressividade do câncer de pâncreas, estudo *in vitro*”

Este exemplar corresponde à redação final
da TESE defendida pela candidata

Karin Juliane Pelizzaro Rocha


e aprovada pela Comissão Julgadora.

Tese apresentada ao Instituto de Biologia da
UNICAMP para obtenção do Título de
Doutora em Biologia Funcional e Molecular,
na área de Bioquímica.

Orientadora: Profa. Dra. Carmen Veríssima Ferreira Halder
Coorientador: Prof. Dr. Ronaldo Aloise Pilli

CAMPINAS,
2013

Ficha catalográfica
Universidade Estadual de Campinas
Biblioteca do Instituto de Biologia
Mara Janaina de Oliveira - CRB 8/6972

P363m Pelizzaro-Rocha, Karin Juliane, 1985-
Modulação da agressividade do câncer de pâncreas, estudo in vitro / Karin
Juliane Pelizzaro Rocha. – Campinas, SP : [s.n.], 2013.

Orientador: Carmen Veríssima Ferreira Halder.
Coorientador: Ronaldo Aloise Pilli.
Tese (doutorado) – Universidade Estadual de Campinas, Instituto de Biologia.

1. Neoplasias pancreáticas. 2. Calix[6]areno. 3. Goniotalamina. 4.
Agressividade. 5. Morte celular. I. Ferreira, Carmen Veríssima, 1969-. II. Pilli,
Ronaldo Aloise. III. Universidade Estadual de Campinas. Instituto de Biologia. IV.
Título.

Informações para Biblioteca Digital

Título em outro idioma: Modulation of pancreatic cancer aggressiveness, in vitro study

Palavras-chave em inglês:

Pancreatic neoplasms

Calix[6]arene

Goniothalamine

Aggressiveness

Cell death

Área de concentração: Biologia Funcional e Molecular

Titulação: Doutora em Biologia Funcional e Molecular

Banca examinadora:

Carmen Veríssima Ferreira Halder [Orientador]

Karla Cristiana de Souza Queiroz

Sheila Siqueira Andrade

Sandra Martha Gomes Dias

Fabio Rogério

Data de defesa: 19-07-2013

Programa de Pós-Graduação: Biologia Funcional e Molecular

Campinas, 19 de julho de 2013

BANCA EXAMINADORA

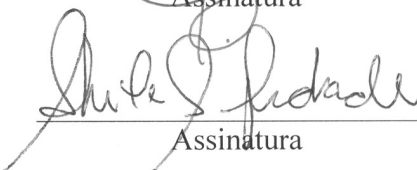
Profa. Dra. Carmen Veríssima Ferreira Halder (orientadora)


Assinatura

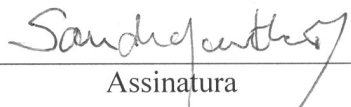
Dra. Karla Cristiana de Souza Queiroz


Assinatura

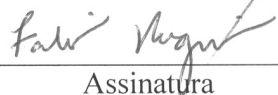
Dra. Sheila Siqueira Andrade


Assinatura

Dra. Sandra Martha Gomes Dias


Assinatura

Prof. Dr. Fábio Rogério


Assinatura

Profa. Dra. Ana Carolina Santos de Souza Galvão

Assinatura

Prof. Dr. Claudio Chrysostomo Werneck

Assinatura

Prof. Dr. Fernando Antonio Santos Coelho

Assinatura

Resumo

A agressividade do câncer de pâncreas está intimamente relacionada com níveis elevados de mediadores pró-sobrevivência, que corroboram com a rápida progressão da doença, resistência e metástase. A elevada taxa de mortalidade deste câncer (84%), se deve, principalmente, à dificuldade em se obter diagnóstico precoce. Além disso, praticamente nenhum progresso tem sido feito no sentido de tratar pacientes com tumores em estágio avançado. Neste contexto, o conhecimento das alterações moleculares que ocorrem no câncer pancreático permitem a identificação de potenciais alvos terapêuticos, o que possibilita desenvolver fármacos mais seletivos e com grande potencial para o controle da agressividade deste câncer. Após uma breve revisão dos fatores associados com a agressividade do câncer de pâncreas, apresentamos o estudo da atividade antitumoral *in vitro* e investigamos os mecanismos, pelos quais, novas moléculas podem combater a agressividade do câncer de pâncreas. O calix[6]areno, um composto macrocíclico de unidades fenólicas, aparece como um potente agente quimioterápico contra essa agressividade. O tratamento com calix[6]areno de células de câncer de pâncreas resultou na redução da viabilidade, proliferação, adesão e migração celular. Este efeito foi, em parte, relacionado com a modulação negativa de importantes proteínas envolvidas com esses processos celulares, como por exemplo, a inibição da transdução do sinal dependente de receptores tirosina quinases (Mer, AXL e PDGFR), resultando na inibição da via de sobrevivência PI3K/AKT/mTOR e na modulação de FAK e MMP-2 e -9. Adicionalmente, o estresse de retículo endoplasmático induzido pelo composto pode também ter contribuído para a indução de morte celular autofágica nas células Panc-1. Contudo, o desenvolvimento de novos fármacos, a partir de produtos naturais, também aparece como uma boa estratégia para o tratamento do câncer. A investigação do efeito sobre a viabilidade celular da goniotalamina, piplartina e análogos sintetizados, revelou moléculas potencialmente ativas, uma vez que a sobrevivência, a proliferação, e a capacidade de formação de colônia foram fortemente reduzidos após o tratamento. Estes efeitos foram acompanhados com a modulação de importantes proteínas que culminam com a indução de apoptose. Este estudo destaca a importância de uma investigação preliminar da modulação de proteínas associadas com a agressividade e resistência do câncer de pâncreas, e abre uma possibilidade de compostos bastante interessante, a fim de melhorar a eficácia do tratamento deste câncer.

Abstract

Pancreatic cancer aggressiveness is closely related to high levels of pro-survival mediators, which corroborate with rapid disease progression, resistance and metastasis. The high mortality rate of this cancer (84%) is mainly due to the difficulty to obtain an early diagnosis. Furthermore, minimal progress has been made to treat patients with advanced-stage tumors. In this context, knowledge of the molecular changes that occur in pancreatic cancer allow the identification of potential therapeutic targets, to develop more selective drugs with great potential to control the aggressiveness of this cancer. After a brief review of the factors associated with the aggressiveness of this neoplasm, we present the study of antitumor activity *in vitro* and investigate the mechanisms by which, new molecules can combat the aggressiveness of pancreatic cancer. Calix[6]arene, a compound macrocyclic phenolic units appears as a potent chemotherapeutic agent. Pancreatic cancer cells-treatment with calix[6]arene resulted in reduced cell viability, proliferation, adhesion and migration. This effect was partly related to downregulation of key proteins involved in cellular processes, such as, the inhibition dependent signal transduction receptor tyrosine kinases (Mer, AXL and PDGFR), resulting in inhibition of PI3K/AKT/mTOR survival pathway and modulation of FAK, MMP-2 and -9. Additionally, endoplasmic reticulum stress compound-induced may also have contributed to the induction of autophagic cell death. Nevertheless, the development of new drugs from natural products also appears as a good strategy for cancer treatment. The investigation of the effect on cell viability of goniothalamin, piplartine and synthesized analogs revealed potentially active molecules, as survival, proliferation and colony formation were strongly reduced after treatment. These effects were accompanied with modulation of important proteins which lead to apoptosis cell death. This study highlights the importance of investigate the structure activity relationship, which aids in the definition and the search for more active compounds with greater selectivity. Moreover, a preliminary investigation of the modulation of proteins associated with aggressiveness and resistance of pancreatic cancer, opens a possibility of finding very interesting compounds.

Sumário

Dedicatória	xvii
Agradecimentos	xix
Lista de abreviaturas	xxiii
Introdução Geral	
Aspectos epidemiológicos do câncer	3
Biologia do câncer de pancreas	4
Aspectos moleculares associados à agressividade do câncer de pâncreas	7
Morte celular e câncer de pancreas	11
Objetivos Gerais	21
Referências Bibliográficas	23
Capítulo 1	
Avaliação da atividade antitumoral <i>in vitro</i> e estudo da modulação de vias de sinalização por Calix[6]areno em células humanas de câncer de pâncreas	31
Resumo	33
1. Introdução	35
2. Objetivos	38
3. Materiais e Métodos	
3.1.Reagentes	39
3.2.Cultura de células	40
3.3.Síntese de diluição do CLX6	41
3.4.Tratamento das células de câncer de pâncreas e avaliação da viabilidade celular através da função mitocondrial (ensaio do MTT)	41
3.5.Avaliação da viabilidade celular de Panc-1 tratadas com CLX6 ao longo do tempo	42
3.6.Análise da proliferação celular pelo ensaio de incorporação do BrdU	42
3.7.Análise do ciclo celular por citometria de fluxo	43
3.8.Análise da expressão de proteínas por <i>Western Blotting</i>	43
3.9.Microscopia Eletrônica de Transmissão	45

3.10. Microscopia Confocal	45
3.11. Investigação do papel da autofagia na morte celular induzida por CLX6	46
3.12. Avaliação da adesão celular	47
3.13. Avaliação da migração celular pelo ensaio de <i>scratch</i>	47
3.14. Quantificação da atividade da proteína fosfatase de baixo peso molecular (LMWPTP) em células Panc-1 tratadas com CLX6	48
3.15. Análise dos dados	49
4. Resultados e Discussão	
4.1.CLX6 reduz a viabilidade celular de linhagens tumorais de pâncreas humano	50
4.2.CLX6 inibe a proliferação de células de câncer de pâncreas	53
4.3.CLX6 inibe a proliferação celular e também induz morte celular em Panc-1	56
4.4.CLX6 inibe a progressão do ciclo celular em G0/G1	57
4.5.CLX6 modula a expressão de receptores tipo tirosina quinases responsáveis por controlar a sobrevivência, proliferação e agressividade do câncer de pâncreas	61
4.6.Autofagia participa da morte celular induzida por CLX6	66
4.7.CLX6 induz estresse de retículo endoplasmático em Panc-1	72
4.8.CLX6 inibe adesão e migração celular através da modulação de integrina/FAK e metaloproteínases	75
4.9.CLX6 aumenta a atividade de LMWPTPs nas células tratadas	81
5. Conclusão	84
6. Referências Bibliográficas	86
Capítulo 2	
Goniotalamina e Piplartina: a busca por compostos ativos contra o câncer de pâncreas	97
Resumo	99
1. Introdução	101
2. Objetivos	105
3. Materiais e Métodos	

3.1.Reagentes	106
3.2.Cultura de células	107
3.3.Síntese e diluição dos compostos	107
3.4.Análise da viabilidade celular através da função mitocondrial (ensaio do MTT)	107
3.5.Ensaio de formação de colônia	108
3.6.Análise da expressão de proteínas por <i>Western Blotting</i>	108
3.7.Análise dos dados	110
4. Resultados e Discussões	
4.1.Redução da viabilidade celular de Panc-1 após o tratamento com goniotalamina e seus derivados	111
4.2.Redução da viabilidade celular de Panc-1 após o tratamento com piplartina e seus derivados	119
4.3.Efeito dos compostos 25 e 44 na formação de colônia	123
4.4.Mecanismo molecular dos derivados 25 e 44 da goniotalamina e piplartina em células Panc-1	124
5. Conclusões	133
6. Referências Bibliográficas	134

“Comece fazendo o que é necessário, depois o que é possível, e de repente você
estará fazendo o impossível”.

São Francisco de Assis

Dedico esse trabalho...

Aos meus avôs,

Armando Pelizzaro (*in memorian*)

e Luis Alencar Rocha (*in memorian*)

Onde quer que estejam guiaram meus passos, me dando força e me protegendo nas batalhas diárias...

Aos meus pais, Nivaldo Rocha e Sandra Aparecida Rocha

À minha irmã Kaline Rocha

O amor, carinho e compreensão de vocês foram importantíssimos para não me deixar desistir. Os ensinamentos dados, os exemplos que me fortalece e me encoraja a ser uma pessoa cada vez melhor...

Ao meu namorado João Eduardo

Que sempre esteve ao meu lado, me incentivou, me alegrou, mais que um grande amor um grande amigo

...

Amo muito vocês!!!

Agradecimentos

Um trabalho nunca é realizado com o esforço de uma única pessoa, mas sim com o apoio de uma equipe, e por isso o sucesso alcançado com o resultado não é mérito apenas de um, mas de todos que contribuíram com muito carinho, atenção e incentivo na conquista deste trabalho.

Agradeço a Deus que se fez presente em todos os momentos da minha vida, me dando força para superar, e discernimento para entender, as mudanças pelas quais passei.

À minha família amada, meus pais Nivaldo e Sandra e minha irmã Kaline, que com amor e compreensão, torceram por mim, ajudando a vencer mais esta etapa da minha vida.

Ao meu namorado e grande amigo João Eduardo Brito. O tempo passou e você sempre esteve ao meu lado, mais do que fazer a diferença na minha vida, você faz parte desse “eu” que me tornei.

Agradeço a professora Dra Carmen Veríssima Ferreira Halder pela orientação, amizade e oportunidade de desenvolver este trabalho, assim como o incentivo no aperfeiçoamento contínuo e aprimoramento dos meus estudos.

Ao Prof. Dr. Ronaldo Aloise Pilli pela co-orientação, pelo apoio e confiança depositada em mim.

Aos professores Hiroshi Ayoma, Celso Vataru Nakamura e Angelo de Fátima pelos conselhos valiosos e pela ajuda oportuna.

Aos professores da Pós-graduação, por contribuírem para minha formação profissional e aos colegas de doutorado, pela companhia nos bons e maus momentos.

A Cláudia de Lourdes Soraggi e a Denise Ciampi, pela colaboração técnica, organização e paciência.

Às minhas amigas Simone Cespedes, Julia Abrantes, Anelisa Guirro, Livia Rittner e Jéssica Bertol pela valorosa amizade, convivência e apoio durante o desenvolvimento deste trabalho.

Aos companheiros de laboratório Julia Abrantes, Cintia Gomez, Marcelo Bispo de Jesus, Roberta Ruela Sousa, Josélia Marques, Thaís Tornatore, Rodrigo Cartaxo, Gustavo Pugliese, Luiz Bandeira, Marcela Rodgers e Marília Valentini, em especial Fernanda Idalgo e Marina Pereira Dias, minhas co-orientadas de iniciação científica, pelo adorável convívio, companheirismo e incentivo, por compartilhar momentos importantes para nossas vidas, assim como pela amizade, alegria e momentos de descontração no dia a dia de laboratório.

Aos membros do Laboratório de Enzimologia-IB/UNICAMP, as Camila(s) Camargo e Wielewski, Darlene Dantzger e Erika Ferraresso dos Anjos, agradeço pela paciência e ajuda nos momentos de necessidade.

Aos membros do laboratório de Síntese Orgânica-IQ/UNICAMP que confiaram a mim suas moléculas. Em especial a Rosimeire Barcelos, o Júlio Pastre, a Carolina Martins e a Vânia Carneiro, acredito que fizemos um belo trabalho e faremos muito outros ainda.

À doutora Karla Cristiana de Souza Queiroz e ao doutor Arnold Spek pela supervisão no curto estágio realizado no Centro de Medicina Experimental e Molecular, Centro Médico Acadêmico da Universidade de Amsterdam.

Aos Professores Dr. João Ernesto, Dra. Ana Carolina Galvão e Dra. Eneida de Paula, pelas colocações no exame de qualificação.

Ao Gilbert, mais que um professor de inglês um amigo.

À família Brito que tem me acolhido como uma filha, obrigada por participarem das minhas conquistas.

À FAPESP pela concessão de bolsa de estudo, reserva técnica e financiamento para pesquisa.

E a todos que contribuíram para a concretização deste sonho, muito obrigada!!!

Às Instituições:



Este trabalho foi financiado pela Fundação de Amparo a Pesquisa do Estado de São Paulo
(FAPESP) - Processo 2010/15496-3



Universidade Estadual de Campinas

Lista de abreviaturas

ACDP: Adenocarcinoma do ducto pancreático

AIF (“apoptosis-inducing factor”): Fator de indução de apoptose

AKT: Proteína quinase B (PKB)

ANOVA: Análise de variância

APAF-1 (“apoptotic protease-activating factor-1”): Fator 1 de ativação de proteases pró-apoptóticas

ATGs: Proteínas relacionadas à autofagia

ATP: Adenosina trifosfato

AXL: Receptor Tirosina Quinase UFO

Bak: Proteína pró-apoptótica da família da BCL2

BAX (“BCL2-associated X protein”): Proteína X associada à BCL2

BCL2 (“B-cell lymphoma protein-2”): Proteína 2 de linfoma de células B

Bcl-XL (“BCL2-like protein 1; BCL2-L-1”): Isoforma L da proteína 1 semelhante à BCL2

BCRJ: Banco de células do Rio de Janeiro

BH3 (BID): Domínio de interação contrário à morte

BiP: Proteína de ligação a imunoglobulina

BrDU: Bromodeoxiuridina

BSA: Albumina de soro bovino

Cdc25: Proteína fosfatase reguladora da divisão celular 25

CDKs (-2, -4 e -6) : Quinases dependentes de ciclina

c-FLIP (“Cellular FLICE (FADD-like IL-1beta-converting enzyme)-inhibitory protein”): Proteína inibidora do receptor FADD.

CHL: Cloroquina

c-IAP (“cellular inhibitor of apoptosis”): Proteína inibidora de apoptose

CLX6: Calix[6]areno

CTRL: Controle

DAPI: Dihidrocloreto de 4'-6'-diamidino-2-fenilindol

DAPK1: Proteína quinase 1 associada à morte

DCC (“Deleted in Colorectal Carcinoma”): Receptor de morte dependente de ligante deletado no carcinoma de colorretal.

DIABLO (“Direct IAP binding protein with low pI”): Proteína de ligação a IAP com baixo pI

DISC (“death-inducing signaling complex”): Complexo de sinalização indutor de morte

DMEM (“Dulbecco's modified Eagle's medium”): Meio Eagle modificado por Dulbecco

DNA: Ácido desoxirribonucleico

DR3 (“death receptor 3”): Receptor de morte 3

DR6 (“death receptor 6”): Receptor de morte 6

E2F: Fator transcricional E2F

ECL: Enhanced luminol-based chemiluminescence

EDTA: Ácido etilenodiaminotetracético

EGF: Fator de crescimento epidérmico

EGFR: Receptor de fator de crescimento epidérmico

EGTA: Ácido etilenoglicoltetracético

ENDO G: Endonuclease G

ERK1/2 (“extracellular signal-regulated kinases 1/2”): Quinases reguladas por sinal extracelular 1/2

EROs: Espécies reativas de oxigênio

FADD (“Fas-associated death domain protein”): Proteína contendo domínio de morte associada ao receptor Fas

FAK: Quinase de adesão focal

FAP (-1 e -19): Fosfatase associada a Fas

FAS (CD95): Membro 6 da superfamília de receptores de fator de necrose tumoral

FASL: Proteína ligante do receptor Fas

FIP200: Proteína de interação a ULK

GAPDH: Gliceraldeído 3-fosfato desidrogenase

Gas6: Fator de crescimento

HEPES: ácido 4-(2-hidroxietil)-1-piperazina etanosulfônico

HNTG: Tampão para imunoprecipitação

HSP90: Heat Shock Protein 90

HTRA2: Serina protease 2

IAP (“inhibitory apoptosis protein type 1”): Proteína inibidora de apoptose

IC₅₀: Concentração do composto teste que diminui em 50% a viabilidade celular

IKK: Quinase Ikappaß

INCA: Instituto Nacional do Câncer

IRE1- α : (“inositol-requiring protein 1”): Proteína recrutadora de inositol 1

JAK2: Janus Quinase 2

JNK (“c-Jun N-terminal kinases”): Quinase c-Jun N-terminal

LC3 (I e II) (“light chain of the microtubule-associated protein 1”): Proteína 1 associada a microtúbulo de cadeia leve

LMWPTP (“low molecular weight phosphatase tyrosine protein”): Proteína tirosina fosfatase de baixa massa molecular

MAPKs (“mitogen-activated protein kinases”): Proteínas quinases ativadas por mitógeno

Mcl-1 (“myeloid cell leukemia sequence 1 BCL2-related”): Membro da família BCL2

MEC: Matriz extracelular

Mer: Receptor Tirosina Quinase

MMP-2: Metaloproteinase-2

MMP-9: Metaloproteinase-9

MMPs: Metaloproteinases

mTOR (“mammalian target of rapamycin”): Proteína quinase alvo de rapamicina

MTT: 1-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difeniltetrazólio

NADPH (“nicotinamide adenine dinucleotide phosphate-oxidase”): Nicotinamida adenina dinucleotideo fosfato reduzido

NFkB: Fator nuclear kappa B

NIPan: Neoplasia Intraepitelial pancreática

NMC: Neoplasia Mucínica Cística

NMPI: Neoplasia Mucínica Papilar Intraductal

p16 (CDKN2A): Inibidor de quinase dependente de ciclina 2A

p27 (p27Kip1): Inibidor de quinase dependente de ciclina 1B

p53: Proteína 53

PAGE (“polyacrylamide gel electrophoresis”): Eletroforese em gel de poliacrilamida

PARP (“poly(ADP-ribose) polyMerase”): Poli(ADP-ribose) polimerase

PBS (“phosphate-buffered saline”): Solução salina tamponada com fosfato

PDGF: Fator de crescimento derivado de plaqueta

PDGFR: Receptor de fator de crescimento derivado de plaqueta

PE: Fosfatidiletanolamina

PI: Iodeto de propídeo

PI3K-p85 (“phosphatidylinositol-3 kinase p85”): Fosfatidilinositol-3 quinase subunidade 85

Pim-1 (“proviral integration site for the moloney murine leukemia virus”): Proteína quinase

PKC δ (“protein kinase C δ ”): Proteína quinase C delta

PMSF: Fluoreto de fenilmetilsulfonil

pNPP: p-Nitrofenil fosfato

PP2A: Proteína serina/treonina fosfatase 2A

PTEN: Fosfatase homóloga a tensina

PTP: Proteína tirosina fosfatase

PVDF: Polyvinylidene difluoride

Rac1: GTPase da subfamília Rac da família das Rho GTPases

Raf1 (Ras): Proteína quinase serina/treonina proto-oncogene

RB: Proteína retinoblastoma

RE: Retículo endoplasmático

Rho: GTPase A

RNase: Ribonuclease

RTQ: Receptor de tirosina quinase

SDS: Dodecilsulfato de sódio

SFB: Soro fetal bovino

SH2: Domínio proteico

SMAC: Segundo ativador mitocondrial de caspase

Src: Proteína tirosina quinase proto-oncogênica Src ou pp60c-src

TBS: Tampão Tris salino

TBST: Tampão Tris salino contendo Tween 20

TNFR: Receptor do fator de necrose tumoral

TRADD (“tumor necrosis factor receptor type 1-associated death domain protein”): Proteína contendo domínio de morte associada ao receptor de fator de necrose tumoral tipo 1

TRAF2 (“TNF receptor-associated factor 2”): Fator 2 associado ao receptor TNF

TRAIL (“TNF-related apoptosis-inducing ligand”): Ligante indutor de apoptose associado a TNF

Tris: tris(hidroximetil)aminometano

TUCAN (“Caspase-associated recruitment domains (CARD)”): Proteínas com domínio para recrutar caspase - antiapoptótica

UICC: União Internacional Contra o Câncer

ULK1/2: Proteínas associadas a autofagia

UNC5B: Protein unc-5 homolog 2

VEGF: Fator de crescimento endotelial vascular

WHO: World Health Organization (Organização Mundial da Saúde)

XIAP (“X-linked inhibitor of apoptosis protein”): Proteína inibidora de apoptose ligada ao cromossomo X

Introdução Geral

Introdução Geral

Aspectos epidemiológicos do câncer

O câncer é o nome dado a um conjunto de doenças que têm em comum o crescimento desordenado de células. Estas células podem ainda invadir os tecidos adjacentes e se espalhar para outras regiões do organismo caracterizando um quadro de metástase (INCA, 2013). Por muito tempo, o câncer foi amplamente considerado uma doença dos países desenvolvidos e com grandes recursos financeiros. No entanto, atualmente com o contínuo crescimento populacional, somado ao aumento da expectativa de vida nos países em desenvolvimento, o impacto do câncer tem representado uma mudança no mundo (Jemal et al., 2011).

Nas últimas décadas, o câncer tem se destacado aparecendo como um evidente problema de saúde pública. De acordo com a Organização Mundial da Saúde (WHO, 2012), estima-se que 12 milhões de pessoas em todo o mundo são diagnosticadas com algum tipo de câncer, a cada ano, sendo que 7,6 milhões irão a óbito (63%). No Brasil, segundo o Instituto Nacional do Câncer (INCA, 2012), no ano de 2012 cerca de 520 mil novos casos de câncer foram diagnosticados. Dentre esses novos casos, à exceção do câncer de pele do tipo não melanoma, os cânceres de próstata, de pulmão e estômago são os mais incidentes no sexo masculino, e os cânceres de mama, colo do útero e glândula tireóide no sexo feminino.

O câncer de pâncreas é uma das mais comuns neoplasias do trato gastrointestinal, sendo a quarta causa de morte relacionada a câncer nos Estados Unidos (Siegel et al., 2012; 2013). No ano de 2013 estima-se que mais de 45.000 novos casos serão diagnosticados neste país (Siegel et al., 2013). No Brasil, no ano de 2010, foram registradas 7.440 mortes por câncer de pâncreas, e, nos últimos anos cerca de 10 mil casos da doença foram confirmados, fazendo com que o câncer de pâncreas represente 2% de todos os tipos de cânceres do país. Raro antes dos 30 anos, o câncer de pâncreas torna-se mais comum a partir dos 60 anos de vida. Segundo a União

Internacional Contra o Câncer (UICC), os casos da doença aumentam com o avanço da idade: de 10/100.000 habitantes entre 40 e 50 anos para 116/100.000 habitantes entre 80 e 85 anos, sendo que a incidência é mais significativa em homens.

Biologia do câncer de pâncreas

Mesmo após décadas de estudos, a origem do câncer de pâncreas ainda não é totalmente compreendida. Algumas evidências sugerem que a origem do câncer de pâncreas, principalmente na porção do ducto (adenocarcinoma do ducto pancreático, ACDP - 85% dos casos de câncer de pâncreas), decorre de lesões precursoras, dentre as quais a neoplasia intraepitelial pancreática (NIPan) constitui um dos tipos mais comuns, sendo os outros tipos conhecidos como neoplasia mucinosa papilar intraductal (NMPI) e neoplasia mucinosa cística (NMC). NIPans são lesões microscópicas do ducto pancreático que se desenvolvem no epitélio colunar e mucoso, e apresentam crescente desorganização do epitélio e aquisição de atipia nuclear (Hruban, Wilentz e Kern, 2000).

Estudos prévios sugerem que, em um estado pré-invasivo, NIPans adquirem um número crescente de alterações genéticas que progridem até a invasão da membrana basal pelas células (Figura 1). Dentre as alterações genéticas relacionadas com o desenvolvimento de ACDP a partir de NIPan estão a ativação do proto-oncogene *KRAS* e inativação de genes supressores de tumor, incluindo *P16^{INK4A}*, *p53* e *SMAD4* (Hruban et al., 2001). No estágio avançado, as mutações e deleções de *KRAS*, *P16^{INK4A}*, *P53* e *SMAD4* são encontradas em aproximadamente 90%, 90%, 75% e 53% de ACDP, respectivamente (Rozenblum, et al., 1997). Além disso, essas e outras vias envolvidas na regulação de apoptose, controle de danos no DNA, ciclo celular e invasão,

tais como Hedgehog e Notch, estão também alteradas no câncer de pâncreas (Hidalgo, 2010; Mihaljevic et al., 2010).

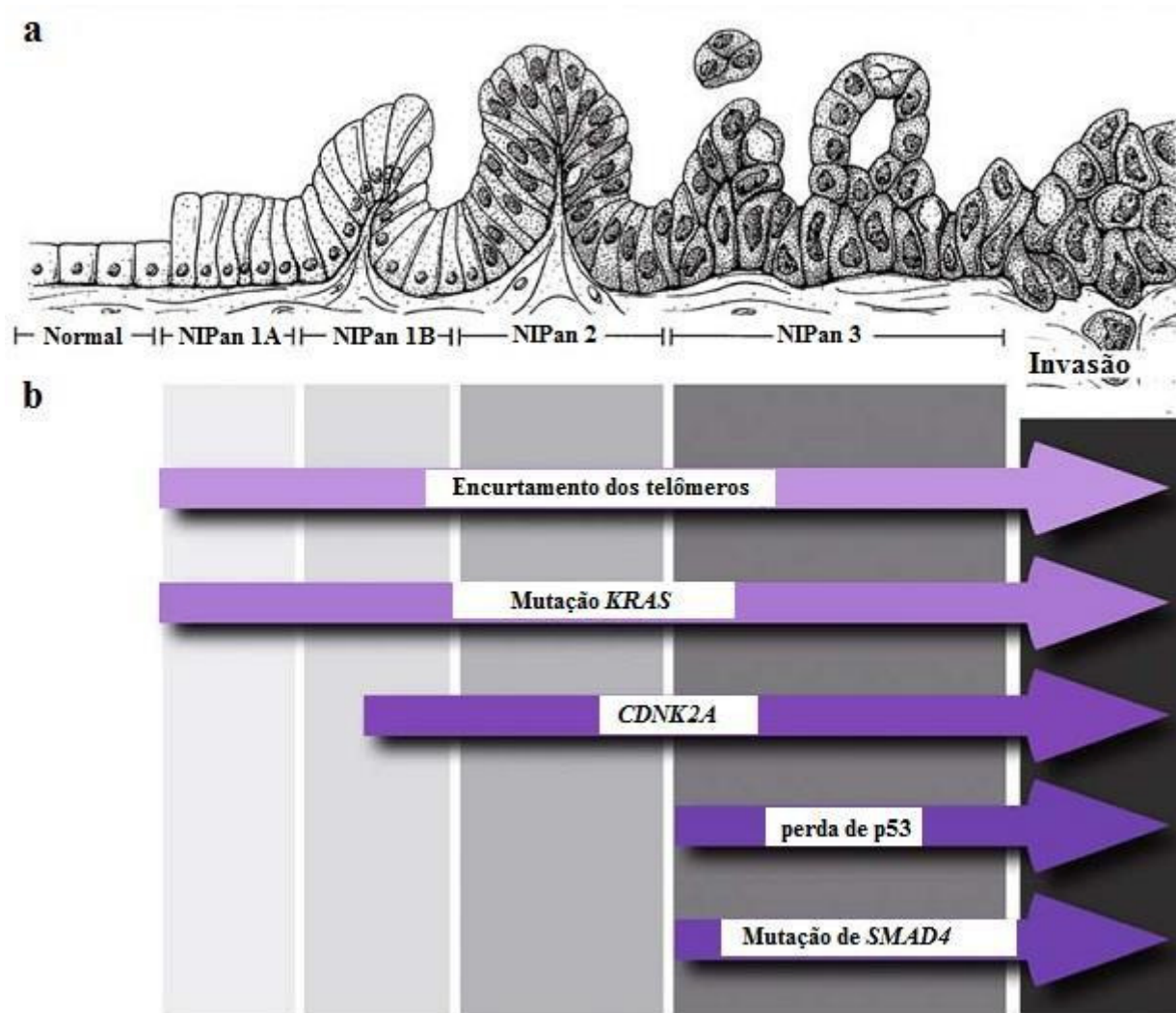


Figura 1. Progressão de ACDP a partir de NIPan. As células pancreáticas adquirem sucessivas alterações moleculares que desenvolvem no epitélio colunar e mucoso, e apresentam crescente desorganização do epitélio e aquisição de atipia nuclear. Em um estágio avançado as células invadem a membrana basal, caracterizando a fase invasiva de ACDP. a) Desenho esquemático das características histopatológicas da progressão de NIPan em ACDP. b) Alterações genéticas conhecidas na progressão de NIPan em ACDP, (adaptado de Mihaljevic et al., 2010).

Apesar dos avanços na terapia do câncer, o tratamento de pacientes com câncer de pâncreas ainda é um desafio, devido à dificuldade em se obter diagnóstico precoce. Além disso,

o prognóstico para pacientes com este tipo de câncer em estágio avançado permanece ruim por causa da alta recorrência e metástase (Hidalgo, 2010), o que justifica a elevada taxa de mortalidade, que praticamente se iguala à incidência, do câncer de pâncreas (Siegel et al., 2012). Até o momento, a cirurgia de retirada do tumor continua sendo o único tratamento que oferece alguma vantagem em termos de sobrevida (intervalo de sobrevida de cinco anos, para 15-25% dos casos). No entanto, na maioria dos casos (80-90%) quando a doença se manifesta clinicamente, não é mais possível realizar cirurgia. Nestes casos, a quimioterapia combinada com a radioterapia é a única opção de tratamento, visando à inibição da progressão tumoral e redução dos efeitos colaterais (Gillen et al., 2010).

Dada a agressividade de ACDP, a grande maioria dos pacientes depende de um tratamento paliativo com quimioterápicos convencionais (Gencitabina e 5-Fluoracil), que apesar de fornecerem uma melhora na qualidade de vida podem resultar em uma sobrevida média de apenas alguns meses (Stathis e Moore, 2010). Esta limitação no tratamento convencional é principalmente devido à resistência que as células cancerosas adquirem, por um desbalanço entre proteínas pró e antiapoptótica que resulta em uma reduzida resposta a apoptose (Wong e Lemoine, 2009; Fulda, 2009a). Uma vez que a maioria das estratégias estabelecidas na terapia do câncer depende da eliminação de células tumorais por apoptose, a capacidade que essas células adquirem de escapar da morte resulta no principal obstáculo ao tratamento anticâncer (Hanahan e Weinberg, 2000; Fulda, 2009b).

Neste contexto, o conhecimento das alterações genéticas e moleculares que ocorrem no câncer pancreático tem permitido a identificação de potenciais alvos terapêuticos, o que possibilita desenvolver fármacos mais seletivos e com grande potencial para o controle da agressividade do câncer de pâncreas.

Aspectos moleculares associados à agressividade do câncer de pâncreas

A agressividade tumoral está intimamente relacionada com a capacidade invasiva e metastática das células tumorais dentro de um microambiente que envolve a matriz extracelular (MEC), moléculas de adesão e o citoesqueleto, os quais modulam a motilidade da célula tumoral e células adjacentes (Sawai et al., 2008). A metástase é um problema central no câncer, uma vez que os mecanismos responsáveis pela habilidade das células em extravasar do tumor primário, circular, e invadir novos tecidos permanecem pouco compreendidos (Segura et al., 2009). Enquanto a remoção cirúrgica e terapia adjuvante podem curar de maneira eficiente tumores primários que estejam localizados (confinados), tumores metastáticos são praticamente incuráveis devido à natureza sistêmica e resistência das células a agentes terapêuticos. Este fato explica porque mais de 90% das mortes por câncer resultam de metástases (Gupta e Massagué, 2006). Portanto, o grande desafio para o tratamento eficiente do câncer é impedir e/ou reverter o processo metastático.

No geral, a disseminação metastática envolve mudanças progressivas no fenótipo do tumor primário, que permitem a disseminação (linfática e hematogênica) e a busca por novos sítios. Durante a disseminação metastática, células do tumor primário passam por uma série de eventos, coletivamente chamados de cascata invasão-metástase, o qual se dá nas seguintes etapas: a) invasão localizada, que envolve a re-estruturação do microambiente tumoral; b) intravasão, no qual a célula do tumor primário atinge a circulação sanguínea; c) sobrevivência na circulação sanguínea; d) extravasão, no qual a célula tumoral sai do vaso sanguíneo; e) formação de micrometástases e colonização; adesão das células no novo sítio (Figura 2) (Fidler, 2003; Chaffer e Weinberg, 2011; Valastyan e Weinberg, 2011). Neste conjunto de eventos, não apenas os sinais da célula tumoral, mas também das demais células que constituem o microambiente

tumoral, regulam a interação de componentes celulares com a matriz e membrana basal estimulando a migração e promovendo a proliferação e sobrevivência celular (Hanahan e Weinberg, 2000; Sawai et al., 2008).

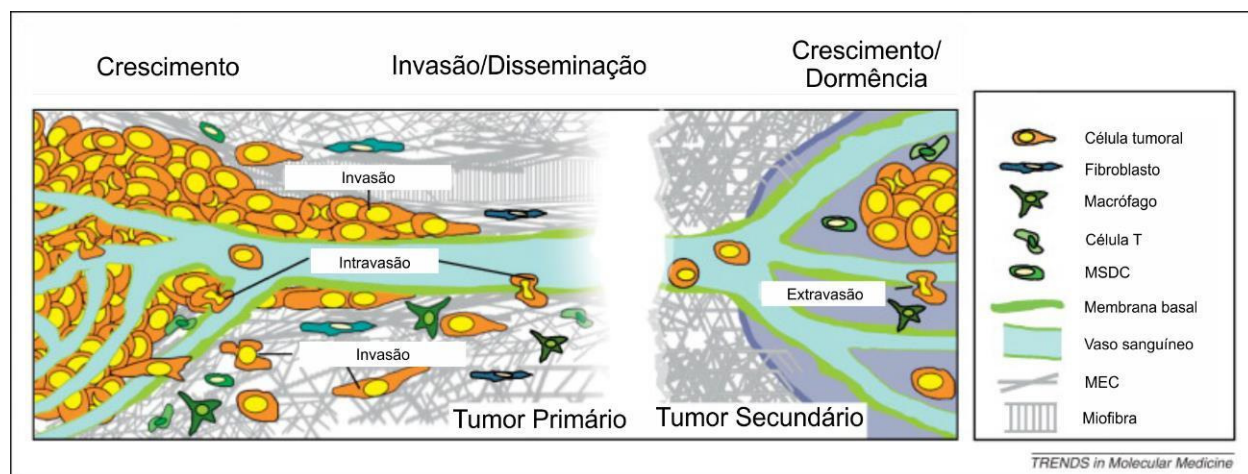


Figura 2: Etapas da disseminação metastática. O tumor primário se desenvolve em um sítio primário, onde uma série de sinais que parte da célula tumoral estimulam a invasão local e posterior distribuição linfática e sanguínea das células tumorais. Através da circulação sanguínea estas células alcançam novos sítios e por e xtravasão inicia-se a formação de um novo tumor em um ou mais sítios (adaptado de Alexander e Friedl, 2012).

Com relação ao câncer de pâncreas, que tem como característica a rápida progressão metastática, a forma pela qual as células tumorais interagem com o microambiente têm ganhado considerável atenção. O estroma do câncer de pâncreas caracteriza-se por ser denso e fibroso. Um conjunto diverso de células têm sido identificado por constituir este estroma, e por isso, a maneira pela qual células do adenocarcinoma de pâncreas interagem com as células inflamatória, células indiferenciadas (*stem cells*), fibroblasto, entre outras, provoca interesse. Até o momento sabe-se que as células de ACDP podem produzir vários componentes da MEC, que por sua vez estimulam outras células do estroma tumoral sintetizarem outros componentes, por exemplo, fator de crescimento de fibroblastos (FGF) e TGF- β -2 (Bachem et al., 2005), que contribuirão na re-estruturação de um microambiente denso. Além disso, ao contrário de muitos outros tumores, ACDP parece ser um tumor pouco vascularizado que juntamente com o fato do tumor ser denso

e fibroso dificulta a entrega de quimioterápicos, tornando-se um fator que explica a resistência deste câncer a quimioterapia.

Uma série de vias de sinalização estão envolvidas nesse processo de metástase, dentre as quais algumas proteínas parecem exercer papel chave. A sinalização via integrinas e a secreção de metaloproteinases (colagenases) são eventos desse processo de metástase, estando acoplados a mecanismos de transdução de sinal que modulam a atividade/função de diferentes proteínas e transcrição gênica (O'Toole, 2001).

As metaloproteinases (MMPs) fazem parte de uma família de endopeptidases dependentes de Zn^{2+} e representam a maior classe de enzimas responsáveis pela degradação ou reabsorção de componentes da MEC (Jones et al., 1999). O aumento na expressão de MMPs tem sido relatado para diversos tumores sólidos, incluindo câncer de pâncreas, e pode resultar na destruição excessiva da matriz extracelular, neo-vascularização e metástase (Jones et al., 1999). Dentre as MMPs, a MMP-2 (72 kDa) e MMP-9 (92 kDa) estão envolvidas na proteólise e rompimento de membranas basais, degradação de colágenos tipo IV e V, colágenos desnaturados (gelatinas), fibronectina e elastina (Kahari e Saarialho-Kere, 1997) e aparecem na forma ativa em células de câncer de pâncreas se comparadas com células normais (Satoh et al., 1994).

