

UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL  
DEPARTAMENTO DE BIOQUÍMICA  
CURSO DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS BIOLÓGICAS

**EFEITOS DO AGENTE ANTIPROLIFERATIVO DE ORIGEM MARINHA ET-743  
SOBRE O CICLO CELULAR, APOPTOSE E CONTEÚDO DE PROTEÍNA Hsp70 EM  
CULTURAS DE GLIOMA HUMANO**

ANDRÉA GISIANE KUREK

DISSERTAÇÃO DE MESTRADO

Porto Alegre, 2005.

ANDRÉA GISIANE KUREK

**EFEITOS DO AGENTE ANTIPROLIFERATIVO DE ORIGEM MARINHA ET-743  
SOBRE O CICLO CELULAR, APOPTOSE E CONTEÚDO DE PROTEÍNA Hsp70 EM  
CULTURAS DE GLIOMA HUMANO**

Dissertação apresentada como exigência para obtenção do título de Mestre em Bioquímica ao Curso de Pós-Graduação em Ciências Biológicas: Bioquímica, do Departamento de Bioquímica do Instituto de Ciências Básicas da Saúde da Universidade Federal do Rio Grande do Sul.

**ORIENTADOR: Prof. Dr. Gilberto Schwartzmann**

Porto Alegre, 2005.

*“ Existe somente uma idade para a gente ser feliz, somente uma época na vida de cada pessoa em que é possível sonhar e fazer planos e ter energia bastante para realizá-los a despeito de todas as dificuldades e obstáculos...  
... Tempo de entusiasmo e coragem em que todo desafio é mais um convite à luta que a gente enfrenta com toda disposição de tentar algo NOVO, de NOVO e de NOVO, e quantas vezes for preciso. Essa idade tão fugaz na vida da gente chama-se PRESENTE e tem a duração do instante que passa.”*

*A IDADE DE SER FELIZ – Mário Quintana*

Aos meus pais, **Valdir e Marli**, pelo incentivo incondicional e imenso amor: Esta conquista é também de vocês!

Aos meus irmãos, **Andrei, Andressa e Adriano** pelo carinho, amizade e companheirismo.

## **AGRADECIMENTOS**

Ao Professor Gilberto Schwartzmann pela orientação e oportunidade de realização deste trabalho.

À Professora Adriana Brondani da Rocha por sua indispensável colaboração no desenvolvimento deste estudo.

À Professora Ivana Grivicich por todo o auxílio teórico e prático.

À Professora Andréa Regner pela disponibilidade de compartilhar o seu conhecimento científico.

Aos colegas de laboratório: Edlaine, Giovana, Carol, Daniel, Guilherme, Lisi, Leonardo, Rafael e Silvana pela amizade, coleguismo e auxílios prestados.

Às colegas Mara, Denise, Lú e Kátia pela amizade e companheirismo.

À amiga e jornalista Gilda Karlinski, pelo incentivo de sempre e pela revisão gramatical deste trabalho.

À Fran, irmã que a vida me deu, pela sua grandiosa amizade, companheirismo, lealdade e inestimável ajuda nos momentos difíceis.

À minha grande amiga Anita, pela parceria, incentivo e cumplicidade.

Ao Deni, pelo seu amor, disponibilidade e apoio.

À Universidade Federal de Santa Maria (UFSM), pela formação acadêmica.

Ao Centro Integrado do Câncer (CINCAN), local de realização deste projeto.

À Fundação SOAD, pelo auxílio financeiro.

À Universidade Federal do Rio Grande do Sul (UFRGS), pela possibilidade de realizar este trabalho de mestrado.

Aos professores e funcionários do Departamento de Bioquímica da UFRGS.

À minha família, pelo amor, apoio, incentivo e por estar ao meu lado sempre.

À Deus, pela força e pela graça da concretização deste sonho.

