

# Caracterização do perfil de resistência da linhagem de LMA HL60R, resistente à citarabina, e efeito antitumoral dos novos compostos LQB-118 e LQB-223

Thaís Hancio Pereira<sup>1,4</sup> (IC), Aline Rangel Pozzo<sup>1</sup>, Luciano Mazzoccoli<sup>1</sup>, Camilla Buarque<sup>2</sup>, Paulo R. Costa<sup>3</sup>, Raquel C. Maia<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Laboratório de Hemato-Oncologia Celular e Molecular, Programa de Pesquisa em Hemato-Oncologia Molecular, Instituto Nacional de Câncer (INCA), Rio de Janeiro, RJ. <sup>2</sup>Departamento de Química, Pontifícia Universidade Católica do Rio de Janeiro, RJ. <sup>3</sup>Laboratório de Química Bio-orgânica (LQB), IPPN, CCS, UFRJ, RJ. <sup>4</sup>Instituto de Biologia, Universidade Federal do Rio de Janeiro, RJ.

## INTRODUÇÃO

A leucemia mieloide aguda (LMA) é uma doença clonal caracterizada pela presença de células mielóides na medula óssea e no sangue periférico que perdem a capacidade de se diferenciar e proliferam descontroladamente. O tratamento atual, baseado na associação de antraciclina com a citarabina (ara-c), é o mesmo após 40 anos apesar dos resultados insatisfatórios. A resistência à quimioterapia e a recidiva são os grandes desafios no tratamento da LMA. Dados prévios do nosso grupo demonstraram que a pterocarpanoquinona LQB-118 e o azapterocarpano LQB-223 induzem baixa toxicidade em células mononucleares do sangue periférico de indivíduos.

## OBJETIVOS

a) Caracterizar os mecanismos moleculares associados à resistência em uma linhagem de LMA resistente a altas concentrações de ara-c (50µM) denominada HL60R, e b) Avaliar a atividade citotóxica dos novos compostos LQB-118 e LQB-223 na linhagem HL60R.

## MATERIAIS E MÉTODOS

A linhagem HL60 (parental) foi exposta a concentrações crescentes de ara-c pelo tempo de seis meses, até que a mesma apresentasse resistência a 50 µM da droga, resultando na linhagem HL60R. Para validação do modelo experimental quanto à sensibilidade ao Ara-c, foram utilizados os ensaios de MTT e os ensaios de Anexin V/PI, análise de conteúdo de DNA e análise do perfil do ciclo celular por citometria de fluxo. Para análise de expressão proteica de alvos envolvidos com apoptose, proliferação celular e fatores de transcrição na linhagem HL60R, foi utilizado o ensaio de Western blot. Para investigação de vias potencialmente alteradas com a aquisição de resistência foi utilizado o array de proteínas fosforiladas e para verificar a localização subcelular do fator de transcrição Nrf2 foi utilizado o ensaio de imunofluorescência. A avaliação da viabilidade celular dos novos compostos na linhagem HL60R foi realizada pelo ensaio de MTT, ensaio de morte celular através da análise de células marcadas por Anexin V/PI, análise de conteúdo de DNA e perfil do ciclo celular após o tratamento com os novos compostos. Para os experimentos envolvendo Ara-C, a linhagem parental foi utilizada como controle.

## RESULTADOS

No ensaio de MTT a linhagem HL60R apresentou apenas 15% de redução da sua viabilidade celular na concentração de 200µM de ara-c em 72h. O ara-c não induziu morte celular na linhagem HL60R quando as células foram marcadas por Anexin V/PI, assim como não induziu aumento na fragmentação do DNA e não induziu mudança no perfil do ciclo celular na linhagem HL60R. A HL60R apresentou aumento na expressão de Bcl-2 e Xiap, e não houve alteração na expressão de proteínas pró-apoptóticas Bax e Bak-1. O fator de transcrição Nrf2 apresentou sublocalização nuclear em ambas às linhagens estudadas (HL60 e HL60R), apresentando maiores focos nucleares na linhagem HL60R. O array de proteínas fosforiladas, mostrou diversas vias de sinalização alteradas na linhagem resistente, que até o momento não foram descritas, na literatura, como participantes na aquisição de resistência ao Ara-c. Os compostos LQB-118 e LQB-223 sensibilizaram a linhagem resistente a partir da concentração de 3µM e 5µM respectivamente, nos menores tempos testados (24h), induzindo redução de viabilidade celular, aumento de células marcadas por Anexin V/PI, aumento na fragmentação do DNA e alteração no ciclo celular na linhagem HL60R quando tratada com os novos compostos.

## CONCLUSÃO

Nossos resultados validam a resistência ao Ara-c na linhagem HL60R e sugerem importantes vias envolvidas na aquisição de resistência a este fármaco. Os compostos LQB-118 e LQB-223 possuem potencial efeito antitumoral na linhagem de LMA resistente ao Ara-c.