As integrinas são proteínas transmembranares constituídas por subunidade α e β que regulam uma variedade de funções celulares necessárias para a formação de metástase do tumor (Hynes, 2002). No crescimento tumoral alterações na expressão das integrinas têm sido observadas. Algumas integrinas são superexpressas, enquanto outras se tornam fosforiladas, afetando a sua relação com o citoesqueleto e proteínas extracelulares (Fawcett e Harris, 1992). Diversos estudos têm mostrado o papel das integrinas no processo de metástase. Estudo *in vitro* com células de câncer de mama mostrou a correlação positiva do aumento da expressão de $\alpha_5\beta_3$ -integrina com a capacidade das células de migrar e aderir (Rolli et al., 2003). No câncer de

pâncreas, o comportamento de metástase foi relacionado com o aumento da expressão de $\alpha_6\beta_1$ -integrina induzido por interleucina 1 α (Sawai et al., 2003). Além disso, a alta expressão da subunidade β_1 -integrina em células tumorais é essencial para os vários estágios de metástase, incluindo adesão, invasão e migração (Yang et al, 2003; Sawai et al., 2006).

Além disso, outros mecanismos garantem a sobrevivência da célula tumoral corroborando para seu caráter agressivo. Dentre os mecanismos pelos quais as células de câncer de pâncreas escapam às terapias convencionais, o mais relevante parece ser a proteção antiapoptótica (Arlt et al., 2010). Células de câncer de pâncreas têm adquirido resistência aos estímulos apoptóticos via receptores de morte (FasL, TRAIL) ou às drogas anticâncer (no caso a gencitabina) por um grande número de alterações moleculares que perturbam a indução de sinal para apoptose ou contrariam a execução desse tipo de morte (Hamacher et al., 2008). Além disso, o câncer de pâncreas apresenta alterações nas vias de sobrevivência celular, EGFR/MAPK/Ras/raf1, PI3K/AKT, TRAIL/TRAFF2 e IKK/NF- κ B, acompanhado pela desregulação na expressão de proteínas reguladoras de apoptose, como c-IAP, BCL2, XIAP ou Survivin, que levam ao bloqueio de ativação das caspases (Hamacher et al., 2008; Muerkoster et al., 2008) (Figura 3).

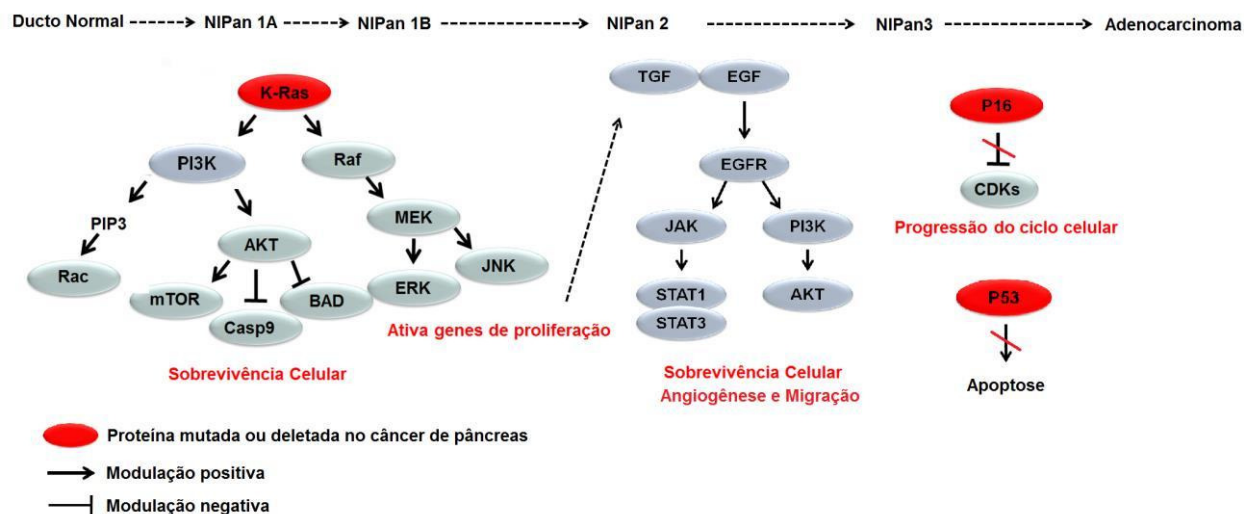


Figura 3. Principais vias de sinalização moduladas durante a progressão de ACDP em decorrência das alterações genéticas, principalmente relacionadas com as proteínas K-Ras, p16 e p53. A ativação de K-ras leva a ativação de importantes vias de sobrevivência como EGFR/MAPK, PI3K/AKT e IKK/NF- κ B, essas vias, por sua vez, levam à inibição de morte celular tanto por autofagia (via mTOR) como apoptose (via inibição de proteínas pró-apoptóticas e ativação de proteínas antiapoptóticas). Além disso, a ativação de ERK e JNK leva a síntese de proteínas de sobrevivência que contribuem ainda mais com a ativação das vias anteriormente citadas. A perda de p16 colabora para a progressão do ciclo celular e a perda de p53 compromete o ciclo celular e também a indução de apoptose, propiciando a proliferação e sobrevivência das células de câncer de pâncreas (adaptado de <http://www.genome.jp/kegg/pathway/hsa/hsa05212.html>, acessado em 10/03/2013).

Morte celular e câncer de pâncreas

Como descrito anteriormente, um dos mecanismos pelo qual o câncer de pâncreas é tão agressivo se deve ao fato da resistência aos estímulos que desencadeiam a morte por apoptose. Dessa forma, muitos grupos de pesquisa tem se concentrado na busca de novos alvos para o câncer de pâncreas que poderiam induzir morte celular, principalmente por um mecanismo diferente de apoptose, por exemplo, autofagia, e assim, contribuir para o desenvolvimento de

novas estratégias terapêuticas (Ali et al., 2009; Arlt et al., 2010; Dalby et al., 2010; Wu et al., 2012).

Desde as primeiras descrições de mecanismos de morte celular programada nos anos 60, várias tentativas foram feitas para que a classificação do tipo de morte celular fosse baseada em características morfológicas das células. No entanto, recentemente, tem se tornado claro, que na maioria das vezes, a morte celular com características morfológicas similares apresenta um alto grau de heterogeneidade funcional, bioquímico e imunológico. Somado a isto, em vista do progresso substancial na análise bioquímica e genética da morte celular tem-se sugerido que a classificação do tipo de morte celular seja baseada em aspectos moleculares. Portanto, o comitê “*Nomenclature Committee on Cell Death 2012*” recomenda que os pesquisadores da área adotem a nomenclatura já estabelecida para classificar os tipos de morte celular e que também utilizem inibidores específicos, como estratégia para definir o mecanismo de morte. De acordo com a revisão publicada por Galluzzi et al (2012), são propostos 13 tipos de morte celular: anoikis, autofagia, apoptose intrínseca dependente de caspase, apoptose intrínseca independente de caspase, cornificação, entose, apoptose extrínseca por receptores de morte, apoptose extrínseca por dependência de receptores, catástrofe mitótica, necroptose, netose, partanatos e piroptose. Neste trabalho serão abordadas com mais detalhes a morte celular por autofagia e apoptose tanto por via extrínseca, como intrínseca.

A autofagia é um processo evolutivamente conservado e altamente regulado que envolve a degradação lisossomal de proteínas com longa vida, macromoléculas, ribossomos e organelas, como o retículo endoplasmático, aparelho de Golgi e mitocôndrias. Com relação à morfologia, o termo “morte celular autofágica” é amplamente empregado para indicar morte celular acompanhada de uma intensa vacuolização citoplasmática, que geralmente (nem sempre) indica aumento do fluxo autofágico (Galluzzi et al., 2007). Fisiologicamente, a autofagia é considerada

um mecanismo que pode contribuir para a sobrevivência temporária da célula, uma vez que a reciclagem de componentes celulares pode gerar energia diante de uma condição de estresse, como inanição (falta de aminoácidos e privação de nutrientes), hipóxia e estresse metabólico. Ou ainda pode conduzir a célula à morte celular quando um fluxo contínuo de estresse é dado, como por exemplo, xenobióticos (Denton, Nicolson e Kumar, 2012).

O processo autofágico (Figura 4) se inicia com o isolamento de membrana para formação do autofagossoma com membrana dupla (Suzuki e Ohsumi, 2007; Yang e Klionsky, 2010), este processo é disparado com a ativação das quinases ULK1 e ULK2 em resposta à inibição da atividade de mTOR (Hosokawa et al., 2009; Ganley et al., 2009) (Figura 4b). Uma vez ativada ULK1/2 participa da formação do complexo ULK1/2-Atg13-FIP200-Atg101, que permite a realocização de diversas proteínas (ATGs) para o local de formação do autofagossoma (Wirawan et al., 2012) (Figura 4a). Dentre as proteínas que são recrutadas estão a Beclin 1, que em complexo com Vps34 e Vps15 atuam no processo de nucleação (Figura 4c). Em seguida, Atg12 é conjugada com Atg5 que se associa com Atg16L formando um complexo denominado Atg16 (Mizushima et al., 2003) (Figura 4d). O complexo Atg16 se associa com a membrana do autofagossoma onde a sua atividade permite a expansão e progressão da autofagia (Mizushima et al., 2003). Além disso, em um processo semelhante à ubiquitinação, a proteína LC3 é clivada por Atg4 para expor um resíduo de glicina C-terminal, originando a LC3-I, que ao ser conjugado com fosfatidiletanolamina (PE) por um processo de ativação, origina LC3-II (Kabeya et al., 2004) (Figura 4d); esta, por sua vez, é recrutada à membrana do autofagossoma. Por participar da fase de progressão da autofagia, a LC3-I/II é considerada um importante marcador deste processo (Kabeya et al., 2004). Uma vez formado o autofagossoma, este pode se fundir com lisossomas, resultando na formação do autolisossomo, estrutura na qual ocorrerá a degradação (Suzuki e Ohsumi, 2007).

O papel da autofagia no câncer é complexo e pode variar dependendo do tipo de tumor ou do contexto. Tumores primários e linhagens celulares de câncer de pâncreas mostram elevada autofagia em condições basais (Fujii et al., 2008). Neste câncer, quando a autofagia é inibida, um aumento de espécies reativas de oxigênio, danos no DNA e disfunção mitocondrial são observados, o que acaba culminando com a redução do crescimento tumoral e, portanto, indicando a participação da autofagia no processo de sobrevivência celular (Yang et al., 2011). Por outro lado, induzir morte celular autofágica pode ser uma estratégia promissora para o tratamento do câncer pancreático, uma vez que foi demonstrado que a inibição de PKC δ (proteína quinase C delta) conduz, de forma eficiente, à morte celular por autofagia (Ozpolat et al., 2007). Embora a autofagia seja um interessante alvo na terapêutica, o ponto chave no qual a autofagia deixa de ser importante para o crescimento do câncer de pâncreas, e passa a participar do processo de morte celular, ainda não está compreendido (Grasso et al., 2012). Enquanto promotores de autofagia podem induzir a morte celular mediada por autofagia em tumores apoptose-resistentes, os inibidores de autofagia podem aumentar a eficácia dos quimioterápicos (Dalby et al., 2010).

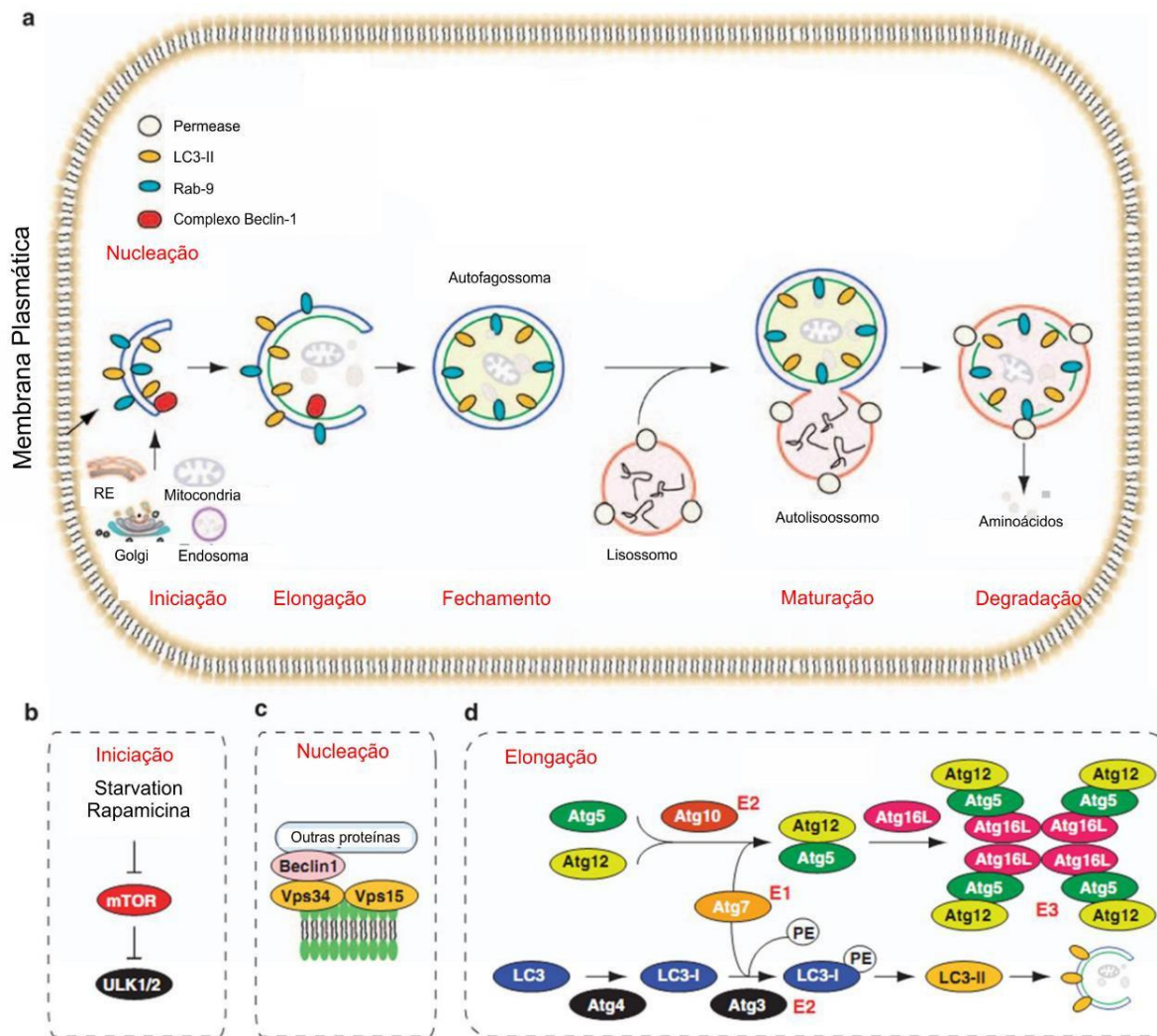


Figura 4. Etapas da autofagia. (a) Formação do autolisossoma. (b) A iniciação ocorre a partir da ativação do ULK1 e ULK2, que permanecem inibidas por mTOR. (c) A nucleação depende do complexo Beclin 1-Vps34-Vps15. (d) O alongamento do fagossoma é mediado por dois sistemas de conjugação ubiquitina-like que, juntos, promovem a montagem do complexo ATG16 e processamento de LC3-PE. A maturação do autofagossoma é promovida pela LC3, Beclin 1 e outras proteínas que permitem a fusão com o lisossoma, (adaptado de Kang et al., 2011).

Apoptose é um mecanismo de morte celular geneticamente programado e conservado evolutivamente, que capacita as células a desencadear um processo de morte altamente regulado em resposta a estímulos inerentes ao desenvolvimento normal ou em situações de estresse celular. O suicídio celular, como é conhecido, ocorre a partir de uma série de eventos bioquímicos como ativação de caspases e inibição de vias de sobrevivência (como PI3K/AKT)

que levam a célula a alterações na morfologia como arredondamento, redução do volume celular e condensação da cromatina, todos estes eventos resultando na fragmentação do DNA e na formação dos corpos apoptóticos, que por sua vez conduzem à morte celular.

Segundo a classificação descrita por Galluzzi e colaboradores (2012), a morte celular por apoptose pode ocorrer (i) por via intrínseca dependente ou independente de caspase; ou (ii) por via extrínseca através dos receptores de morte ou receptores dependentes de ligante (Galluzzi et al., 2012).

A via intrínseca (via mitocondrial) de morte celular por apoptose, é um processo mediado pela permeabilização da membrana externa da mitocôndria e, portanto, está sempre associada a dissipação do potencial da membrana mitocondrial generalizada e irreversível, aumento de proteínas mitocondriais no citosol (e sua possível realocização em outros compartimentos subcelulares), e inibição da cadeia respiratória. O processo intrínseco ocorre então, em resposta as múltiplas condições de estresse intracelular, como por exemplo, algum dano ao DNA e aumento da concentração citosólica de Ca^{+2} . Neste sentido, sinais a favor da indução de morte ou de sobrevivência convergem ao mecanismo de controle centralizado na mitocôndria (Kroemer, Galluzzi e Brenner, 2007). A liberação do citocromo c ocorre, principalmente, por um desbalanço entre as proteínas pró-apoptótica (BAX) e anti-apoptótica (BCL2). Uma vez liberado, o citocromo c interage com o fator de ativação de proteases pró-apoptóticas-1 (Apaf-1) e dATP resultando na formação do apoptossomo, um complexo multiproteico que desencadeia a ativação de caspase-9, que por sua vez, ativa caspase-3 em uma cascata proteolítica. A proteína DIABLO, também conhecida como segundo ativador de caspase derivado da mitocôndria (SMAC) e a proteína HTRA2 facilitam a ativação de caspase por sequestrar e/ou degradar vários membros da família de proteína IAP, que exercem funções inibitórias da apoptose. Além disto, o fator de indução de apoptose (AIF) e endonuclease G (ENDOG) exercem suas funções em favor da

apoptose, de maneira caspase-independente por translocarem-se para o núcleo e mediar em grande escala a fragmentação do DNA (Figura 5A).

A outra forma pela qual a apoptose pode ser iniciada é por via extrínseca que é mediada por receptores de morte na membrana celular, os quais transmitem um sinal para o interior da célula (Ashkenazi e Dixit, 1999). Essa sinalização pode ocorrer via receptor de morte [TNFR, Fas (CD95), DR3 e DR6], ou por receptores dependentes de ligação (por exemplo, receptores de netrina) que só exercem sua função de sinalização de morte, quando o ligante atinge concentrações muito baixas (Mehlen e Bredesen, 2011). No caso da sinalização por receptores de morte, quando transduzido para o interior do citoplasma o sinal é reconhecido pelo domínio de adaptadores associado ao receptor Fas (FADD) e TRADD que ativam os complexos indutores de morte, denominados DISC. Em adição aos domínios que recebem o estímulo de morte, os adaptadores FADD contêm domínios efetores de morte, os quais interagem formando um complexo e sequestrando as pró-caspases 8 ou 10 para o complexo DISC. Uma vez ativadas, estas caspases (8 e/ou 10) podem (i) ativar as pró-caspases executoras 3, 6 ou 7; ou (ii) estimular a permeabilização da membrana mitocondrial externa, através da clivagem do domínio BH3 da proteína BID (Figura 5B). Proteínas c-IAPs e c-FLIPs exercem função pró-sobrevivência acopladas ao complexo DISC, caso o estresse extracelular não persista. Além disso, a apoptose extrínseca também pode ocorrer por receptores dependentes de ligante, tais como DCC ou UNC5B, que transmitem sinais letais na ausência de seu ligante (netrina-1). No caso de DCC e UNC5B, a sinalização pró-apoptótica prossegue através da montagem de um complexo entre TUCAN e caspase-9 ou pela ativação mediada por desfosforilação da proteína quinase 1 associada a morte (DAPK1) pela proteína fosfatase 2A (PP2A). DAPK1 pode mediar a ativação direta de caspases ou via permeabilização da membrana mitocondrial através da clivagem de BID (Figura 5B).

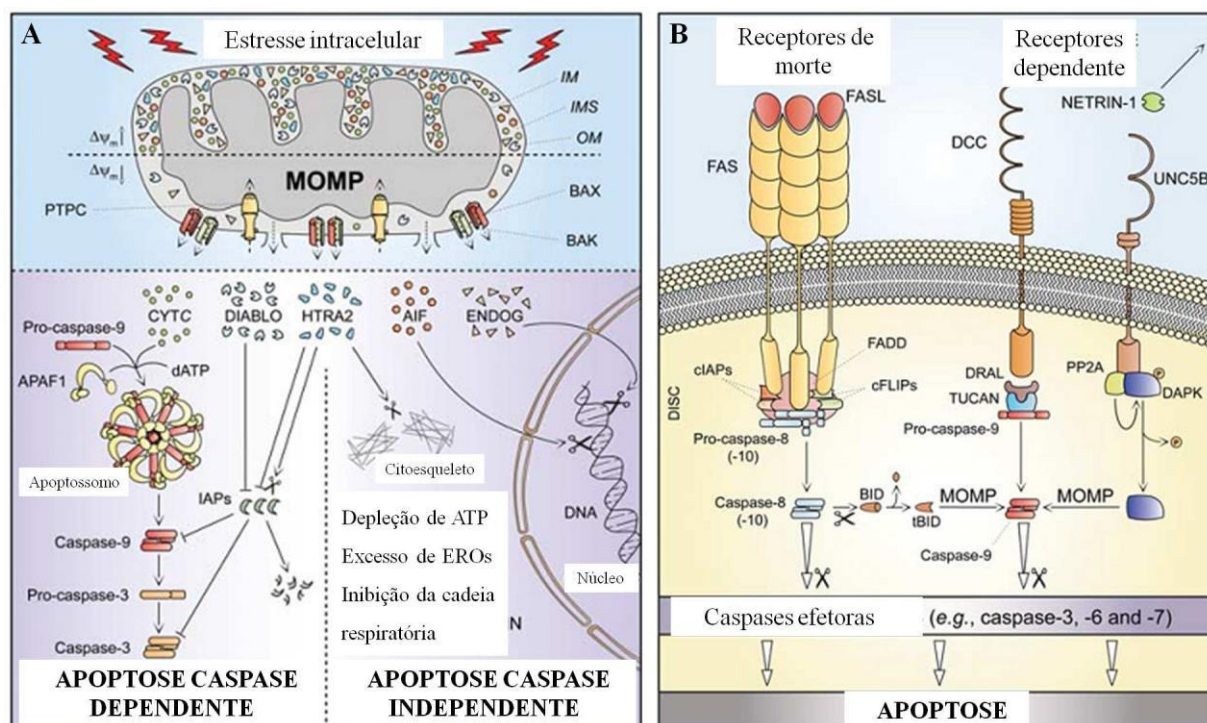


Figura 5. Indução de apoptose pelas vias intrínseca e extrínseca. (A) A via intrínseca de indução da apoptose envolve a ativação da pró-caspase 9 pela liberação de proteínas apoptogênicas da mitocôndria para o citoplasma, como o citocromo c. Com interação do fator de ativação de proteases pró-apoptóticas-1 (Apaf-1) e formação do apoptossomo, ocorre a consequente ativação da caspase 9. Uma vez ativada, a caspase 9 ativa uma série de outras pró-caspases como, por exemplo, as caspases 3, 6 e 7 que levam a execução do sinal apoptótico. AIF e endonuclease G que também são liberadas quando ocorre permeabilização da membrana mitocondrial translocam-se diretamente para o núcleo no qual executarão a fragmentação do DNA (função independente de caspases). (B) A via extrínseca de indução da apoptose é mediada pelos receptores de morte, os quais transmitem um sinal de morte para o interior da célula que podem culminar com a ativação de caspase 8 (ou 10) quando ocorre via receptores de morte, ou caspase 9 via receptores dependentes de ligantes. Uma vez ativadas, estas caspases ativam as pró-caspases executoras 3, 6 ou 7 seja diretamente ou via mitocôndria. Abreviaturas contidas na figura: IM, membrana interna da mitocôndria; IMS, espaço intermembrana da mitocôndria; OM, membrana externa da mitocôndria; MOMP, permeabilização da membrana externa da mitocôndria (adaptado a partir de Galluzzi et al., 2012).

No câncer de pâncreas, a liberação de produtos mitocondriais está sempre envolvida no mecanismo apoptótico, independentemente do estímulo inicial envolver ou não receptores de morte ou estresse ambiental (Adrian, 2007). Isso se deve ao fato da alta expressão de proteínas

(FAP-19 e c-FLIP) que tem a capacidade de inibir os sinais de morte, tornando assim o câncer pancreático insensível a apoptose por via extrínseca (Elnemr et al., 2001). Somado a isso, a resistência ao sinal apoptótico pode estar envolvida com o estado inativo do precursor, pró-caspase 3. Seu estado inativo é mantido por um bloqueio de resíduos de ácido aspártico essenciais para a catálise (Roy et al., 2001). Além disso, essa protease é altamente expressa em células pancreáticas cancerosas e esta expressão está relacionada, não apenas com a resistência a indução de apoptose, como também com a capacidade de invasão desse tumor (Satoh et al., 2000). Por conta dessa dificuldade em induzir apoptose em células de câncer de pâncreas, vários estudos têm sugerido a indução de morte autofágica como estratégia terapêutica viável em tumores apoptose resistente.

Introdução Geral

Objetivos Gerais

O câncer de pâncreas surpreende por sua agressividade, que está principalmente associada as diversas alterações moleculares que contribuem para a rápida progressão da doença, bem como, para a elevada resistência à quimioterapia. Desta forma, uma descrição do mecanismo molecular responsável pelo efeito biológico de novos compostos, abre uma nova possibilidade para melhorar a eficácia terapêutica contra o câncer pancreático.

Neste sentido, dividimos este estudo em dois capítulos, dos quais os objetivos gerais foram:

Capítulo 1 - Investigar a atividade antitumoral do calix[6]areno em células de câncer de pâncreas, bem como, definir os mecanismos envolvidos nesta atividade, principalmente relacionada com a redução da viabilidade e proliferação celular, somado a indução de morte e inibição da adesão e migração de células humanas de câncer de pâncreas (Panc-1);

Capítulo 2 - Buscar moléculas ativas que superem a resistência do câncer de pâncreas à indução de morte celular por apoptose, a partir do estudo de estrutura-atividade realizado com derivados de goniotalamina e piplartina;

Introdução Geral

Referências Bibliográficas

- Adrian TE (2007). Inhibition of pancreatic cancer cell growth. *Cellular and Molecular Life Sciences*. 64: 2512–2521.
- Alexander S, Friedl P (2012). Cancer invasion and resistance: interconnected processes of disease progression and therapy failure. *Trends in Molecular Medicine*. 18(1): 13-16.
- Ali N, MacLeod S, Jean Hine R, Chowdhury P (2009). Cellular signaling mechanisms in pancreatic apoptosis. Chen GG, Lai PBS (eds.), in *Apoptosis in Carcinogenesis and Chemotherapy*. Cap 13: 295-325.
- Arlt A, Muerköster SS, Schäfer H (2010). Targeting apoptosis pathways in pancreatic cancer. *Cancer Let*. Epub ahead of print.
- Ashkenazi A, Dixit VM (1999). Apoptosis control by death and decoy receptors. *Current Opinion in Cell Biology*. 11: 255–260.
- Bachem MG, Schünemann M, Ramadani M, Siech M, Beger H, Buck A, Zhou S, Schmid-Kotsas A, Adler G. (2005). Pancreatic carcinoma cells induce fibrosis by stimulating proliferation and matrix synthesis of stellate cells. *Gastroenterology*. 128(4), 907–921.
- Chaffer CL, Weinberg RA (2011). A perspective on cancer cell metastasis. *Science*. 331: 1559-1564.
- Dalby KN, Tekedereli I, Lopez-Berestein G, Ozpolat B (2010). Targeting the prodeath and prosurvival functions of autophagy as novel therapeutic strategies in cancer. *Autophagy*. 6(3): 322–329.
- Denton D, Nicolson S, Kumar S (2012). Cell death by autophagy: facts and apparent artefacts. *Cell Death and Differentiation*. 19: 87-95.

- Elnemr A, Ohta T, Yachie A, Kayahara M, Kitagawa H, Fujimura T, Ninomiya I, Fushida S, Nishimura GI, Shimizu K, Miwa K (2001). Human pancreatic cancer cells disable function of Fas receptors at several levels in Fas signal transduction pathway. *International Journal of Oncology*. 18: 311–316.
- Fawcett J, Harris AL (1992). Cell adhesion molecules and cancer. *Current Opinion Oncology*. 4: 142-148.
- Fidler IJ (2003). The pathogenesis of cancer metastasis: the seed and soil hypothesis revisited. *Nature Reviews Cancer*. 3: 453–458.
- Fujii S, Mitsunaga S, Yamazaki M, Hasebe T, Ishii G, Kojima M, Kinoshita T, Ueno T, Esumi H, Ochiai A (2008). Autophagy is activated in pancreatic cancer cells and correlates with poor patient outcome. *Cancer Science* 99 (9): 1813–1819.
- Fulda S (2009a). Apoptosis pathways and their therapeutic exploitation in pancreatic cancer. *Journal of Cellular and Molecular Medicine*. 13: 1221–1227.
- Fulda S (2009b). Tumor resistance to apoptosis. *International Journal of Cancer*. 124: 511–515.
- Galluzzi L, Maiuri MC, Vitale I, Zischka H, Castedo M, Zitvogel L, Kroemer G (2007). Cell death modalities: classification and pathophysiological implications. *Cell Death and Differentiation*. 14, 1237–1266.
- Galluzzi L, Vitale I, Abrams JM, Alnemri ES, Baehrecke EH, Blagosklonny MV, Dawson TM, Dawson VL, El-Deiry WS, Fulda S, Gottlieb E, Green DR, Hengartner MO, Kepp O, Knight RA, Kumar S, Lipton SA, Lu X, Madeo F, Malorni W, Mehlen P, Nunez G, Peter ME, Piacentini M, Rubinsztein DC, Shi Y, Simon HU, Vandenabeele P, White E, Yuan J, Zhivotovsky B, Melino G, Kroemer G (2012). Molecular definitions of cell death subroutines: recommendations of Nomenclature Committee on Cell Death 2012 *Cell Death and Differentiation*. 19: 107-120.

- Ganley IG, Lam DH, Wang J, Ding X, Chen S, Jiang X (2009). ULK1 ATG13 FIP200 Complex mediates mTOR signaling and is essential for autophagy. *Journal of Biological Chemistry*. 284(18): 12297–12305.
- Gillen S, Schuster T, Buschenfelde CM, Friess H, Kleeff J (2010). Preoperative/Neoadjuvant therapy in pancreatic cancer: A systematic review and meta-analysis of response and resection percentages. *PLoS Medicine*. 7(4): 1-15.
- Grasso D, Garcia MN, Iovanna JL (2012). Autophagy in pancreatic cancer. *International Journal of Cell Biology*. 7.
- Gupta GP, Massagué J. (2006). Cancer metastasis: building a framework. *Cell*. 127(4):679-95.
- Hamacher R, Schmid RM, Saur D, Schneider G (2008). Apoptotic pathways in pancreatic ductal adenocarcinoma. *Molecular Cancer*. 7: 64.
- Hanahan D, Weinberg RA (2000). The hallmarks of cancer. *Cell*. 100: 57.
- Hidalgo M (2010). Pancreatic cancer. *The New England Journal of Medicine*. 362(17): 1605-1617.
- Hosokawa N, Hara T, Kaizuka T, Kishi C, Takamura A, Miura Y, Iemura S, Natsume T, Takehana K, Yamada N, Guan JL, Oshiro N, Mizushima N (2009). Nutrient-dependent mTORC1 association with the ULK1–Atg13–FIP200 complex required for autophagy, *Molecular Biology of the Cell*. 20(7): 1981–1991.
- Hruban RH, Adsay NV, Albores-Saavedra J, Compton C, Garrett ES, Goodman SN, Kern SE, Klimstra DS, Klöppel G, Longnecker DS, Lüttges J, Offerhaus GJ (2001). Pancreatic intraepithelial neoplasia: a new nomenclature and classification system for pancreatic duct lesions. *The American Journal of Pathology*. 25(5): 579–586.
- Hruban RH, Wilentz RE, Kern SE (2000). Genetic progression in the pancreatic ducts. *The American Journal of Pathology*. 156: 1821–1825.

Hynes RO (2002). Integrins: bidirectional, allosteric signaling machines. *Cell* 110: 673-687.

INCA (<http://www.inca.gov.br>). – acessado em 12/12/2012 e em 10/03/2013.

Jemal A, Bray F, Center MM, Ferlay J, Ward E, Forman D (2011). Global cancer statistics. *CA Cancer Journal for Clinicians*. 61: 69–90.

Jones L, Ghaneh P, Humphreys M, Neoptolemos JP (1999). The matrix metalloproteinases and their inhibitors in the treatment of pancreatic cancer. *Annals of New York Academy Science*. 880: 288–307.

Kabeya Y, Mizushima N, Yamamoto A, Oshitani-Okamoto S, Ohsumi Y, Yoshimori T (2004). LC3, GABARAP and GATE16 localize to autophagosomal membrane depending on form-II formation. *Journal of Cell Science* 117(13): 2805–2812.

Kahari VM, Saarialho-Kere U (1997). Matrix Metalloproteinases in Skin. *Experimental Dermatology*. 6: 199-213.

Kang R, Zeh HJ, Lotze MT, Tang D (2011). The Beclin 1 network regulates autophagy and apoptosis. *Cell Death and Differentiation*. 18: 571–580.

Kroemer G, Galluzzi L, Brenner C (2007). Mitochondrial Membrane Permeabilization in Cell Death. *Physiology Review* 87: 99–163.

Mehlen P, Bredesen DE (2011). Dependence receptors: from basic research to drug development. *Science Signalling*. 25(4): 157.

Mihaljevic AL, Michalski CW, Friess H, Kleeff J (2010). Molecular mechanism of pancreatic cancer—understanding proliferation, invasion, and metastasis. *Langenbecks Archives Surgery*. 395:295–308.

Mizushima N, Kuma A, Kobayashi Y, Yamamoto A, Matsubae M, Takao T, Natsume T, Ohsumi Y, Yoshimori T (2003). Mouse Apg16L, a novel WD-repeat protein, targets to the

- autophagic isolation membrane with the Apg12-Apg5 conjugate. *Journal of Cell Science* 116(9): 1679–1688.
- Muerkoster SS, Werbing V, Koch D, Sipos B, AmMerpohl O, Kalthoff H, Tsao MS, Folsch UR, Schafer H (2008). Role of myofibroblasts in innate chemoresistance of pancreatic carcinoma-epigenetic downregulation of caspases. *International Journal of Cancer*. 123: 1751–1760.
- O'Toole EA (2001). Extracellular matrix and keratinocyte migration. *Clinical and Experimental Dermatology* 26: 525-530.
- Ozpolat B, Akar U, Mehta K, Fok J, Kondo Y, Lopez-Berestein G (2007) PKC δ and tissue transglutaminase (TG2) are novel inhibitors of autophagy. *Molecular Cancer Research*. 5: 241-249.
- Rolli M, Fransvea E, Pilch J, Saven A, Felding-Habermann B (2003). Activated integrin $\alpha 5 \beta 3$ cooperates with metalloproteinase MMP-9 in regulating migration of metastatic breast cancer cells. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the USA*. 100: 9482-9487.
- Roy S, Bayly CI, Gareau Y, Houtzager VM, Kargman S, Keen SL, Rowland K, Seiden IM, Thornberry NA, Nicholson DW (2001). Maintenance of caspase-3 proenzyme dormancy by an intrinsic “safety catch” regulatory tripeptide. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the USA*. 98: 6132–6137.
- Rozenblum E, Schutte M, Goggins M, Hahn SA, Panzer S, Zahurak M, Goodman SN, Sohn TA, Hruban RH, Yeo CJ, Kern SE (1997). Tumor-suppressive pathways in pancreatic carcinoma. *Cancer Research*. 57(9): 1731–1734.
- Satoh K, Kaneko K, Hirota M, Toyota T, Shimosegawa T (2000). The pattern of CPP32/caspase-3 expression reflects the biological behavior of the human pancreatic duct cell tumors. *Pancreas*. 21: 352–357.

- Satoh K, Ohtani H, Shimosegawa T, Koizumi M, Sawai T, Toyota T (1994). Infrequent stromal expression of gelatinase A and intact basement membrane in intraductal neoplasms of the pancreas. *Gastroenterology* 107: 1488–1495.
- Sawai H, Funahashi H, Yamamoto M, Okada Y, Hayakawa T, Tanaka M, Takeyama H, Manabe T (2003). Interleukin-1 α enhances integrin α (6) β (1) expression and metastatic capability of human pancreatic cancer. *Oncology*. 65: 167-173.
- Sawai H, Okada Y, Funahashi H, Matsuo Y, Takahashi H, Takeyama H, Manabe T (2006). Integrin-linked kinase activity is associated with interleukin-1 α -induced progressive behavior of pancreatic cancer and poor patient survival. *Oncogene*. 25: 3237-3246.
- Sawai H, Okada Y, Funahashi H, Takahashi H, Matsuo Y, Yasuda A, Ochi N, Takeyama H, Manabe T (2008). Basement membrane proteins play an important role in the invasive processes of human pancreatic cancer cells. *Journal of Surgical Research*. 144: 117–123.
- Segura MF, Hanniford D, Menendez S, Reavie L, Zou X, Alvarez-Diaz S, Zakrzewski J, Blochin E, Rose A, Bogunovic D, Polsky D, Wei J, Lee P, Belitskaya-Levy I, Bhardwaj N, Osman I, Hernando E (2009). Aberrant miR-182 expression promotes melanoma metastasis by repressing FOXO3 and microphthalmia-associated transcription factor. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the USA*. 106(6):1814-1819.
- Siegel R, Naishadham DMA, Jemal A (2012). Cancer statistics. *CA Cancer Journal Clinical*. 62: 10–29.
- Siegel R, Naishadham DMA, Jemal A (2013). Cancer statistics. *CA Cancer Journal Clinical*. 63: 11–30.
- Stathis A, Moore MJ (2010) Advanced pancreatic carcinoma: current treatment and future challenges. *Nature Reviews Clinical Oncology*. 7: 163-172.

- Suzuki K, Ohsumi Y (2007). Molecular machinery of autophagosome formation in yeast, *Saccharomyces cerevisiae*. *FEBS Letters*. 581(11): 2156–2161.
- Valastyan S, Weinberg RA (2011). Tumor metastasis: molecular insights and evolving paradigms. *Cell*. 147: 275 – 292.
- Wirawan E, Berghe TV, Lippens S, Agostinis P, Vandenabeele P (2012). Autophagy: for better or for worse. *Cell Research*. 22(1): 43–61.
- Wong HH, Lemoine NR (2009). Pancreatic cancer: molecular pathogenesis and new therapeutic targets. *Nature Review Gastroenterology and Hepatology*. 6(7): 412-422.
- World Health Organization-(<http://www.who.int/cancer/en/>) – acessado em 10/03/2013
- Wu WKK, Coffelt SB, Cho CH, Wang XJ, Lee CW, Chan FKL, Yu J, Sung JJY (2012). The autophagic paradox in cancer therapy. *Oncogene*. 31: 939–953.
- Yang C, Zeisberg M, Lively JC, Nyberg P, Afdhal N, Kalluri R (2003). Integrin $\alpha 1 \beta 1$ and $\alpha 2 \beta 1$ are the key regulators of hepatocarcinoma cell invasion across the fibrotic matrix microenvironment. *Cancer Research*. 63: 8312-8317.
- Yang S, Wang X, Contino G, Liesa M, Sahin E, Ying H, Bause A, Li Y, Stommel JM, Dell’Antonio G, Mautner J, Tonon G, Haigis M, Shirihai OS, Doglioni C, Bardeesy N, Kimmelman AC (2011). Pancreatic cancers require autophagy for tumor growth. *Genes & Development*. 25(7): 717–729.
- Yang Z, Klionsky DJ (2010). Mammalian autophagy: core molecular machinery and signaling regulation *Current Opinion in Cell Biology* 22(2): 124–131.

Introdução Geral

Capítulo 1

Avaliação da atividade antitumoral *in vitro* e estudo da modulação de vias de sinalização por Calix[6]areno em células humanas de câncer de pâncreas

Capítulo 1

Resumo

O câncer de pâncreas ocupa a quarta posição entre as mortes relacionadas ao câncer na América do Norte. Praticamente nenhum progresso tem sido feito no sentido de diagnosticar e tratar pacientes com tumores em estágio avançado. Somado a isso, a agressividade do câncer do pâncreas está intimamente relacionada com níveis elevados de mediadores pró-sobrevivência, que propiciam a rápida progressão da doença, resistência e metástase. O principal objetivo deste estudo foi definir os mecanismos pelos quais calix[6]areno (CLX6) diminui, de forma eficiente, a agressividade da linhagem humana droga-resistente de câncer de pâncreas (Panc-1). CLX6 foi potente na redução da viabilidade celular de Panc-1 ($IC_{50} = 17,9 \text{ uM}$), enquanto que o tratamento com gencitabina e 5-fluorouracil não resultou em redução significativa da viabilidade destas células. Em relação aos mecanismos moleculares, CLX6 levou ao bloqueio do ciclo celular na fase G0/G1 através da redução nos níveis de Pim-1, CDK2, CDK4 e inibição da proteína retinoblastoma. CLX6 ainda reduziu significativamente os níveis de receptores tirosina quinases (Mer e AXL), ambos superexpressos no câncer de pâncreas. Consequentemente, houve inibição da PI3K e mTOR, estas proteínas são conhecidas por serem positivamente moduladas por Mer e AXL. Apesar de diminuir a fosforilação de AKT em Thr308, CLX6 causou um incremento de fosforilação em Ser473. Estes resultados, em conjunto com um aumento de BiP, IRE1- α e redução nos níveis de HSP90 constituem a base molecular para explicar a capacidade de CLX6 no desencadeamento de estresse do retículo endoplasmático e da morte celular autofágica. CLX6 foi também um inibidor potente da adesão celular e da migração associada à inibição de PDGFR e níveis reduzidos de integrina. Por fim, a inibição de PDGFR, resultou em um aumento da atividade da proteína fosfatase LMWPTP que, juntamente com a diminuição dos níveis de integrina, levou a inibição de FAK. A modulação da FAK pode ser responsável pela redução dos níveis de expressão de MMP-2 e MMP-9. Nossas descobertas indicam CLX6 como um candidato potencial para superar a agressividade do câncer de pâncreas. É importante ressaltar que fornecemos evidências de que CLX6 afeta as principais vias que são geralmente disfuncionais no câncer de pâncreas, uma característica altamente desejável para quimioterápicos.