## RESUMO

Ecteinascidina 743 (ET-743) é uma nova droga isolada de um tunicado marinho, a *Ecteinascidia turbinata*, que está na fase III dos estudos clínicos por sua marcada atividade anticâncer. Apesar de seu mecanismo de ação não estar completamente elucidado, tem sido demonstrado que a ET-743 se liga ao DNA formando adutos covalentes com o N2 da guanina. Além disso, a ET-743 tem sido relatada como potente inibidora da transcrição. No presente estudo, utilizou-se como modelo para a investigação dos efeitos antiproliferativos deste composto a linhagem celular derivada de glioblastoma humano, U-251 MG. Uma vez que o foco principal de atenção nos estudos sobre o mecanismo de ação da ET-743 esteja concentrado em suas interações com o DNA, a autora buscou avaliar outros aspectos de sua atividade antiproliferativa, quais sejam, o seu efeito sobre a distribuição das células no ciclo celular, sobre a atividade de enzimas associadas ao processo de apoptose, bem como sobre o conteúdo celular da proteína Hsp70. Em incubações de 0,5 nM por 48 h, a ET-743 causou um significativo acúmulo das células na fase G<sub>2</sub>M do ciclo celular, o mesmo ocorrendo com doses mais elevadas (1,0 e 1,5) e incubações mais prolongadas (72 h). A ET-743 induziu morte celular dose-dependente e este efeito foi significativamente prevenido pelo inibidor de caspases z-VAD-fmk. Contudo, não foi observado aumento significativo nos níveis de Hsp70 após tratamento com ET-743. Considerando que alta expressão de Hsp70 é um dos principais mecanismos de proteção das células em condições de estresse, incluindo-se o tratamento com drogas citotóxicas, a não elevação de seus níveis na presença da ET-374 pode estar, ao menos em parte, relacionada à citotoxicidade produzida por este agente na linhagem estudada.

## ABSTRACT

Ecteinascidin-743 (ET-743) is a new marine-derived agent isolated from the tunicate *Ecteinascidia turbinata* currently under phase III clinical trials for its remarkable anticancer activity. Although its mechanism of action remains unclear, it has been demonstrated that ET-743 binds DNA forming covalent adducts at the N2 position of guanine. Also, ET-743 has been related as a potent inhibitor of transcription. In the present study, we investigated the effects of this compound on the *in vitro* growth of the glioblastoma cell line U-251MG. In order to understand the basis for its antiproliferative activity, the potential effects of ET-743 on cell cycle distribution, caspase activity and Hsp70 content were studied. In incubations of 0.5 nM for 48 h, ET-743 caused significant accumulation of cells in the G<sub>2</sub>M phase, the same occurring at higher doses (1.0 and 1.5 nM) and incubations for 72 h. Additionally, ET-743 induced cell death in a dose-dependent manner and this effect was significantly prevented when caspase inhibitor z-VAD-fmk was incubated concomitantly with drug. Our data showed that no significant increase of Hsp70 levels was found following treatment *in vitro* with ET-743 in the cell line studied. Several evidences have been established the cytoprotector role of Hsp70 by interference with apoptotic-signaling pathway. Thus, considering that high expression Hsp70 as an essential defense mechanism for protection of cells from harmful conditions including cytotoxic drugs, the lack of this protection mechanism maybe, at least in part, associated with the cytotoxicity induced by this agent.



## LISTA DE FIGURAS

<b>Figura I.1.</b> Estrutura Química da Ecteinascidina 743.....	16
<b>Figura I.2.</b> Estrutura Química da Phthalascidina .....	17
<b>Figura I.3.</b> Atividade Antiproliferativa da ET-743 e seu Análogo Sintético Pt 650 comparado com outras Drogas Anticâncer.....	18
<b>Figura I.4.</b> Modelo Teórico de Ação Citotóxica da ET-743 em Leveduras.....	25
<b>Figura I.5.</b> Vias Genéticas da Progressão de Gliomas.....	31
<b>Figura I.6.</b> Representação Esquemática do Ciclo Celular.....	34
<b>Figura I.7.</b> Componentes envolvidos na Sinalização da p53.....	35
<b>Figura I.8.</b> Vias de Ativação da Morte Celular Programada.....	42
<b>Figura I.9.</b> Via Intrínseca de Ativação da Apoptose.....	43
<b>Figura I.10.</b> Principais Vias de Sinalização Ativadas por Estresse e Mecanismos de Defesa Mediados por Hsps.....	47
<b>Figura IV.1.</b> Efeitos Citotóxicos da ET-743 sobre a Linhagem Celular U-251MG.....	57
<b>Figura IV.2.</b> Curva de Sobrevivência da Linhagem U-251 MG após Tratamento com ET-743.....	58
<b>Figura IV.3.</b> Distribuição das Células nas Fases do Ciclo Celular após Tratamento com ET-743 com Diferentes Doses por 48h e 72 h.....	61
<b>Figura IV.4.</b> Envolvimento das Caspases na Morte Celular Promovida pela ET-743.....	63
<b>Figura IV.5.</b> Efeito da ET-743 sobre o Conteúdo Celular de Hsp70.....	64