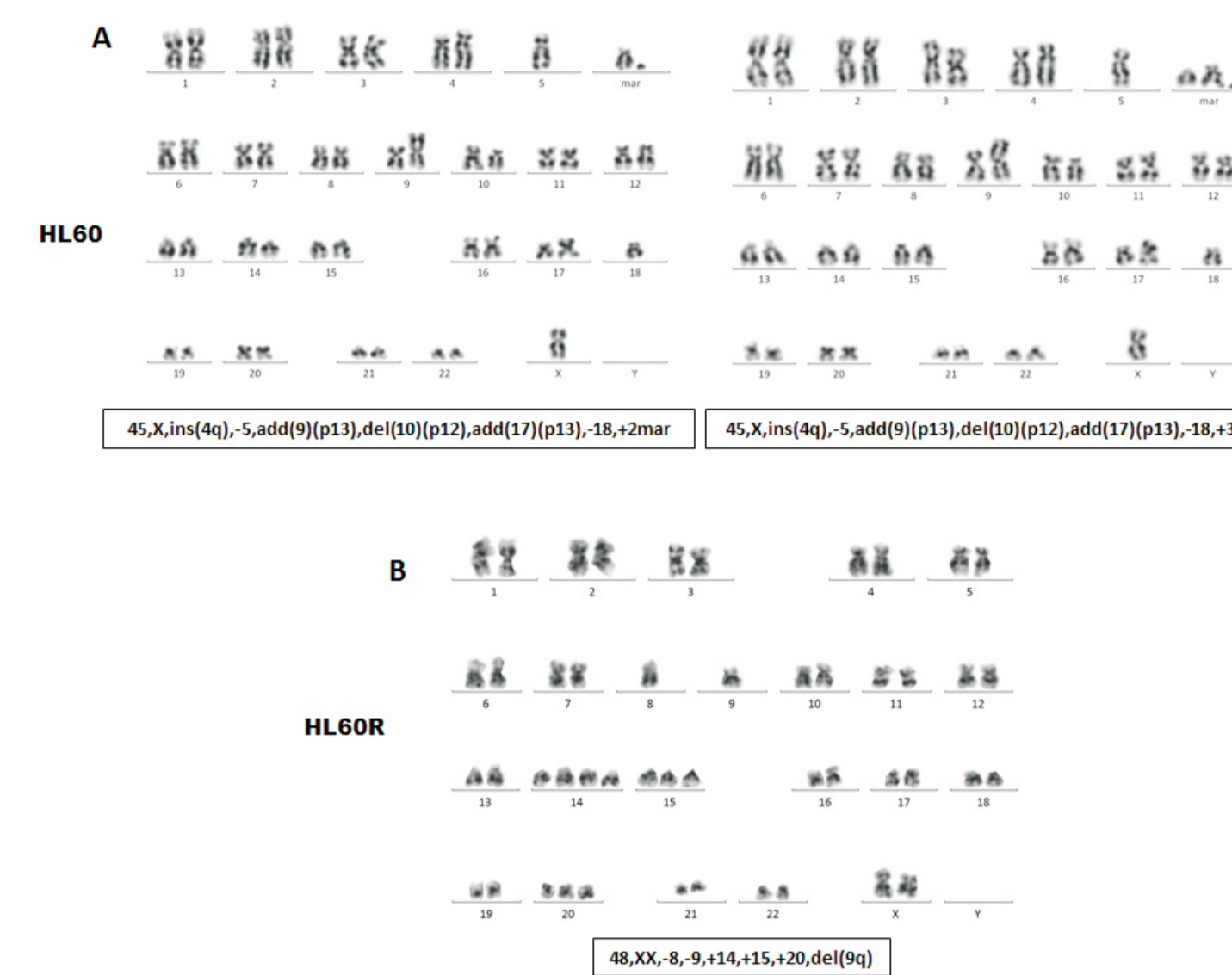


Figura 5. Análise do padrão de cromossomos por citogenética clássica (Bandeamento GTG) mostrando a alterações cromossômicas numéricas encontradas na HL60 (A) e HL60R (B).

Proteína	Alteração no wB	Localização do gene	Alteração na citogenética na HL60R
Bcl-2	Aumento na HL60R	Cromossomo 18	Gain do cromossomo 18
Bak-1	?	Cromossomo 6	?
Bax	?	Cromossomo 19	?
Bcl-XL	?	Cromossomo 20	Gain do cromossomo 20 (trisomia)
c-Myc	Aumento na HL60R	Cromossomo 8	Perda do cromossomo 8 (monossomia)
Nrf2	Aumento na HL60R	Cromossomo 2	?
Xiap	Aumento na HL60R	Cromossomo X	Gain do cromossomo X
Survivina	?	Cromossomo 17	?
AKT	Menos fosforilada na HL60R	Cromossomo 14	Quadrissomia do cromossomo 14
ERK	?	Cromossomo 22	?
JNK	?	Cromossomo 10	?
p38	?	Cromossomo 6	?

Tabela 1. Tabela comparativa entre alterações citogenéticas e alterações proteicas na linhagem HL60R. As análises levaram em consideração a linhagem parental HL60 como padrão.