Capítulo 1

1. Introdução

O câncer de pâncreas é a quarta principal causa de mortes relacionadas ao câncer na América do Norte (Siegel, Naishadham, Jemal, 2013). Este tipo de câncer é extremamente agressivo, devido à alta capacidade de invasão local e metástases, mesmo durante os estágios iniciais da doença (Stathis e Moore, 2010). Além disso, a grande heterogeneidade do câncer de pâncreas, causada pela desregulação em múltiplas vias de sinalização, culminam na resistência intrínseca ou adquirida à quimioterapia, radioterapia, ou ambos (Mimeault, Hauke e Batra, 2008; Kim e Siomeone, 2011). Atualmente, as abordagens terapêuticas para o câncer de pâncreas são bastante ineficientes e incapazes de reverter a biologia agressiva da doença. Assim, a falta de novas estratégias de quimioterápicos é refletida no pequeno aumento na sobrevida dos pacientes com câncer de pâncreas, ao longo dos últimos 30 anos (Siegel, Naishadham e Jemal, 2012). A partir desta perspectiva, a busca de novas drogas para tratamento do câncer de pâncreas e a definição do mecanismo molecular de ação são cruciais para melhorar a eficácia do tratamento desta neoplasia. Neste contexto, calix[n]arenos têm emergido como agentes antitumorais promissores.

Calixarenos são compostos macrocíclicos de unidades fenólicas unidas por grupos metilenos ou sulfúricos, nas posições 2 e 6 orto à hidroxila (de Fátima et al., 2009). O nome calixareno foi sugerido por Gutsche (1990), sendo que *calix* significa vaso e *areno* presença de anéis aromáticos. Estes compostos permitem a inclusão de compostos variados em seu anel macrocíclico, o que torna os calixarenos interessantes na química supramolecular, possibilitando reconhecimento molecular, catálise, transporte de moléculas e íons metálicos. Os calixarenos apresentam alto ponto de fusão, baixa solubilidade e elevada acidez (Lazzarotto et al., 1995).

Por serem utilizados como plataformas para o desenvolvimento de novos fármacos e como carreadores de fármacos, várias propriedades biológicas dos calixarenos substituídos têm sido reportadas, tais como, atividade antiviral (Motornaya et al., 2006), antifúngica (Paquet et al., 2006), antibacteriana (Conforth et al., 1955; Jain e Jahagirdar 1985; Hart et al., 1996; Colston et al., 2004), além da atividade anti-angiogênica e antitumoral (Blaskovic et al., 2000; Sebti e Hamilton, 2000; Dings et al., 2006; Zhou et al., 2006; Viola et al., 2008; Dings et al., 2012). Com relação à atividade antitumoral, o calix[4]areno tem sido até o momento o mais estudado. Este composto, bem como, seus derivados apresentaram interessante atividade antitumoral *in vitro* e *in vivo* (Blaskovic et al., 2000; Sebti e Hamilton, 2000; Dings et al., 2006; Zhou et al., 2006; Dings et al., 2012). O tratamento diário de camundongos *nude* injetados com células U87MG (glioblastoma humano) com calix[4]areno substituído resultou em significativa redução tumoral e resultados similares foram observados com células A-549 (adenocarcinoma de pulmão humano) (Blaskovic et al., 2000; Sebti e Hamilton, 2000). O tratamento diário com o calix[4]areno não causou efeitos tóxicos nos animais, mesmo após um mês de administração. Além disso, Dings e colaboradores (2006) observaram uma diminuição do crescimento do tumor de ovário (58-65%) e melanoma (42-57%) em camundongos tratados com derivado de calix[4]areno. Adicionalmente, derivados do calix[8]areno inibiram a migração e proliferação de glioma de ratos (Viola et al., 2008).

A respeito do calix[6]areno (CLX6) (Figura 1), Kamada e colaboradores (2010), utilizando derivados, reportaram um aumento da atividade do fator de transcrição, proteína p53, através da estabilização da sua forma tetramérica. No entanto, pouco ou praticamente nenhum estudo relata a atividade biológica de calixarenos na sua forma precursora. Recentemente nosso grupo avaliou a atividade do CLX6 sobre células leucêmicas que promoveu efeito concentração-dependente, reduzindo a viabilidade celular em 50% (IC₅₀) com valores entre 1-5 µM para

células K562, e entre 5-10 μM para a linhagem Lucena-1 (células resistentes a quimioterápicos). Além disso, o CLX6 induziu morte celular por apoptose nas células leucêmicas, e foi mais tóxico para células tumorais do que para células normais (Ferreira, 2010).

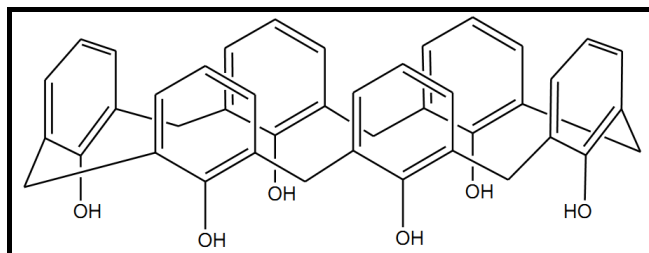


Figura 1. Estrutura química do calix[6]areno.

Neste contexto, a investigação da atividade antitumoral do CLX6 em células de câncer de pâncreas, bem como, o estudo dos mecanismos envolvidos nesta atividade coloca este composto como um candidato em potencial para a superação da agressividade do câncer de pâncreas.

2. Objetivos

O principal objetivo deste estudo foi avaliar a atividade antitumoral e definir o mecanismo de ação do CLX6 em uma linhagem humana de câncer de pâncreas altamente agressiva e resistente (Panc-1).

2.1. Objetivos específicos

- a) Avaliar a atividade citotóxica *in vitro* do CLX6 frente a diferentes linhagens de câncer de pâncreas (Panc-1, MiaPaca-1 e BxPC-3);
- b) Avaliar o efeito do CLX6 na proliferação celular;
- c) Investigar a modulação de proteínas envolvidas na progressão ciclo celular de Panc-1 frente ao tratamento com CLX6;
- d) Analisar a expressão e atividade de proteínas envolvidas na agressividade e sobrevivência de Panc-1 tratadas com CLX6;
- e) Definir o tipo de morte celular induzido pelo composto nas células Panc-1;
- f) Avaliar a capacidade de adesão e migração das células Panc-1 tratadas com CLX6;
- g) Investigar a modulação dos marcadores de adesão e migração induzidos por CLX6.

3. Materiais e Métodos

3.1. Reagentes

Meio de cultura Dulbecco's Modified Eagle's Medium (DMEM), sulfato de estreptomicina e penicilina foram obtidos da Nutricell (Campinas, SP, Brasil), enquanto que o Soro Fetal Bovino (SFB) foi obtido da Gibco (Invitrogen, NY, EUA). 1-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difeniltetrazólio (MTT), albumina de soro bovino (BSA), cloreto de sódio (NaCl), Tween 20, desoxicolato de sódio, o-vanadato, fluoreto de sódio (NaF), aprotinina, leupeptina, ditioneitol (DTT), dodecilsulfato de sódio (SDS), tris(hidroximetil) aminometano (Tris), 4-(2-hidroxietil)-1-piperazina ácido etanosulfônico (HEPES), fluoreto de fenilmetilsulfonil (PMSF), cloreto de potássio (KCl), cloreto de magnésio ($MgCl_2$), ácido etilenodiaminotetracético (EDTA), ácido etilenoglicoltetracético (EGTA), fosfato de sódio monobásico (NaH_2PO_4), glicina, hidróxido de sódio (NaOH), bicarbonato de sódio ($NaHCO_3$), cloreto de cálcio ($CaCl_2$), gelatina, acrilamida, bis-acrilamida, kit para dosagem de atividade fosfatásica (Protein Tyrosine Phosphatase Assay Kit - PTP 101), ribonuclease (RNase) tipo I, iodeto de propídeo (PI) e cloroquina foram obtidos da Sigma Chemical Co. (St. Louis, MO, EUA). Coomassie Blue R-250, azul de bromofenol, Triton X-100, glicerol, metanol e etanol foram obtidos da Merck Sharp & Dohme (Whitehouse Station, NJ, EUA). Kit para avaliar a proliferação celular - Cell Proliferation ELISA, BrdU (chemiluminescent) foi obtido da Roche Applied Science (Mannheim, Germany). Os anticorpos primários para a Ciclina D1 (Cat. Nº #2978S), CDK2 (Cat. Nº #2546), CDK4 (Cat Nº #2906), Caspase-3 (Cat. Nº #9665), BAX (Cat. Nº #2772), BCL2 (2870), fosfo-fosfatidilinositol-3 quinase subunidade 85 (PI3K-p85 – Tyr 458/ p55 – Tyr 199) (Cat. Nº #4228S), PI3K p85 (Cat. Nº #4257), GAPDH (Cat. Nº 2118), LC3B (Cat. Nº #2775), Mer (Cat. Nº #9178S), fosfo-mTOR (Ser 2448) (Cat. Nº #2971S), MMP2 (Cat. Nº #4022), MMP9 (Cat. Nº #3852), fosfo-PTEN

(Ser380/Thr382/383) (Cat. N° #9549S), PTEN (Cat. N° #9559), AKT-1 (Cat. N° #2938S), fosfo-AKT (Thr 308) (Cat. N° #4056S), fosfo-AKT (Ser 473) (Cat. N° #4060), AXL (Cat. N° #4566), fosfo-FAK (Tyr576/577) (Cat. N° #3281), FAK (Cat. N° #3285), BiP (Cat. N° #3177), IRE1- α (Cat. N° #3294), fosfo- SAPK/JNK (Thr183/Tyr185) (Cat. N° #9255), SAPK/JNK (Cat. N° #9258), fosfo-RB (Ser795) (Cat. N° #9301S), PP2A subunidade C não metilada (Cat. N° #4957S), Pim-1 (Cat. N° #2907S) foram obtidos da Cell Signaling Technology (Beverly, MA, EUA). Anticorpos primários para a LMWPTP (Cat. N° ab26232) e integrina beta 3 (Cat. N° ab7167) foram obtidos da Abcam (San Francisco, CA, EUA). Anticorpo primário para mTOR (Cat. N°2949) foi obtido da Sigma-Aldrich (St. Louis, MO, EUA). Anticorpo primário para HSP90 (Cat. N° sc-27987) foi obtido da Santa Cruz Biotechnology. Os anticorpos secundários conjugados com peroxidase anti-coelho (Cat. N° #7074) e anti-camundongo (Cat. N° #7076) foram obtidos da Cell Signaling Technology, anti-ovelha (Cat. N° ab6895) da Abcam. Anticorpo secundário conjugado a Alexa-456 utilizado na microscopia confocal foi obtido da Invitrogen Life Technologies (Carlsbad, CA, EUA). Os reagentes utilizados na microscopia eletrônica de transmissão foram comprados da Electron Microscopy Sciences (Hatfield, PA, USA).

3.2. Cultura de células

Três linhagens de câncer de pâncreas foram utilizadas nesse trabalho, todas elas de origem humana. Uma breve descrição genotípica e fenotípica das três linhagens pode ser observada na tabela 1. A linhagem celular Panc-1 foi adquirida no Banco de Células do Rio de Janeiro (BCRJ) enquanto que as linhagens celulares BxPC-3 e MIA PaCa-2 foram gentilmente doadas pelo Dr. Arnold Spek (Amsterdam Medical Center, Amsterdam, Holanda). O cultivo das linhagens celulares foi realizado em meio DMEM contendo 100 U/mL de penicilina, 100 μ g/mL

de sulfato de estreptomicina e suplementado com 10% de soro fetal bovino (SFB). As células foram cultivadas em atmosfera umidificada, 5% CO₂ a 37°C e o subcultivo foi realizado periodicamente (2-3 vezes na semana).

3.3. Síntese e diluição do CLX6

O CLX6 foi sintetizado no Laboratório de Estudos em Biologia Química e Orgânica da Universidade Federal de Minas Gerais sob a coordenação do Prof. Dr. Ângelo de Fátima e nos encaminhado para avaliar seu potencial efeito antitumoral. O composto foi previamente diluído em 10% DMSO em meio DMEM sem soro, a fim de se obter uma solução 10 mM. Em seguida, essa solução foi sonicada por 5 min para total solubilização do composto. A concentração de DMSO adicionada ao CLX6 foi utilizada de tal modo que a concentração final após diluição em meio de cultura não fosse citotóxica (0,1%).

3.4. Tratamento das células de câncer de pâncreas e avaliação da viabilidade celular através da função mitocondrial (ensaio do MTT)

Para a análise de viabilidade celular, células de câncer de pâncreas (Panc-1, BxPC-3 e MIAPaCa-2) foram plaqueadas independentemente na densidade de 1×10^5 células/ml em placas de 96 poços (volume de plaqueamento por poço: 100 µl), e incubadas a 37°C, 5% CO₂ por 24 h. Após o tratamento com 0,1; 1; 5, 10; 25 e 50 µM de CLX6 por 24, 48 e 72 h o meio de tratamento foi removido, os poços foram lavados com PBS, em seguida, foram adicionados aos poços meio sem soro contendo MTT (0,5 mg/mL). Após incubação por 4 h a 37°C, o meio foi retirado cuidadosamente e foi adicionado 100 µL de etanol para solubilização do formazan. As placas foram agitadas por 10 min e a absorbância correspondente a cada poço foi lida em leitor

de placas (ELx 800 BIO-TEK) em $\lambda = 570$ nm. Os valores foram expressos em porcentagens de redução de MTT, em relação ao controle DMSO 0,1% (células não tratadas com CLX6) (Mosmann, 1983). Os resultados foram representados como média $\pm$ erro padrão da média de 3 experimentos independentes conduzidos em triplicata.

3.5. Avaliação da viabilidade celular de Panc-1 tratadas com CLX6 ao longo do tempo

Para avaliar se o tratamento com CLX6 comprometia a proliferação celular e/ou induzia morte celular, células de câncer de pâncreas (Panc-1) foram plaqueadas e tratadas da mesma forma como descrito anteriormente (Materiais e Métodos 3.4). No entanto, neste experimento a viabilidade celular foi avaliada desde o tempo 0, que corresponde ao momento em que o meio de tratamento contendo ou não o composto foi adicionado a placa. Outras mensurações foram realizadas após 3, 6, 12 e 24 h de tratamento. Da mesma forma como descrito anteriormente (Materiais e Métodos 3.4) a viabilidade celular foi avaliada através do ensaio de redução do MTT. Neste caso, os valores foram expressos em porcentagens de redução de MTT em relação ao tempo 0 para as diferentes concentrações testadas. Os resultados foram representados como média $\pm$ erro padrão da média de 3 experimentos independentes conduzidos em triplicata.

3.6. Análise da proliferação celular pelo ensaio de incorporação do BrdU

Para a análise de proliferação celular, células Panc-1, BxPC-3 e MIAPaCa-2 foram plaqueadas, independentemente, e tratadas com 0,1; 1; 5, 10; 25 e 50 μ M de CLX6 por 24 h. Após o tratamento o protocolo de marcação com bromodesoxiuridina (BrdU) foi seguido conforme instruções do fabricante (Cell Proliferation ELISA, BrdU (chemiluminescent), Roche Applied Science). Os valores foram expressos em porcentagens de incorporação de BrdU, em

relação ao controle DMSO 0,1% (células não tratadas com CLX6). Os resultados foram representados como média $\pm$ erro padrão da média de 3 experimentos independentes conduzidos em duplicata.

3.7. Análise do ciclo celular por citometria de fluxo

Com o objetivo de avaliar o efeito do CLX6 no ciclo celular de Panc-1, as células foram plaqueadas em placas de 6 poços, numa densidade de 3×10^5 células/mL (1 mL/poço), incubadas por 24 h em estufa úmida à 37°C e 5% CO₂. Em seguida, as células foram incubadas por mais 18 h em meio DMEM sem soro, para sincronização do ciclo celular. O tratamento com CLX6 se deu nas 24 h seguintes, utilizando 3 concentrações abaixo da IC₅₀ (concentração que reduziu a viabilidade celular em 50%), previamente determinada. Ao final do tratamento, as células Panc-1 foram tripsinizadas, lavadas com PBS, e ressuspensas em solução de trabalho (1 g/L de citrato de sódio, 0,5 mg/mL de ribonuclease A, 50 µg/mL de iodeto de propídeo e 0,01% de Triton X-100). Após incubação no escuro por 60 min, à temperatura ambiente, as amostras foram analisadas em citômetro de fluxo Gallios (Beckman Coulter, EUA). Os resultados foram representados como média $\pm$ erro padrão da média de 2 experimentos independentes.

3.8. Análise da expressão de proteínas por *Western Blotting*

A fim de avaliar a expressão de proteínas associadas com vias de sobrevivência, ciclo celular e morte das células Panc-1 após o tratamento com CLX6, amostras para *Western Blotting* foram preparadas. Para isso, $1,87 \times 10^5$ células/mL (10 mL/placa) foram plaqueadas em placa de 100 mm, e incubadas por 24 h em estufa úmida à 37°C e 5% de CO₂. Em seguida as células foram tratadas por 24 h com 10 e 20 µM de CLX6. Após o tratamento as células foram coletadas

das placas com o auxílio de um raspador de células (“*cell scraper*”), transferidas para tubos do tipo eppendorf, centrifugadas, lavadas com PBS (3X) e lisadas com tampão de lise apropriado contendo antiproteases. As amostras foram, então, homogeneizadas com sonicador e mantidas em banho de gelo durante 2 h, com agitações a cada 30 min, com o objetivo de aumentar a eficiência da extração de proteínas. Após centrifugação do extrato celular a 21.255 g por 10 min a 4°C, o precipitado foi descartado e o conteúdo de proteínas foi determinado por espectrofotometria através do método de Bradford, utilizando kit comercial (Sigma) e BSA como padrão. Após a dosagem de proteínas as amostras foram acrescidas de tampão de amostra na proporção 1:1 [Tris-HCl 100 mM (pH 6,8), DTT 200 mM, SDS 4%, azul de bromofenol 0,1 % e glicerol 20%]. A seguir, as amostras foram fervidas por 5 min e aplicadas em gel de poliacrilamida (8 - 12%) contendo SDS (SDS-PAGE).

Após a eletroforese, as proteínas foram transferidas para membranas de PVDF (previamente ativadas com metanol) na presença de 20% de metanol e 0,02% de SDS durante 1 h e 30 min, para proteínas de baixo peso molecular, e 4 h para proteínas de alto peso molecular, em amperagem constante de 400 mA. As membranas foram bloqueadas com BSA a 5% preparado em tampão Tris contendo tween 20 a 0,05% (TBST) e incubadas *overnight* com anticorpos primários diluídos 1:1000 em BSA 3%. Em seguida, as membranas foram lavadas com TBST (3X de 5 min) e incubadas com anticorpo secundário específico conjugado com peroxidase-HRP (1:10000) por 1 h e 30 min. Após lavagem das membranas com TBST (3X de 5 min), as bandas foram detectadas por quimioluminescência no equipamento ImageQuant LAS 4000 (GE Healthcare Life Science). A intensidade das bandas foi quantificada por densitometria com o auxílio do programa Image J. Os valores resultantes foram corrigidos pelo valor obtido para o controle interno (gliceraldeído-3 fosfato desidrogenase - GAPDH) correspondente a cada

banda. As intensidades finais foram expressas relativamente ao controle DMSO 0,1% e como Unidades Arbitrárias (u.a.).

3.9. Microscopia Eletrônica de Transmissão

Células Panc-1 foram tratadas com CLX6 (10 e 20 μ M) por 24 h e, em seguida, processadas para microscopia eletrônica. Após o tratamento as células foram coletadas e lavadas duas vezes com PBS, fixadas com glutaraldeído 2,5% em tampão cacodilato de sódio 0,1 M a 4 °C. Após a fixação as células foram lavadas em tampão cacodilato 0,1 M pH 7,2, e pós-fixadas em uma solução contendo 1% tetróxido de ósmio (OsO_4) e 0,8% ferrocianeto de potássio por 1 h. Em seguida, foi realizada a desidratação das amostras em gradiente crescente de acetona e inclusão em resina Epon ®. Em seguida, cortes ultrafinos foram obtidos em um ultramicrotomo e coletados em grades de cobre com 400 mesh, as amostras foram contrastadas com acetato de uranila e citrato de chumbo e as imagens foram obtidas em microscópio eletrônico de transmissão JEOL JM 1400.

3.10. Microscopia Confocal

Células Panc-1 ($6,25 \times 10^4$ células/mL – 1 mL/poço) foram plaqueadas 24 h antes do experimento em lamínulas de vidro (12 mm de diâmetro), inseridas no interior de placas de cultura de 24 poços (1 lamínula por poço). No dia seguinte, as células de câncer de pâncreas foram tratadas e mantidas com 20 μ M de CLX6 por 24 h em estufa úmida à 37°C e 5% CO_2 . Após este período, as células foram lavadas com PBS, fixadas por 20 min com paraformaldeído (PFA) 4% em PBS, tratadas com glicina 0,1 M em PBS por 20 min, permeabilizadas com triton X-100 0,2% por 2 min e bloqueadas com solução de SFB 10% (solução bloqueadora) por 5 min.

Subsequentemente, as células foram incubadas com anticorpo primário anti-LC3 (1:200) por 1 h a 37 °C em câmara umidificada. O anticorpo primário foi previamente diluído em solução bloqueadora. As células foram, então, lavadas 1 vez com PBS e bloqueadas por 1 min. Em seguida, as células foram incubadas com anticorpo secundário fluorescente por 30 min a 37 °C em câmara umidificada. O anticorpo secundário Alexa-Fluor®456 foi diluído 1:1000 em solução bloqueadora. O núcleo das células foi marcado com o cromóforo DAPI. Após 3 lavagens com PBS, as lamínulas foram montadas em lâminas de vidro, utilizando meio de montagem da DAKO. As análises foram feitas no Instituto Nacional de Ciência e Tecnologia de Fotônica aplicada a Biologia Celular (INFABIC), na Universidade Estadual de Campinas – UNICAMP. As amostras foram analisadas usando um confocal Zeiss LSM 780-NLO em um microscópio Axio Observer Z.1 (Carl Zeiss AG, Alemanha) equipado com lentes de imersão 60X. As imagens foram adquiridas sob airy-unity 1, garantindo a confocalidade. Foram adquiridas imagens com 1024 por 1024 pixels e os arquivos foram salvos em formato próprio (lsm) sem perda de qualidade, sendo posteriormente analisadas utilizando programa Image J (NIH).

3.11. Investigação do papel da autofagia na morte celular induzida por CLX6

Para confirmar o papel da autofagia na morte celular induzida por CLX6, o inibidor de autofagia cloroquina (CHL) foi utilizado. Células Panc-1 foram plaqueadas em placas de 96 poços como descrito no item 3.4. Meio com ou sem cloroquina (concentração final 50 µM) foi adicionado à várias concentrações de CLX6 e mantido em contato com as células, durante 24 h. Em seguida, a viabilidade celular foi avaliada por ensaio de redução de MTT, como descrito no método 3.4.

3.12. Avaliação da adesão celular

A fim de avaliar a capacidade de células (Panc-1) aderirem após o tratamento com 10 e 20 μM de CLX6, as células foram plaqueadas ($6,25 \times 10^4$ células/mL – 1 mL/poço) em placas de 24 poços cultivadas em atmosfera umidificada à 37 °C, 5% CO_2 em meio DMEM contendo ou não o composto. A adesão celular foi determinada após 6 h de incubação (tempo em que 100% das células não tratadas, controle, estavam aderidas). Para isso, o meio dos poços foi removido, cada poço foi lavado com PBS e meio sem soro contendo MTT (0,5 mg/mL), foi adicionado. Após incubação por 4 h a 37°C, o meio foi retirado cuidadosamente e foi adicionado 1,0 mL de etanol para solubilização do formazan. As placas foram agitadas por 10 min e a absorbância correspondente a cada poço foi lida em leitor de placas (ELx 800 BIO-TEK) em $\lambda = 570 \text{ nm}$. Os valores foram expressos em porcentagens de redução de MTT em relação ao controle (Mosmann, 1983). A adesão celular foi estimada comparando-se os valores de absorbância do controle DMSO 0,1% com os valores de absorbância das células tratadas com CLX6, sendo expressos em porcentagem em relação ao controle (100% de adesão). Os resultados foram representados como média $\pm$ erro padrão da média de 2 experimentos independentes conduzidos em duplicata.

3.13. Avaliação da migração celular pelo ensaio de *scratch*

A fim de avaliar a migração celular, a linhagem celular Panc-1 foi plaqueada numa densidade de 3×10^5 células/mL (2 mL/poço) em placas de 6 poços, e incubadas à 37 °C e 5% CO_2 por 24 h. Em seguida, um risco no tapete celular foi realizado com a ajuda de uma ponteira 200 μl , o que permitiu a abertura de uma lacuna (área) ausente de células, e o tratamento com CLX6 foi realizado nas concentrações de 5 e 10 μM . Após 24 h de tratamento imagens foram obtidas utilizando Microscópio Zeiss Cell Observer Z1 acoplado a uma câmera AxioCam MRm.

Análises da área de migração foram realizadas com o auxílio do programa Image J. Os valores de porcentagens de migração foram realizados em comparação ao controle DMSO 0,1%. Os resultados foram representados como média $\pm$ erro padrão da média de 2 experimentos independentes realizados em duplicata.

3.14. Quantificação da atividade da proteína fosfatase de baixo peso molecular (LMWPTP) em células Panc-1 tratadas com CLX6

Após exposição às diferentes concentrações (10 e 20 μ M) de CLX6 por 24 h, as células (Panc-1) foram lavadas com PBS e lisadas com tampão específico (50 mmol/L HEPES, pH 7,5, 150 mmol/L NaCl, 1,5 mmol/L $MgCl_2$, 1 mmol/L EGTA, 10% glicerol, 1% Triton X-100, 1 mmol/L PMSF, 1 μ g/mL leupeptina e 1 μ g/mL aprotinina) por 2 h a 4 °C. A seguir, o extrato foi clarificado por centrifugação a 21.255 g por 10 min 4°C e a concentração de proteína determinada por espectrofotometria através do método de Bradford, utilizando kit comercial (Sigma) com albumina de soro bovino (BSA) como padrão. O precipitado foi descartado e o sobrenadante foi incubado com anticorpo específico para LMWPTP e Protein A-Sepharose (proporção de 3 μ L de anticorpo e 50 μ L de beads para cada 1 mL de lisado) para imunoprecipitação. Após 1 h de incubação a 4 °C sob agitação constante, os imunocomplexos foram centrifugados a 21.255 g por 5 min a 4 °C e ressuspensos em tampão HNTG (20 mmol/L HEPES, pH 7,5, 150 mmol/L NaCl, 10% glicerol e 0,1% Triton X-100) gelado. Os imunocomplexos foram lavados 2 vezes com tampão HNTG e 2 vezes com tampão acetato 0,1 mol/L. Adicionalmente, a atividade fosfatásica foi determinada seguindo o protocolo do fabricante (Protein Tyrosine Phosphatase Assay Kit - Sigma-Aldrich), em tampão acetato 0,1 M pH 5,0, contendo 0,25 mmol/L de p-nitrofenil fosfato (pNPP) como substrato. A liberação de

fosfato inorgânico foi determinada colorimetricamente após 45 min de incubação pela leitura da absorbância em 620 nm, que corresponde ao complexo fosfato/molibdato de amônio-verde malaquita. A atividade da enzima foi calculada em nmol de PO_4 /min/mg de proteína e o resultado expresso em relação ao controle DMSO 0,1% (100%). Os resultados foram representados como média $\pm$ erro padrão da média de 2 experimentos independentes conduzidos em duplicata.

3.15. Análise dos dados

Os resultados foram expressos como média $\pm$ erro padrão da média. A análise estatística foi realizada utilizando-se ANOVA seguida por teste de Tukey. Foi adotado o nível de significância $p < 0,05$.

4. Resultados e Discussão

4.1. CLX6 reduz a viabilidade celular de linhagens tumorais de pâncreas humano

O câncer de pâncreas é considerado um grave problema de saúde devido a sua alta incidência e mortalidade associadas ao diagnóstico tardio. Em geral, os quimioterápicos atualmente disponíveis no mercado contribuem apenas para prolongar a vida dos pacientes em poucos meses, no entanto, esses tratamentos dificilmente levam a cura. Assim, a identificação de novos agentes antitumorais contra este tipo de câncer, bem como a definição do mecanismo molecular se faz necessário (Costello et al., 2012).

Neste sentido, os calixarenos aparecem como uma boa alternativa quimioterapêutica, uma vez que uma série de resultados demonstra um potencial antitumoral para derivados dessa classe de compostos. No entanto, para o CLX6 pouca informação é encontrada na literatura. Em 2010, nosso grupo demonstrou o potencial deste composto contra linhagens celulares leucêmicas, inclusive em linhagens altamente resistente (Ferreira, 2010). Além disso, em 2010, Kamada e colaboradores indicaram que derivados de CLX6 aumentavam a estabilização do fator transcricional p53, e que isso pode conduzir o desenvolvimento de um candidato para a terapia do câncer.

A investigação da atividade antitumoral do CLX6 teve início com a avaliação da viabilidade de três linhagens humanas de câncer de pâncreas (Panc-1, MiaPaca-2 e BxPC-3) através do ensaio de redução do MTT. Os resultados obtidos demonstraram que nas três linhagens o CLX6 apresentou significativa redução da viabilidade celular de forma concentração- e tempo- dependente (Figura 2). Os resultados indicaram que no tempo de 24 h a linhagem BxPC-3 nas concentrações mais altas (25 e 50 μ M) foi mais sensível ao CLX6 do que as linhagens Panc-1 e MiaPaca-2, enquanto que a Miapaca-2 foi mais sensível do que a Panc-1

na concentração de 50 μ M. Nos demais tempos de tratamento (48 e 72 h) as três linhagens, com relação à viabilidade celular, responderam praticamente da mesma forma. Os valores de IC₅₀ (concentração que reduz a viabilidade celular em 50%) foram calculados para as diferentes linhagens nos diferentes tempos e estão apresentados na Tabela 1.

Tabela 1. IC₅₀ (μ M) de CLX6 em células de câncer de pâncreas.

	24 h	48 h	72 h
PANC-1	17,9 $\pm$ 5,2	7,3 $\pm$ 3,9	3,5 $\pm$ 1,2
BxPC-3	14,7 $\pm$ 0,6	6,7 $\pm$ 1,9	2,8 $\pm$ 1,1
MIA PaCa-2	28,3 $\pm$ 2,4	4,1 $\pm$ 2,6	1,9 $\pm$ 0,7

IC₅₀ – Concentração que reduz a viabilidade celular em 50%.

Características genótípicas e fenotípicas dessas três linhagens de câncer de pâncreas estão apresentadas na tabela 2. Como observado, a linhagem BxPC-3 é wildtype para a mutação do gene KRAS, o que poderia explicar sua sensibilidade ao tratamento com CLX6 nas maiores concentrações (25 e 50 μ M).

Tabela 2. Origem e perfil genético das linhagens de câncer de pâncreas.

Linhagem celular	Origem	KRAS	P53	P16	SMAD4	Fenótipo
Panc-1	Pâncreas humano	+	+	-	Wt	Metástática
MiaPaCa-2	Pâncreas humano	+	+	-	Wt	Metástática
BxPc-3	Pâncreas humano	Wt	+	-	-	Não Metástática

+ Mutação; - Deleção; Wt Wildtype.

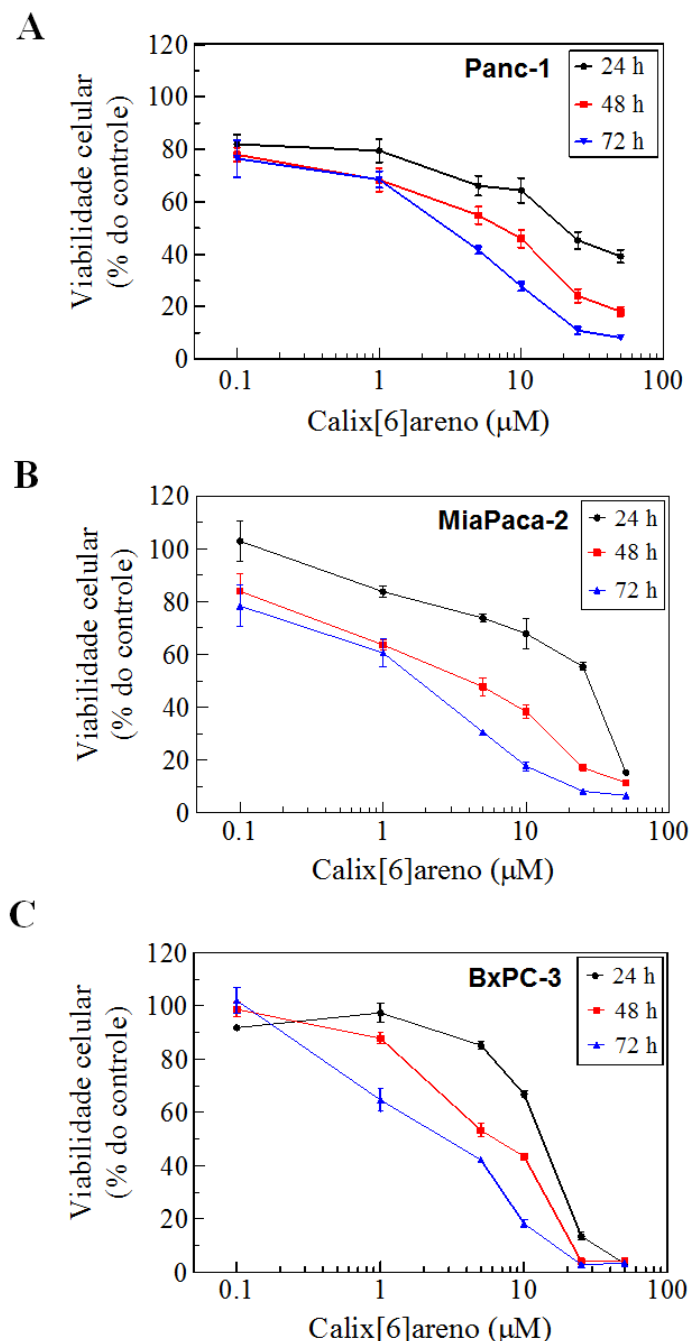


Figura 2. CLX6 reduz a viabilidade de linhagens celulares humanas de câncer de pâncreas. Panc-1 (A), MiaPaca-2 (B) e BxPC-3 (C) foram plaqueadas (1×10^5 células/mL) em microplacas de 96 poços e incubadas por 24 h a 37°C e 5% de CO₂. As células foram tratadas com diferentes concentrações do CLX6 e incubadas nas mesmas condições por 24, 48 e 72 h. A viabilidade celular foi avaliada pela redução do MTT. Os valores foram expressos em porcentagens de redução de MTT em relação ao controle DMSO 0,1% (100% de viabilidade). Resultados representam média $\pm$ erro padrão da média de 3 experimentos independentes realizados em triplicata.

4.2. CLX6 inibe a proliferação de células de câncer de pâncreas

Interessados em investigar a resposta proliferativa das células de câncer de pâncreas frente ao tratamento com CLX6, utilizamos a técnica do BrdU. Esta técnica se baseia na utilização de anticorpo contra bromodeoxiuridina (BrdU) um nucleosídeo sintético análogo a timidina. BrdU é incorporado as fitas de DNA recém sintetizadas de células em processo de replicação, substituindo a timidina. Assim, quanto maior a incorporação de BrdU, maior é a taxa proliferativa das células analisadas, uma vez que isto indica o aumento da síntese de DNA. A avaliação da incorporação do BrdU nas três linhagens de câncer de pâncreas (Panc-1, MiaPaca-2 e BxPC-3) tratadas com CLX6 demonstrou que esse composto inibe significativamente a proliferação nestas células a partir da concentração de 1 μ M (Figura 3). Nas concentrações mais baixas de CLX6 - 0,1 e 1 μ M - a linhagem Panc-1 foi mais sensível apresentando reduções de 11 e 15%, respectivamente na proliferação celular, quando comparada com as linhagens BxPC-3 e MiaPaca-2. Na concentração de 5 μ M de CLX6 a porcentagem de inibição da proliferação celular foi de aproximadamente 70-75% nas três linhagens, com a perda completa da proliferação com 10 μ M.

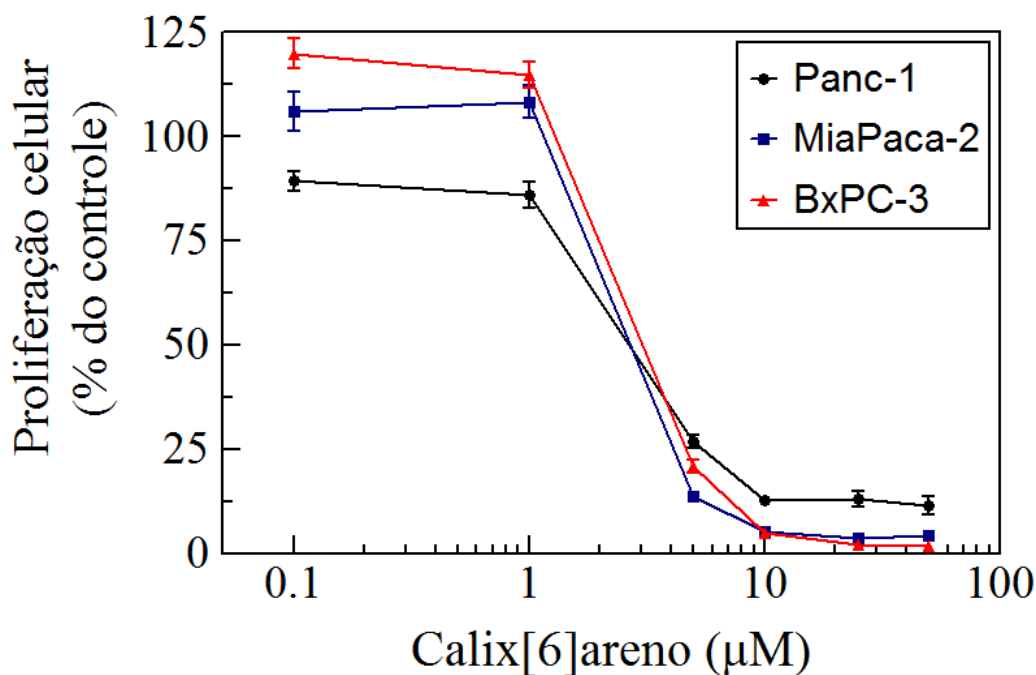


Figura 3. CLX6 inibe a proliferação das três linhagens de câncer de pâncreas (Panc-1, MiaPaca-2 e BxPC3). As três linhagens celulares (1×10^5 células/mL) foram plaqueadas independentemente em microplacas de 96 poços escuras com fundo transparente e incubadas por 24 h a 37°C e 5% de CO₂. As células foram tratadas com diferentes concentrações do composto e incubadas nas mesmas condições por 24 h. A proliferação celular foi avaliada pela incorporação de BrDU. Resultados representam média $\pm$ erro padrão da média de 3 experimentos independentes realizados em duplicata.

A linhagem Panc-1 é sabidamente mais resistente ao quimioterápico (Gencitabina) de uso no tratamento do câncer de pâncreas e, além disso, o fenótipo desta célula apresenta um caráter mais agressivo (Hong et al., 2009; Deer et al., 2010). Por conta disso, demos continuidade ao estudo de mecanismo de ação com a linhagem Panc-1, por entender que uma avaliação dos efeitos do possível novo quimioterápico numa linhagem mais agressiva e resistente poderá contribuir no entendimento de vias relacionadas com esses fenótipos, a fim de suprimi-los.