## LISTA DE TABELAS

<b>Tabela I.1.</b> Esquemas de tratamento com ET-743 durante a Fase I dos Estudos Clínicos.....	27
<b>Tabela I.2.</b> Espectro Antitumoral e Toxicidade nas Fases I e II dos Ensaios Clínicos.....	28
<b>Tabela I.3.</b> Classificação e Estadiamento dos Graus de Malignidade dos Gliomas.....	29
<b>Tabela I.4.</b> Principais Alterações Genéticas dos Gliomas.....	32
<b>Tabela I.5.</b> Exemplos de Oncogenes.....	33
<b>Tabela I.6.</b> Exemplos de Genes de Supressão Tumoral.....	33
<b>Tabela IV.1.</b> Valores de IC <sub>50</sub> para a Linhagem Derivada de Glioma Humano U-251 MG após 48 h e 72 h de exposição à ET-743.....	56
<b>Tabela IV.2.</b> Distribuição das Células no Ciclo Celular após Tratamento com ET-743 por 48 h.....	59
<b>Tabela IV.3.</b> Distribuição das Células no Ciclo Celular após Tratamento com ET-743 por 72 h.....	60
<b>Tabela IV.4.</b> Efeito <i>in vitro</i> da ET-743 na presença ou ausência do inibidor de caspases z-VAD-fmk.....	62

## LISTA DE ABREVIATURAS

- Apaf-1** – Fator ativador de proteases pró-apoptótico
- BCNU** – 1,3-bis[2-cloroetil]-1 nitrosuréia
- CDK** – *Cyclin-dependent kinase*
- CD95 (APO-1/Fas)** – Receptor de morte CD95
- CD95-L (APO-1-L/FasL)** – ligante do receptor de morte CD95
- CDK4** – *Cyclin-dependent kinase 4*
- CDKN2A** – *Cyclin-dependent kinase inhibitor 2A*
- DISC** – *Death-inducing signaling complex*
- DMEN** – *Dulbecco's Modified Eagle's Medium*
- DR4 (TRAIL-R1)** – Receptor de morte da família do TNF
- DR5 (TRAIL-R2)** – Receptor de morte da família do TNF
- EDTA** – Ácido etileno diamino tetracético
- EFC** – Eficiência de formação de colônias
- EGF** – *Epidermal Growth Factor*
- EGFR** – *Epidermal Growth Factor Receptor*
- ET-743** – Ecteinascidina 743
- FADD** – Proteína adaptadora: *Fas-associated death domain*
- FCS** – Soro fetal bovino
- FGF** – *Fibroblast Growth Factor*
- GADD45** – *Growth arrest and DNA Damage*
- GBM** – Glioblastoma Multiforme
- GRP** – Proteínas reguladas por glicose
- HSF** – Fator de transcrição de choque térmico
- Hsp** – Proteína de choque térmico
- IAF** – Fator indutor de apoptose
- IAP** – Proteína inibidora de apoptose

**JNKs** – Jun n-terminal kinase

**KDa** – Quilodalton

**HeLa** - Linhagem celular derivada de adenocarcinoma do epitélio cervical

**HL 60** - Linhagem celular derivada de leucemia miolóide aguda

**LOH** – Perda da heterozigosidade

**M** – Mitose

**MAPK** – *Mitogen-activated protein kinase*

**MCF-7** – Linhagem celular derivada de carcinoma mamário

**MDM-2** – *Murine-double-minute 2*

**MDR-1** – *Multidrug resistance gene*

**MG** – *Malignant Glioblastoma*

**μM** – Micromolar ( $10^{-6}$ )

**nM** – Nanomolar ( $10^{-9}$ )

**NF-Y** – Fator de Transcrição Nuclear Y

**OMS** – Organização Mundial da Saúde

**PBS** – Solução Salina Fostato Tamponada

**PCNA** – Antígeno de proliferação nuclear

**PDGF** – *Platelet-Derived Growth Factor*

**PKC** – Proteína Kinase C

**PTEN** – *Phosphatase and tensin homologue deleted from chromossome 10*

**Pt-650** – Phthalascidina 650

**RMN** – Ressonância Magnética Nuclear

**SAPK** – *Stress-activated protein kinase*

**SF** – Fração de Sobrevivência

**Smac/DIABLO** – *second mitochondria-derived activator of caspases/direct IAP-binding protein with a low isoelectric point*