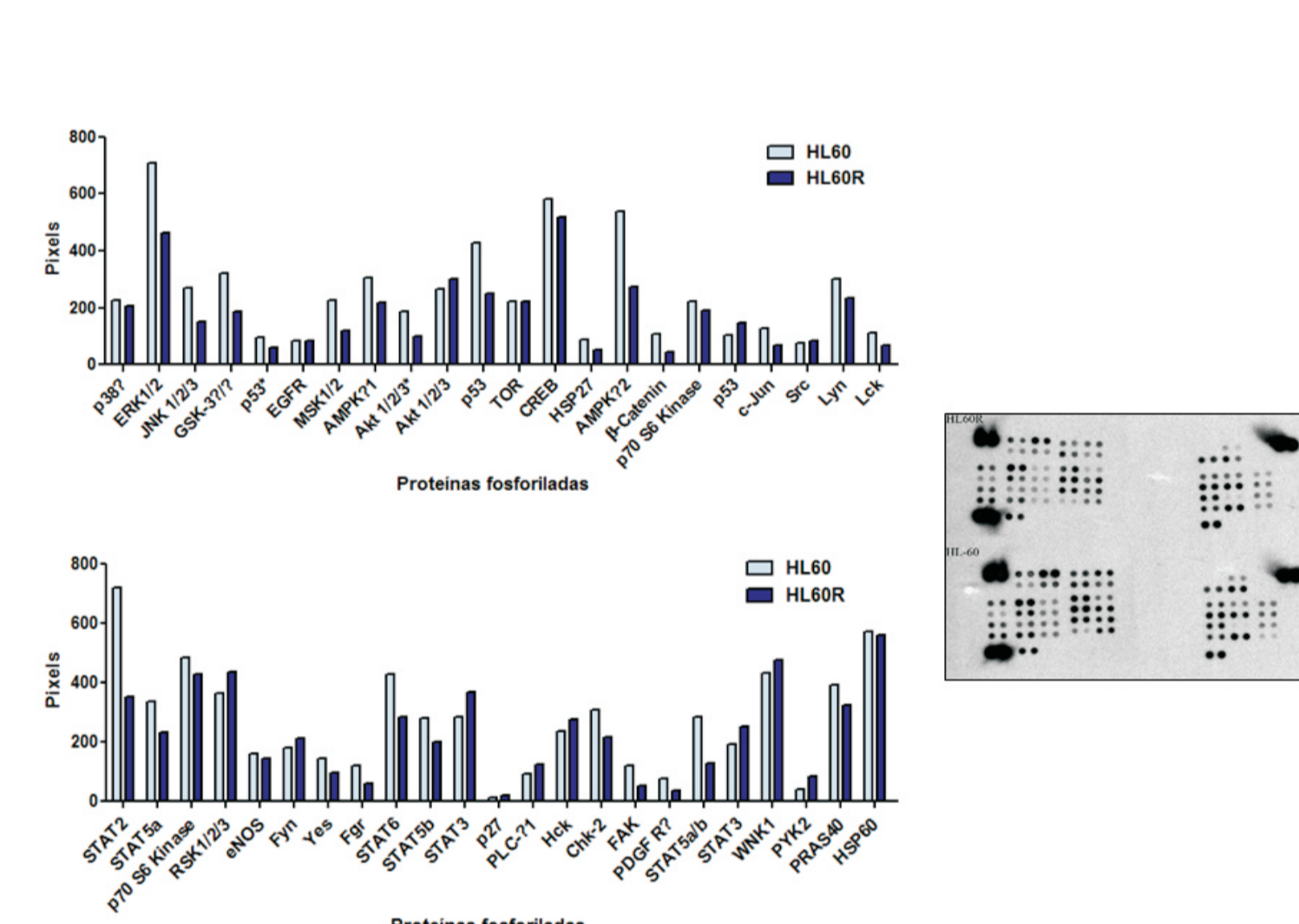


Figura 8. Avaliação da fosforilação de diferentes proteínas envolvidas com apoptose, sobrevivência celular e proliferação através do ensaio de array de proteínas fosforiladas. Gráficos comparativos de entre as linhagens HL60 e HL60R (A e B) e membrana representativa do experimento (C).