Para confirmar o potencial antitumoral do CLX6 contra células Panc-1, os efeitos da gencitabina e 5'fluorouracil (atuais agentes quimioterapêuticos utilizados no tratamento do câncer do pâncreas) foram também examinados. Ambos os compostos foram avaliados em concentrações até 2 mM, durante 24 e 48 horas. A viabilidade de Panc-1 foi afetada apenas a partir de 48 h de tratamento, sendo observada uma redução na viabilidade de 50% das células em aproximadamente 200 μ M para gencitabina e 500 μ M para 5-Fluorouracil (Figura 4).

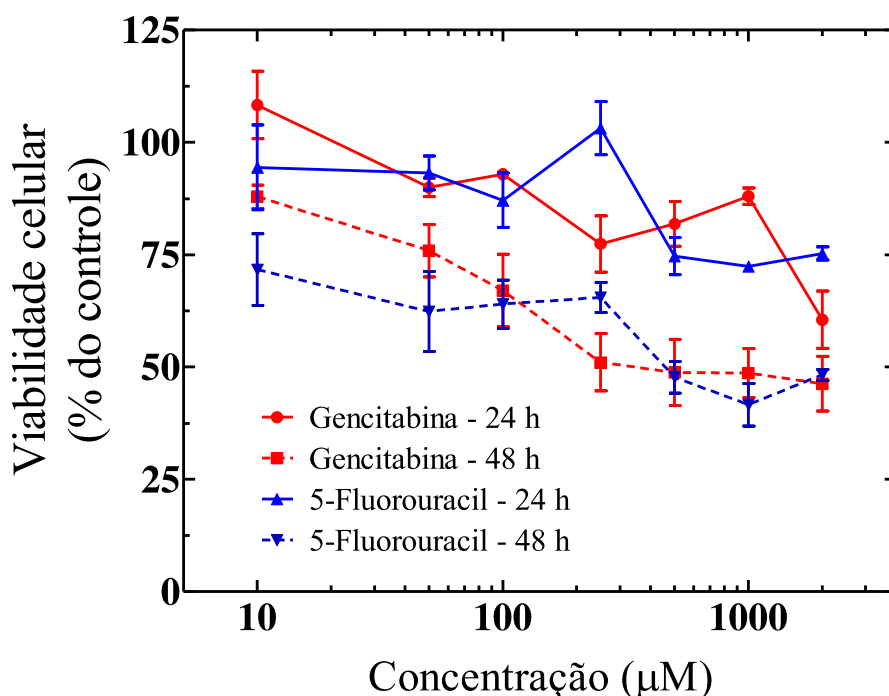


Figura 4. Viabilidade celular de Panc-1 frente ao tratamento com gencitabina e 5-fluorouracil. Panc-1 foram plaqueadas (1×10^5 células/mL) em microplacas de 96 poços e incubadas por 24 h a 37°C e 5% de CO₂. As células foram tratadas com diferentes concentrações do CLX6 e incubadas nas mesmas condições por 24 e 48 h. A viabilidade celular foi avaliada pela redução do MTT. Os valores foram expressos em porcentagens de redução de MTT em relação ao controle DMSO 0,1% (100% de viabilidade). Resultados representam média $\pm$ erro padrão da média de 3 experimentos independentes realizados em triplicata.

4.3. CLX6 inibe a proliferação celular e também induz morte celular em Panc-1

A fim de investigar se a redução da viabilidade celular ocorreu como um resultado apenas da inibição da proliferação celular, ou também pela indução de morte, uma avaliação da viabilidade ao longo do tempo foi realizada também através do ensaio de redução do MTT para as células Panc-1. Nesse ensaio consideramos o tempo 0 h (momento em que se adicionou, ou não, CLX6 nas células) como 100% de viabilidade celular, e em seguida, de tempo em tempo acompanhamos a viabilidade das células Panc-1 frente ao tratamento (Figura 5). Nas primeiras 3 h de incubação a concentração de 50 μ M de CLX6 reduziu a viabilidade celular quando comparada ao grupo controle que mantinha 100% de viabilidade. Após 24 h, as concentrações de 25 e 50 μ M reduziram $47,6 \pm 4,6$ e $67,3 \pm 3,5\%$, respectivamente, o percentual de células viáveis, no qual as células não tratadas apresentavam $169,2 \pm 2,4\%$ de viabilidade, o que indica que nestas concentrações CLX6 induziu, provavelmente, morte celular em Panc-1. Por outro lado, a concentração de 10 μ M de CLX6 resultou, ao final do tratamento, em $92,5 \pm 6,8\%$ de células viáveis, e ao longo do tempo não foi observado nenhuma alteração da linha base (100%) (Figura 5), indicando que 10 μ M de CLX6 não induz morte celular em células Panc-1, mas inibe a proliferação celular. Este resultado está de acordo com o ensaio do BrDU, uma vez que, na concentração de 10 μ M, praticamente 100% das células não proliferaram.

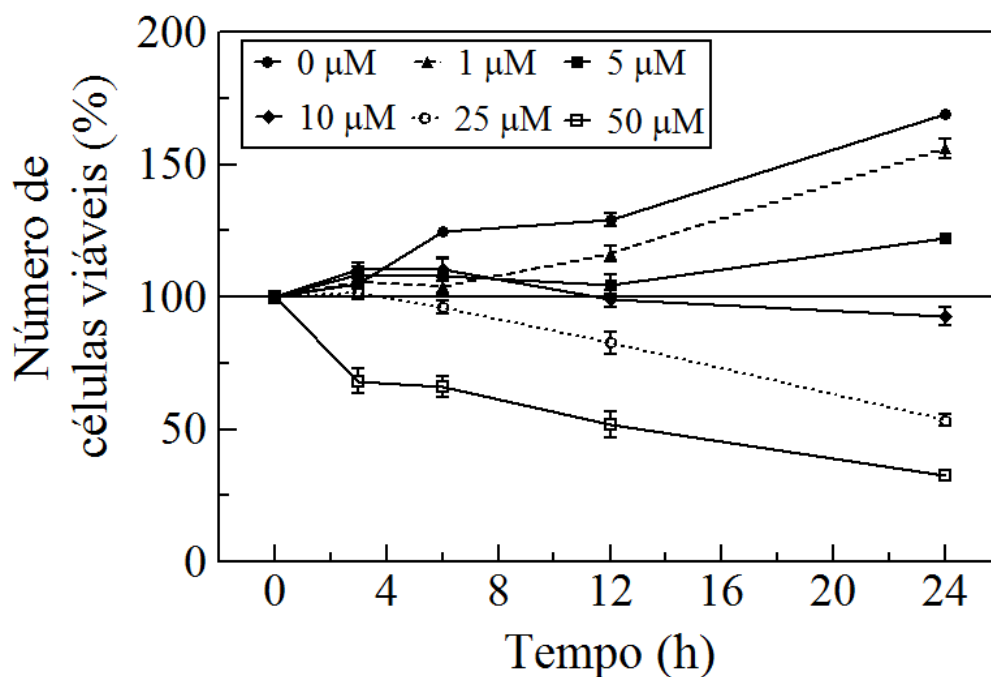


Figura 5. CLX6 inibe a proliferação e induz morte celular em Panc-1. Células Panc-1 (1×10^5 células/mL) foram plaqueadas em microplacas de 96 poços e incubadas por 24 h a 37°C e 5% de CO₂. As células foram tratadas com diferentes concentrações do CLX6 e incubadas nas mesmas condições por 0, 3, 6, 12 e 24 h. A viabilidade celular foi determinada através do ensaio de redução do MTT. Os valores foram expressos em porcentagens em relação ao tempo 0 (100% de viabilidade). Resultados representam média $\pm$ erro padrão da média de 3 experimentos independentes realizados em triplicata.

4.4. CLX6 inibe a progressão do ciclo celular em G0/G1

Sabendo que o CLX6 inibe a proliferação celular, decidimos avaliar a distribuição das células, tratadas ou não, nas diferentes fases do ciclo celular através da análise do conteúdo de DNA, por citometria de fluxo. Conforme observado na figura 6, houve um aumento do percentual de células Panc-1 na fase G0/G1 após o tratamento com CLX6 em todas concentrações avaliadas (Figura 6), enquanto que o percentual de células nas fase S e G2/M diminuíram. É importante notar que, mesmo na concentração mais baixa de CLX6, 2,5 µM, $67,4 \pm 1,3\%$ das células estavam em fase G0/G1 em comparação com $29,1 \pm 0,3\%$ das células não

tratadas (***, $p < 0,001$). Por outro lado, a porcentagem de células na fase S baixou de $40,5 \pm 1,5\%$ das células não tratadas para $14,4 \pm 4,4\%$ em células tratadas com $2,5 \mu\text{M}$ de CLX6 (** $p < 0,01$). O mesmo perfil foi observado com 5 e $10 \mu\text{M}$ de CLX6 (Figura 6).

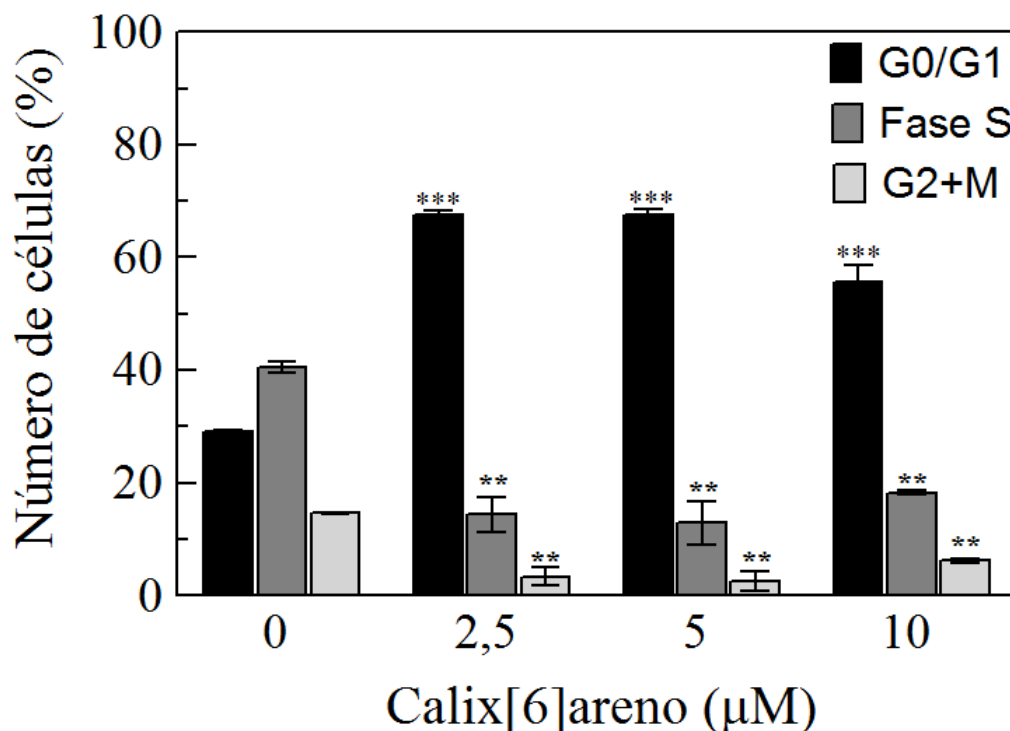


Figura 6. CLX6 bloqueia o ciclo celular na fase G0/G1 de células de câncer de pâncreas (Panc-1). Número de células Panc-1 em diferentes fases do ciclo celular (fase G0/G1, S e fase G2 + M) foi determinada por incorporação de iodeto de propídio seguido por citometria de fluxo após tratamento com concentrações específicas de CLX6 por 24 h. Resultados representam média $\pm$ erro padrão da média de 3 experimentos independentes realizados em duplicata. ** $p < 0,01$ diferença significativa vs Controle; *** $p < 0,001$ diferença significativa vs Controle. ANOVA seguido por teste de Tukey.

A fim de obter mais detalhes sobre o mecanismo molecular pelo qual CLX6 induz a parada do ciclo celular de Panc-1, proteínas moduladoras da progressão do ciclo também foram analisadas (Figura 7). Apesar de nenhuma mudança na expressão de Ciclina D1 ter sido observada, uma redução nos níveis de CDK2, CDK4, seguida por uma redução na fosforilação da proteína retinoblastoma em Ser795, foi observada. Além disso, uma forte redução nos níveis

da quinase Pim-1, que tem sido descrita como promotora chave da proliferação celular, também foi detectada.

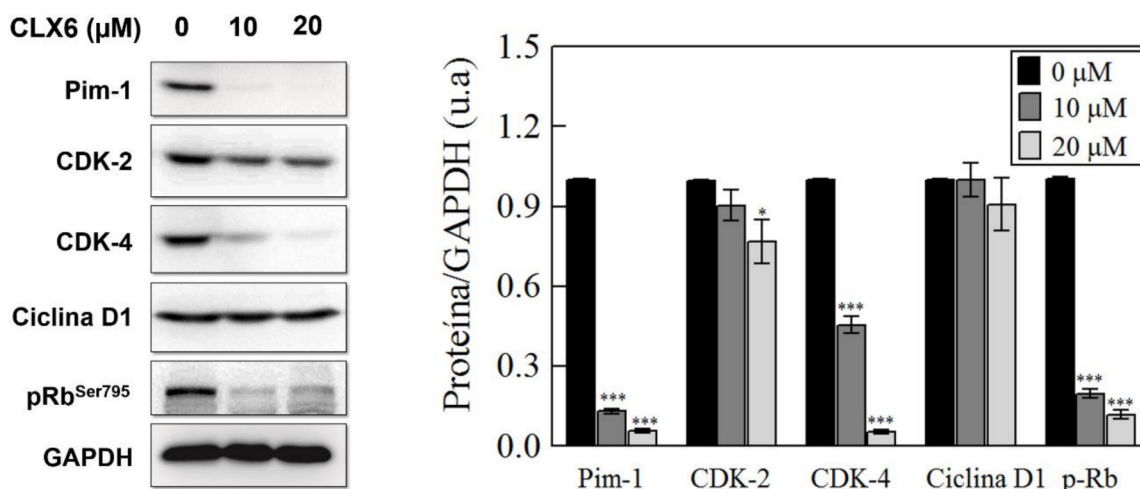


Figura 7. CLX6 modula a expressão e/ou atividade de proteínas associadas com a fase G1 do ciclo celular. A expressão de Pim-1, CDK2, CDK4, Cyclina D1 e fosforilação de retinoblastoma no resíduo Ser795 foi determinada por *Western blotting*. A proteína GAPDH foi utilizada como controle interno. Análise densitométrica dos blottings. A intensidade apresentada é relativa ao controle interno e expressa como unidades arbitrárias (u.a.) (n = 3 experimentos independente, $P < 0,05$). Valores são média $\pm$ EPM. * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$; *** $p < 0,001$ diferença significativa vs controle. ANOVA seguido por teste de Tukey.

A redução na taxa de proliferação desencadeada por CLX6 pode ser relacionada, em parte, com a diminuição nos níveis de CDK2, CDK4, Pim-1 e inibição da proteína retinoblastoma (RB), proteínas que ativam a progressão do ciclo celular. A progressão do câncer envolve a perda de controle nos pontos de verificação do ciclo celular (*checkpoint*), que regulam a passagem através das diferentes fases (Hartwell e Weinert, 1989; Molinari, 2000; Yu et al., 2007). Os resultados obtidos com a citometria de fluxo mostraram parada do ciclo celular na fase G0/G1, por isso, decidimos avaliar a expressão/atividade de proteínas ligadas a esta fase do ciclo. O controle do ciclo celular, na fase G1, é mediado por complexos de proteínas, tais como

CDKs e ciclinas. As CDK2, -4 e -6 (quinases dependentes de ciclinas) formam um complexo com ciclina D1 que atua na fosforilação de RB, permitindo a passagem através do ponto de restrição entre a G1/S. Como observado, CLX6 induziu uma redução na expressão de CDK2 e -4 e inibição de Rb. Uma vez fosforilada, RB libera o fator de transcrição E2F, que é responsável pela transcrição de proteínas envolvidas na fase S. Por isso, a redução nos níveis de RB fosforilada indica que o fator de E2F não é liberado e, assim, haverá uma parada do ciclo em G0/G1.

Outro dado que reforça a capacidade de CLX6 em bloquear o ciclo celular foi a forte diminuição da quinase Pim-1. A Pim foi descrita por ativar as fosfatases CDC25A e CDC25C, promovendo a progressão do ciclo celular de G1 para S e de G2 para M, através da desfosforilação e ativação de CDKs (Mochizuki et al., 1999; Bachmann et al., 2006). Além disso, Pim-1 reprime a expressão de p27 (um inibidor da progressão do ciclo celular) e também o inativa por fosforilação (Morishita et al., 2008). Em particular no câncer pancreático, Pim-1 é um alvo promissor uma vez que esta quinase foi encontrada estar regulada positivamente em modelo *in vitro* de adenocarcinoma do ducto pancreático (ADCP) (Qian et al., 2005), e por contribuírem com o crescimento, dependente ou independente de ancoragem, invasão e radiorresistência (Xu et al., 2011). De forma bastante interessante, vale ressaltar que uma vez que Pim-1 está expressa sua atividade é constitutiva (Brault et al., 2010), o que indica que a redução nos níveis de Pim-1 é uma forma de modular sua atividade.

4.5. CLX6 modula a expressão de receptores tipo tirosina quinases responsáveis por controlar a sobrevivência, proliferação e agressividade do câncer de pâncreas

A análise de vias de transdução de sinais tem sido utilizada para estudar diferentes aspectos biológicos, uma vez que entender os mecanismos pelos quais uma célula ou tecido responde aos diversos estímulos pode servir como base para a identificação de alvos moleculares para o desenvolvimento de novos fármacos. Nesse contexto, para entender o mecanismo molecular envolvido no efeito do CLX6 na linhagem celular Panc-1, examinamos a expressão e *status* de ativação de moduladores chaves das vias de sinalização associadas com a resistência de células de câncer de pâncreas ao estímulo de morte.

O tratamento das células de câncer de pâncreas com CLX6 culminou com a forte redução nos níveis dos receptores tirosina quinase (RTQ), AXL e Mer, e da proteína *Heat Shock* 90 (HSP90) (Figura 8A). Como esperado, moléculas *downstream* a estes receptores, como PI3K, AKT e mTOR foram negativamente moduladas, como observado através da razão entre a proteína fosforilada/proteína total (Figura 8B). A ativação de PI3K pode ocorrer por ligação da subunidade p85 aos RTQs ativados ou pela ligação da subunidade p110 a RAS constitutivamente ativa no câncer de pâncreas (Giroux et al., 2009). A AKT é importante alvo da PI3K e tem como função fosforilar e regular uma grande variedade de proteínas implicadas na sobrevivência/morte celular. Um dos alvos de AKT é a mTOR, proteína que participa da proliferação celular, além de ser o principal modulador negativo de morte celular por autofagia. Nossos dados confirmam uma redução na atividade de PI3K como consequência da redução dos níveis de AXL e Mer, por conta de uma redução na fosforilação da subunidade p85. Além disso, uma forte inibição da atividade de mTOR também foi observada, porém, a inibição de mTOR foi bem mais forte do

que a inibição de AKT. Este achado indica que outros moduladores de mTOR podem também estar sendo afetados pelo CLX6.

Duas proteínas fosfatases que modulam negativamente a atividade de AKT também foram investigadas. A PTEN que desfosforila o fosfatidionositol 3,4,5 trifosfato (PI3), intermediário da ativação de AKT por PI3K e PP2A uma serina/treonina fosfatase que desfosforila diretamente AKT. Os resultados demonstraram que as células tratadas não apresentaram aumento significativo na atividade de PTEN, como indicado por comparação entre a fosforilação do sítio inibitório (Ser380/Thr382/Thr383) e a PTEN não fosforilada (Figura 8C). Adicionalmente, observou-se uma diminuição nos níveis da subunidade C da proteína PP2A não metilada, indicando que PP2A pode estar mais ativa (Figura 8D).

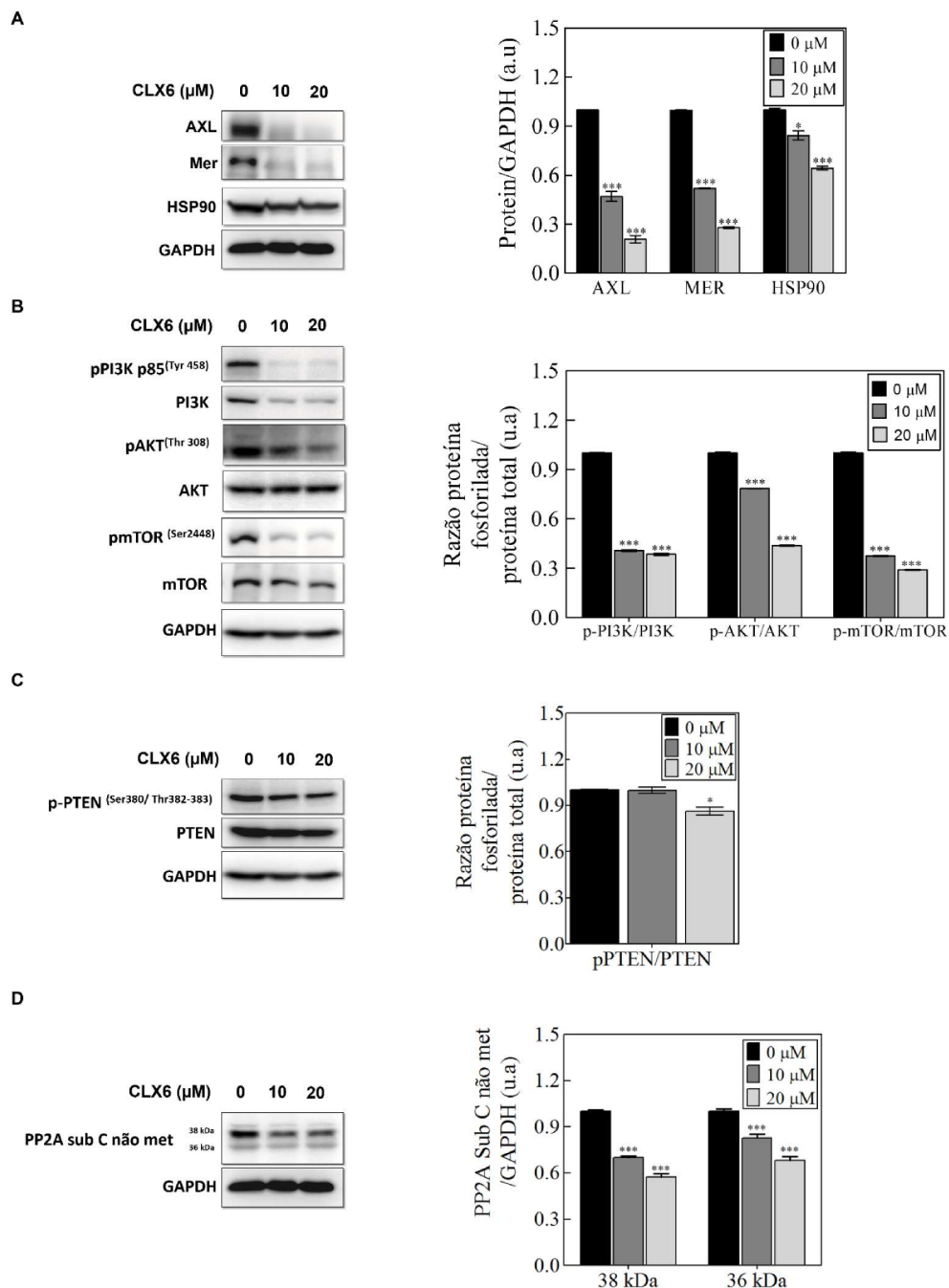


Figura 8. CLX6 modula a expressão de receptores tirosina quinase (Mer e AXL) e consequentemente inibe a via PI3K/AKT/mTOR de células de câncer de pâncreas (Panc-1). A expressão e/ou atividade de Mer, AXL, PI3K, AKT, mTOR, PTEN e PP2A foi determinada por *Western blotting*. A proteína GAPDH foi utilizada como controle interno (A-D). Análise densitométrica dos blottings. A intensidade apresentada é relativa ao controle interno e expressa como unidades arbitrárias (u.a.) ($n = 3$ experimentos independente, $P < 0,05$). Valores são média $\pm$ EPM. * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$; *** $p < 0,001$ diferença significativa vs controle. ANOVA seguido por teste de Tukey.

Assim, além da modulação de proteínas do ciclo celular, o tratamento de células de câncer de pâncreas com CLX6 também culminou com uma potente diminuição na expressão de receptores de tirosina quinases (AXL e Mer), ambos envolvidos com a proliferação e sobrevivência celular. AXL é um receptor tirosina quinase (RTQ) ativado pelo fator de crescimento Gas6, um membro das proteínas dependentes de vitamina K. Esta quinase foi originalmente identificada em leucemia mielóide crônica e tem sido relatada por estar superexpressa em muitos tipos de tumores humanos, incluindo glioma, melanoma, osteossarcoma, carcinomas do pulmão, cólon, próstata, mama, ovário, esôfago, estômago e rins (revisado por Verma et al., 2011). Recentemente, Song et al., (2011) mostraram que AXL e Gas6 são frequentemente superexpressas tanto em adenocarcinoma do ducto pancreático, como em linhagens celulares humanas de adenocarcinoma do pâncreas e desempenham papel anti-apoptótico além de contribuírem para a invasão do câncer de pâncreas. Anteriormente, Koorstra e colaboradores (2009) relataram que a *downregulation* estável de AXL resultou em redução significativa na viabilidade das células, no crescimento independente de ancoragem, bem como a atenuação da migração e invasão da linhagem celular MiaPaCa-2.

A proteína Mer também é um RTQ associado com vários cânceres humanos. A ativação anormal dessa proteína tem sido implicada no desenvolvimento do câncer através da ativação de vias de proliferação, inibição da apoptose e migração/metástase. A expressão aumentada de Mer foi detectada em tumores sólidos, incluindo câncer de pulmão, mama, próstata, rim, osteosarcoma, ovário, útero e pâncreas (Rochlitz et al., 1999; Nakano et al., 2003; Shieh et al., 2005). Nestes cânceres estudos têm mostrado que a inibição de Mer diminui significativamente a ativação da PI3K e ERK1 reduzindo assim a sinalização de vias de sobrevivência (Shankar et al., 2003; Shankar et al., 2006).

O mecanismo pelo qual CLX6 diminui os níveis de Mer e AXL precisa ser mais bem investigado, no entanto, a nossa hipótese é a de que a degradação de ambos os receptores é estimulada na presença do composto. Esta hipótese baseia-se no fato de que também foi observada uma redução nos níveis da proteína HSP90 nas células tratadas com CLX6 (Fig. 8A). Recentemente, Krishnamoorthy e colaboradores relataram que a inibição da proteína HSP90 com 17-alil-amino-17-demetoxigeldanamicina induziu a degradação de AXL via ubiquitina/proteassoma, e que a estabilidade e a translocação de AXL na membrana é dependente da HSP90 (Krishnamoorthy et al., 2013).

Em continuidade deste trabalho, foi avaliada a expressão/atividade de proteínas associadas à ativação de receptores tirosina quinase, tais como PI3K, AKT e mTOR que demonstraram ser negativamente moduladas pelo tratamento com CLX6. AKT desempenha um papel importante em muitos processos biológicos, incluindo a diferenciação, proliferação e sobrevivência celular (Vivanco e Sawyer, 2002). A desregulação desta quinase parece ter um papel fundamental na natureza agressiva desta doença, incluindo a resistência à quimioterapia (Bardeesy e DePinho, 2002; Agbunag e Bar-Sagi, 2004; Asano et al., 2004; Chadha et al., 2006). Portanto, a capacidade de CLX6 em modular promotores do câncer, tais como AKT, reforça o potencial antitumoral deste composto. Curiosamente, apesar de observar inibição da AKT, não foi detectado efeito na atividade de PTEN. Por outro lado, uma ativação de PP2A foi observada, o que poderia ser responsável pela modulação negativa de AKT. Além disso, a PP2A foi demonstrada por ser um importante regulador da estabilidade e da função de Pim-1 (Losman et al., 2003). Assim, a ativação de PP2A por CLX6 pode ser responsável, não só pela inibição da AKT, mas também por controlar os níveis de Pim-1.

4.6. Autofagia participa da morte celular induzida por CLX6

Levando-se em consideração a atividade citotóxica de CLX6, o tipo de morte celular desencadeada pelo composto foi investigada. Inicialmente, marcadores de apoptose foram avaliados quanto a expressão. As proteínas pro-apoptóticas BAX e anti-apoptóticas BCL2 permaneceram inalteradas, além disso, não foi observada clivagem da pró-caspase 3 (Figura 9). Caspase-3 é considerada um efetor crítico da via apoptótica, sua ativação requer a clivagem da pró-caspase nos fragmentos ativos p17 e p12 (Nicholson et al., 1995). Uma vez ativadas as caspases desempenham um importante papel no processo de ativação de DNases, inibição de enzimas de reparo do DNA e degradação de proteínas estruturais no núcleo. Dessa forma, como não foi detectada nenhuma alteração nos níveis de BCL2, BAX e clivagem de caspase-3, sugerimos que o CLX6 não induz morte celular em Panc-1 através da via clássica de apoptose.

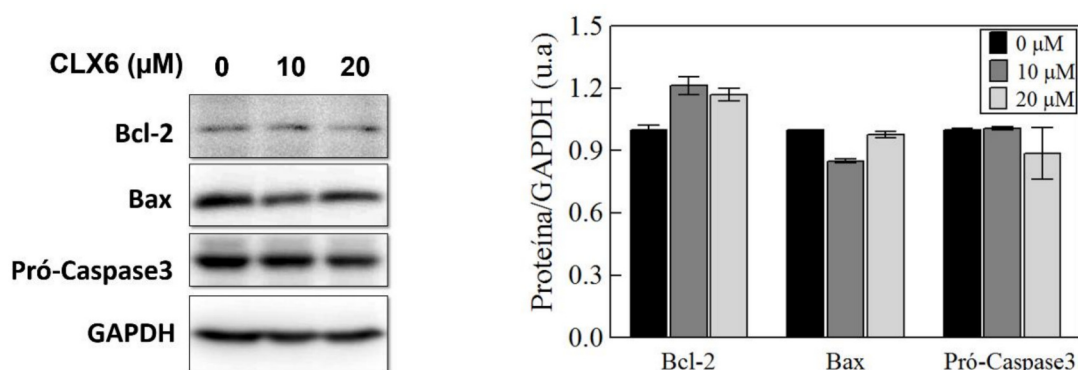


Figura 9. CLX6 não induz apoptose dependente de caspase. A expressão de BCL2, BAX e Pró-caspase-3 foram determinadas por *Western blotting*. A proteína GAPDH foi utilizada como controle interno. Análise densitométrica dos blottings. A intensidade apresentada é relativa ao controle interno e expressa como unidades arbitrárias (u.a.) ($n = 3$ experimentos independente, $P < 0,05$). Valores são média $\pm$ EPM. ANOVA seguido por teste de Tukey.

Uma vez que não foi observada indução de apoptose e que vias de sinalização AKT/mTOR envolvidas na regulação da sobrevivência e morte celular foram inibidas, avaliamos o efeito do CLX6 em marcadores da autofagia.

A potente redução na viabilidade de Panc-1 induzida por CLX6 resultou no aumento nos níveis da proteína LC3-II (Figura 10A). A proteína LC3 é considerada um dos principais marcadores de autofagia (Kabeya et al., 2004). Uma vez no citosol LC3 é convertida em LC3-I, ao passo que ao ocorrer sinalização para formação de autofagossoma, a proteína LC3-I é modificada em LC3-II direcionando a formação do autofagossoma. Dessa forma, os resultados obtidos indicam que a autofagia pode ser o tipo de morte induzido por CLX6 nestas células. Confirmando a participação da LC3 no autofagossoma um aumento no número de pontos positivos para LC3 foi observado por microscopia confocal nas células tratadas com CLX6 por 24 h (Figura 10C), enquanto que a célula controle apresentou uma menor marcação (Figura 10B).

Adicionalmente, identificamos por microscopia eletrônica de transmissão a formação de vacúolos autofágicos em diferentes pontos de maturação (Figura 11B-C), que correspondem a vesículas com membrana dupla, carregadas de material citoplasmático ou organelas ainda íntegras (insertos de 11B-C). A ultraestrutura de Panc-1 não tratada pode ser observada na figura 11A.

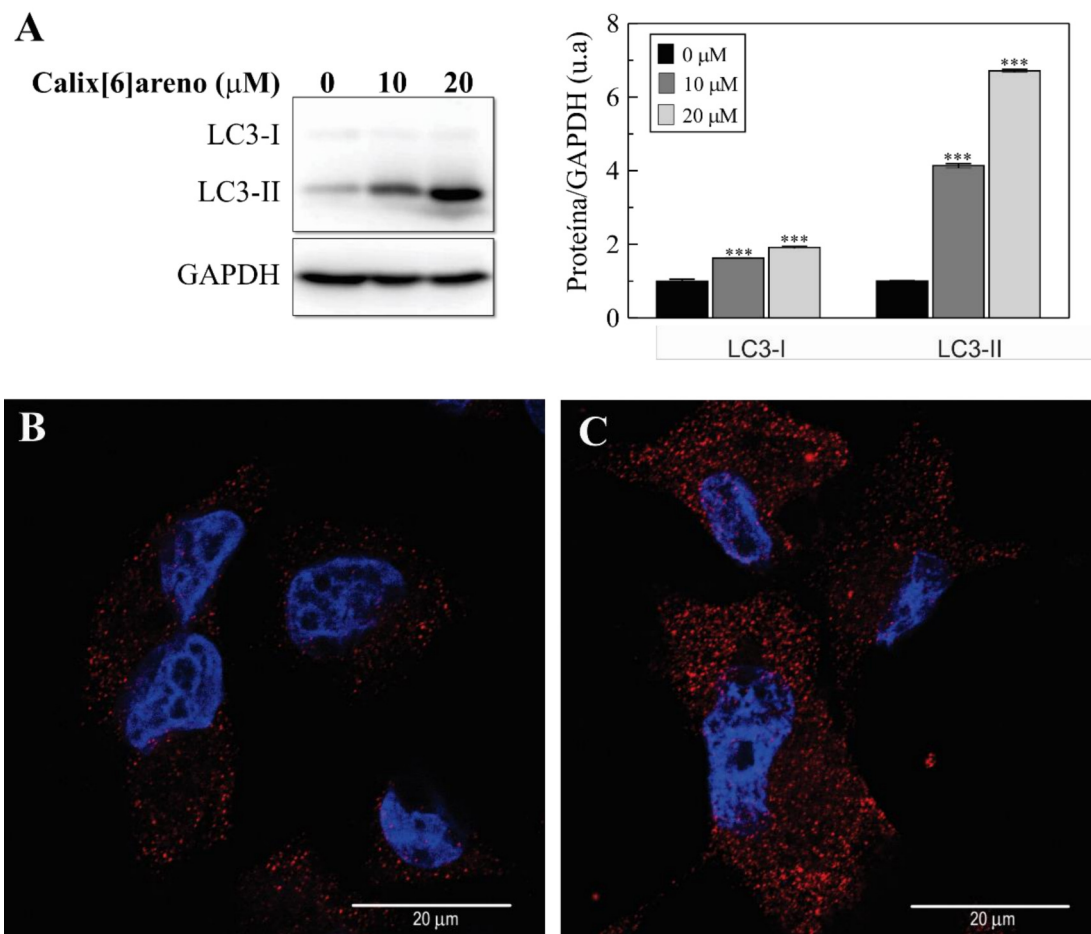


Figura 10. CLX6 aumenta os níveis de LC3-II e a marcação positiva de autofagossoma em Panc-1. (A) LC3B expressão I / II foi determinada por western blotting. A proteína GAPDH foi utilizada como controle interno. Análise densitométrica dos blottings. A intensidade apresentada é relativa ao controle interno e expressa como unidades arbitrárias (u.a.) ($n = 3$ experimentos independente, $P < 0,05$). Valores são médias $\pm$ EPM. *** $p < 0,001$ diferença significativa vs controle. ANOVA seguido por teste de Tukey. (B) Marcação de LC3 observada por microscopia confocal corresponde ao controle e (C) corresponde as células tratadas com 20 μM de CLX6 por 24 h. Resultado representativo de 2 experimentos independentes.

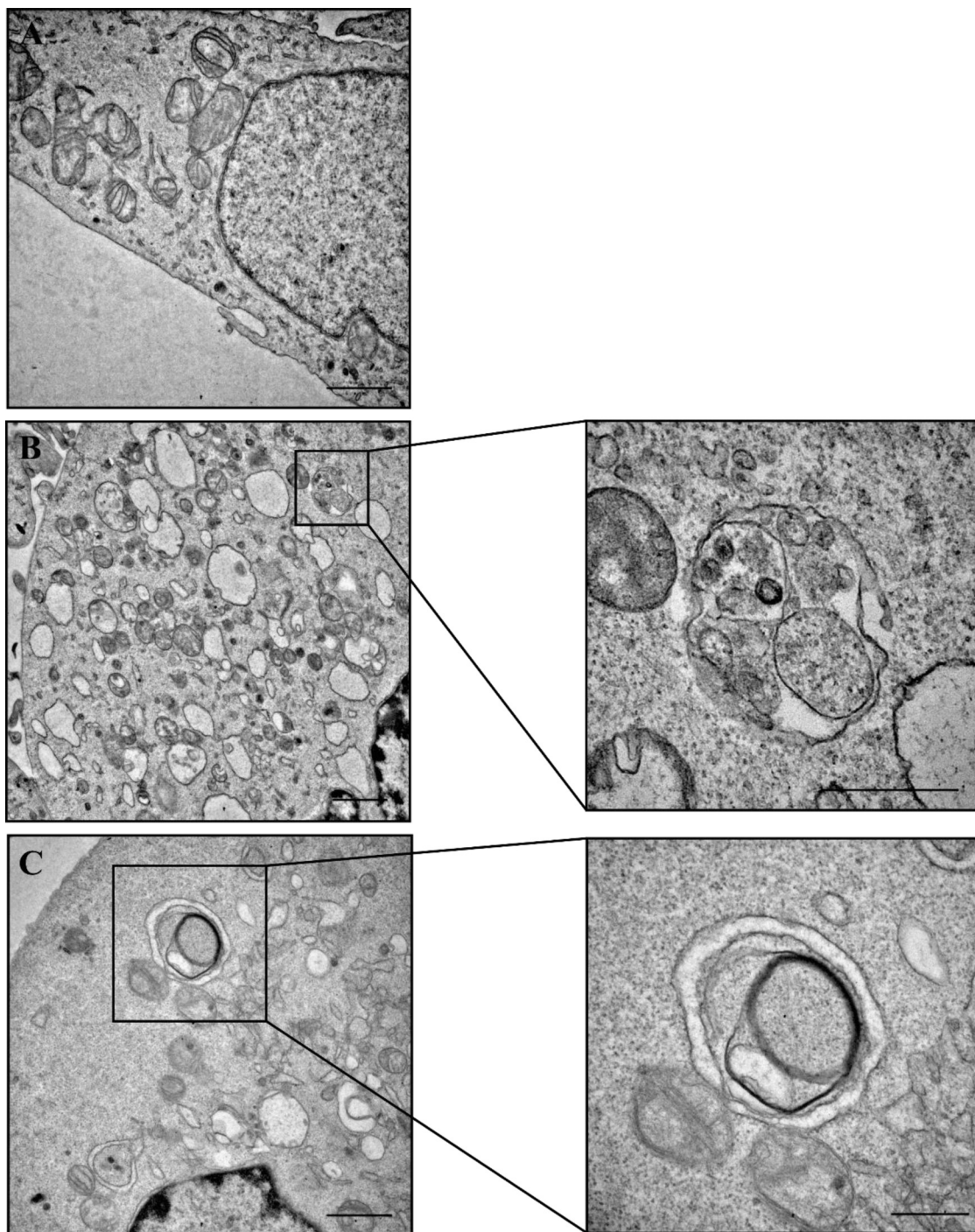


Figura 11. CLX6 induz a formação de vacúolos típicos de autofagia em células Panc-1. Análise ultraestrutural de células Panc-1, (A) Controle (B) tratadas com 10 μ M e (C) tratadas com 20 μ M de CLX6 por 24 h. As imagens foram obtidas através de microscopia eletrônica de transmissão (A-C) foram obtidas com um aumento de 12.000X. Insertos representam típicas estruturas autofágicas, inserto de B foi obtido em um aumento de 50.000X, enquanto o inserto de C foi obtido em um aumento de 30.000X. Barra de A, B e C = 1 μ m, Barras dos insertos de B e C = 0,5 μ m.

Por outro lado, o aumento de LC3-II e o acúmulo de vacúolos autofágicos não são suficientes para dizer se o fluxo autofágico está induzido ou inibido. A autofagia é um processo dinâmico que pode ser modulado em diferentes passos, seja de forma positiva como de forma negativa. Um acúmulo de autofagossoma (medido por microscopia eletrônica, fluorescência de LC3, ou acúmulo de LC3 por *Western blotting*) pode, por exemplo, refletir indução de autofagia, inibição de autofagia por falha no *turnover* de autofagossomas (revisado por Klionsky et al., 2012), ou na incapacidade de manter a formação de autofagossoma (Chu, 2006). Dessa forma, a melhor opção é utilizar inibidores de autofagia e avaliar a resposta ao tratamento com CLX6 na presença deste inibidor. O inibidor escolhido foi a cloroquina que eleva/neutraliza o pH lisossomal bloqueando a fusão entre autofagossoma e lisossomo. Como podemos observar na figura 12, a adição de Cloroquina anulou o efeito citotóxico de CLX6, indicando que a morte celular induzida por este composto ocorre via autofagia.