**SNC** – Sistema Nervoso Central

**TC-NER** – Reparo por excisão de nucleotídeos acoplado à transcrição

**TNF** – Fator de Necrose Tumoral

**TNF $\alpha$**  – Ligante do receptor de Fator de Necrose Tumoral – TNF-R1

**TNF-R1** – Receptor de Fator de Necrose Tumoral 1

**TRADD** – Proteína adaptadora: *TNF-R-associated death domain*

**TRAIL** – *TNF-related apoptosis-inducing ligand*

**VEGF** – Fator de crescimento endotelial vascular

**z-D-dbmK** – z-Asp 2,6 diclorobenzoiloximethylketone

**z-VAD-fmk** – z-Val-Ala-DI-Asp-fluoromethylketone

## SUMÁRIO

<b>I – INTRODUÇÃO.....</b>	<b>15</b>
I.1. Ecteinascidina 743.....	15
I.1.1. Origem.....	15
I.1.2. Estrutura Química.....	15
I.1.3. Produção e Síntese da ET-743.....	16
I.1.4. Mecanismo de Ação.....	18
I.1.4.1. Interação com o DNA.....	18
I.1.4.2. Interferência na Transcrição de Genes.....	20
I.1.4.3. Efeitos no Ciclo Celular.....	20
I.1.4.4. Efeitos em Microtúbulos.....	22
I.1.4.5. Efeitos sobre a enzima Topoisomerase I.....	22
I.1.4.6. Efeitos em Vias de Reparo de DNA.....	23
I.1.5. Estudos Clínicos.....	26
I.2. Aspectos Básicos sobre os Gliomas Humanos.....	28
I.2.1. Classificação e Epidemiologia dos Gliomas.....	28
I.2.2. Aspectos Moleculares dos Gliomas.....	30
I.2.3. Modalidades de Tratamento.....	36
I.3. O Mecanismo de Apoptose (Morte Celular Programada).....	37
I.4. As Proteínas do Sistema de Choque Térmico.....	43
<b>II – OBJETIVOS.....</b>	<b>49</b>
II.1. Objetivo Geral.....	49
II.2. Objetivos Específicos.....	49
<b>III – MATERIAIS E MÉTODOS.....</b>	<b>50</b>
III.1. Materiais.....	50

III.2. A Linhagem Celular U-251 MG e seu Cultivo.....	51
III.3. Avaliação da Citotoxicidade da ET-743.....	52
III.4. Determinação da Distribuição das Células nas Fases do Ciclo Celular.....	52
III.5. Avaliação do Efeito da Droga ET-743 sobre a Indução de Apoptose.....	53
III.6. Avaliação do Efeito da Droga ET-743 na Formação de Colônias.....	53
III.6.1. Fração de Sobrevivência Celular após Tratamento com ET-743.....	53
III.7. Determinação do Conteúdo Celular de Hsp70 após Tratamento com ET-743.....	54
III.8. Análise Estatística.....	55
III.9. Local de Realização dos Estudos.....	55
<b>IV – RESULTADOS.....</b>	<b>56</b>
IV.1. Efeitos Citotóxicos da ET-743 sobre a Proliferação Celular.....	56
IV.2. Efeito da ET-743 sobre a Formação de Colônias Celulares.....	57
IV.3. Efeito da ET-743 sobre a Distribuição das Células no Ciclo Celular.....	58
IV.4. Efeito da ET-743 sobre a Indução de Apoptose.....	62
IV.5. Efeito da ET-743 sobre o Conteúdo Celular de Hsp70.....	63
<b>V– DISCUSSÃO.....</b>	<b>65</b>
<b>VI – CONCLUSÕES.....</b>	<b>72</b>
VI.1. Conclusão geral.....	72
VI.2. Conclusões Específicas.....	72
<b>V – REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....</b>	<b>73</b>

## I – INTRODUÇÃO

### I.1. ECTEINASCIDINA 743 (ET-743)

#### I.1.1. ORIGEM

Ecteinascidinas (ETs) são compostos isolados de um animal marinho, o tunicado *Ecteinascidia turbinata*, encontrado no mar do Caribe, o qual produz diversas toxinas como mecanismo de defesa química contra microorganismos e predadores [Schwartzmann *et al.*, 2001; Schwartzmann *et al.*, 2003].