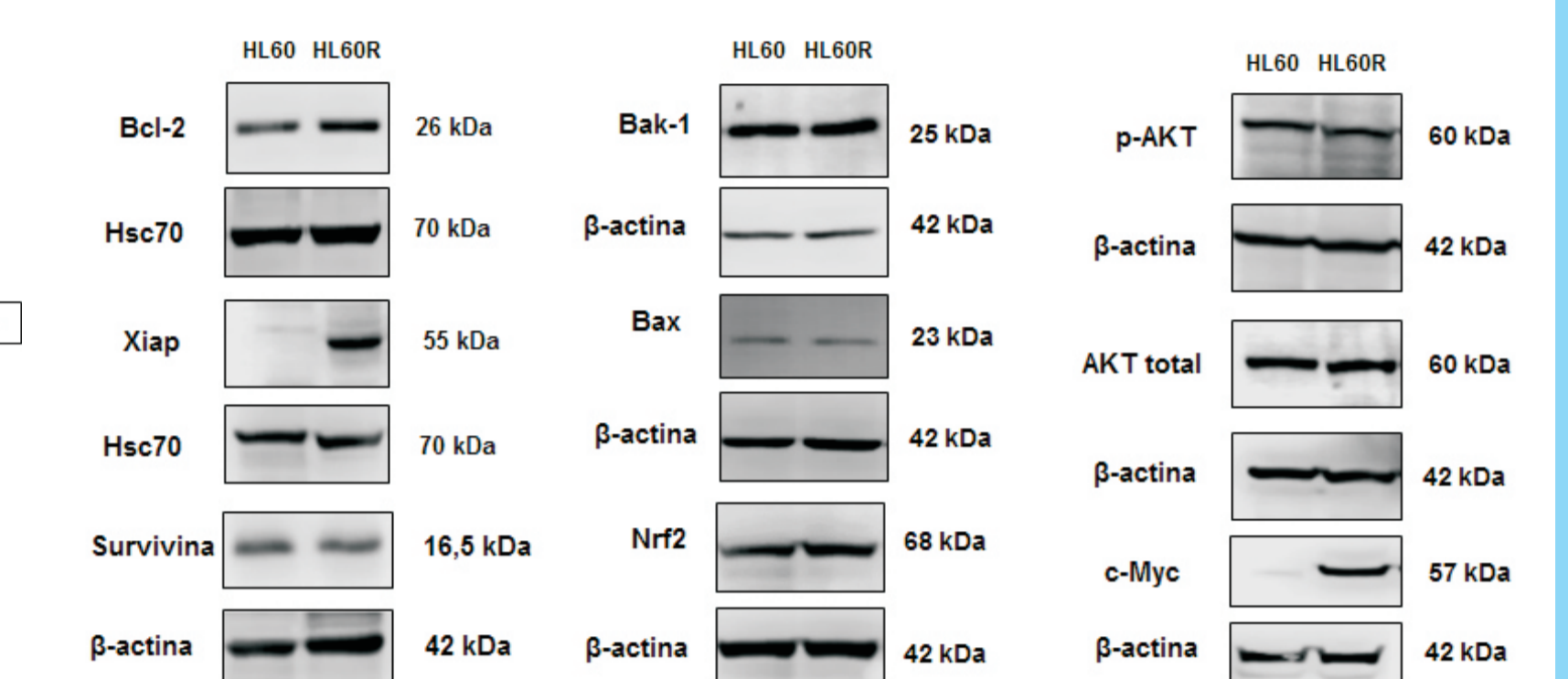


Figura 6. Perfil de expressão de proteínas anti-apoptóticas (Bcl-2, Xiap e Survivina), pró-apoptóticas (Bak-1 e Bax), fatores de transcrição oncogênicos (c-Myc e Nrf2) e proteínas envolvidas com sobrevivência celular (AKT e p-AKT) nas linhagens HL60 e HL60R por Western blotting. Para a análise foram considerados três experimentos independentes.