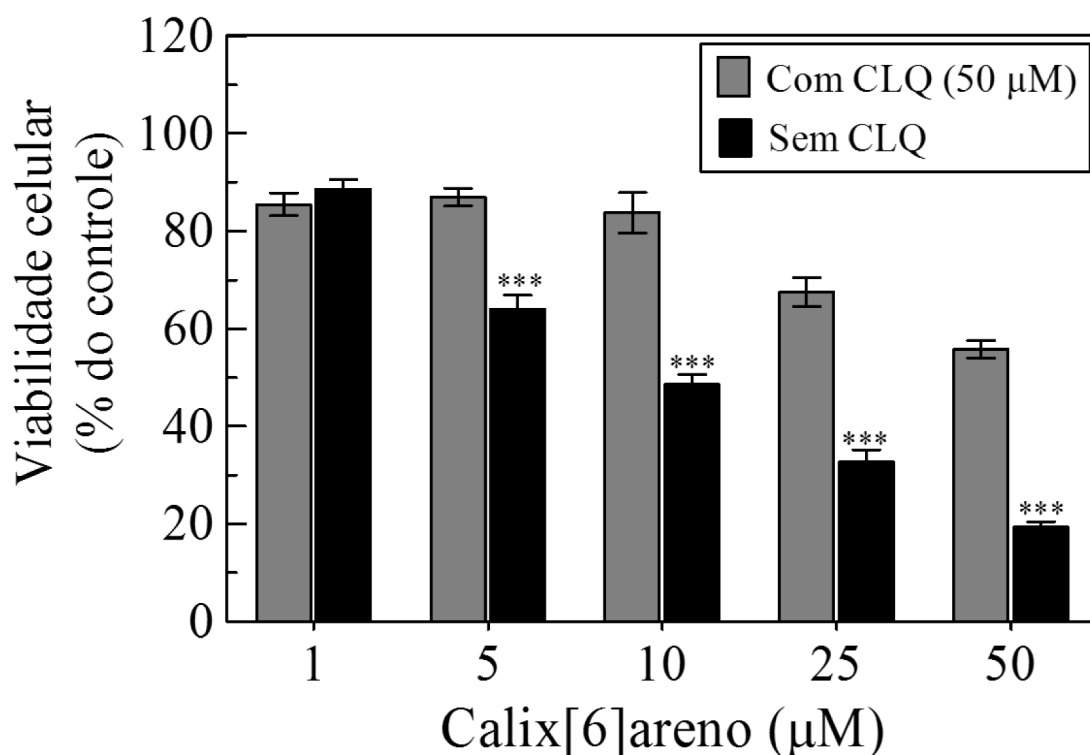


Figura 12. Cloroquina protege as células de câncer de pâncreas da morte celular induzida por CLX6. Células Panc-1 foram tratadas com CLX6, na presença ou na ausência de cloroquina (50 μM) durante 24 h. A viabilidade celular foi avaliada pela redução do MTT. Os valores foram expressos em porcentagens de redução de MTT em relação ao controle DMSO 0,1% (100% de viabilidade). Resultados representam média ± erro padrão da média de 3 experimentos independentes realizados em triplicata. *** $p < 0,001$ diferença significativa vs sem CHL. ANOVA seguido por teste de Tukey.

A autofagia é um processo pelo qual os componentes citoplasmáticos, incluindo macromoléculas e organelas, são degradados pelo lisossoma. O papel da autofagia nas células cancerosas é controverso, por um lado a autofagia parece ser importante para a sobrevivência da célula tumoral exposta ao estresse, por outro pode mediar a morte celular. Apesar dessa questão ainda ser motivo de discussão, a autofagia parece ser responsável pela morte de algumas células cancerosas, em especial quando moduladores essenciais de apoptose, tais como BAX e Bak ou caspases são disfuncionais (Shimizu et al., 2004; Fazi et al., 2008). Especificamente em relação ao câncer de pâncreas, alguns estudos mostram que este tipo de câncer apresenta altos níveis de

procaspase-3, Bcl-XL e FAP-1, o que está associado à resistência à morte celular por apoptose (Roy et al., 2001; Hu et al., 1998). Somado a isso, diferentes grupos de pesquisa têm mostrado um número diversificado de agentes antitumorais que promovem a morte celular por autofagia (Kondo et al., 2005; Ruela-de-Sousa et al., 2010; Salazar et al., 2009). De acordo com os resultados obtidos, a autofagia parece ser um mecanismo importante para induzir a morte celular em células resistentes a apoptose, como Panc-1.

4.7. CLX6 induz estresse de retículo endoplasmático em Panc-1

Na análise por microscopia eletrônica de transmissão, além de mudanças na ultraestrutura celular com características de estruturas autofágicas, observamos também significativa alteração na estrutura do retículo endoplasmático (RE). De fato, CLX6 induziu dilatação e linearização desta organela, típicos sinais de estresse de retículo (Figura 13). Para obter mais informações sobre a ocorrência deste processo, a expressão de duas proteínas reconhecidas como marcadores de estresse de retículo, IRE1 e BiP foram analisadas. O tratamento com CLX6 das células Panc-1 aumentou os níveis de IRE-1 seguido pelo de BiP (Figura 16A-B). Além disso, as células de câncer de pâncreas tratadas com CLX6 apresentaram ativação de JNK2 e ativação da AKT como evidenciado pelo aumento de fosforilação no resíduo Ser473(Figura 14).

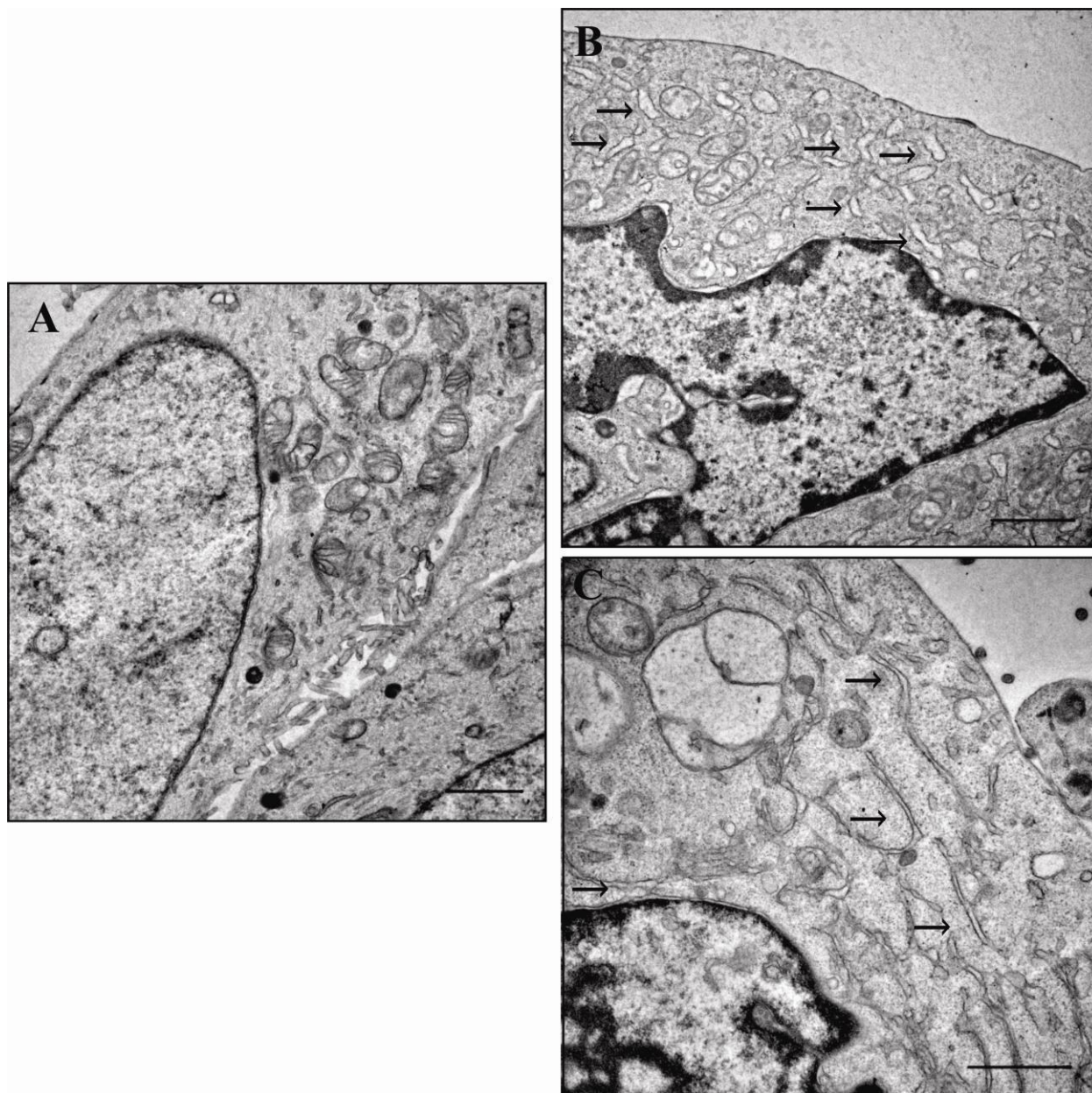


Figura 13. CLX6 induz dilatação e linearização de retículo endoplasmático de Panc-1. Análise ultraestrutural de células Panc-1, (A) Controle (B) tratadas com 10 μ M e (C) tratadas com 20 μ M de CLX6 por 24 h. As imagens foram obtidas através de microscopia eletrônica de transmissão (A-B) foram obtidas com um aumento de 12.000X e (C) foi obtida com um aumento de 15.000X. Setas em B e C indicam alterações no RE como dilatação e linearização. Barra de A, B e C = 1 μ m.

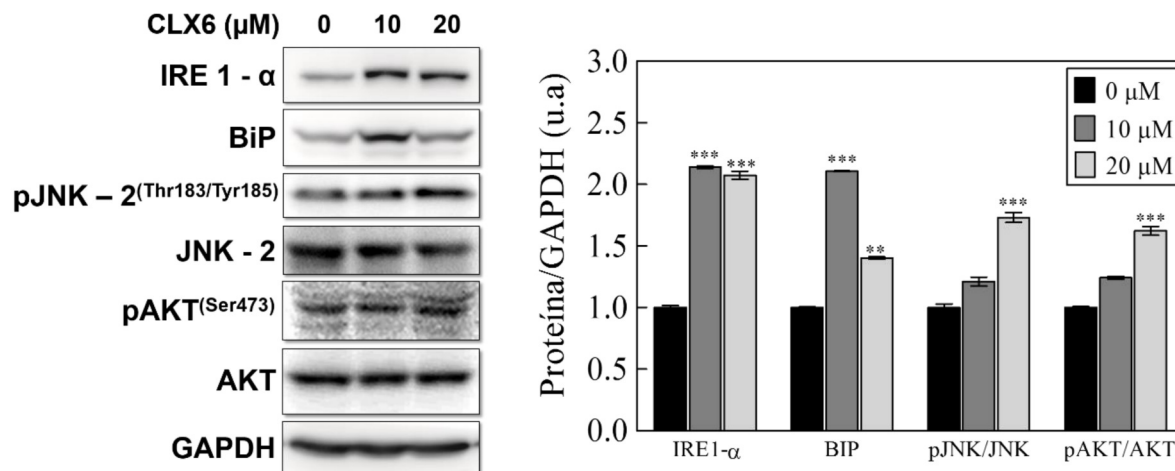


Figura 14. CLX6 induz estresse do retículo em células de câncer de pâncreas. (A) A expressão de IRE1 e BiP e ativação de JNK2 foram determinadas por western blotting. A proteína GAPDH foi utilizada como controle interno. (B) Análise densitométrica dos blottings. A intensidade apresentada é relativa ao controle interno e expressa como unidades arbitrárias (u.a.) (n = 3 experimentos independente, P < 0,05). Valores são média ± EPM. **p<0,01 diferença significativa vs controle, ***p<0,001 diferença significativa vs controle. ANOVA seguido por teste de Tukey.

O retículo endoplasmático (RE) é uma organela que desempenha um papel importante na manutenção da homeostase do cálcio intracelular, na síntese de proteínas, nas modificações pós-traducionais e enovelamento correto de proteínas, bem como seu tráfego intracelular (Groenendyk et al., 2006). Estímulos diferentes podem ser responsáveis pela indução de estresse de RE, tais como alteração na homeostase de cálcio e acúmulo de proteínas desenoveladas. CLX6 aumentou os níveis de IRE1 e BiP, confirmando que as alterações na ultraestrutura de RE podem estar relacionadas com a indução de estresse nessa organela.

Curiosamente, apesar da inibição de AKT no resíduo Thr 308, anteriormente apresentado, registramos um aumento na fosforilação do resíduo Ser473 desta mesma proteína. AKT pode ser ativada por fosforilação em dois resíduos: Thr308 e Ser473 (Yung, Charnock-Jones e Burton, 2011). É importante realçar que a atividade máxima da AKT depende da relação de fosforilação dos dois resíduos (Yung, Charnock-Jones e Burton, 2011). Essa relação tem sido descrita por

orientar a modulação de mediadores *downstream* a AKT. E que o aumento da fosforilação Ser473, em resposta ao estresse de retículo, determina a especificidade da AKT pelo substrato, incluindo uma menor afinidade por mTOR (Yung et al., 2011). Dessa forma, este resultado de AKT Ser473 em relação a inibição de AKT Thr308 pode explicar a forte inibição da mTOR. Assim, estes dados sugerem um envolvimento de estresse ER sobre o efeito de CLX6. Qin e colaboradores (2010) também demonstraram que o estresse de RE modula negativamente mTOR, e assim aumenta autofagia. Este achado corrobora com nossa observação de CLX6 medeia a indução de autofagia em células Panc-1. Adicionalmente, a ativação de JNK tem sido relacionada com a fase inicial do estresse de RE via *upregulation* de IRE1 e indução de autofagia (Ogata et al., 2006). Dessa forma, os dados obtidos reforçam a hipótese de que autofagia participa da resposta celular final frente ao composto. Além disso, a associação entre a atividade de JNK2 e a autofagia foi descrita em células de câncer colorretal tratadas com bufalina que exibiram um aumento dos marcadores de autofagia, tais como LC3-II, estimulação do fluxo autofágico e ativação de JNK2 (Xie et al., 2011). Os mesmos autores demonstraram que a ativação de JNK2 aumenta a expressão de ATG5 e Beclin-1, proteínas envolvidas na ativação de autofagia, e que o silenciamento de JNK2, por siRNA, atenua autofagia induzida por bufalina.

4.8. CLX6 inibe adesão e migração celular através da modulação de integrina/FAK e metaloproteínases

A agressividade tumoral está diretamente relacionada com a capacidade de adesão, invasão e migração celular. Importantes mediadores da agressividade tumoral, como receptores tirosina quinases (AXL e Mer) e a via de sobrevivência PI3K/AKT/mTOR, foram moduladas por CLX6. A desregulação de vias de sinalização *downstream* aos RTQs está associada com o

aumento da migração e metástase (Verma et al., 2011). Dessa forma, hipotetizamos que CLX6, ao inibir a via PI3K/AKT/mTOR, poderia também inibir processos metastáticos como adesão e migração de células humanas de câncer de pâncreas.

No ensaio de adesão, as células Panc-1 foram plaqueadas na presença ou ausência de 10 e 20 μ M de CLX6. Após 6 h de incubação, período em que 100% das células não tratadas (controle) estavam aderidas na placa, avaliamos através do ensaio de redução do MTT a viabilidade celular. Aproximadamente 60% das células tratadas, em ambas as concentrações, aderiram na placa ao final de 6 h de incubação (Figura 15), indicando que o composto inibiu a adesão celular dos tratados quando comparados com o controle.

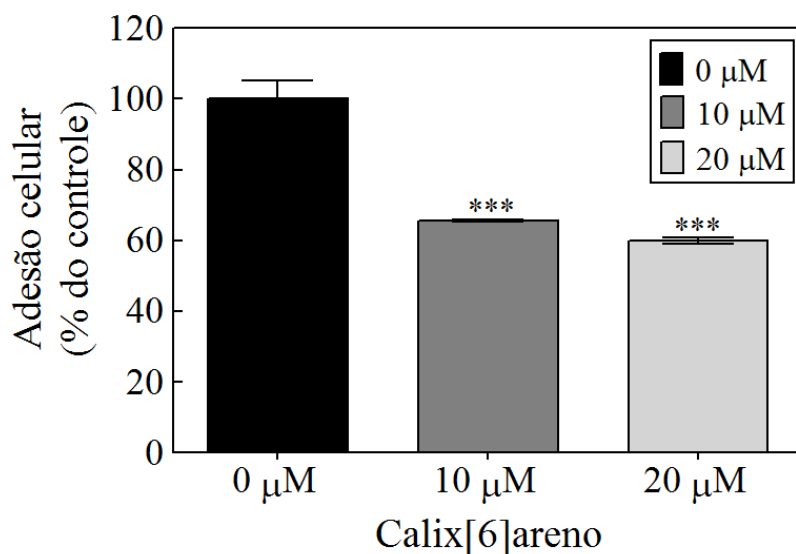


Figura 15. CLX6 inibe a adesão das células Panc-1 após 6 h de incubação. Células Panc-1 ($6,25 \times 10^4$ células/mL) foram plaqueadas em placas de 24 poços e incubadas por 6 h na presença ou ausência do CLX6 a 37°C e 5% de CO₂. A viabilidade celular foi avaliada pelo ensaio de redução do MTT. Os valores foram expressos em porcentagens de redução de MTT em relação ao controle (100%). Resultados representam média $\pm$ erro padrão da média de 3 experimentos independentes realizados em triplicata. ***p<0,001 diferença significativa vs controle. ANOVA seguido por teste de Tukey.

Adicionalmente ao dado de adesão celular, investigamos a influência do CLX6 na migração de Panc-1. O aumento da taxa de migração é uma das principais características das células cancerígenas metastáticas (Hanahan e Weinberg, 2000; 2011). O câncer de pâncreas é um problema de saúde devido ao seu elevado risco de metástases, dessa forma, avaliar a capacidade de um composto em inibir a migração celular é um ponto chave em estudos de mecanismo de ação que visam reduzir a agressividade deste tumor.

Foi observado, através do ensaio de migração por *Scratch*, que CLX6 foi capaz de inibir a migração celular em aproximadamente 70% nas duas concentrações avaliadas, 5 e 10 μM (Figura 16). Este ensaio consiste na mensuração da área ocupada pelas células após a abertura de uma lacuna no tapete celular e subsequente tratamento com CLX6. A escolha de duas concentrações inferiores ao IC_{50} se deve ao fato de que neste tipo de teste nosso objetivo era garantir que as células estivessem viáveis e, portanto, o efeito observado na migração não decorresse da morte celular induzida pelo composto.

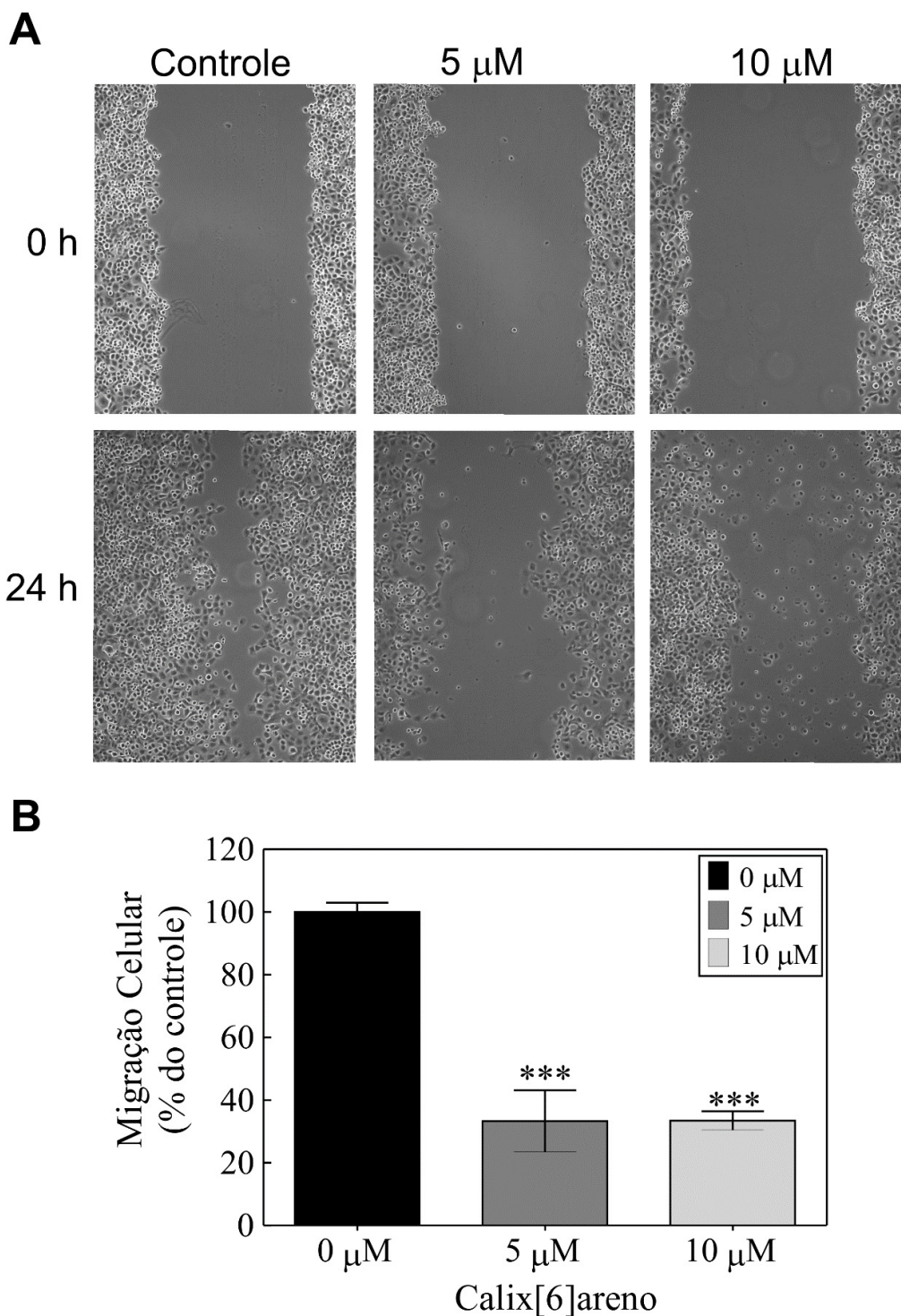


Figura 16. CLX6 inibe a migração de células Panc-1. Uma lacuna no tapete celular foi realizada, em seguida as células foram incubadas na ausência ou na presença do composto durante 24 h. Quantificação da área ocupada foi mensurada utilizando o programa Image J, os resultados representam a média $\pm$ EPM de 2 experiências independentes em duplicata. *** $p < 0,001$ diferença significativa vs controle. ANOVA seguido por teste de Tukey.

Os mecanismos moleculares envolvidos na resposta de perda de adesão e inibição de migração, mediados por CLX6, também foram investigados. Como observado, o CLX6 reduziu significativamente os níveis de expressão de integrina $\beta 3$, MMP-9 e MMP-2 (Figura 17A). Além disso, a proteína de adesão focal (FAK) teve sua atividade inibida, como observado na comparação entre proteína fosforilada em tirosina 576 e 577 (sítio de ativação) e proteína total (Figura 17B).

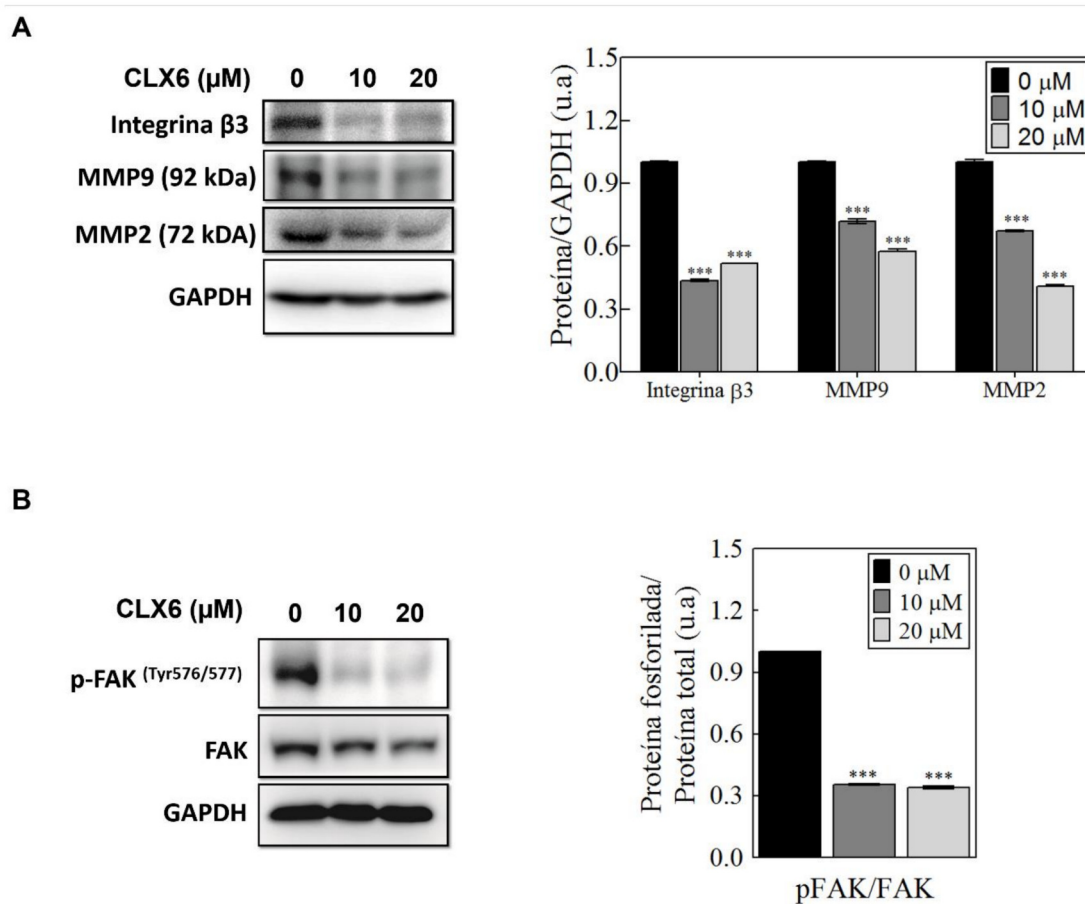


Figura 17. CLX6 modula proteínas envolvidas na adesão e migração de Panc-1 (A) A expressão de Integrina $\beta 3$, MMP9 e MMP2 foi determinada por *Western blotting*. (B) A atividade de FAK foi determinada por western blotting, comparando proteína fosforilada com proteína total. A proteína GAPDH foi utilizada como controle interno. Análise densitométrica dos blottings. A intensidade apresentada é relativa ao controle interno e expressa como unidades arbitrárias (u.a.) ($n = 3$ experimentos independente, $P < 0,05$). Valores são média $\pm$ EPM, *** $p < 0,001$ diferença significativa vs controle. ANOVA seguido por teste de Tukey.

Os dados discutidos até o momento evidenciam o efeito do CLX6 na proliferação e sobrevivência celular, além de fornecer informações consistentes do envolvimento da autofagia no processo de morte celular induzido pelo composto. Contudo, dados adicionais também demonstraram que CLX6 modula importantes mediadores envolvidos no processo metastático, como integrina, metaloproteinases e FAK.

As integrinas participam diretamente do processo de adesão, migração e invasão celular uma vez que comunicam a sinalização entre célula e a matrix extracelular. Em particular, a expressão de integrina $\alpha 5\beta 3$ tem sido relacionada com a capacidade de aderência das células, e por participar da migração (Cluzel et al., 2005).

A proteína de adesão focal (FAK) é uma tirosina quinase que participa da sinalização mediada por integrina, e que está envolvida na motilidade celular e proteção contra a apoptose (Sanders e Basson, 2000; Crowe e Ohannessian, 2004; Schmitz et al., 2005; Kirsch et al., 2002; Mukhopadhyay et al., 2005). FAK sofre fosforilação no resíduo de tirosina 397, que constitui o principal sítio de fosforilação dessa proteína. A fosforilação deste sítio cria um local de ligação de alta afinidade reconhecido pelo domínio SH2 das proteínas da família Src quinase (Gilmore e Romer, 1996; Richardson et al., 1997). O recrutamento de Src leva a fosforilação dos resíduos de tirosina 576 e 577 de FAK que correspondem à ativação do sítio catalítico desta quinase. No câncer de pâncreas, Sawai e colaboradores (2005) demonstraram que a ativação de FAK aumenta a adesão e invasão de células de câncer de pâncreas.

Ainda com relação a este câncer, análises demonstraram o envolvimento de integrina $\alpha 5\beta 3$, em sítios metastáticos, com a ativação de MMP-2 (Hosotani et al., 2002). Interessantemente, em células tumorais como um todo, a ativação de FAK é importante para promover expressão de VEGF e metaloproteinases como MMP-2 e MMP-9. Dessa forma, a

modulação destas proteínas por CLX6, somado aos efeitos observados no teste de adesão e migração com células humanas de câncer de pâncreas reforçam ainda mais o potencial quimioterápico do composto.

4.9. CLX6 aumenta a atividade de LMWPTPs nas células tratadas

A fim de entender com mais detalhes a modulação de FAK por CLX6, a atividade e expressão de LMWPTPs foi quantificada. As LMWPTPs são importantes moduladoras de vias de sinalização associadas à sobrevivência, proliferação, diferenciação e morte celular, além de participarem da inibição da adesão celular o que envolve desfosforilação de FAK (Souza et al., 2009).

Os resultados obtidos demonstraram (Figura 18A) um aumento nos níveis de LMWPTPs e uma forte redução na fosforilação do receptor do fator de crescimento derivado de plaquetas (PDGFR). Adicionalmente, a atividade de LMWPTPs isoladas das células Panc-1 expostas ao CLX6, apresentou um aumento de cerca de 10 vezes quando o composto foi utilizado na concentração de 20 μ M (Figura 18B).

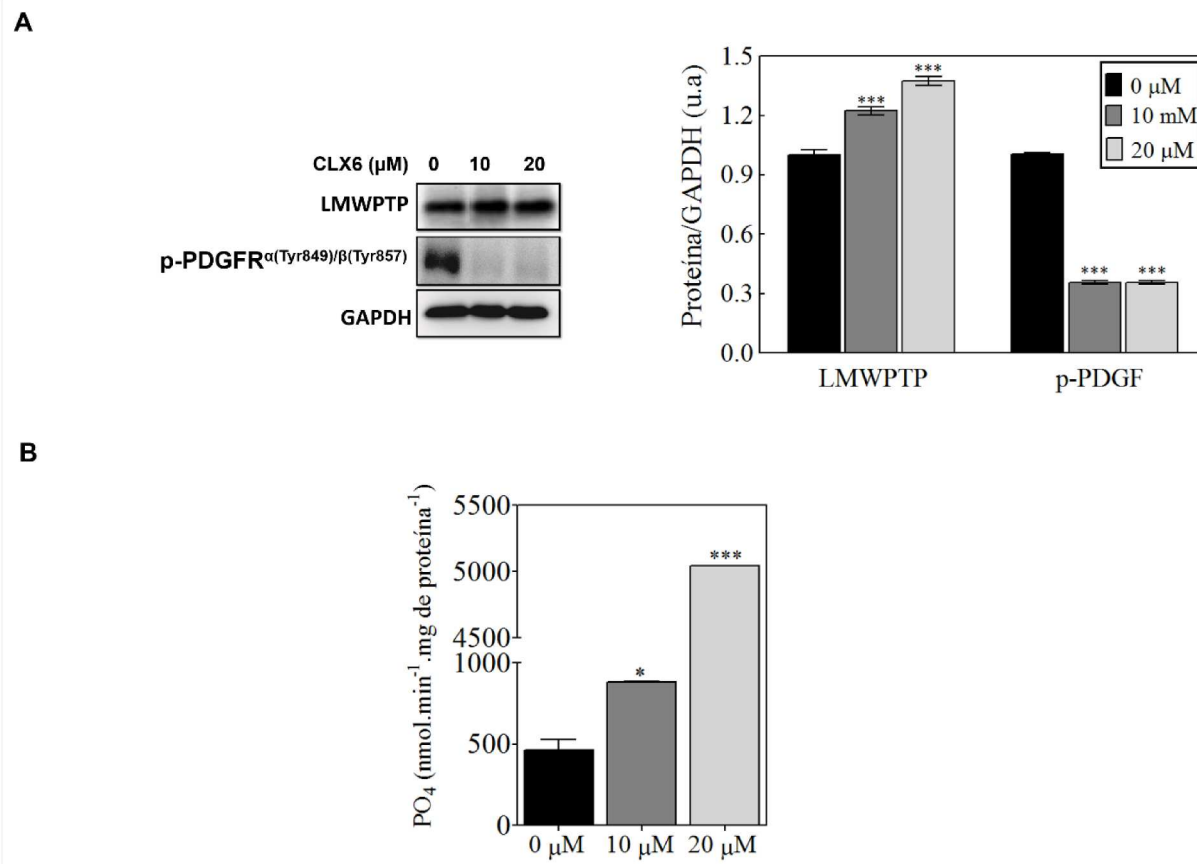


Figura 18. Aumento da atividade de LMWPTP de Panc-1 induzido por CLX6. Após o tratamento das células com várias concentrações de calix[6]aremo por 24 h, o extrato celular foi preparado e submetido à análise por *Western blotting*, utilizando anticorpo específico para LMWPTP e p-PDGFR α (Tyr849)/ β (Tyr857) (A). GAPDH foi utilizada como controle de aplicação. Análise densitométrica das bandas mostradas em normalizadas em função da GAPDH e expressas em relação ao controle (atribuído valor 1). A atividade fosfatásica foi determinada colorimetricamente como descrito em “Material e Métodos” (B). Resultados são representativos de 3 experimentos independentes. Os experimentos para determinação da atividade da LMWPTP foram realizados em duplicata. * $p < 0,05$, *** $p < 0,001$ em relação ao controle (ANOVA, teste de Tukey).

A modulação da atividade de LMWPTP pode se dar através da fosforilação/desfosforilação dos resíduos de tirosina 131/132 e pela oxidação reversível do resíduo de cisteína, presente no sítio ativo da enzima. O papel da LMWPTP em células tumorais ainda é controverso. De um lado, a forma cataliticamente ativa de LMWPTP é capaz de desfosforilar receptores e moléculas de sinalização, resultando na inibição da proliferação

celular. Por outro lado, a forma cataliticamente inativa de LMWPTP pode também atuar como uma proteína suporte para moléculas contendo domínio SH2, contribuindo assim, para a positiva regulação da sobrevivência e proliferação celular. Contudo, cabe mencionar que a real contribuição da LMWPTP para o desenvolvimento e progressão de um tipo de câncer específico necessita ser analisado considerando o *status* da atividade catalítica da enzima, seus níveis de expressão e prováveis mutações.

Tem sido demonstrado que a ativação de fatores de crescimento em célula de câncer de pâncreas, por exemplo, PDGFR, induz um aumento transitório de espécies reativas de oxigênio (EROs) induzido pela ativação de NADPH oxidase (Catarzi et al., 2005). Além disso, uma nova via de sinalização foi sugerida por Lee e colaboradores (2007), no qual espécies reativas de oxigênio produzidas pela NADPH-oxidase, em especial Nox4 no câncer de pâncreas, atuam na inibição oxidativa de PTPs, como LMWPTP. Esta inibição por sua vez conduz a fosforilação aumentada e sustentada de quinases, tais como JAK2 e supressão de apoptose.

Adicionalmente sabe-se que a LMWPTP também é responsável por desfosforilar e assim inativar FAK, porém uma vez que LMWPTP está inibida, FAK mantém a ativação e colabora no processo de metástase. Isso leva a hipótese de que a oxidação reversível de LMWPTP por EROs, no câncer de pâncreas, colabora para a manutenção da agressividade tumoral.

Adicionalmente, calixarenos têm sido utilizados como inibidores da interação do ligante a receptores de fatores de crescimento (Blaskovich et al., 2000; Sun et al. 2005; Zhou et al. 2006) que, por sua vez previne especificamente a fosforilação de tirosina do receptor do fator de crescimento derivado de plaqueta (PDGF), exercendo atividade antiangiogênica e anticancerígena (Blaskovich et al. 2000). Dessa forma, CLX6 pode exercer sua função em células de câncer de pâncreas através da inibição de PDGFR, o que resulta na redução nos níveis de EROs e, conseqüentemente, ativação de LMWPTP.

5. Conclusão

Os avanços científicos têm contribuído de forma inestimável para a terapia de diversas doenças. Isso se deve particularmente a identificação de alvos moleculares, bem como, a definição do mecanismo de ação do candidato a fármaco no microambiente celular. Os resultados apresentados nesse estudo permitiram a identificação dos mecanismos moleculares pelos quais o CLX6 reduz a viabilidade e proliferação celular, somado a indução de morte e inibição da adesão e migração de células humanas de câncer de pâncreas (Panc-1).

O CLX6 aparece como um potente agente quimioterapêutico contra a agressividade do câncer de pâncreas, principalmente por inibir a transdução de sinal dependente de receptores de tirosina quinases (Mer, AXL e PDGFR), que são geralmente superexpressos neste tumor, e por inibir a via PI3K/AKT/mTOR. Além disso, o estresse de retículo induzido por este composto parece contribuir para a morte celular autofágica. O CLX6 também reduziu a adesão e migração e este comportamento foi associado com a modulação de integrina/FAK, metaloproteinase e LMWPTP (Figura 19). O estudo demonstra a importância de uma descrição profunda do mecanismo molecular responsável pelo efeito biológico dos novos compostos, e abre uma nova possibilidade para melhorar a eficácia terapêutica contra o câncer pancreático.

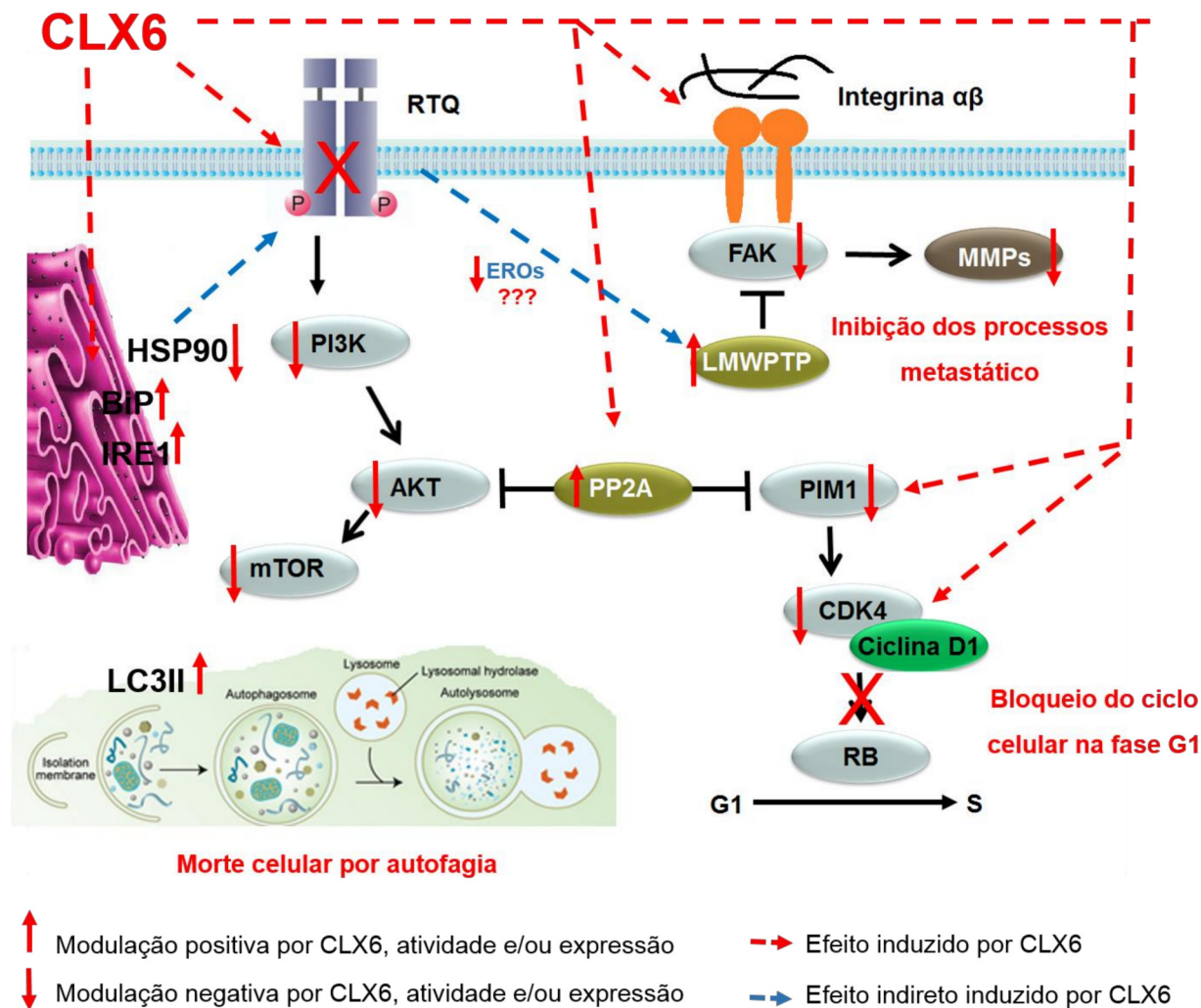


Figura 19. Mecanismo molecular proposto para o efeito do calix[6]areno nas células de câncer de pâncreas (Panc-1). CLX6 inibe a transdução de sinal dependente de receptores de tirosina quinases (Mer, AXL e PDGFR), que são geralmente superexpressos neste tumor, e consequentemente, inibe a via PI3K/AKT/mTOR. Além disso, o estresse de retículo induzido por este composto parece contribuir para a morte celular autofágica. CLX6 também levou ao bloqueio do ciclo celular na fase G0/G1 através da redução nos níveis de Pim-1, CDK2, CDK4 e inibição da proteína retinoblastoma. Enquanto que a redução na adesão e migração foi associada com a modulação de integrina/FAK, metaloproteinase e LMWPTP.