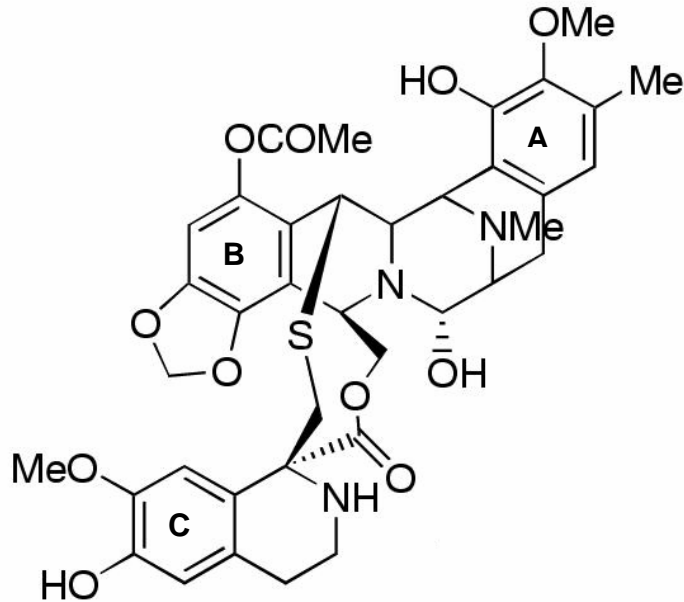
A citotoxicidade e a atividade antitumor das ecteinascidinas foram verificadas pela primeira vez no final da década de 1960. Entretanto, o isolamento e a determinação da estrutura química dos compostos ocorreu somente em 1990, por um grupo de pesquisadores da Universidade de Illinois [Rinehart *et al.*, 1990]. Desde então, mais de dez compostos potencialmente ativos foram isolados e designados como Ecteinascidinas, seguido por um número indicando a massa iônica, dentre os quais podem ser citados ET-743, ET-729, ET-722 e ET-736 sendo que o primeiro é o composto mais promissor devido à sua citotoxicidade e abundância neste tunicado [Sakai *et al.*, 1992; Jimeno *et al.*, 1996].

#### I.1.2. ESTRUTURA QUÍMICA

A ecteinascidina 743 (ET-743) é um alcalóide estruturalmente relacionado a outros antibióticos (Figura I.1), como a saframicina, isolada de espécies de



*Streptomyces*. Esta difere apenas pela ausência da subunidade C, a qual pode estar relacionada à atividade antitumor da ET-743 [Sakai *et al.*, 1996].



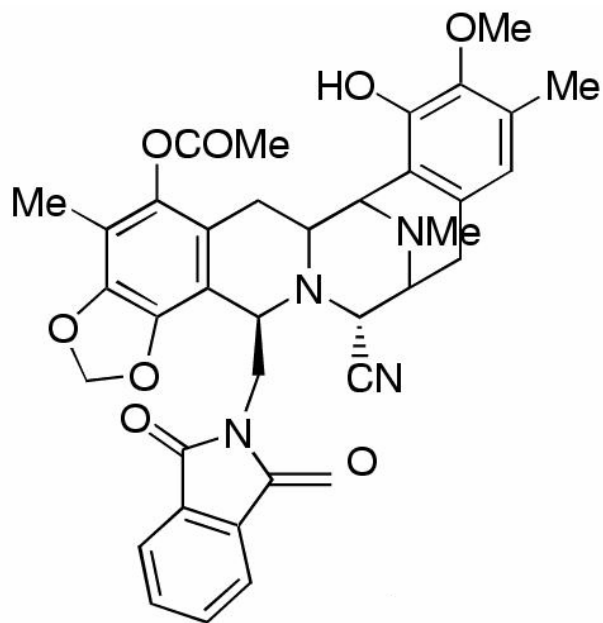
**Figura I.1.** Estrutura química da ecteinascidina 743.