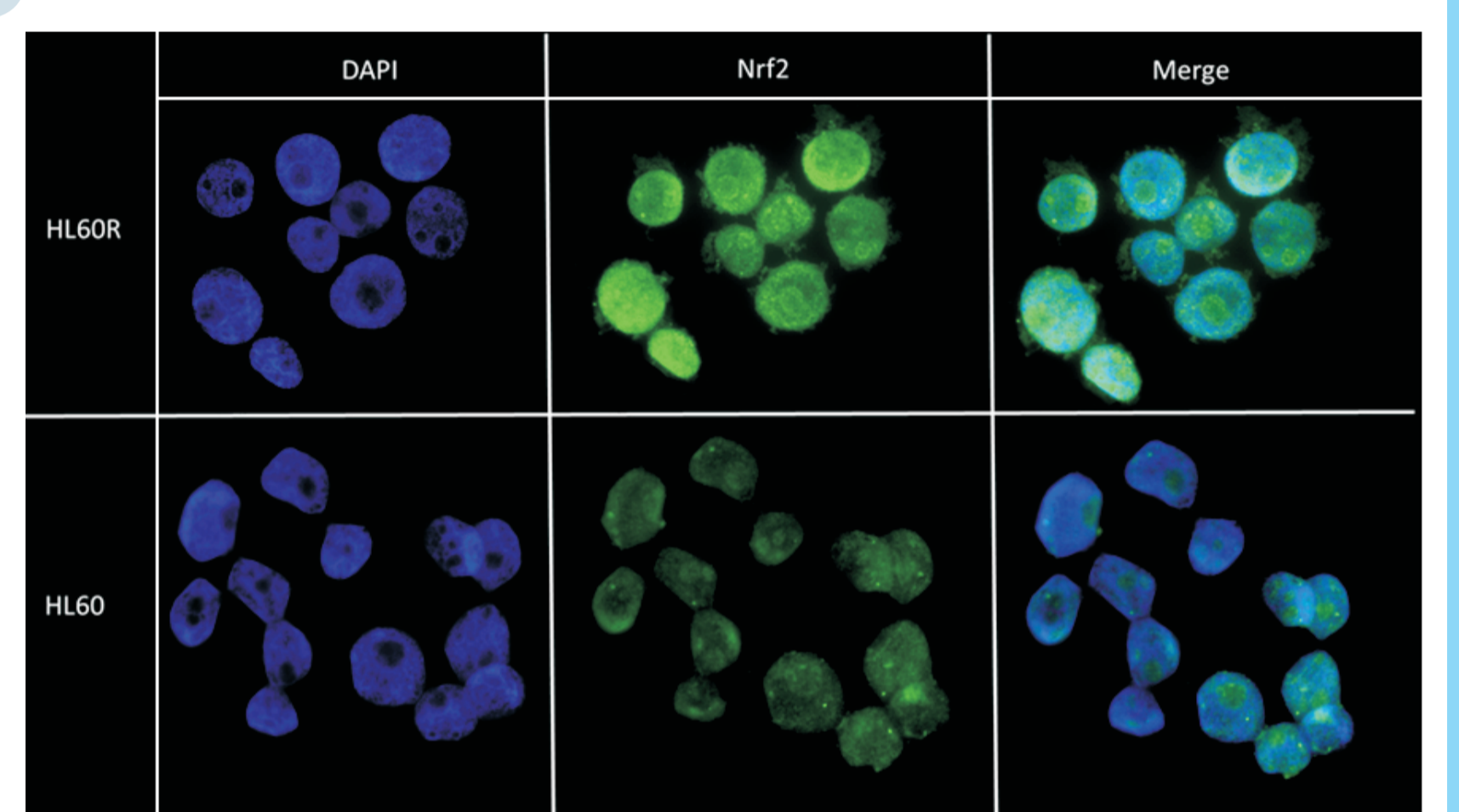


Figura 7. Avaliação da localização subcelular basal do fator de transcrição Nrf2 nas linhagens HL60 e HL60R. Para esse ensaio foram realizados dois experimentos independentes.