6. Referências Bibliográficas

- Agbunag C, Bar-Sagi D (2004). Oncogenic K-ras drives cell cycle progression and phenotypic conversion of primary pancreatic duct epithelial cells. *Cancer Research*. 64(16): 5659–5663.
- Asano T, Yao Y, Zhu J, Li D, Abbruzzese JL, Reddy SA (2004). The PI3-kinase/AKT signaling pathway is activated due to aberrant PTEN expression and targets transcription factors NF-kappaB and c-Myc in pancreatic cancer cells. *Oncogene* 23(53): 8571-8580.
- Bachmann M, Kosan C, Xing PX, Montenarh M, Hoffmann I, Möröy T (2006). The oncogenic serine/threonine kinase PIM1 directly phosphorylates and activates the G2/M specific phosphatase Cdc25C. *International Journal of Biochemistry and Cell Biology*. 38(3): 430–443.
- Bardeesy N, DePinho RA (2002). Pancreatic cancer biology and genetics. *Nature Reviews Cancer*. 2(12): 897-909.
- Blaskovic MA, Lin Q, Delarue FL, Sun J, Park HS, Coppola D, Hamilton AD, Sefti SM (2000). Design of GFB-111, a platelet-derived growth factor binding molecule with antiangiogenic and anticancer activity against human tumors in mice. *Nature Biotechnology*. 18(10): 1065-1070.
- Brault L, Gasser C, Bracher F, Hube K, Knapp S, Schwaller J (2010). PIM serine/threonine kinases in the pathogenesis and therapy of hematologic malignancies and solid cancers. *Haematologica*. 95(6): 1004–1015.
- Catarzi S, Biagioni C, Giannoni E, Favilli F, Marcucci T, Iantomasi T, Vincenzini MA (2005). Redox regulation of platelet-derived-growth-factor-receptor: Role of NADPH- oxidase and c-Src tyrosine kinase. *Biochimica et Biophysica Acta*. 1745, 166–175.

- Chadha KS, Khoury T, Yu J, Black JD, Gibbs JF, Kuvshinoff BW, Tan D, Brattain MG, Javle MM (2006). Activated AKT and Erk expression and survival after surgery in pancreatic carcinoma *Annals Surgical Oncology*. 13: 933-939.
- Chu CT (2006). Autophagic stress in neuronal injury and disease. *Journal of Neuropathology & Experimental Neurology*. 65(5): 423-432.
- Cluzel C, Saltel F, Lussi J, Paulhe F, Imhof BA (2005). The mechanisms and dynamics of alphavbeta3 integrin clustering in living cells. *The Journal of Cell Biology*. 171: 383-92.
- Colston MJ, Hailes HC, Stavropoulos E, Hervé AC, Hervé G, Goodworth KJ, Hill AM, Jenner P, Hart PD, Tascon R (2004). Antimycobacterial calixarenes enhance innate defense mechanisms in murine macrophages and induce control of *Mycobacterium tuberculosis* Infection in Mice. *Infection and Immunity*. 72(11): 6318-6323.
- Conforth JW, Hart PD, Nicholls GA, Rees RJW, Stock JA (1955). Antituberculous effects of certain surface-active polyoxyethylene ethers. *British Journal of Pharmacology Chemotherapy*. 10(1): 73-86.
- Costello E, Greenhalf W, Neoptolemos JP (2012). New biomarkers and targets in pancreatic cancer and their application to treatment. *Nature Reviews Gastroenterology and Hepatology*. 9: 435–444.
- Crowe DL, Ohannessian A (2004). Recruitment of focal adhesion kinase and paxillin to $\beta 1$ integrin promotes cancer cell migration via mitogen activated protein kinase activation. *BMC Cancer*. 4: 18.
- de Fátima A, Fernandes SA, Sabino AA (2009). Calixarenes as new platforms for drug design. *Current Drug Discovery Technologies*. 6(2): 151-170.

- Deer EL, Gonzalez-Hernandez J, Coursen JD, Shea JE, Ngatia J, Scaife CL, Firpo MA, Mulvihill SJ (2010). Phenotype and genotype of pancreatic cancer cell lines. *Pancreas*. 39(4): 425-435.
- Dings RP, Chen X, Hellebrekers DM, Van Eijk LI, Zhang Y, Hoye TR, Griffioen AW, Mayo KH (2006). Design of non-peptidic helix/sheet topomimetics: applications to inhibition of angiogenesis and tumor growth in mice. *Journal of the National Cancer Institute*. 98(13): 932-936.
- Dings RP, Miller MC, Nesmelova I, Astorgues-Xerri L, Kumar N, Serova M, Chen X, Raymond E, Hoye TR, Mayo KH (2012). Anti-tumor agent Calixarene 0118 targets human galectin-1 as an allosteric inhibitor of carbohydrate binding *Journal of Medicinal Chemistry*. 55(11): 5121-5129.
- Fazi B, Bursch W, Fimia GM, Nardacci R, Piacentini M, Di Sano F, Piredda L (2008). Fenretinide induces autophagic cell death in caspase-defective breast cancer cells. *Autophagy*. 4(4): 435–441.
- Ferreira, PA (2010). Modulação de vias de sinalização para indução de morte em células leucêmicas. Tese de Doutorado, Unicamp.
- Gilmore AP, Romer LH (1996). Inhibition of focal adhesion kinase (FAK) signaling in focal adhesions decreases cell motility and proliferation. *Molecular Biology Cell*. 7:1209-1224.
- Giroux V, Dagorn JC, Iovanna JL (2009). A Review of Kinases Implicated in Pancreatic Cancer. *Pancreatology* 9:738–754
- Groenendyk J, Opas M, Michalak M (2006) Protein folding and calcium homeostasis in the endoplasmic reticulum. *Calcium Binding Proteins*. 1(2): 77-85.
- Gutsche CD (1990). Calixarenes. *Pure & Applied Chemistry*. 62: 485.
- Hanahan D, Weinberg RA (2000). The hallmarks of cancer. *Cell*. 100: 57.

Hanahan D, Weinberg RA (2011). Hallmarks of Cancer: The Next Generation. *Cell* 144, 646-670.

Hart PD, Armstrong JA, Brodaty E (1996). Calixarenes with host-mediated potency in experimental tuberculosis: further evidence that macrophage lipids are involved in their mechanism of action. *Infection and Immunology*. 64(4): 1491-1493.

Hartwell LH, Weinert TA (1989). Checkpoints: controls that ensure the order of cell cycle events. *Science*. 246(4930): 629-634.

Hong SP, Wen J, Bang S, Park S, Song SY (2009). CD44-positive cells are responsible for gemcitabine resistance in pancreatic cancer cells. *International Journal of Cancer*. 125: 2323–2331.

Hosotani R, Kawagushi M, Masui T, Koshiha T, Ida J, Fujimoto K, Wada M, Doi R, Imamura M (2002) Expression of integrin $\alpha 5\beta 3$ in pancreatic carcinoma: Relation to MMP2 activation and Lymph Node metastasis. *Pancreas*. 25(2): 30-35.

Hu Y, Benedict MA, Wu D, Inohara N, Nunez G (1998). Bcl- xL interacts with Apaf-1 and inhibits Apaf-1- dependent caspase-9 activation. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the USA*. 95(8): 4386-4391.

Jain MK, Jahagirdar DV (1985). Effect of antituberculous calixarenes on phospholipase A2 susceptibility and on fusion of phospholipid bilayers. *Biochemical Journal*. 227(3): 789-794.

Kabeya Y, Mizushima N, Yamamoto A, Oshitani-Okamoto S, Ohsumi Y, Yoshimori T (2004). LC3, GABARAP and GATE16 localize to autophagosomal membrane depending on form-II formation. *Journal of Cell Science* 117(13): 2805–2812.

Kamada R, Yoshino W, Nomura T, Chuman Y, Imagawa T, Suzuki T, Sakaguchi K (2010). Enhancement of transcriptional activity of mutant p53 tumor suppressor protein through

- stabilization of tetramer formation by calix[6]arene derivatives. *Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters*. 20: 4412–4415.
- Kim EJ, Simeone DM (2011). Advances in pancreatic cancer, *Curr. Opin. Gastroenterol.* 27:5 460-466.
- Kirsch K, Kensinger M, Hanafusa H, August A (2002). A p130Cas tyrosine phosphorylated substrate domain decoy disrupts v-Crk signaling. *BMC Cell Biology*. 3:18.
- Klionsky DJ e outros 1269 autores (2012). Guidelines for the use and interpretation of assays for monitoring autophagy. *Autophagy*. 8(4): 445-544.
- Kondo Y, Kanzawa T, Sawaya R, Kondo S (2005). The role of autophagy in cancer development and response to therapy, *Nat. Rev. Cancer*. 5:9 726–734.
- Koorstra JB, Hong SM, Shi C, Meeker AK, Ryu JK, Offerhaus GJ, Goggins MG, Hruban RH, Maitra A (2009). Widespread activation of the DNA damage response in human pancreatic intraepithelial neoplasia. *Modern Pathology*. 11: 1439-1445
- Krishnamoorthy GP, Guida T, Alfano L, Avilla E, Santoro M, Carlomagno F, Melillo RM (2013). Molecular mechanism of 17-Allylamino-17-demethoxygeldanamycin (17-AAG) induced AXL Degradation. *JBC Papers in Press*.
- Lazzarotto M, Nachtigall FF, Nome F (1995). Calixarenos: Receptores para reconhecimento molecular. *Química nova*. 18: 444-451.
- Lee J, Edderkaoui M, Truong P, Ohno I, Jang K, Berti A, Pandol S, Gukovskaya A (2007) NADPH oxidase promotes pancreatic cancer cell survival via inhibiting JAK2 dephosphorylation by tyrosine phosphatases. *Gastroenterology*. 133, 1637 – 1648.
- Losman JA, Chen XP, Vuong BQ, Fay S, Rothman PB (2003). Protein Phosphatase 2A Regulates the Stability of Pim Protein Kinases. *The Journal of Biological Chemistry*. 278(7): 4800–4805.

- Mimeault M, Hauke R, Batra SK (2008). Recent advances on the molecular mechanisms involved in the drug resistance of cancer cells and novel targeting therapies, *Clin. Pharmacol. Ther.* 83:5 673–691.
- Mochizuki T, Kitanaka C, Noguchi K, Muramatsu T, Asai A, Kuchino Y (1999). Physical and functional interactions between PIM1 kinase and Cdc25A phosphatase. Implications for the PIM1-mediated activation of the c-Myc signaling pathway. *The Journal of Biological Chemistry*. 274: 18659–18666.
- Molinari M (2000). Cell cycle checkpoints and their inactivation in human cancer. *Cell Proliferation*. 33(5) 261-264.
- Morishita D, Katayama R, Sekimizu K, Sekimizu T, Tsuruo T, Fujita N (2008). Pim kinases promote cell cycle progression by phosphorylating and down-regulating p27 Kip1 at the transcriptional and posttranscriptional levels. *Cancer Research*. 68(13): 5076-5085.
- Mosmann T (1983). Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: application to proliferation and cytotoxicity assays. *Journal of Immunology Methods*. 16; 65(1-2): 55-63.
- Motornaya AAL, Shokova E, Kovalev VV (2006). Synthesis and antiherpetic activity of N-(3-amino-1-ada-mantyl)calix[4]arenes. *Pharmaceutical Chemistry Journal*. 40: 68-72.
- Mukhopadhyay NK, Gordon GJ, Chen CJ, Bueno R, Sugarbaker DJ, Jaklitsch MT (2005). Activation of focal adhesion kinase in human lung cancer cells involves multiple and potentially parallel signaling events. *Journal of Cell and Molecular Medicine*. 9:387-397.
- Nakano T, Tani M, Ishibashi Y, Kimura K, Park YB, Imaizumi N, et al. (2003). Biological properties and gene expression associated with metastatic potential of human osteosarcoma. *Clinical and Experimental Metastasis*. 20: 665–74.
- Nicholson DW, Ali A, Thornberry NA, Vaillancourt JP, Ding CK, Gallant M, Gareau Y, Griffin PR, Labelle M, Lazebnik YA, Munday NA, Raju SM, Smulson ME, Yamin TT, Yu VL,

- Miller DK (1995). Identification and inhibition of the ICE/CED-3 protease necessary for mammalian apoptosis. *Nature*. 376: 37-43.
- Ogata M, Hino S, Saito A, Morikawa K, Kondo S, Kanemoto S, Murakami T, Taniguchi M, Tanii I, Yoshinaga K, Shiosaka S, Hammarback JA, Urano F, Imaizumi K (2006). Autophagy is activated for cell survival after endoplasmic reticulum stress. *Molecular and Cellular Biology*. 26(4): 9220–9231.
- Paquet V, Zumbuehl A, Carreira EM (2006). Biologically active amphotericin B—calix[4]arene conjugates. *Bioconjugate Chemistry*. 17(6): 1460-1463.
- Qian J, Niu J, Li M, Chiao PJ, Tsao MS (2005). In vitro modeling of human pancreatic duct epithelial cell transformation defines gene expression changes induced by K-ras oncogenic activation in pancreatic carcinogenesis. *Cancer Research*. 65(12): 5045–5053.
- Qin L, Wang Z, Tao L, Wang Y (2010). ER stress negatively regulates AKT/TSC/mTOR pathway to enhance autophagy. *Autophagy*. 6(2) 239-247.
- Richardson A, Malik RK, Hildebrand JD, Parsons JT (1997). Inhibition of cell spreading by expression of the C-terminal domain of focal adhesion kinase (FAK) is rescued by coexpression of Src or catalytically inactive FAK: a role for paxillin tyrosine phosphorylation. *Molecular Cell Biology*. 17: 6906-6914.
- Rochlitz C, Lohri A, Bacchi M, Schmidt M, Nagel S, Fopp M, et al. (1999). Axl expression is associated with adverse prognosis and with expression of Bcl-2 and CD34 in de novo acute myeloid leukemia (AML): results from a multicenter trial of the Swiss Group for Clinical Cancer Research (SAKK). *Leukemia*. 13:1352–1358.
- Roy S, Bayly CI, Gareau Y, Houtzager VM, Kargman S, Keen SL, Rowland K, Seiden IM, Thornberry NA, Nicholson DW (2001). Maintenance of caspase-3 proenzyme dormancy by

an intrinsic “safety catch” regulatory tripeptide. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the USA*. 98: 6132–6137.

Ruela-de-Sousa RR, Fuhler GM, Blom N, Ferreira CV, Aoyama H, Peppelenbosch MP (2010) Cytotoxicity of apigenin on leukemia cell lines: implications for prevention and therapy, *Cell Death Dis.* 1; 1-11.

Salazar M, Carracedo A, Salanueva IJ, Hernández-Tiedra S, Lorente M, Egia A, Vázquez P, Blázquez C, Torres S, García S, Nowak J, Fimia GM, Piacentini M, Cecconi F, Pandolfi PP, González-Feria L, Iovanna JL, Guzmán M, Boya P, Velasco G (2009). Cannabinoid action induces autophagy-mediated cell death through stimulation of ER stress in human glioma cells, *J. Clin. Invest.* 119:5 1359–1372.

Sanders MA, Basson MD (2000). Collagen IV-dependent ERK activation in human Caco-2 intestinal epithelial cells requires focal adhesion kinase. *The Journal of Biology Chemistry*. 275: 38040-38047.

Sawai H, Okada Y, Funahashi H, Matsuo Y, Takahashi H, Takeyama H, Manabe T (2005). Activation of focal adhesion kinase enhances the adhesion and invasion of pancreatic cancer cells via extracellular signal-regulated kinase-1/2 signaling pathway activation. *Molecular Cancer*. 4: 37.

Schmitz KJ, Grabellus F, Callies R, Otterbach F, Wohlschlaeger J, Levkau B, Kimmig R, Schmid KW, Baba HA (2005). High expression of focal adhesion kinase (p125FAK) in node-negative breast cancer is related to overexpression of HER-2/neu and activated AKT kinase but does not predict outcome. *Breast Cancer Research*. 7: 194-203.

Sebti SM, Hamilton AD (2000). Farnesyltransferase and geranylgeranyltransferase I inhibitors and cancer therapy: Lessons from mechanistic and bench-to-bedside translational studies. *Oncogene*. 19(56): 6566-6573.

- Shankar SL, O'Guin K, Cammer M, McMorris FA, Stitt TN, Basch RS, Varnum B, Shafit-Zagardo B (2003). The Growth Arrest-Specific Gene Product Gas6 Promotes the Survival of Human Oligodendrocytes via a Phosphatidylinositol 3-Kinase-Dependent Pathway. *The Journal of Neuroscience*. 23(10): 4208-4218.
- Shankar SL, O'Guin K, Kim M, Varnum B, Lemke G, Brosnan CF, Shafit-Zagardo B (2006). Gas6/Axl Signaling Activates the Phosphatidylinositol 3-Kinase/Akt1 Survival Pathway to Protect Oligodendrocytes from Tumor Necrosis Factor α -Induced Apoptosis. *The Journal of Neuroscience*. 26(21): 5636-5648.
- Shieh YS, Lai CY, Kao YR, Shiah SG, Chu YW, Lee HS, Wu CW (2005). Expression of axl in lung adenocarcinoma and correlation with tumor progression. *Neoplasia*. 12: 1058-1064.
- Shimizu S, Kanaseki T, Mizushima N, Mizuta T, Arakawa-Kobayashi S, Thompson CB, Tsujimoto Y (2004). Role of BCL2 family proteins in a non-apoptotic programmed cell death dependent on autophagy genes. *Nature Cell Biology*. 6(12): 1221–1228.
- Siegel R, Naishadham DMA, Jemal A (2012). Cancer statistics. *CA Cancer Journal Clinical*. 62: 10–29.
- Siegel R, Naishadham DMA, Jemal A (2013). Cancer statistics. *CA Cancer Journal Clinical*. 63: 11–30.
- Song X, Wang H, Logsdon CD, Rashid A, Fleming JB, Abbruzzese JL, Gomez HF, Evans D, Wang H (2011). Overexpression of receptor tyrosine kinase AXL promotes tumor cell invasion and survival in pancreatic ductal adenocarcinoma. *Cancer*. 117(4):734-43.
- Souza AC, Azoubel S, Queiroz KC, Peppelenbosch MP, Ferreira CV (2009). From immune response to cancer: a spot on the low molecular weight protein tyrosine phosphatase. *Cellular and Molecular Life Science*. 66: 1140-1153.

- Stathis A, Moore MJ (2010) Advanced pancreatic carcinoma: current treatment and future challenges. *Nature Reviews Clinical Oncology*. 7: 163-172.
- Sun J, Wang DA, Jain RK, Carie A, Paquette S, Ennis E, Blaskovich MA, Baldini L, Coppola D, Hamilton AD (2005). Inhibiting angiogenesis and tumorigenesis by a synthetic molecule that blocks binding of both VEGF and PDGF to their receptors. *Oncogene*. 24(29): 4701–4709.
- Verma A, Warner SL, Vankayalapati H, Bearss DJ, Sharma S (2011) Targeting AXL and Mer Kinases in Cancer. *Molecular Cancer Therapeutics*. 10: 1763-1773.
- Viola S, Consoli GML, Merlo S, Drago F, Sortino MA, Geraci C (2008). Inhibition of rat glioma cell migration and proliferation by a calix[8]arene scaffold exposing multiple GlcNAC and ureido functionalities. *Journal of Neurochemistry*. 107: 1047-1055.
- Vivanco I, Sawyer CL (2002) The phosphatidylinositol 3-Kinase–AKT pathway in human cancer. *Nature Reviews Cancer*. 2: 489-501.
- Xie CM, Chan WY, Yu S, Zhao J, Cheng CH (2011). Bufalin induces autophagy-mediated cell death in human colon cancer cells through reactive oxygen species generation and JNK activation. *Free Radical Biology Medicine*. 51(7): 1365-1375.
- Xu D, Allsop SA, Witherspoon SM, Snider JL, Yeh JJ, Fiordalisi JJ, White CD, Williams D, Cox AD, Baines AT (2011). The oncogenic kinase PIM1 is modulated by K-Ras signaling and mediates transformed growth and radioresistance in human pancreatic ductal adenocarcinoma cells. *Carcinogenesis*. 32(4): 488–495.
- Yu Y, Kovacevic Z, Richardson DR (2007). Tuning cell cycle regulation with an iron key. *Cell Cycle*. 6(16): 1982-1994.
- Yung HW, Charnock-Jones DS, Burton GJ (2011). Regulation of AKT Phosphorylation at Ser473 and Thr308 by Endoplasmic Reticulum Stress Modulates Substrate Specificity in a Severity Dependent Manner. *Plos one*. 6(3): e17894.

Zhou H, Wang DA, Baldini L, Ennis E, Jain R, Carie A, Sebtí SM, Hamilton, AD (2006).

Structure-activity studies on a library of potent calix[4]arene-based PDGF antagonists that inhibit PDGF-stimulated PDGFR tyrosine phosphorylation. *Organic & Biomolecular Chemistry*. 4(12): 2376-2386.

Capítulo 2

Goniotalamina e Piplartina: a busca por compostos ativos contra o câncer de pâncreas

Agradecimento especial à Rosimeire Coura Barcelos que sintetizou os compostos estudados neste capítulo, e à Marina Pereira Dias que contribuiu na coleta de dados do estudo *in vitro*.

Resumo

O desenvolvimento de novos fármacos a partir de produtos naturais tem sido uma boa estratégia para o tratamento do câncer. O potencial antitumoral das moléculas goniotalamina e piplartina, obtidas principalmente de plantas do gênero *Goniotalamus* e *Piper*, respectivamente, já foi descrito na literatura contra uma série de células tumorais. O presente estudo fornece evidências sobre o grande potencial da goniotalamina, piplartina e os análogos sintéticos **25** e **44** contra células humanas de câncer de pâncreas (Panc-1). Em resumo, a investigação do efeito sobre a viabilidade celular da goniotalamina e análogos sintetizados, demonstrou que a atividade biológica da goniotalamina reside em sua unidade δ -lactona α,β -insaturada, que pode atuar como acceptor de Michael. Além disto, a substituição de um oxigênio (“O”) por um grupo “NH” no anel lactônico da goniotalamina resultou em uma lactama α,β -insaturada, porém sem atividade biológica. Em contrapartida, a acilação do “N” dessa nova estrutura resgatou o potencial biológico, sendo que a presença de mais uma dupla tornou o composto ainda mais ativo. A avaliação da piplartina, uma lactama α,β -insaturada N-acilada, e seus derivados, confirmaram também o potencial desse tipo de molécula contra as células Panc-1. No estudo molecular, observamos que a goniotalamina, piplartina e seus derivados modularam negativamente a agressividade de células de câncer de pâncreas, uma vez que a sobrevivência, a proliferação, a capacidade de formação de colônia foram fortemente reduzidos após o tratamento. Tanto goniotalamina, piplartina como os análogos **25** e **44** reduziram significativamente os níveis do receptor tirosina-quinase (AXL), sabidamente superexpresso no câncer de pâncreas. Proteínas *downstream* a AXL foram também negativamente moduladas, os compostos foram capazes de reduzir a atividade de ERK. Além disso, a modulação de importantes marcadores apoptóticos revela participação da apoptose no mecanismo de morte induzido pelos compostos. Este estudo destaca a importância da investigação de estrutura atividade que auxilia na definição e na busca por compostos mais ativos e com maior seletividade. Além disso, uma investigação preliminar da modulação de proteínas associadas com a agressividade e resistência do câncer de pâncreas, permite a seleção de compostos que possam ser utilizados como base para síntese de moléculas mais potentes.

Capítulo 2

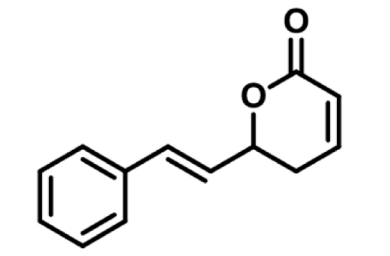
1. Introdução

O adenocarcinoma do ducto pancreático (ACDP), principal tipo do câncer de pâncreas, caracteriza-se por se tratar de uma doença com alta mortalidade, que até o momento não dispõe de um tratamento eficaz (Vincent et al., 2011). A alta heterogeneidade deste câncer se deve, principalmente, pela desregulação de múltiplas vias que regem os processos celulares fundamentais (Kim e Simeone, 2011), dentre os quais, a resistência a indução de morte por apoptose caracteriza a principal limitação no tratamento atual. A contínua busca por novas estratégias terapêuticas para o tratamento do câncer, em geral, desempenha papel central como alternativa para combater essa resistência, além da agressividade tumoral, relacionado com a rápida progressão da doença e metástase.

Neste sentido, os produtos naturais aparecem como uma fonte interessante de moléculas precursoras para o desenvolvimento de novos compostos para o tratamento do câncer (Newman e Cragg, 2012). A química orgânica sintética complementa a natureza possibilitando que os compostos naturais sejam sintetizados em larga escala ou sirvam como protótipos para a síntese total, ou semissíntese de novos e eficientes medicamentos (Newman e Cragg, 2012). Vários composto originados de produtos naturais já são utilizados atualmente no tratamento de um amplo espectro de cânceres. Dentre estes destacamos, a vimblastina e vincristina que foram originalmente isolados de *Catharanthus roseus*, e atualmente são utilizadas no tratamento de linfoma, leucêmias e câncer de mama (Revisado por Nobili et al., 2009). O paclitaxel, inicialmente isolado das cascas de *Taxus brevifolia*, utilizado no tratamento do câncer de mama, de ovário, de pulmão e de sarcoma de Kaposi (Revisado por Nobili et al., 2009). E as combretastatinas que foram isoladas das cascas da árvore *Combretum caffrum*, e apresentaram potencial atividade contra uma ampla variedade de linhagens celulares de cânceres humano,

inclusive multirresistentes (Revisado por Nobili et al., 2009). Todos esses exemplos já serviram de molde para a síntese de análogos mais ativos também utilizados na quimioterapia (Srivastava et al., 2005; Cragg e Newman, 2009; Yue et al., 2010).

As estirilactonas representam uma classe promissora de potenciais compostos, estruturalmente simples, com ampla atividade biológica (de Fátima et al., 2006a). A goniotalamina (Fig. 1), uma estirilactona de seis membros α,β -insaturada foi originalmente isolada a partir de várias espécies do gênero *Goniothalamus* (Annonaceae) (Wattanapiromsakul et al., 2005), mas também pode ser encontrada em plantas dos gêneros *Cryptocarya* (Laulareceae) (Cavalheiro et al., 2000) e *Bryonopsis* (Cucurbitaceae) (Kabir et al., 2003). A atividade citotóxica e antiproliferativa da goniotalamina já foi investigada contra uma variedade de linhagens de células tumorais, incluindo células de câncer de rim, próstata, mama, pulmão, leucemia e fígado (de Fatima et al., 2005; 2006b; Chiu et al., 2011; Al-Qubaisi et al., 2011; Vendramini-Costa et al., 2010). Além disso, goniotalamina apresenta ainda outras importantes atividades biológicas incluindo antimicrobiana (Khan et al., 1999; Mosaddik et al., 2003), antifúngica (Martins et al., 2009), larvicida (Kabir et al., 2003), inseticida (Senthil-Nathan et al., 2008; Rajab et al., 2005) e tripanocida (de Fatima et al., 2006c). Contudo até o momento essa estirilactona não foi investigada contra o câncer de pâncreas.



Goniotalamina

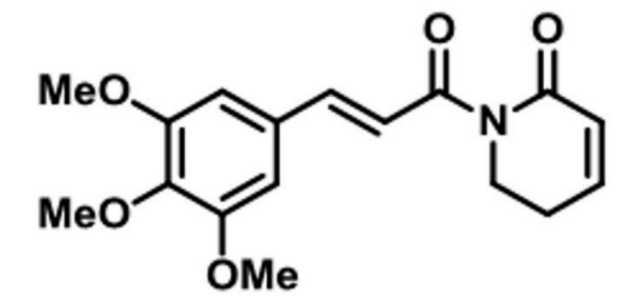
Figura 1. Estrutura química da goniotalamina.

Estudos prévios a respeito do mecanismo de ação da goniotalamina indicam a indução de apoptose em células tumorais por diversos mecanismos, dentre os quais o aumento da atividade das caspases 3, 7 e 9 (Inayat-Hussain et al., 2003; Inayat-Hussain et al., 1999), o aumento da expressão da proteína pró-apoptótica BAX (Pihie et al., 1998), a inibição da expressão e da atividade da NO sintase (NOS) (de Fátima et al., 2008).

A piplartina (Fig. 2), também conhecida como piperlongumina, é encontrada em diversas espécies do gênero *Piper*. Este alcalóide apresenta diversas propriedades biológicas, incluindo atividades citotóxica e antitumoral, antifúngica e tripanocida (Bezerra et al., 2013). Raj e colaboradores (2011) identificaram em uma triagem *in vitro* e *in vivo* que a piplartina apresenta um efeito antiproliferativo seletivo contra células tumorais, inclusive neste estudo, piplartina reduziu significativamente a viabilidade de células de câncer de pâncreas (Panc-1). Somado a isso, estudos *in vivo* mostraram a eficácia em animais inoculados com Sarcoma 180, exibindo efeitos tóxicos moderados e potencialmente reversíveis (Bezerra et al., 2006). Neste sentido, por conta da alta seletividade que a piplartina tem demonstrado, diversos grupos estão atualmente realizando estudos, a fim de, investigar os mecanismos moleculares envolvidos nos seus efeitos.

Adams et al. (2012) demonstraram que a piplartina elevou seletivamente, os níveis celulares de espécies reativas de oxigênio (EROs) e induziu a morte por apoptose de células tumorais. Neste mesmo estudo, a realização de uma triagem de pequenas moléculas derivadas de piplartina, resultou na identificação dos grupos farmacofóricos. Foi proposto que a dupla endocíclica do anel lactâmico α,β -insaturado corresponde a porção estrutural com maior potencial na toxicidade celular, sendo responsável pela elevação de EROs e depleção de glutatona no meio intracelular. Por outro lado, a dupla exocíclica também se demonstrou essencial para a atividade tóxica, porém não é necessária para a elevação de EROs, e seu papel

foi relacionado com a glutationação de proteínas. Outros estudos também indicam a participação de morte celular por apoptose induzida por piplartina em células tumorais (Bezerra et al., 2007).



Piplartina

Figura 2. Estrutura química da piplartina.

Tendo-se em vista a atuação da goniotalamina frente às células tumorais, principalmente relacionado com o envolvimento da apoptose, como mecanismo de morte disparado por esse composto, bem como, a identificação da piplartina como um potente e seletivo composto contra células tumorais (inclusive câncer de pâncreas), a síntese de moléculas derivadas desses compostos pareceu uma estratégia bastante promissora na busca por compostos mais ativos, e que possivelmente possam ultrapassar a resistência de morte por apoptose do câncer de pâncreas.

2. Objetivos

Diante do exposto, os objetivos desse trabalho foram:

- a) Avaliar a atividade citotóxica *in vitro* da goniotalamina, seus análogos e um híbrido, goniotalamina e piplartina, em células humanas de câncer de pâncreas (Panc-1);
- b) Investigar a modulação de proteínas envolvidas na progressão, agressividade e sobrevivência do câncer de pâncreas;
- c) Investigar a modulação de proteínas apoptóticas nas células Panc-1.

3. Materiais de Métodos

3.1. Reagentes

Meio de cultura Dulbecco's Modified Eagle's Medium (DMEM), sulfato de estreptomicina e penicilina foram obtidos da Nutricell (Campinas, SP, Brasil), enquanto que o Soro Fetal Bovino (SFB) foi obtido da Gibco (Invitrogen, NY, EUA). 1-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difeniltetrazólio (MTT), albumina de soro bovino (BSA), cloreto de sódio (NaCl), Tween 20, desoxicolato de sódio, o-vanadato, fluoreto de sódio (NaF), aprotinina, leupeptina, ditioneitol (DTT), dodecilsulfato de sódio (SDS), tris(hidroximetil) aminometano (Tris), 4-(2-hidroxietil)-1-piperazina ácido etanosulfônico (HEPES), fluoreto de fenilmetilsulfonil (PMSF), cloreto de potássio (KCl), cloreto de magnésio ($MgCl_2$), ácido etilenodiaminotetracético (EDTA), ácido etilenoglicoltetracético (EGTA), fosfato de sódio monobásico (NaH_2PO_4), glicina, hidróxido de sódio (NaOH), bicarbonato de sódio ($NaHCO_3$), cloreto de cálcio ($CaCl_2$), acrilamida, bis-acrilamida foram obtidos da Sigma Chemical Co. (St. Louis, MO, EUA). Coomassie Blue R-250, azul de bromofenol, Triton X-100, glicerol, metanol e etanol foram obtidos da Merck Sharp & Dohme (Whitehouse Station, NJ, EUA). Os anticorpos primários para a BAX (Cat. Nº #2772), GAPDH (Cat. Nº 2118), AXL (Cat. Nº #4566), p44/42 MAPK (ERK1/2) (137F5) (Cat. Nº #4695), p-p44/42 MAPK (ERK1/2) (Thr202/Tyr204) (Cat. Nº #9101) foram obtidos da Cell Signaling Technology (Beverly, MA, EUA). Anticorpo primário para PARP-1 (cleaved p25) (Cat. Nº 04-576) foi obtido da Millipore Corporation. Os anticorpos secundários conjugados com peroxidase anti-coelho (Cat. Nº #7074) e anti-camundongo (Cat. Nº #7076) foram obtidos da Cell Signaling Technology.

3.2. Cultura de células

A linhagem celular Panc-1 (carcinoma de pâncreas) foi adquirida no Banco de Células do Rio de Janeiro (BCRJ). O cultivo foi realizado em meio DMEM contendo 100 U/mL de penicilina, 100 µg/mL de sulfato de estreptomicina e suplementados com 10% de soro fetal bovino (SFB). As células foram cultivadas em atmosfera umidificada, 5% CO₂ a 37°C e o subcultivo foi realizado periodicamente (2-3 vezes na semana).

3.3. Síntese e diluição dos compostos

Os compostos goniotalamina, análogos, piplartina e híbrido foram sintetizados no Laboratório de Síntese Orgânica da Universidade Estadual de Campinas, coordenado pelo Prof. Dr. Ronaldo Aloise Pilli. Os procedimentos de síntese estão descritos em Barcelos, 2013 (Tese de doutorado). Após a síntese e caracterização estrutural, os compostos foram encaminhados ao nosso laboratório para serem avaliados com relação ao efeito sobre a viabilidade celular de Panc-1. Previamente, os compostos foram diluídos em DMSO, a fim de se obter uma solução estoque 100 mM, e mantidos em freezer -20°C. Para os ensaios subsequentes, uma segunda solução (1 mM) foi preparada a partir da estoque (100 mM) diretamente em meio de cultura (DMEM, 10% SFB) e submetido ao sonicador por 5 min para total solubilização do composto. A concentração de DMSO final nos experimentos, descritos abaixo, não ultrapassou a concentração citotóxica de 0,1%.

3.4. Análise da viabilidade celular através da função mitocondrial (ensaio do MTT)

Para a análise de viabilidade celular, células de câncer de pâncreas (Panc-1) foram plaqueadas independentemente na densidade de 1×10^5 células/ml em placas de 96 poços (volume de plaqueamento por poço: 100 µl), e incubadas a 37°C, 5% CO₂ por 24 h. Após o tratamento com 1; 10; 25; 50 e 100 µM dos compostos, por 24 h, o meio de tratamento foi removido, os poços foram lavados com PBS, em seguida, foram adicionados aos poços meio sem soro contendo MTT (0,5 mg/mL). Após incubação por 4 h a 37°C, o meio foi retirado cuidadosamente e foi adicionado 100 µL de etanol para solubilização do formazan. As placas foram agitadas por 10 min e a absorbância correspondente a cada poço foi lida em leitor de placas (ELx 800 BIO-TEK) em $\lambda = 570$ nm. Os valores foram expressos em porcentagens de redução de MTT em relação ao controle (Mosmann, 1983). A viabilidade das células Panc-1 foi também investigada após o tratamento com Gencitabina (até a concentração de 2 mM). Os resultados foram representados como média $\pm$ desvio padrão de 3 experimentos independentes conduzidos em triplicata.

3.5. Ensaio de formação de colônia

Células Panc-1 foram semeadas em placas de seis poços na concentração de 200 células/poço e incubadas em estufa úmida 37°C, 5% CO₂. Após 24 h as células foram tratadas com diferentes concentrações dos compostos em estudo. Após o tratamento por 15 dias, as células foram fixadas e coradas com 0,2% de cristal violeta e 2,5% gliceraldeído durante 60 min. O número de colônias foi determinado com o auxílio de um microscópio estereoscópico.

3.6. Análise da expressão de proteínas por *Western Blotting*

A fim de avaliar a expressão de proteínas associadas com agressividade, sobrevivência e morte celular amostras para *Western Blotting* foram preparadas. Para isso, $1,87 \times 10^5$ células/mL (10 mL/placa) foram plaqueadas em placa de 100 mm, e incubadas por 24 h em estufa úmida à 37°C e 5%CO₂. Em seguida as células foram tratadas por 24 h com concentrações determinadas pelo ensaio de viabilidade celular. Após o tratamento as células foram coletadas das placas com o auxílio de um raspador de células (“*cell scraper*”), transferidas para tubos do tipo eppendorf, centrifugadas, lavadas com PBS (3X) e lisadas com tampão de lise apropriado contendo antiproteases (50 mM Tris-HCl (pH 7.4) contendo 1% Tween 20, 0.25% deoxicolato de sódio, 150 mM NaCl, 1 mM EGTA, 1 mM o-vanadate, 1 mM fluoreto de sódio, 1 µg/mL aprotinina, 10 µg/mL leupeptina, e 1 mM PMSF). As amostras foram, então, homogeneizadas com sonificador e mantidas em banho de gelo durante 2 h, com agitações a cada 30 min, com o objetivo de aumentar a eficiência da extração de proteínas. Após centrifugação do extrato celular a 21.255 g por 10 min a 4°C, o precipitado foi descartado e o conteúdo de proteínas foi determinado por espectrofotometria através do método de Bradford, utilizando kit comercial (Sigma) e BSA como padrão. Após a dosagem de proteínas as amostras foram acrescidas de tampão de amostra na proporção 1:1 [Tris-HCl 100 mM (pH 6,8), DTT 200 mM, SDS 4%, azul de bromofenol 0,1 % e glicerol 20%]. A seguir, as amostras foram fervidas por 5 min e aplicadas em gel de poliacrilamida (8 - 12%) contendo SDS (SDS-PAGE).

Após a eletroforese, as proteínas foram transferidas para membranas de PVDF (previamente ativadas com metanol) na presença de 20% de metanol e 0,02% de SDS durante 1 h e 30 min, para proteínas de baixo peso molecular, e 4 h para proteínas de alto peso molecular, em amperagem constante de 400 mA. As membranas foram bloqueadas com BSA a 5% preparado em tampão Tris contendo tween 20 a 0,05% (TBST) e incubadas *overnight* com anticorpos primários diluídos 1:1000 em BSA 3%. Em seguida, as membranas foram lavadas

com TBST (3X de 5 min) e incubadas com anticorpo secundário específico conjugado com peroxidase-HRP (1:10000) por 1h e 30 min. Após lavagem das membranas com TBST (3X de 5 min), as bandas foram detectadas por quimioluminescência no equipamento ImageQuant LAS 4000 (GE Healthcare Life Science). A intensidade das bandas foi quantificada por densitometria com o auxílio do programa Image J. Os valores resultantes foram corrigidos pelo valor obtido para o controle interno (gliceraldeído-3 fosfato desidrogenase - GAPDH) correspondente a cada banda. As intensidades finais foram expressas relativamente ao controle e como Unidades Arbitrárias (u.a.).