### I.1.3. PRODUÇÃO E SÍNTESE DA ET-743

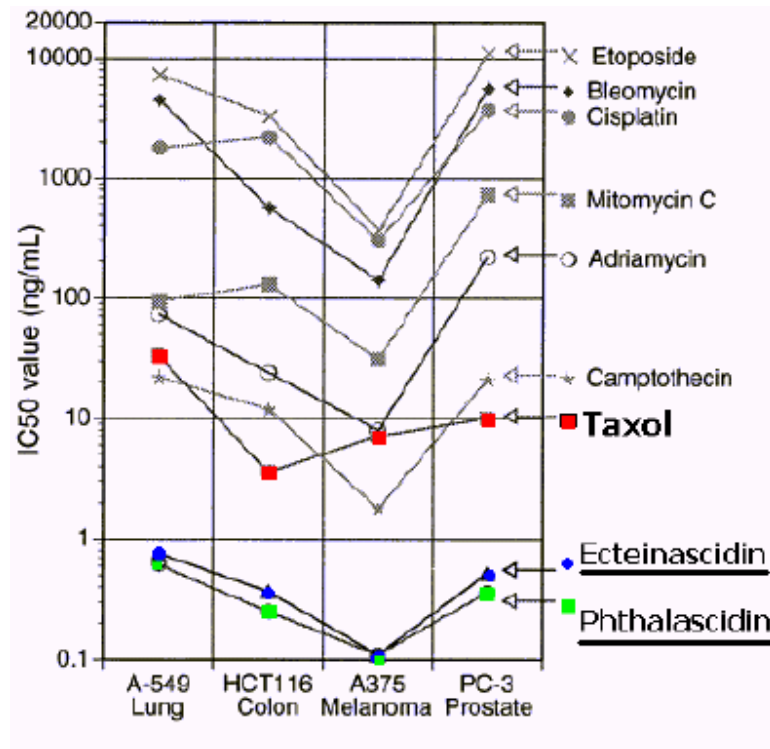
Apesar de pequenas doses serem requeridas para utilização da ET-743 devido a sua alta potência, o suprimento deste produto de fonte natural rara é inadequado para estudos clínicos em grande escala, conseqüentemente, a síntese química desta droga tem sido desenvolvida para fornecer as quantidades adequadas. A primeira síntese total da ET-743 foi realizada por Corey e colaboradores [1996], que após otimização das rotas de síntese, alcançaram um rendimento de aproximadamente 57% [Martinez & Corey, 2000]. Outra opção para a síntese da ecteinascidina 743 foi descrita por Cuevas e colaboradores [2000] a partir da cianosafracina B, a qual é produzida através da fermentação da bactéria *Pseudomonas fluorescens*.

Estes estudos de síntese conduziram à identificação de um derivado sintético, a Phthalascidina (Pt-650) (Figura I.2), que demonstrou potente atividade antiproliferativa

comparável à da ET-743 (Figura I.3). Na Pt-650 a unidade C é substituída por uma molécula de phtalimida. Tem sido demonstrado que modificações na unidade C da molécula da ET-743 alteram a habilidade da droga em inibir a divisão celular; porém, a substituição desta unidade pela molécula de phtalimida não afeta a atividade antiproliferativa [Martinez *et al.*,1999]. Atualmente, a ecteinascidina 743 é produzida por métodos de semi-síntese a partir de precursores obtidos de extratos provenientes de aquacultura pela empresa biofarmacêutica PharmaMar (Espanha).



**Figura I.2.** Estrutura química da phthalascidina (Pt-650).



**Figura I.3.** Atividade antiproliferativa da ET-743 e seu análogo sintético Pt-650, comparado com outras drogas anticâncer [Martinez *et al.*, 1999].

#### I.1.4. MECANISMO DE AÇÃO

##### I.1.4.1. INTERAÇÃO COM O DNA

O mecanismo molecular de morte celular induzido pela ET-743 é ainda pouco conhecido. A sua estrutura química sugere que ela possa interagir com proteínas e com o DNA, interferindo na duplicação do material nucléico. Estudos têm demonstrado que esta droga forma adutos covalentes na dobra menor do DNA, através da alquilação do N2 da guanina [Pommier *et al.*, 1996; Zewail-Foote & Hurley, 1999].

Modelos baseados em ressonância magnética nuclear (RMN) mostraram que as subunidades A e B da ET-743 são responsáveis pelo reconhecimento e ligação na dupla hélice, enquanto a subunidade C faz contato limitado com o DNA e se projeta

para fora da dobra menor, fazendo com que o DNA se curve em direção à dobra maior [Moore *et al.*, 1997; Zewail-Foote & Hurley, 1999].