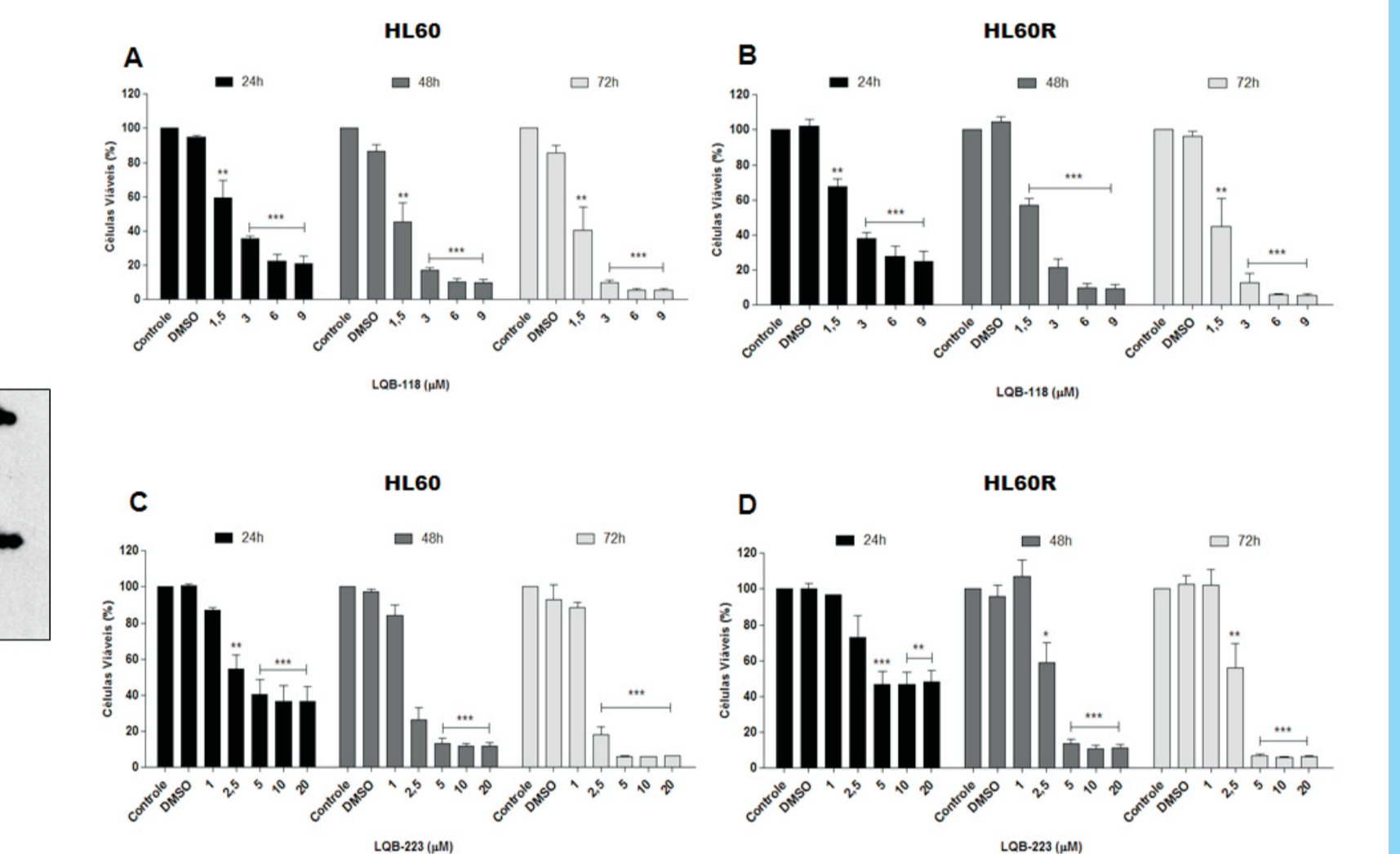


Figura 9. Viabilidade celular da linhagem HL60 (A e C) e HL60R (B e D) após incubação com os compostos LQB-118 e LQB-223, avaliada pelo ensaio de MTT. Percentagem de células viáveis das linhagens após incubação com diferentes concentrações dos compostos por 24, 48 e 72h. Para análise foi considerada a média de três experimentos independentes ± desvio padrão. ANOVA e pós-teste Bonferroni \*\*\*p<0,001 em relação ao controle tratado com DMSO.

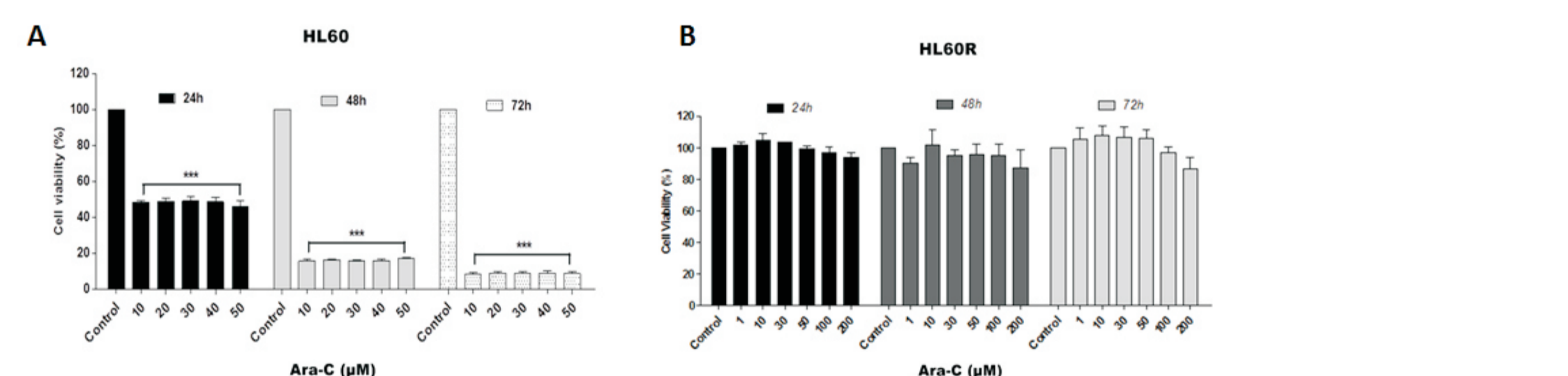


Figura 1. Viabilidade celular da linhagem HL60 (A) e HL60R (B) após incubação com ara-c, avaliada pelo ensaio de MTT. Percentagem de células viáveis das linhagens após incubação com diferentes concentrações de ara-c por 24, 48 e 72h. Para análise foi considerada a média de três experimentos independentes ± desvio padrão. ANOVA e pós-teste Bonferroni \*\*\*p<0,001 em relação ao controle não tratado.

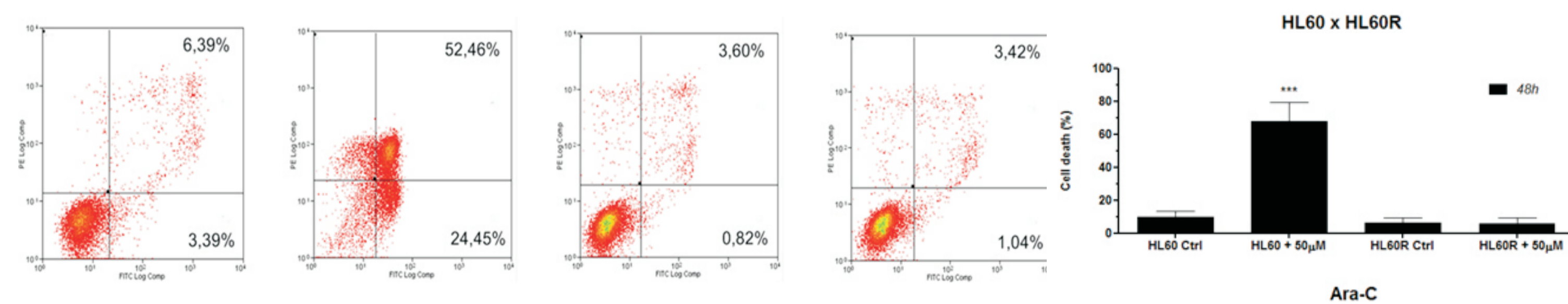


Figura 2. Avaliação da indução de morte celular nas linhagens HL60 e HL60R tratadas com 50µM de ara-c no tempo de 48h. Para análises estatísticas do ensaio de Anexin V/PI foram considerados as médias de três experimentos independentes ± desvio padrão. Teste t student seguido do pós-teste Mann Whitney \*p<0,05, \*\*p<0,01, \*\*\*p<0,001 em relação ao controle não tratado.