3.7. Análise dos dados

Os resultados foram expressos como média $\pm$ erro padrão da média. A análise estatística foi realizada utilizando-se ANOVA seguida de *post test* Tukey. Foi adotado o nível de significância $p < 0,05$.

4. Resultados e Discussões

4.1. Redução da viabilidade celular de Panc-1 após o tratamento com goniotalamina e seus derivados

A goniotalamina (**1**) apresentou interessante atividade citotóxica contra Panc-1, reduzindo a viabilidade celular em 50% na concentração de 65 μM após 24 h de tratamento. Como observado na figura 3, as curvas de viabilidade celular em relação a concentração de goniotalamina apresentaram os mesmos perfis nos tempos de 24 e 48 h, sugerindo que este composto não apresenta um efeito dependente do tempo. Contudo, a avaliação da viabilidade celular de Panc-1 frente ao tratamento com gencitabina, quimioterápico atualmente utilizado no tratamento do câncer de pâncreas, revelou que no tempo de 24 h, até a concentração de 2 mM, nenhum efeito citotóxico foi observado, sendo que em 48 h uma redução de 50% na viabilidade celular foi detectada na concentração de 200 μM (Figura 3).

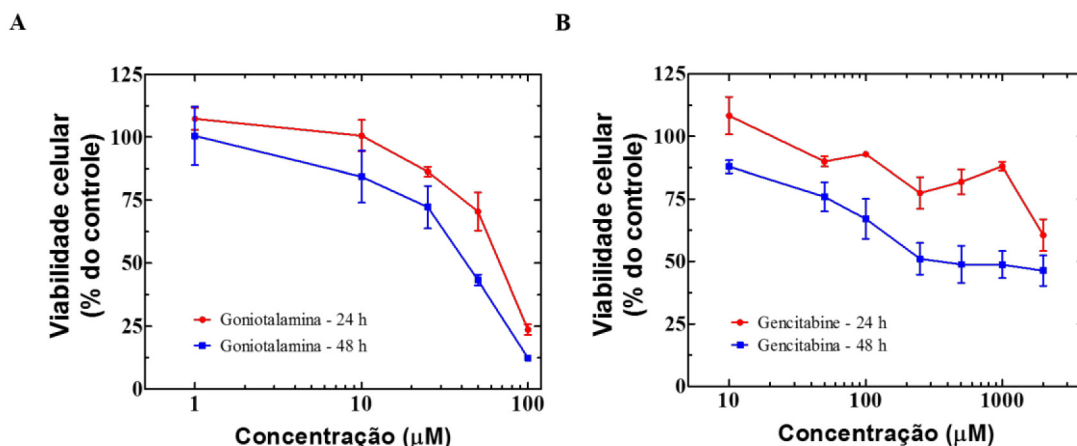
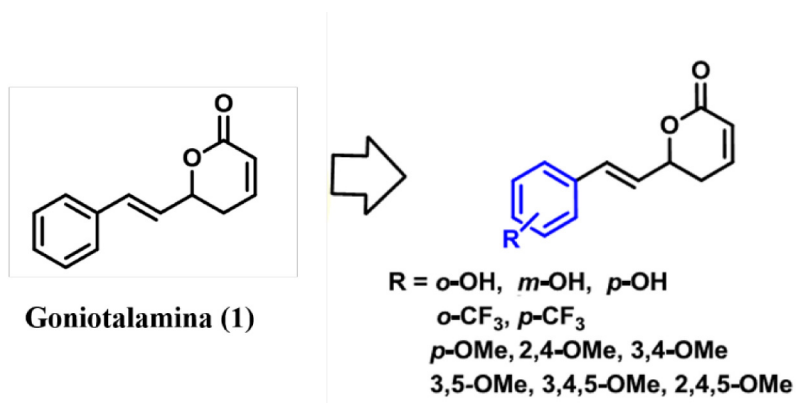


Figura 3. Redução da viabilidade celular de Panc-1 após o tratamento com goniotalamina e gencitabina. Células Panc-1 foram plaqueadas (1×10^5 células/mL) em microplacas de 96 poços e incubadas por 24 h a 37°C e 5% de CO_2 . As células foram tratadas com diferentes concentrações da goniotalamina (A) e gencitabina (B) e incubadas nas mesmas condições por 24 e 48 h. A viabilidade celular foi avaliada pela redução do MTT. Os valores foram expressos em porcentagens de redução de MTT em relação ao controle (100%). Resultados representam média $\pm$ erro padrão da média de 3 experimentos independentes realizados em triplicata.

Diante do potencial efeito que a goniotalamina apresentou frente esta linhagem resistente de câncer de pâncreas, o grupo do Prof. Pilli (Departamento de Química Orgânica do Instituto de Química da Unicamp) se propôs a sintetizar análogos da goniotalamina com o objetivo de torná-los mais potentes. Conforme apresentado na Tese de doutorado de Rosimeire Barcelos (2013) a estratégia inicial foi sintetizar novos análogos racêmicos da goniotalamina com o anel aromático contendo grupos hidroxila, metoxila e trifluorometila como substituintes (Esquema 1).



Esquema 1. Estruturas dos novos análogos de goniotalamina (adaptado de Barcelos, 2013).

Todos esses análogos de goniotalamina foram avaliados com relação ao efeito sobre a viabilidade celular de Panc-1 por 24 h. Dentre os análogos contendo hidroxila no anel aromático (2-4), apenas a adição de um grupo hidroxil na posição meta (3) representou uma melhora de 2 vezes na atividade citotóxica (IC_{50} : $29,2 \pm 8,4 \mu M$) comparada com a goniotalamina (1) (Figura 4). Somado a esses resultados, a adição do grupamento trifluorometil (5-6) ou metoxilas (7-12) na porção fenil da goniotalamina, não resultou em nenhuma melhora significativa no efeito citotóxico dos análogos contra Panc-1, se comparado a goniotalamina (Figura 4).

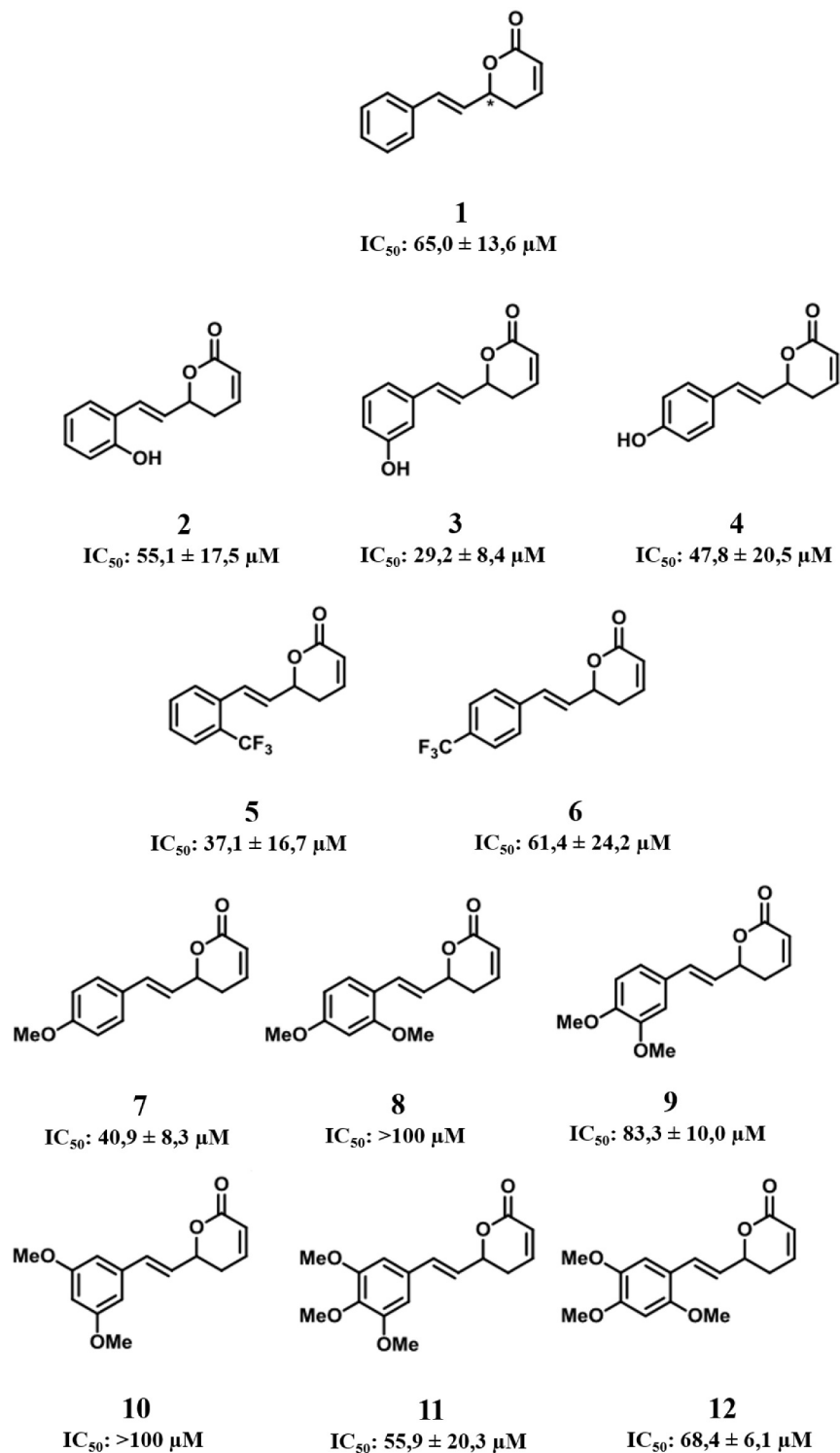


Figura 4. Estrutura química dos análogos da goniotalamina e a concentração que reduziu a viabilidade celular de Panc-1 em 50% após 24 h de tratamento.

Muitos trabalhos já relatam que a atividade citotóxica das di-hidropiranonas, como a goniotalamina, reside em sua unidade δ -lactona α,β -insaturada, pois esse núcleo pode atuar como acceptor de Michael em sistemas biológicos (Bialy et al., 2003; de Fátima et al., 2006a; Kasaplar et al., 2010). Dessa forma, o efeito observado para a maioria dos análogos apresentados pode estar relacionado puramente a α,β - insaturação do anel lactônico. Dentre as alterações estruturais propostas para a goniotalamina (**1**), a adição do grupamento hidroxila consiste em melhorar a solubilidade do composto por conta de uma região mais polar, permitindo assim uma melhor disponibilidade em meio biológico. Contudo dos três análogos hidroxilados (**2-4**), apenas o composto com OH na posição meta (**3**) apresentou melhor efeito citotóxico, sugerindo que neste caso, a posição do grupamento hidroxila parece ser relevante.

Adicionalmente, Barcelos e colaboradores (2012) demonstraram que o análogo dimetoxilado de goniotalamina (**10**) foi potencialmente mais ativo e seletivo contra células tumorais de mama, ovário e cólon do que a goniotalamina (Barcelos et al., 2012). Porém, em células de câncer de pâncreas, os nossos dados não demonstraram nenhum efeito citotóxico deste composto (**10**) até a concentração de 100 μ M.

Em um segundo momento houve interesse em substituir o “O” do esqueleto lactônico por um “NH”, o que caracteriza um anel lactâmico. Na literatura existe relato dessa substituição estar relacionada, principalmente, com melhora na biodisponibilidade do composto em meio biológico, em decorrência de uma maior estabilização de hidrólise no anel, e consequente melhora significativa da atividade biológica (Mulzer et al., 2008).

Na molécula de goniotalamina a introdução do anel lactâmico (a partir de agora chamado de azagoniotalamina (**13**)) reduziu significativamente a atividade antiproliferativa observada para a goniotalamina em 24 h, não apresentando qualquer atividade citotóxica contra Panc-1 até a concentração de 100 μ M (Figura 5). Neste caso, os resultados demonstram a importância da

presença da unidade estrutural farmacofórica δ -lactona α,β -insaturada em detrimento da δ -lactama α,β -insaturada. Como relatado por Barcelos (2013), a substituição do átomo de oxigênio por um nitrogênio provavelmente aumentou a densidade eletrônica da carbonila devido à ressonância com o par eletrônico do átomo de nitrogênio. Dessa forma, o carbono β da lactama α,β -insaturada apresentou menor deficiência em elétrons e foi menos suscetível ao ataque nucleofílico em uma adição de Michael, influenciando dessa forma o perfil biológico desse análogo.

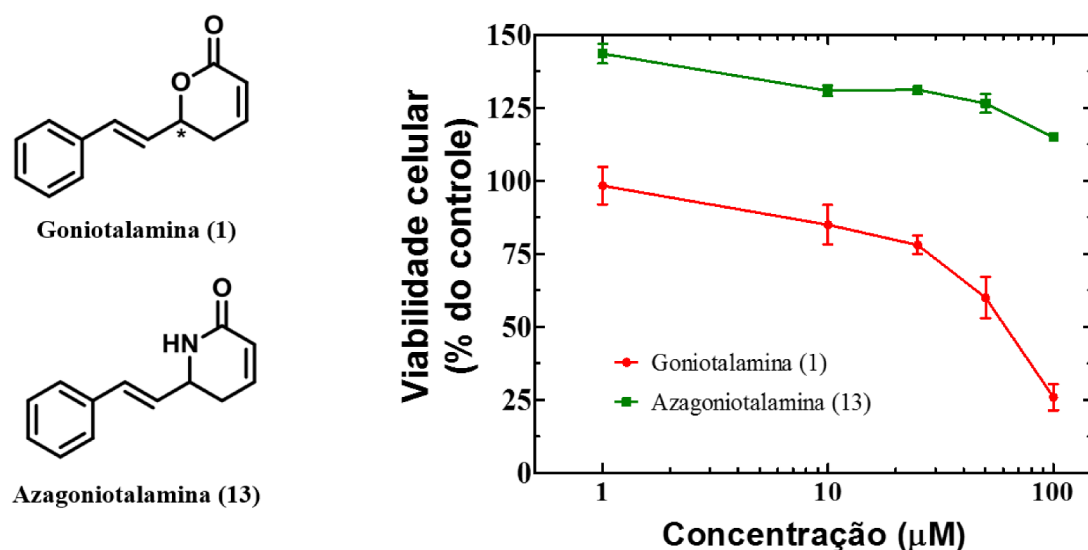


Figura 5. Estrutura química dos aza-análogos da goniotalamina e a curva de viabilidade celular de Panc-1 após 24 h de tratamento.

Da mesma forma, que para a goniotalamina (1), foram sintetizados análogos da azagoniotalamina (13) contendo grupo trifluorometil e metoxil no seu anel aromático (14-21). Conforme observado na figura 6, essas alterações estruturais não surtiram efeito positivo na atividade biológica da azagoniotalamina (13) (Figura 6). O menor efeito biológico dos análogos de azagoniotalamina (13), também já foi descrito para outras células tumorais (Barcelos et al., 2012).

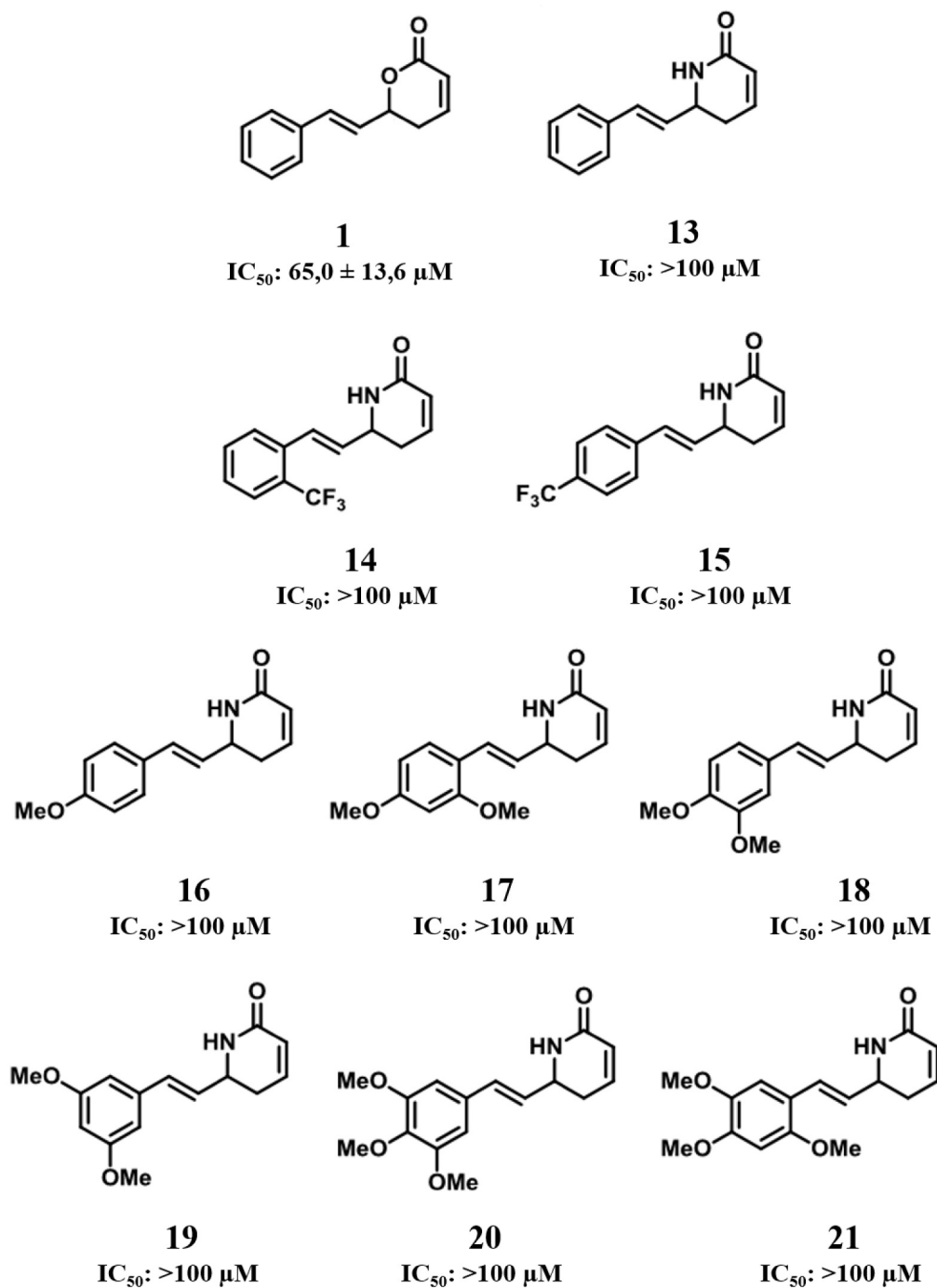
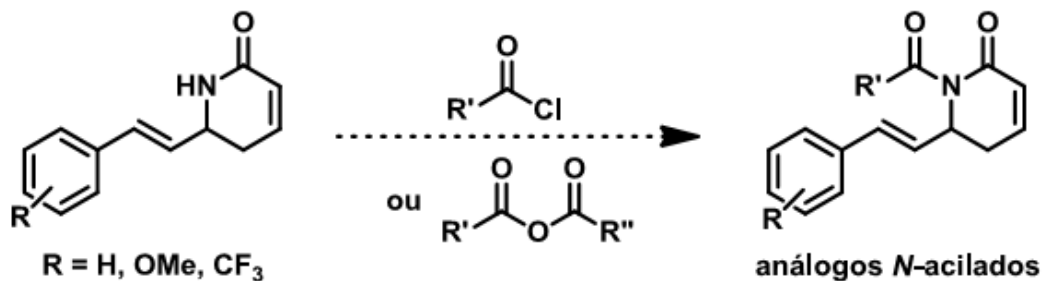


Figura 6. Estrutura química dos análogos de azagoniotalamina (**13**) e a concentração que reduziu a viabilidade celular de Panc-1 em 50% após 24 h de tratamento.

A fim de confirmar que a perda da atividade biológica observada para a azagoniotalamina (**13**) e seus análogos (**14-21**) era decorrente da menor deficiência eletrônica do sistema α,β -

insaturado, foram sintetizados análogos de azagoniotalamina *N*-acilados no átomo de nitrogênio do anel lactâmico (Esquema 2).



Esquema 2. Síntese dos derivados *N*-acilados da azagoniotalamina (adaptado de Barcelos, 2013)

A síntese desses análogos *N*-acilados (**22-29**) foi bastante interessante e melhorou significativamente a atividade citotóxica contra Panc-1, não somente com relação a azagoniotalamina (**13**), mas também se comparados a goniotalamina (**1**) (Figura 7). O análogo **25**, que apresenta um grupo crotonoíla, demonstrou ser o mais ativo, no entanto, a metoxilação do anel aromático dessa molécula (**30-37**) não resultou em melhora significativa da atividade biológica, como observado na figura 7.

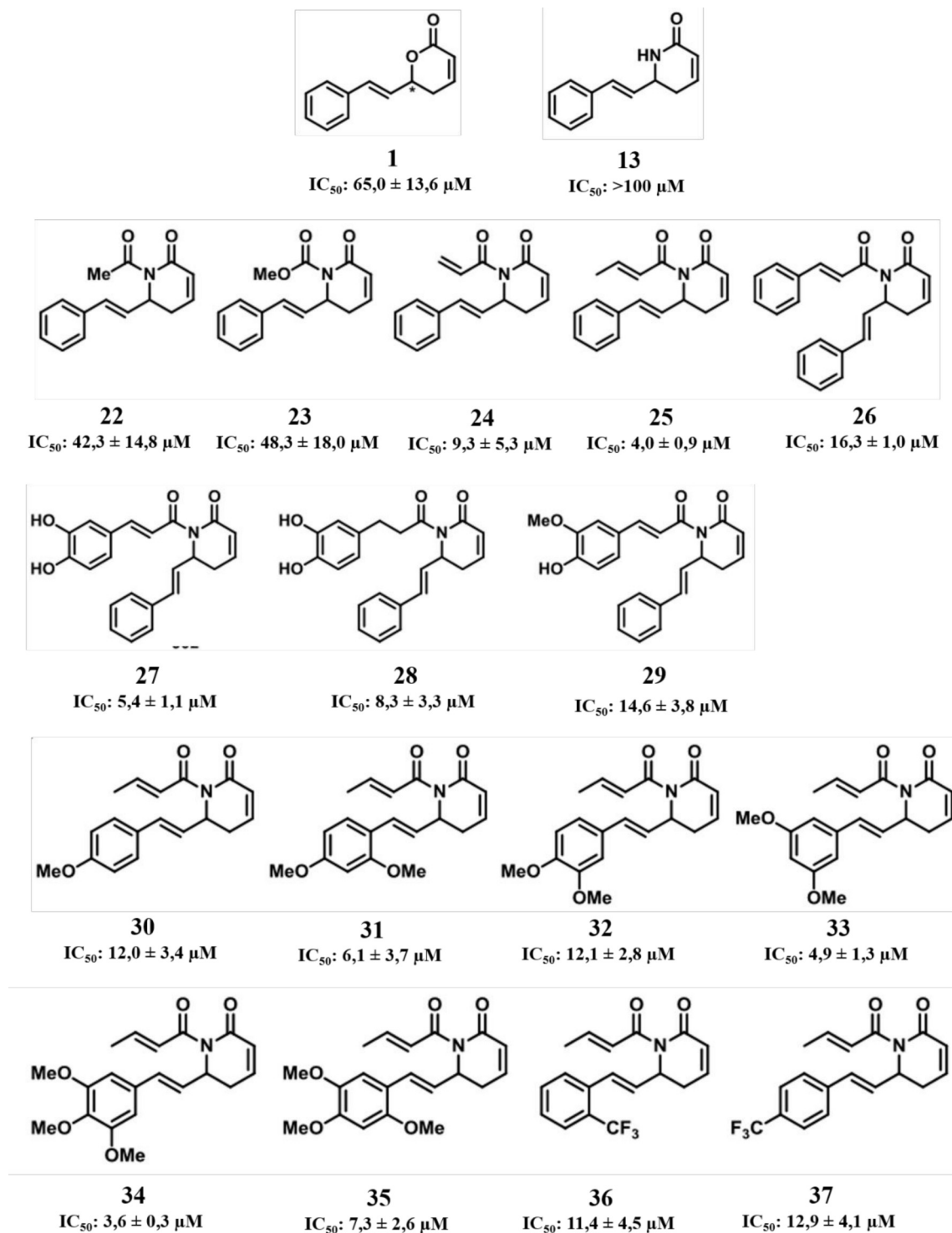
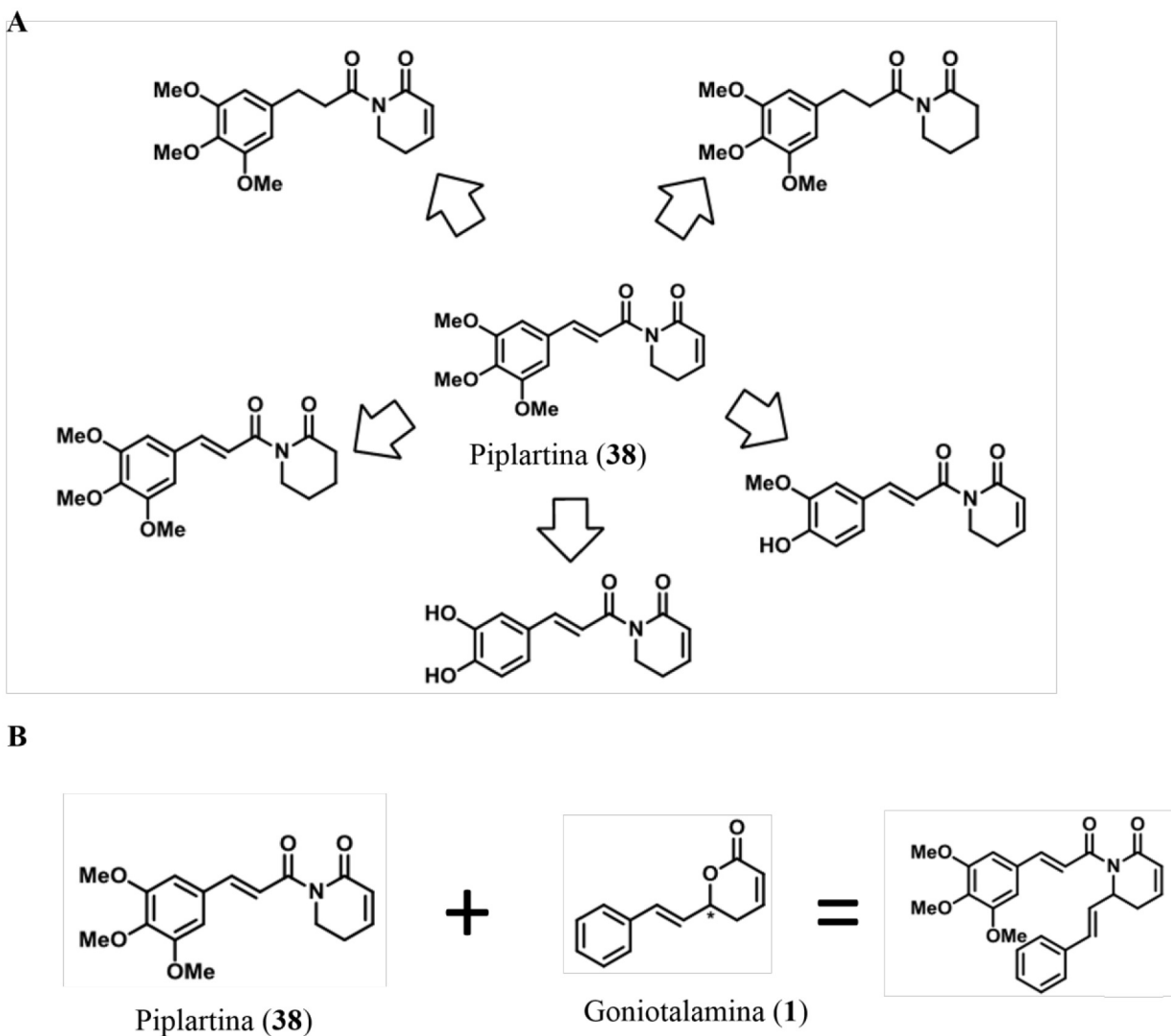


Figura 7. Estrutura química dos análogos de azagoniotalamina *N*-acilados e a concentração que reduziu a viabilidade celular de Panc-1 em 50% após 24 h de tratamento.

Conforme descrito por Barcelos (2013), a síntese dos análogos **22** e **23** teve como objetivo avaliar a importância do núcleo aceptor de Michael para a atividade citotóxica, uma vez que a acilação do nitrogênio com o grupo acetila ou na forma de um carbamato diminui a ressonância do par de elétrons do nitrogênio com a carbonila do anel lactâmico. Dessa forma, esse par eletrônico está agora também comprometido na ressonância com a carbonila oriunda da acilação. Consequentemente, o sistema α,β -insaturado tornou-se mais deficiente em elétrons, podendo atuar como um melhor aceptor de Michael em sistemas biológicos. Somado a isso, a síntese dos análogos **24-29** resultou em compostos ainda mais potentes, e isso se deve ao fato de um segundo núcleo aceptor de Michael presente nas moléculas. Por outro lado, a adição de substituintes no anel aromático (**30-37**) não indicou nenhum efeito, revelando aqui novamente a importância do núcleo aceptor de Michael no efeito biológico.

4.2. Redução da viabilidade celular de Panc-1 após o tratamento com piplartina e seus derivados

Como já abordado na introdução deste capítulo, a literatura relata uma interessante atividade biológica da piplartina (**38**), uma lactama α,β -insaturada *N*-acilada, que foi importante para definir a síntese dos análogos de azagoniotalamina *N*-acilados. Em função de sua estrutura, contendo uma porção idêntica aos compostos *N*-acilados propostos, o grupo do prof Pilli sintetizou uma série de análogos da piplartina, bem como a síntese de uma molécula híbrida entre piplartina e goniotalamina (Esquema 3), a fim de fornecer novos compostos mais potentes contra o câncer de pâncreas.



Esquema 3. Síntese dos derivados de piplartina (A) e um híbrido goniotalamina-piplartina (B) (adaptado de Barcelos, 2013)

A atividade da piplartina (**38**) já foi avaliada contra células de câncer de pâncreas apresentando um IC_{50} de $\sim 5 \mu M$ (Raj et al., 2011). No presente estudo também confirmamos a potencial atividade anti-câncer de pâncreas da piplartina, sendo o valor de IC_{50} estimado em $3,2 \pm 0,3 \mu M$. As alterações estruturais propostas para a piplartina, pelo grupo do prof Pilli, tais como hidrogenação da dupla exocíclica (estrutura **39**) e/ou endocíclica (estrutura **41**), foram recentemente também propostas por Adams e colaboradores (2012). Da mesma forma, os nossos

resultados corroboram o proposto por Adams et al., que permitiram identificar o grupo farmacofórico da molécula piplartina para linhagens celulares tumorais de adenocarcinoma cervical e endometrial, osteosarcoma e pulmão. Conforme observado na figura 8, a hidrogenação da dupla exocíclica (estrutura **39**) da piplartina resultou em uma perda de 6 vezes da atividade contra Panc-1, enquanto a hidrogenação da dupla endocíclica (estrutura **41**) resultou em uma perda de 18 vezes. Dessa forma, as ligações duplas demonstraram ser essenciais para a atividade biológica da piplartina, já que o IC₅₀ da tetra-hidropiplartina (estrutura **40**), molécula ausente de duplas ligações, foi superior a 100 µM. Com isso, a ligação dupla *endo* (estrutura **41**) é mais importante para o efeito citotóxico contra Panc-1 do que a presença da dupla *exo* (estrutura **39**). Com relação aos derivados fenólicos da piplartina, observou-se que o composto **42**, com duas hidroxilas levou a uma perda na atividade de 2 vezes em relação a piplartina, por outro lado, a molécula com uma hidroxila e uma metoxila (estrutura **43**) exibiu atividade similar à piplartina, com valor de IC₅₀ igual a 3,1 µM (Figura 8).

Como citado anteriormente, foi sintetizada uma molécula híbrida de goniotalamina e piplartina, que apresentou um excelente efeito, reduzindo a viabilidade celular em 50% em uma concentração de $2,7 \pm 0,5$ µM. Por conta disso, decidimos investigar os mecanismos moleculares pelos quais esse híbrido reduziu a viabilidade celular de Panc-1.

É importante mencionar que os ácidos trimetoxicinâmico (**45**), ferúlico (**46**) e cafeíco (**47**) também foram avaliados e como observado na figura 8, apresentaram valores de IC₅₀ superiores a 100 µM, indicando que a atividade biológica observada para os análogos de azagoniotalamina *N*-acilados e o híbrido goniotalamina-piplartina está de fato associado com o anel lactâmico α,β -insaturado *N*-acilado.

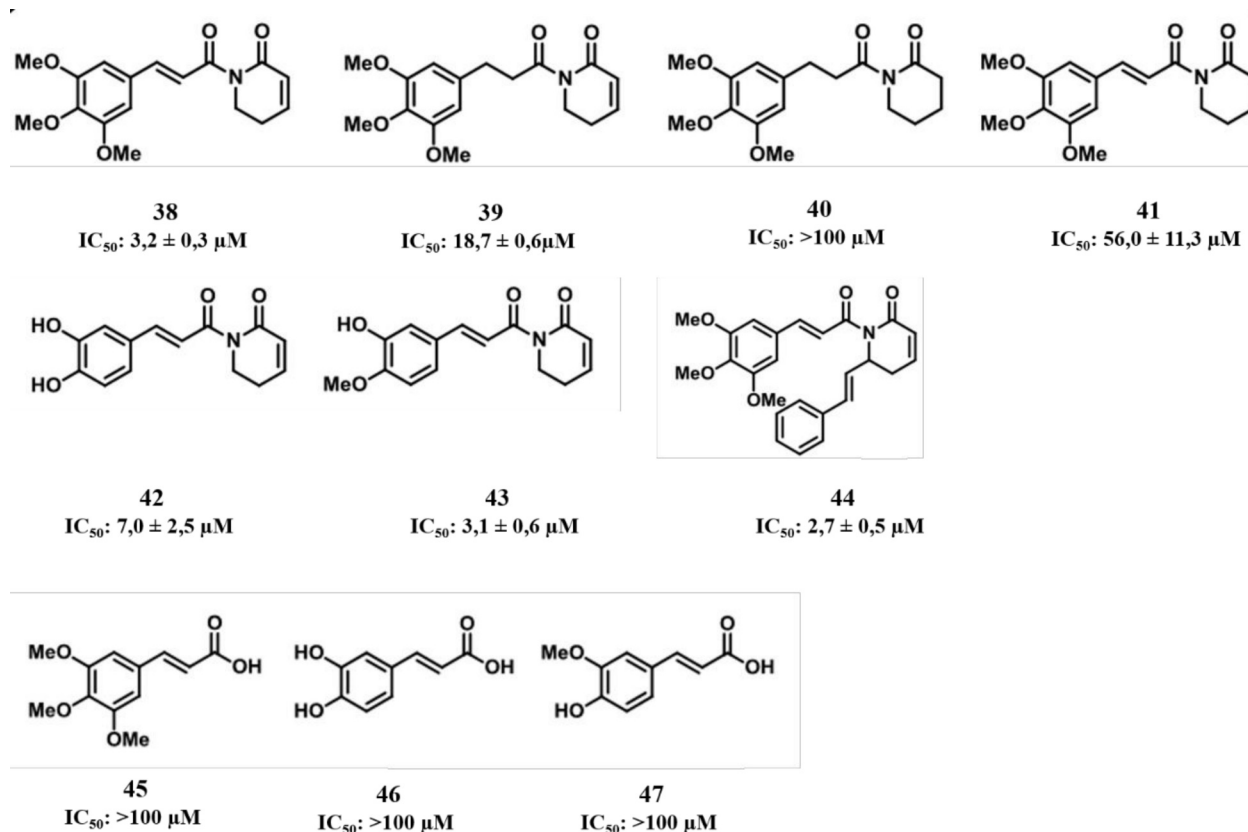


Figura 8. Estrutura química da piplartina (38) seus derivados e do híbrido goniotalamina-piplartina (44), e a concentração que reduziu a viabilidade celular de Panc-1 em 50% após 24 h de tratamento.

Diante desse quadro de compostos sintetizados, decidimos escolher algumas moléculas que poderiam nos fornecer informações sobre seu papel biológico, principalmente com relação ao mecanismo pelo qual esses compostos induzem morte das células de câncer de pâncreas. Dentre os diferentes grupos de compostos, derivados de goniotalamina (1) e derivados de piplartina (38), escolhemos o análogo 25 e a molécula híbrida entre goniotalamina e piplartina (estrutura 44), que se destacaram em relação ao efeito da goniotalamina contra Panc-1. Neste sentido, a fim de comparar o efeito desencadeado pelos derivados decidimos utilizar goniotalamina e piplartina como compostos de referência.

4.3. Efeito dos compostos 25 e 44 na formação de colônia

O ensaio de formação de colônia é baseado no princípio de que certos estímulos causam bloqueio do ciclo celular ou morte celular, resultando numa redução no número de colônias. Para este ensaio foram escolhidas concentrações inferiores as citotóxicas em 24 h, a fim de determinar a viabilidade e proliferação celular ao longo do tempo. A exposição de Panc-1 a goniotalamina (**1**), piplartina (**38**) e derivados (**25** e **44**) por 15 dias foi suficiente para causar uma redução expressiva no número colônias nas concentrações mais altas (Fig. 9). É importante mencionar que o tamanho das colônias é menor nas concentrações mais baixas, comparando-se ao tamanho das colônias do controle. Isso revela o efeito desses compostos não só na sobrevivência, mas também na proliferação celular. Além disso, a piplartina foi a mais potente, já que na concentração de 0,3 μ M os tamanhos das colônias foram bem menores.

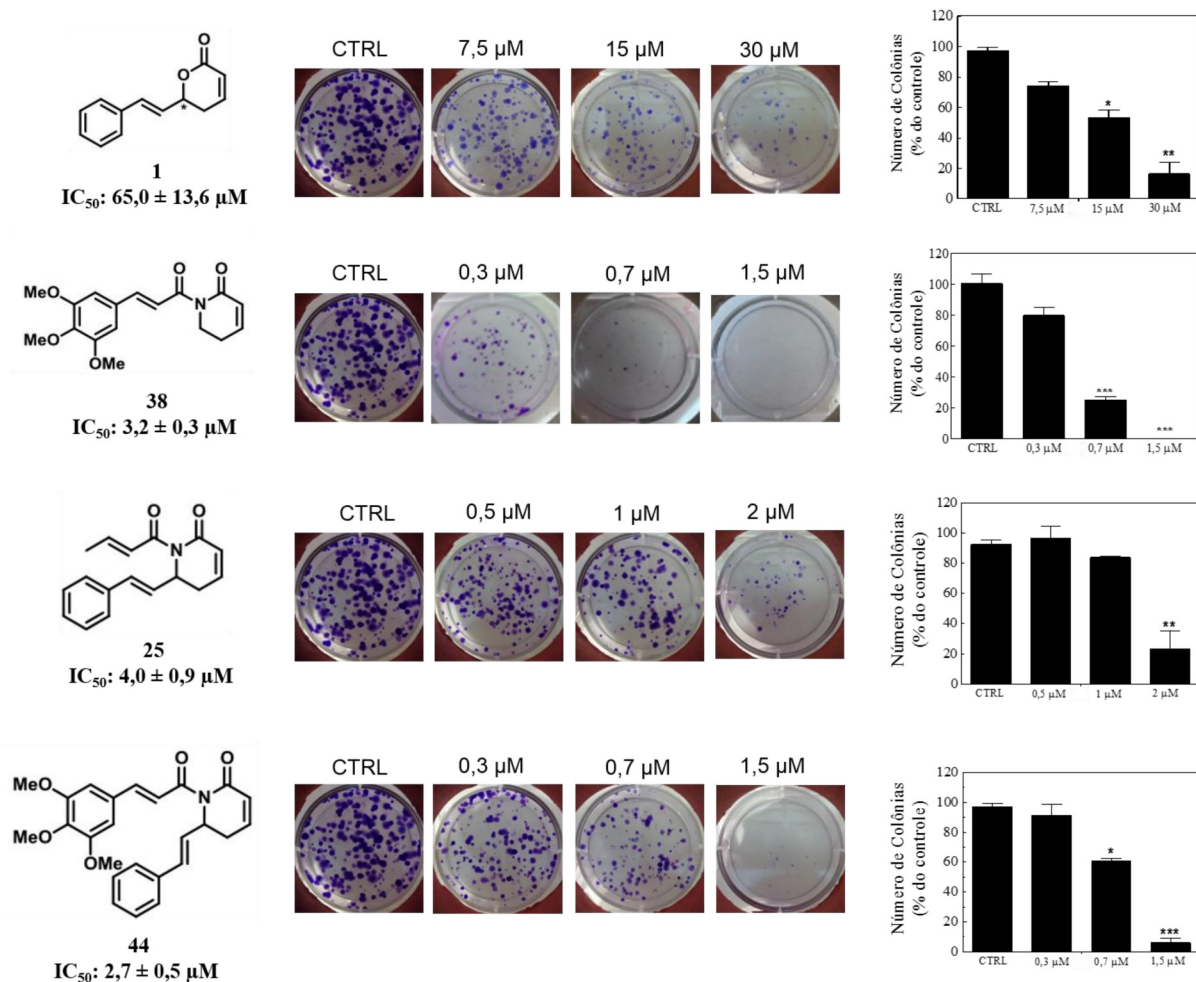


Figura 9. Ensaio de formação de colônia de células Panc-1 tratadas com Goniotalamina (1), Piplartina (38) e derivados 25 e 44. Células Panc-1 foram tratadas durante 15 dias. O número de colônias foi determinado por contagem após coloração com cristal violeta. Os valores foram expressos em porcentagens de número de colônias em relação ao controle (100%). Resultados representam média $\pm$ erro padrão da média de 3 experimentos independentes realizados em duplicata.