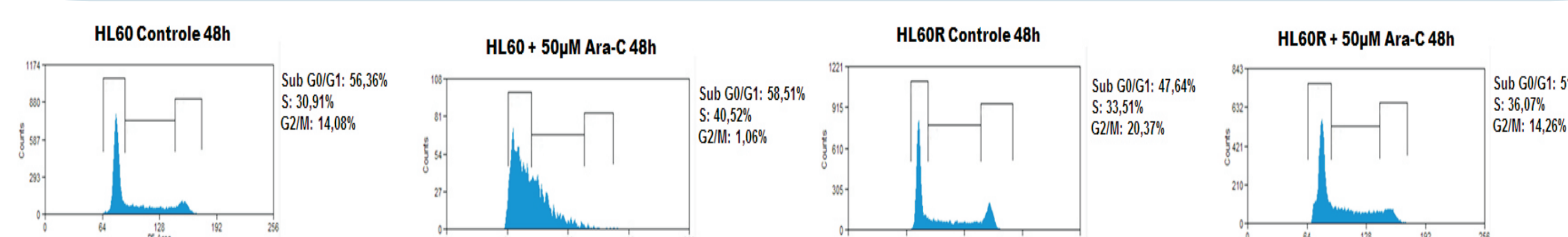


Figura 3. Avaliação da indução de mudança do perfil do ciclo celular nas linhagens HL60 e HL60R tratadas com 50µM de ara-c no tempo de 48h. Para análises do ensaio de ciclo celular foram considerados as médias de dois experimentos independentes.

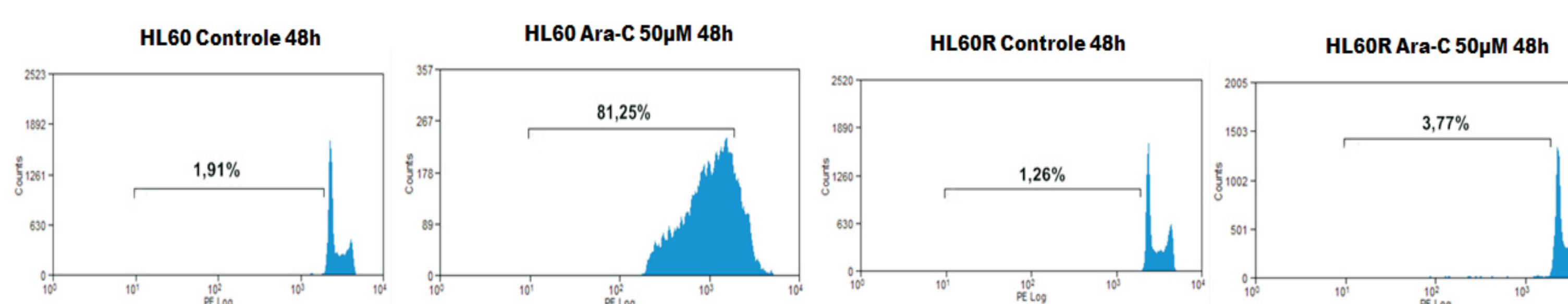


Figura 4. Avaliação da indução de morte celular através da análise de conteúdo de DNA nas linhagens HL60 e HL60R tratadas com 50µM de ara-c no tempo de 48h. Para análises do ensaio de ciclo celular foram considerados as médias de dois experimentos independentes.

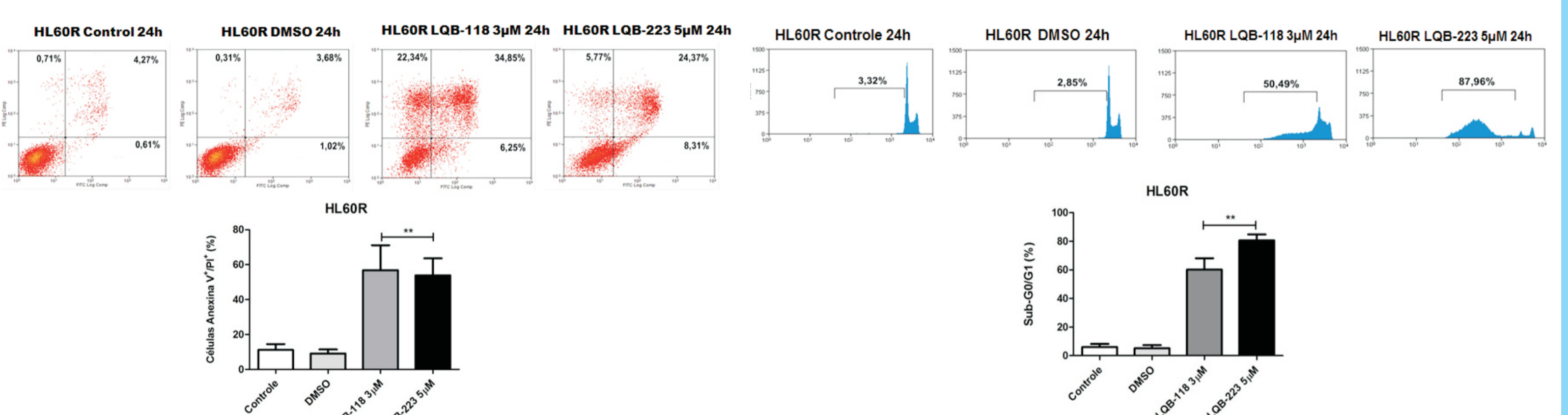


Figura 10. Avaliação da indução de morte celular nas linhagens HL60 e HL60R tratadas com 3µM de LQB-118 e 5µM de LQB-223 no tempo de 24h. Para análises estatísticas do ensaio de Anexin V/PI foram considerados as médias de três experimentos independentes ± desvio padrão. Teste t student seguido do pós-teste Mann Whitney \*p<0,05, \*\*p<0,01, \*\*\*p<0,001 em relação ao controle tratado com DMSO.

Figura 11. Avaliação da indução de morte celular através da análise de conteúdo de DNA nas linhagens HL60 e HL60R tratadas com 3µM de LQB-118 e 5µM de LQB-223 no tempo de 24h. Para análises estatísticas do ensaio de fragmentação de DNA foram considerados as médias de quatro experimentos independentes ± desvio padrão. Teste t student seguido do pós-teste Mann Whitney \*p<0,05, \*\*p<0,01, \*\*\*p<0,001 em relação ao controle tratado com DMSO.

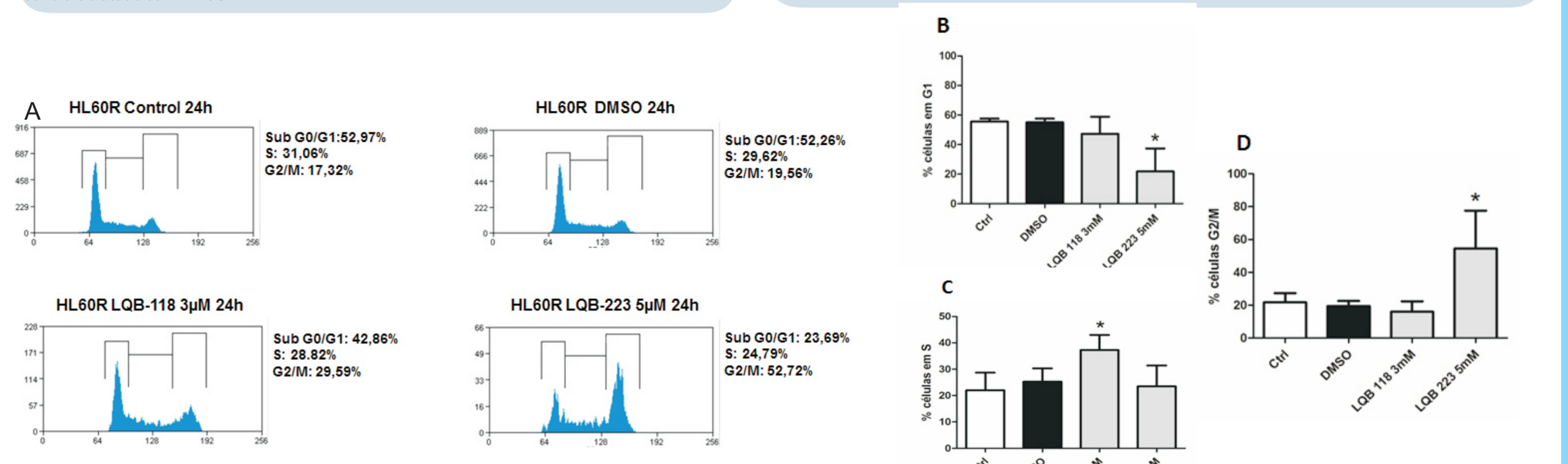


Figura 12. Avaliação da indução de mudança do perfil do ciclo celular nas linhagens HL60 e HL60R tratadas com 3µM de LQB-118 e 5µM de LQB-223 no tempo de 24h. (A) Histograma representativo de quatro experimentos independentes, (B) gráfico das médias da percentagem de células na fase G1, (C) gráfico das médias da percentagem de células em S e (D) gráfico das médias da percentagem de células em G2/M. Para análises estatísticas foram considerados as médias de quatro experimentos independentes ± desvio padrão. Teste t student seguido do pós-teste Mann Whitney \*p<0,05, \*\*p<0,01, \*\*\*p<0,001 em relação ao controle tratado com DMSO.