4.4. Mecanismo molecular dos derivados 25 e 44 da goniotalamina e piplartina em células Panc-1

Devido à ação inibidora sobre a proliferação e sobrevivência das células Panc-1 um importante mediador desses processos, o receptor tirosina quinase AXL, foi investigado. Como

observado na figura 10, os derivados **25** e **44** foram capazes de reduzir significativamente a expressão de AXL, bem como a goniotalamina (**1**) e piplartina (**38**).

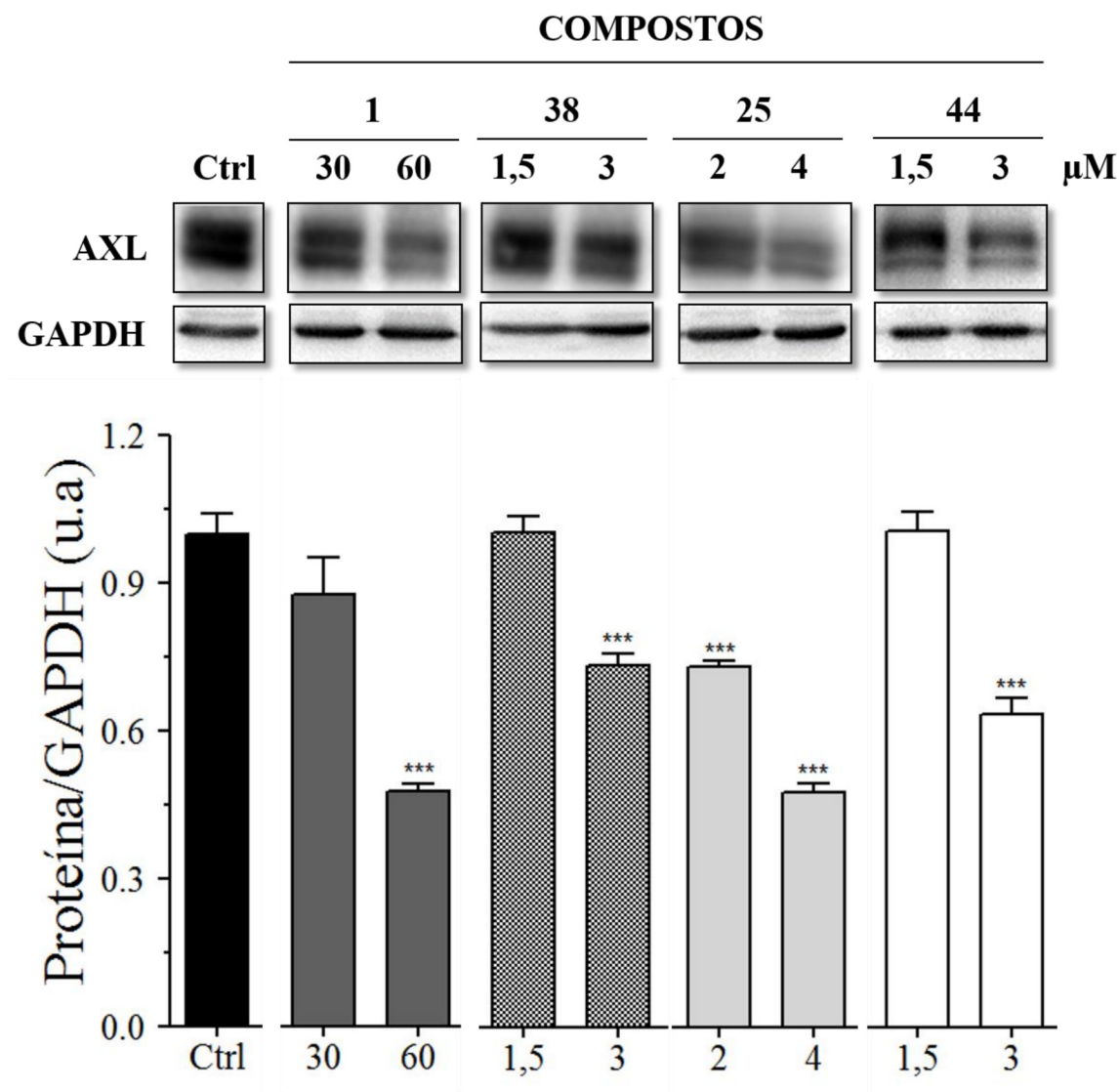


Figura 10. Modulação da expressão do receptor tirosina quinase AXL em células Panc-1 tratadas com os compostos Goniotalamina (1), Piplartina (38) e derivados 25 e 44. As células foram tratadas por 24h com os compostos nas concentrações indicadas. A expressão AXL foi determinada por *Western blotting*. A proteína GAPDH foi utilizada como controle interno. Análise densitométrica dos blottings. A intensidade apresentada é relativa ao controle interno e expressa como unidades arbitrárias (u.a.) (n = 3 experimentos independentes, P < 0,05). Valores são média ± EPM. ***p<0,001 diferença significativa vs controle. ANOVA seguido por teste de Tukey.

O receptor AXL está altamente expresso no câncer de pâncreas, e representa um importante alvo na busca por novos quimioterápicos. Vias de sinalização *downstream* à AXL contribuem para uma variedade de mecanismos oncogênicos, incluindo a sobrevivência e proliferação celular, migração e invasão, angiogênese, quimioresistência e metástase. O potencial oncogênico de AXL é atribuído, principalmente a ativação do domínio tirosina quinase que desencadeia uma série de vias de sinalização anti-apoptótica e proliferativa (Sainaghi et al., 2005; Sawabu et al., 2007). Mais especificamente, a ativação de AXL resulta na fosforilação de AKT e ERK (Lee et al., 2002; Hong et al., 2008; Eisenman et al., 2010) e na inibição de proteínas pró-apoptóticas, por exemplo BAX (Lee et al., 2002; Hong et al., 2008). Estudos indicam que a inibição de AKT e ERK requer inibição concomitante de AXL e de outros receptores tipo tirosina quinases como, por exemplo, membros da família EGFR (Liu et al., 2009; Qi et al., 2009).

Neste sentido, investigamos se a redução nos níveis de AXL pelos compostos foi suficiente para modular a atividade de ERK. Como observado na figura 11, goniotalamina, pipartina e os outros dois derivados inibiram significativamente a atividade de ERK, levando-se em consideração a razão entre a fosforilação no sítio de ativação de ERK (Thr202/Tyr 204) e a ERK total.

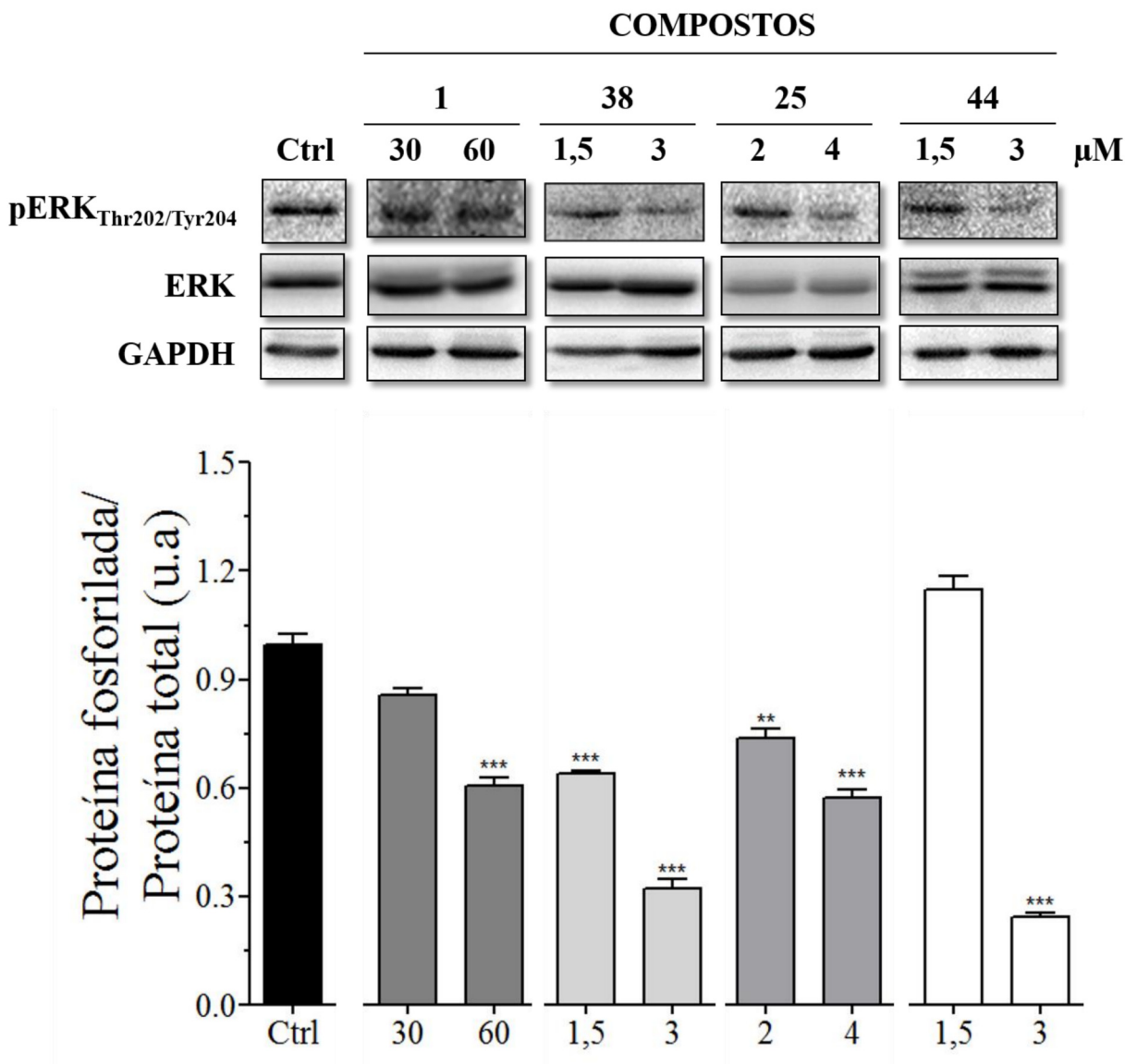


Figura 11. Modulação da atividade de ERK em células Panc-1 tratadas com os compostos Goniotalamina (1), Piplartina (38) e derivados 25 e 44. A expressão e atividade de ERK foi determinada por *Western blotting*. A proteína GAPDH foi utilizada como controle interno. Análise densitométrica dos blottings. A intensidade apresentada é relativa ao controle interno e expressa como unidades arbitrárias (u.a.) (n = 3 experimentos independentes, P < 0,05). Valores são média ± EPM. ***p<0,001 diferença significativa vs controle. ANOVA seguido por teste de Tukey.

Muitos estudos associam o potencial oncogênico da ativação de ERK com o aumento da sobrevivência celular, principalmente através da promoção da atividade de proteínas anti-

apoptóticos, tais como Bcl-2, Bcl-XL, Mcl-1, IAP, e reprimindo proteínas pro-apoptóticas, como BAX e Bim (Balmanno e Cook, 2009). A expressão de BAX é reduzida em cerca de 50% no câncer de pâncreas (Evans et al., 2001; Magistrelli et al., 2006). Uma vez que nossos resultados indicaram até o momento, *downregulation* de AXL e ERK por esses compostos, decidimos investigar se goniotalamina (**1**), piplartina (**38**) e derivados (**25** e **44**) seriam capazes de modular a expressão da proteína pró-apoptótica BAX. Conforme observada na figura 12, houve um aumento significativo na expressão de BAX após o tratamento com goniotalamina (**1**), piplartina (**38**) e o derivado **25**, enquanto que o derivado **44** aumentou discretamente os níveis de BAX. O desequilíbrio entre os níveis de proteínas pró-apoptóticas e anti-apoptóticas conduz à ativação de apoptose através da perturbação da integridade da membrana mitocondrial externa (Adams e Cory, 2007). Essa indução dispara a liberação de proteínas apoptóticas no citoplasma, que por sua vez, podem participar da ativação de caspases que levarão a apoptose. Como observamos um aumento significativo de BAX, decidimos investigar se isso era suficiente para disparar apoptose.

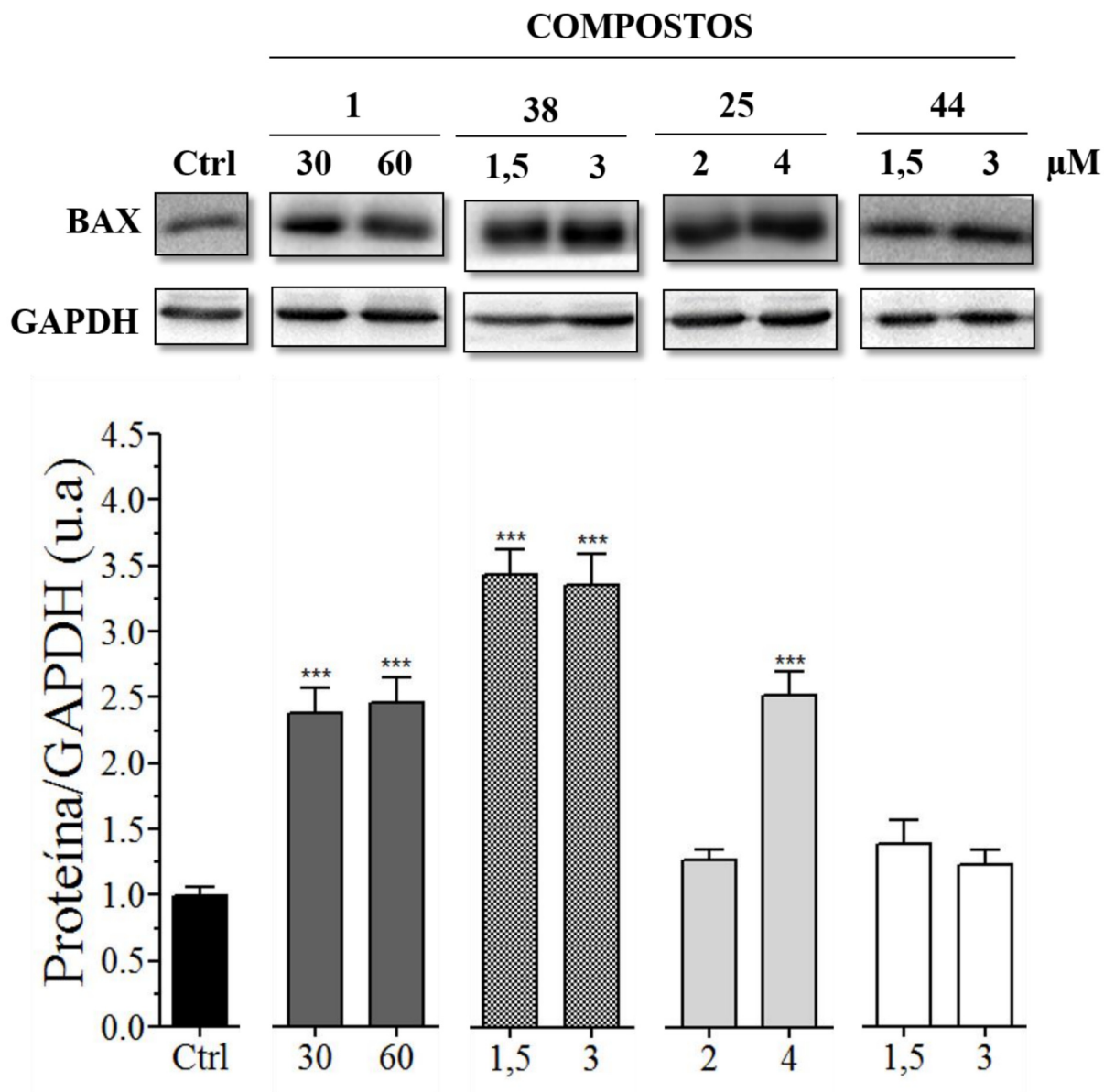


Figura 12. Modulação da expressão da proteína pró-apoptótica BAX em células Panc-1 tratadas com os compostos Goniotalamina (1), Piplartina (38) e derivados 25 e 44. A expressão BAX foi determinada por *Western blotting*. A proteína GAPDH foi utilizada como controle interno. Análise densitométrica dos blottings. A intensidade apresentada é relativa ao controle interno e expressa como unidades arbitrárias (u.a.) (n = 3 experimentos independentes, P < 0,05). Valores são média ± EPM. ***p<0,001 diferença significativa vs controle. ANOVA seguido por teste de Tukey.

A Poli (ADP-Ribose) Polimerase, ou PARP, é uma enzima que reconhece quebras no DNA e desempenha um importante papel no processo de reparo do DNA (Fernandes-Alnemri et al., 1994). Uma vez que determinada célula dispara apoptose, uma série de caspases cliva PARP, impossibilitando, dessa forma, que sua função reparadora ocorra, consequentemente o DNA sofre fragmentação. Sendo assim, analisando os níveis de PARP clivada podemos inferir sobre o fato da apoptose estar induzida ou não. Tanto os compostos de referência goniotalamina (**1**) e piplartina (**38**), como os dois derivados estudados (**25** e **44**) foram capazes de induzir clivagem de PARP (Figura 13), confirmando a nossa hipótese de que a apoptose foi induzida após o tratamento com estes compostos. Este fato ainda sugere, que apesar do derivado **44** não ter aumentado significativamente a expressão da proteína BAX, outros moduladores da resposta apoptótica poderiam estar envolvidos com a ativação de PARP por essa molécula.

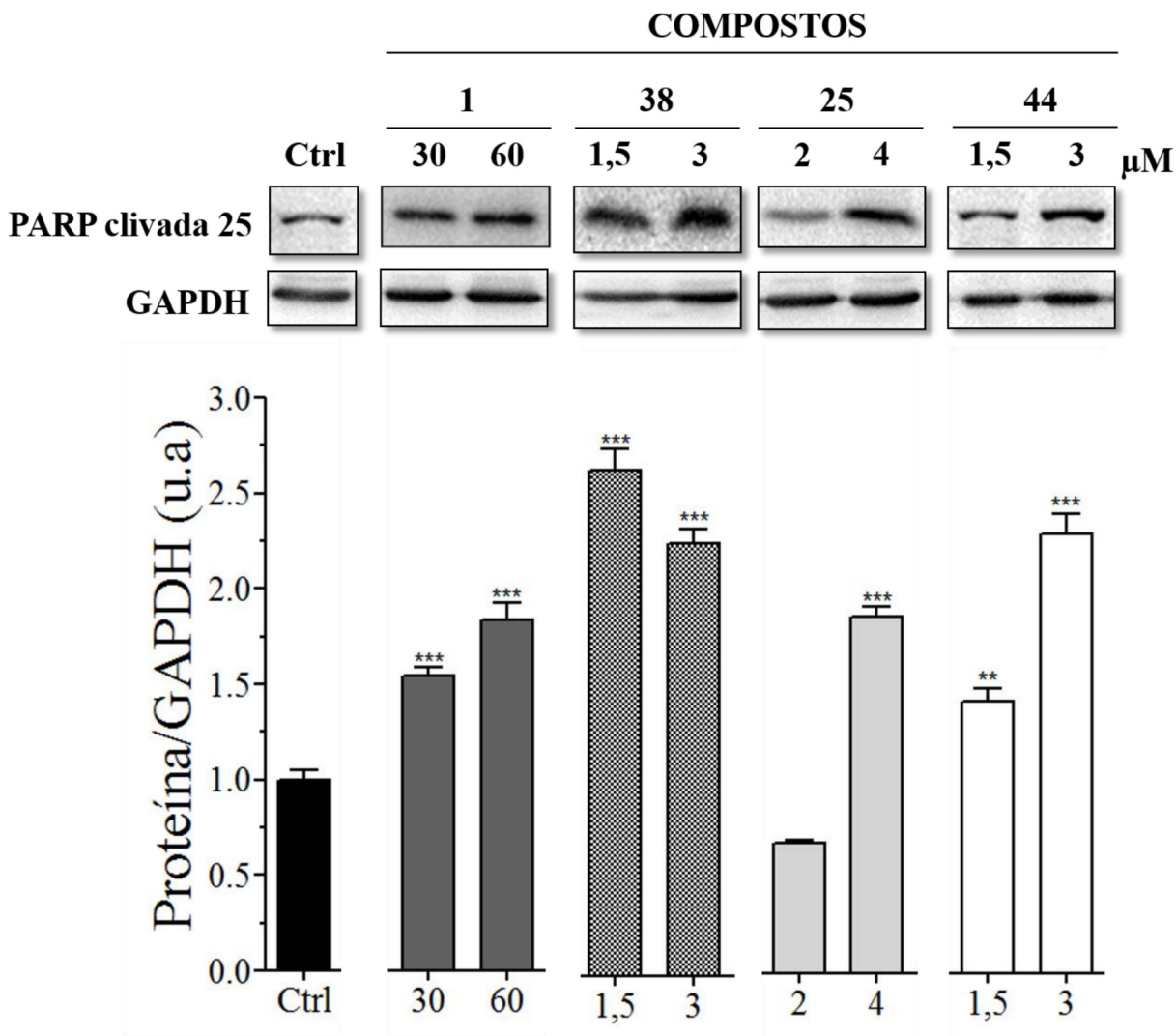


Figura 13. Modulação dos níveis de PARP clivada em células Panc-1 tratadas com os compostos Goniotalamina (1), Piplartina (38) e derivados 25 e 44. Os níveis de PARP clivada foi determinada por *Western blotting*. A proteína GAPDH foi utilizada como controle interno. Análise densitométrica dos blottings. A intensidade apresentada é relativa ao controle interno e expressa como unidades arbitrárias (u.a.) (n = 3 experimentos independentes, P < 0,05). Valores são média ± EPM. ***p<0,001 diferença significativa vs controle. ANOVA seguido por teste de Tukey.

A indução de apoptose por goniotalamina já foi relatada para uma variedade de células tumorais, como câncer renal e de pulmão, no entanto, levando-se em consideração a resistência que células de câncer de pâncreas apresentam à indução de apoptose, ficamos bastante

interessados em investigar se o efeito sobre a viabilidade celular de Panc-1, seria uma consequência da indução de apoptose. Conforme observado todos os nossos dados em conjunto apontam que de fato goniotalamina também foi capaz de induzir apoptose em células resistentes a esse mecanismo de morte, como é a Panc-1. Isso revela o potencial de goniotalamina, e coloca esse composto como uma interessante molécula para um estudo de terapia combinada.

Em adição, a piplartina também já foi descrita por induzir apoptose em uma série de linhagens tumorais, principalmente pela modulação negativa de BCL2 (proteína anti-apoptótica) e aumento expressivo de p53 (Raj et al., 2011). Sendo assim, nós não descartamos a possibilidade do híbrido 44 ter modulado negativamente a expressão de BCL2, uma vez que o aumento de BAX foi discreto. Porém estudos adicionais devem ser realizados a fim de investigar o mecanismo pelo qual esse composto induz apoptose. Por outro lado, o derivado *N*-acilado de azagoniotalamina (**25**) foi capaz de mediar a modulação positiva para indução de apoptose aparentemente pelos mesmos mecanismos que goniotalamina e piplartina. Adicionalmente, a desregulação da maquinária apoptótica e evasão de apoptose é um mecanismo de resistência bem caracterizado no câncer de pâncreas (Hamacher et al., 2007). Dessa forma, a identificação de novas moléculas que promovam a apoptose nessas células deve ser estimulada.

5. Conclusões

A investigação do efeito sobre a viabilidade celular da goniotalamina, piplartina e análogos sintetizados, demonstra que a atividade biológica da goniotalamina está de fato associada com seu anel lactônico, uma vez que a substituição desse anel por uma lactâma resultou em perda total da atividade. Além disso, apenas a adição de uma hidroxila na posição meta do anel aromático da goniotalamina resultou em melhora na atividade citotóxica contra Panc-1. Adicionalmente, a N-acilação do análogo azagoniotalamina indicou uma recuperação do potencial eletrofílico da dupla ligação *endo* do anel lactâmico, sendo que a adição de substituintes com mais uma dupla proporcionou um segundo núcleo de reação, aumentando significativamente a atividade citotóxica. A piplartina junto com a molécula híbrida (**44**) apresentaram uma potencial atividade citotóxica contra Panc-1. A investigação com os análogos de piplartina confirmam os dados da literatura, no qual indicam os grupos farmacofóricos da piplartina.

Tanto goniotalamina, piplartina como os análogos **25** e **44** reduziram significativamente os níveis do receptor tirosina-quinase (AXL) sabidamente superexpresso no câncer de pâncreas. Proteínas *downstream* a AXL foram também moduladas, os compostos foram capazes de reduzir a atividade de ERK. Além disso, a modulação de importantes marcadores apoptóticos revela participação da apoptose no mecanismo de morte induzido pelos compostos.

6. Referências bibliográficas

- Adams DJ, Dai M, Pellegrino G, Wagner BK, Sterna AM, Shamji AF, Schreiber SL. (2012). Synthesis, cellular evaluation, and mechanism of action of piperlongumine analogs. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 109 (38): 15115–15120.
- Adams JM, Cory S. (2007). Bcl-2-regulated apoptosis: mechanism and therapeutic potential. *Current Opinion Immunology*, 19: 488-496.
- Al-Qubaisi M, Rozita R, Yeap S-K, Omar A-R, Ali A-M, Alitheen NB. (2011). Selective Cytotoxicity of Goniotalamin against Hepatoblastoma HepG2 Cells. *Molecules*, 16: 2944-2959.
- Balmano K, Cook SJ. (2009). Tumour cell survival signalling by the ERK1 / 2 pathway. *Cell Death Differentiation*, 16: 368–377.
- Barcelos RC, Pastre JC, Caixeta V, Vendramini-Costa D, de Carvalho JE, Pilli RA. (2012). Synthesis of methoxylated goniotalamin, aza-goniotalamin and γ -pyrones and their in vitro evaluation against human cancer cells. *Bioorganic & Medicinal Chemistry*, 20(11): 3635-3651.
- Barcelos, RC. (2013). Síntese e avaliação da atividade antiproliferativa de análogos da goniotalamina, azagoniotalamina e piplartina. Tese de doutorado. UNICAMP.
- Bezerra DP, Castro FO, Alves APNN, Pessoa C, Moraes MO, Silveira ER, Lima MAS, Elmiro FJM, Costa-Lotufo LV. (2006). In vivo growth-inhibition of Sarcoma 180 by piplartine and piperine, two alkaloid amides from Piper. *Brazilian Journal of Medical and Biological Research*, 39(6): 801-807.
- Bezerra DP, Militão GCG, de Castro FO, Pessoa C, de Moraes MO, Silveira ER, Lima MAS, Elmiro FJM, Costa Lotufo LV. (2007). Piplartine induces inhibition of leukemia cell

- proliferation triggering both apoptosis and necrosis pathways. *Toxicology in Vitro*, 21(1): 1–8.
- Bezerra DP, Pessoa C, de Moraes MO, Saker-Neto N, Silveira ER, Costa-Lotufo, LV. (2013). Overview of the therapeutic potential of piplartine (piperlongumine). *European Journal of Pharmaceutical Sciences*, 48: 453-463.
- Bialy L, Waldmann H. (2003). Synthesis and biological evaluation of cytostatin analogues. *Chemistry Communication*, 15: 1872-1873.
- Cavaleiro AJ, Yoshida M. (2000). 6-[omega-arylalkenyl]-5,6-dihydro-alpha-pyrones from *Cryptocarya moschata* (Lauraceae). *Phytochemistry*. 53(7): 811-819.
- Chiu CC, Liu PL, Huang KJ, Wang HM, Chang KF, Chou CK, Chang FR, Chong IW, Fang K, Chen JS, Chang HW, Wu YC. (2011). Goniiothalamine inhibits growth of human lung cancer cells through DNA damage, apoptosis, and reduced migration ability. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 59(8): 4288-4293.
- Cragg GM, Newman DJ. (2009). Nature: a vital source of leads for anticancer drug development. *Phytochemistry Reviews*. 8: 313–331.
- de Fátima A, Kohn LK, Antônio MA, de Carvalho JE, Pilli RA. (2005) (R)- Goniiothalamine: Total syntheses and cytotoxic activity against cancer cell lines. *Bioorganic & Medicinal Chemistry*, 13, 2927-2933.
- de Fátima A, Kohn LK, Carvalho JE, Pilli RA. (2006b) Cytotoxic activity of (S)-goniiothalamine and analogues against human cancer cells. *Bioorganic & Medicinal Chemistry*, 14(3): 622-31.
- de Fátima A, Marquissolo C, de Albuquerque S, Carraro-Abrahão AA, Pilli RA. (2006c). Trypanocidal activity of 5,6-dihydropyran-2-ones against free trypomastigotes forms of *Trypanosoma cruzi*. *European Journal of Medicinal Chemistry*, 41(10): 1210-1213.

- de Fátima A, Modolo LV, Conegero LS, Pilli RA, Ferreira CV, Kohn LK, de Carvalho JE. (2006a). Styryl lactones and their derivatives: biological activities, mechanisms of action and potential leads for drug design. *Current Medicinal Chemistry*, 13(28): 3371-3384.
- de Fátima A, Zambuzzi WF, Modolo LV, Tarsitano CA, Gadelha FR, Hyslop S, de Carvalho JE, Salgado I, Ferreira CV, Pilli RA. (2008). Cytotoxicity of goniothalamine enantiomers in renal cancer cells: involvement of nitric oxide, apoptosis and autophagy. *Chemical Biological Interaction*, 176(2-3): 143-150.
- Diehn M, Cho RW, Lobo NA, Kalisky T, Dorie MJ, Kulp AN, Qian D, Lam JS, Ailles LE, Wong M, Joshua B, Kaplan MJ, Wapnir I, Dirbas F, Somlo G, Garberoglio C, Paz B, Shen J, Lau SK, Quake SR, Brown JM, Weissman IL, Clarke MF. (2009). Association of Reactive Oxygen Species Levels and Radioresistance in Cancer Stem Cells. *Nature*. 458(7239): 780-783.
- Eisenman K, Sather S, McGranahan A, Liang X, Desch A, Cannon C, Martinson H, Keating AK, Graham DK. (2010). Mer receptor tyrosine kinase as a potential novel target in acute myeloid leukemia. *Pediatric Blood & Cancer*, 54(6): 790.
- Evans JD, Cornford PA, Dodson A, Greenhalf W, Foster CS, Neoptolemos JP. (2001). Detailed tissue expression of bcl-2, bax, bak and bcl-x in the normal human pancreas and in chronic pancreatitis, ampullary and pancreatic ductal adenocarcinomas. *Pancreatology*, 1: 254-262.
- Fernandes-Alnemri T, Litwack G, Alnemri ES. (1994). CPP32, a novel human apoptotic protein with homology to *Caenorhabditis elegans* cell death protein Ced-3 and mammalian interleukin-1 β -converting enzyme. *Journal of Biology and Chemistry*, 269: 30761-30764.
- Guo JY, Chen H-Y, Mathew R, Fan J, Strohecker AM, Karsli-Uzunbas Z, Kamphorst JJ, Chen G, Lemons JMS, Karantza V, Collier HA, DiPaola RS, Gelinas C, Rabinowitz JD, White E.

- (2011). Activated Ras requires autophagy to maintain oxidative metabolism and tumorigenesis. *Genes & Development*, 25: 460–470.
- Hamacher R, Schmid RM, Saur D, Schneider G. (2008). Apoptotic pathways in pancreatic ductal adenocarcinoma. *Molecular Cancer*, 7:64
- Hong CC, Lay JD, Huang JS, Cheng AL, Tang JL, Lin MT, Lai GM, Chuang SE. (2008). Receptor tyrosine kinase AXL is induced by chemotherapy drugs and overexpression of AXL confers drug resistance in acute myeloid leukemia. *Cancer Letter*, 268(2): 314–24.
- Inayat-Hussain SH, Annuar BO, Din LB, Ali AM, Ross D. (2003). Loss of mitochondrial transmembrane potential and caspase-9 activation during apoptosis induced by the novel styryl-lactone goniothalamine in HL-60 leukemia cells. *Toxicology In Vitro*, 17: 433-439.
- Inayat-Hussain SH, Chan KM, Rajab NF, Din LB, Chow SC, Kizilors A, Farzaneh F, Williams GT. (2010). Goniothalamine-induced oxidative stress, DNA damage and apoptosis via caspase-2 independent and Bcl-2 independent pathways in Jurkat T-cells. *Toxicology Letter*, 193(1): 108–114.
- Inayat-Hussain SH, Osman AB, Din LB, Ali AM, Snowden RT, MacFarlane M, Cain K. (1999). Caspases-3 and -7 are activated in goniothalamine-induced apoptosis in human Jurkat T-cells. *FEBS Letter*. 456: 379–383.
- Jiao L, Bondy ML, Hassan MM, Chang DZ, Abbruzzese JL, Evans DB, Smolensky MH, Li D. (2007) Glutathione S-transferase gene polymorphisms and risk and survival of pancreatic cancer. *Cancer*, 109(5): 840–848.
- Kabir KE, Khan AR, Mosaddik A. (2003). Goniothalamine a potent mosquito larvicide from *Bryopsis laciniosa* L. *Journal of Applied Entomology*, 127: 112-115.

- Kasaplar P, Yilmazer O, Çag ır A. (2009). 6-Bicycloaryl substituted (S)- and (R)-5,6-dihydro-2H-pyran-2-ones: Asymmetric synthesis, and anti-proliferative properties. *Bioorganic & Medicinal Chemistry*, 17: 311–318
- Khan MR, Komine K, Omoloso AD (1999). Antimicrobial activity of *Gonothalamous grandiflorous*. *Pharmaceutical Biology*, 37: 340-342.
- Kim EJ, Simeone DM. (2011). Advances in Pancreatic Cancer. *Current Opinion Gastroenterology*, 27: 460-466.
- Lee WP, Wen Y, Varnum B, Hung MC. (2002). Akt is required for Axl-Gas6 signaling to protect cells from E1A-mediated apoptosis. *Oncogene*, 21(3): 329–36.
- Liu L, Greger J, Shi H, Liu Y, Greshock J, Annan R, Halsey W, Sathe GM, Martin AM, Gilmer TM. (2009). Novel mechanism of lapatinib resistance in HER2-positive breast tumor cells: activation of AXL. *Cancer Research*, 69(17): 6871–6878.
- Luo J, Solimini NL, Elledge SJ. Principles of Cancer Therapy: Oncogene and Non-oncogene Addiction. *Cell*, 136(5): 823-37.
- Magistrelli P, Coppola R, Tonini G, Vincenzi B, Santini D, Borzomati D, Vecchio F, Valeri S, Castri F, Antinori A, Nuzzo G, Caraglia M, Picciocchi A. (2006). Apoptotic index or a combination of Bax/Bcl-2 expression correlate with survival after resection of pancreatic adenocarcinoma. *Journal of Cell Biochemistry*, 97:98-108.
- Martins CV, de Resende MA, da Silva DL, Magalhães TF, Modolo LV, Pilli RA, de Fátima A. (2009). In vitro studies of anticandidal activity of goniothalamine enantiomers. *Journal of Applied Microbiology*, 107(4):1279-86.
- Mosaddik MA, Haque ME. (2003). Cytotoxicity and antimicrobial activity of goniothalamine isolated from *Bryonopsis laciniosa*. *Phytotherapy Research*, 17(10): 1155–1157.

- Mosmann T (1983). Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: application to proliferation and cytotoxicity assays. *Journal of Immunology Methods*, 16; 65(1-2): 55-63.
- Mulzer J, Altmann K, Höfle G, Müller R, Prantz KCR. (2008). Epothilones – A fascinating family of microtubule stabilizing antitumor agents. *Chimica*, 11, 1336.
- Newman DJ, Cragg GM. (2012). Natural products as sources of new drugs over the 30 years from 1981 to 2010. *Journal of Natural Products*, 75(3): 311-335.
- Nobili S, Lippib D, Witortc E, Donninic M, Bausic L, Minia E, Capaccioli S. (2009). Natural compounds for cancer treatment and prevention. *Pharmacological Research*, 59: 365–378.
- Pihie AH, Stanslas J, Din LB. (1998). Non-steroid receptor mediated antiproliferative activity of styrylpyrone derivative (SPD) in human breast cancer cell lines. *Anticancer Research*, 18: 1739-1744.
- Qi W, Cooke LS, Stejskal A, Riley C, Croce KD, Saldanha JW, Bears D, Mahadevan D. (2009). MP470, a novel receptor tyrosine kinase inhibitor, in combination with Erlotinib inhibits the HER family/PI3K/Akt pathway and tumor growth in prostate cancer. *BMC Cancer*. 9: 142.
- Raj L, Ide T, Gurkar AU, Foley M, Schenone M, Li X, Tolliday NJ, Golub TR, Carr SA, Shamji AF, Stern AM, Mandinova A, Schreiber SL, Lee SW. (2011). Selective killing of cancer cells by a small molecule targeting the stress response to ROS. *Nature*, 475: 231.
- Rajab NF, Hamid AZ, Hassan H, Ali AM, Din LB, Iayat-Hussain. (2005). Evaluation of the cytotoxic and genotoxic effects of goniiothalamine in leukemic cell lines. *Environmental Mutagen Research*, 27(3): 161-164.
- Ravindran J, Prasad S, Aggarwal BB. (2009). Curcumin and cancer cells: how many ways can curry kill tumor cells selectively? *American Association of Pharmaceutical Scientists*, 11: 495–510.

- Sainaghi PP, Castello L, Bergamasco L, Galletti M, Bellosta P, Avanzi GC. (2005). Gas6 induces proliferation in prostate carcinoma cell lines expressing the Axl receptor. *Journal of Cell Physiology*, 204(1): 36–44.
- Sawabu T, Seno H, Kawashima T, Fukuda A, Uenoyama Y, Kawada M, Kanda N, Sekikawa A, Fukui H, Yanagita M, Yoshiyoshi H, Satoh S, Sakai Y, Nakano T, Chiba T. (2007). Growth arrest-specific gene 6 and Axl signaling enhances gastric cancer cell survival via Akt pathway. *Molecular Carcinogenesis*, 46(2): 155–64.
- Schumacker PT. (2006). Reactive oxygen species in cancer cells: live by the sword, die by the sword. *Cancer Cell*, 10(3): 175-176.
- Senthil-Nathana S, Choi M-Y, Paika C-H, Kalaivani K. (2008). The toxicity and physiological effect of goniothalamin, a styryl-pyrone, on the generalist herbivore. *Chemosphere*, 72: 1393–1400.
- Srivastava V, Negi AS, Kumar JK, Gupta MM, Khanuja SP. (2005). Plant-based anticancer molecules: a chemical and biological profile of some important leads. *Bioorganic Medicinal Chemistry*. 13(21): 5892-5908.
- Trachootham D, Zhou Y, Yang H, Demizu Y, Chen Z, Pelicano H, Chiao PJ, Achanta G, Arlinghaus RB, Liu J, Huang P. (2006). Selective killing of oncogenically transformed cells through a ROS-mediated mechanism by b-phenylethyl isothiocyanate. *Cancer Cell*, 10, 241–252.
- Vendramini-Costa DB, de Castro IB, Ruiz AL, Marquissolo C, Pilli RA, de Carvalho JE. (2010). Effect of goniothalamin on the development of Herlich solid tumor in mice. *Bioorganic & Medicine Chemistry*, 18(18): 6742-6747.
- Vincent A, Herman J, Schulick R, Hruban RH, Goggins M. (2011). Pancreatic cancer. *Lancet*. 378: 607-620.

Wattanapiromsakul C, Wangsintaweekul B, Sangprapan P, Itharat A, Keawpradub N. (2005).

Goniothalamine, a cytotoxic compound, isolated from *Goniothalamus macrophyllus* (Blume) Hook. f. & Thomson var. *Macrophyllus*. *Songklanakarin Journal of Science and Technology*, 27: 2, 479-487.

Yue P, Zhou Z, Khuri FR, Sun SY. (2006). Depletion of intracellular glutathione contributes to JNK-mediated death receptor 5 upregulation and apoptosis induction by the novel synthetic triterpenoid methyl-2-cyano-3, 12-dioxooleana-1, 9-dien-28-oate (CDDO-Me). *Cancer Biology & Therapy*, 5, 492-497.

Yue Q-X, Liu X, Guo D-A. (2010). Microtubule-binding natural products for cancer therapy, *Planta Medica*, 76: 1037.