Tem sido descrito que estas alquilações ocorrem preferencialmente em guaninas localizadas nas seqüências 5' – PyGG (onde Py representa uma pirimidina – T ou C) ou 5' – PuGC (onde Pu representa uma purina – A ou G) de modo que ocorra o maior número possível de ligações pontes de hidrogênio entre a droga e o DNA. Zewail-Foote & Hurley [2001] investigaram as diferenças entre as alquilações da ET-743 em regiões do DNA favorecidas e não favorecidas e observaram que as reações ocorriam à mesma velocidade. Entretanto, a reversibilidade da droga a partir de sítios ligantes não favorecidos pareceu ocorrer mais rapidamente.

Neste contexto, foi sugerido que a velocidade da reversibilidade da ligação covalente, e não a velocidade da ligação, é o que governa a especificidade pelas seqüências observadas. Em tese, todas as drogas alquilantes de DNA podem interferir com funções celulares cruciais como reparo de DNA, replicação e transcrição. Deste modo, a interferência na formação dos complexos entre ativadores da transcrição e seus respectivos alvos no DNA podem conduzir a alterações na expressão gênica [Zewail-Foote & Hurley, 1999].

#### **I.1.4.2. INTERFERÊNCIA NA TRANSCRIÇÃO DE GENES**

As modificações estruturais do DNA provocadas pela ET-743 podem influenciar no reconhecimento e ligação de fatores de transcrição ou proteínas ligantes do DNA. A mudança da curvatura do DNA induzida pela ecteinascidina 743 pode ser, em alguns casos, incompatível com a ligação de alguns fatores de transcrição, mas por outro lado, pode facilitar a ligação de outros. A precisa caracterização destes efeitos poderia explicar porque a ET-743 simultaneamente inibe a expressão de alguns genes e estimula a de outros [D'Incalci *et al.*, 2002].

Alguns estudos têm sugerido que a ET-743 afeta a ativação transcricional através do fator de transcrição nuclear Y (NF-Y). Foi demonstrado que, sob indução de calor, esta droga inibe *in vivo* a transcrição da proteína de choque térmico Hsp70, por inibir a formação do complexo NF-Y com a região CCAAT-box do DNA, e que este efeito foi observado em concentrações farmacológicas clinicamente aceitáveis (nM). Além disso, a ET-743 inibiu a expressão da proteína MDR1 induzida por tricostatina em células tumorais, mas não a expressão constitutiva em células normais [Minuzzo *et al.*, 2000; Jin *et al.*, 2000].

Considerando que o fator de transcrição NF-Y ativa a transcrição de genes envolvidos na regulação do ciclo celular, é provável que a inibição deste seja, pelo menos em parte, responsável pelo retardo na progressão do ciclo celular induzido pela ET-743.

#### **I.1.4.3. EFEITOS NO CICLO CELULAR**

Tem sido amplamente relatado na literatura que a ecteinascidina 743 causa perturbação no ciclo celular, promovendo um retardo na progressão das células da fase G<sub>1</sub> para G<sub>2</sub>, inibição da síntese de DNA e acúmulo das células na fase G<sub>2</sub>M, sendo que

as células que se encontram na fase G<sub>1</sub> pareceram ser mais sensíveis à droga [Erba *et al.*, 2001].

Um estudo realizado por Gajate e colaboradores [2002] sugeriu que a ET-743 exerce dois principais efeitos dose dependentes em células tumorais: (a) quando usada em concentrações de 1 – 10 ng/mL, provoca retardo na proliferação celular dependente da transcrição de proteínas, com acúmulo de células nas fases S e G<sub>2</sub>/M do ciclo celular e subsequente apoptose; (b) promove apoptose independente da transcrição, sem causar prévio retardo na progressão do ciclo celular, quando a droga é utilizada em doses mais elevadas (100 ng/mL).

Estas observações foram baseadas em experimentos onde as células foram pré-tratadas com cicloheximida ou actinomicina D, em concentrações capazes de inibir a síntese de RNAm e proteínas, seguido de tratamento com doses de ET-743 de 1 – 10 ng/mL por 24 – 48 h. Nestas condições foi observado que a resposta apoptótica induzida pela droga não foi afetada; no entanto, o retardo no ciclo celular foi completamente prevenido. Adicionalmente, houve indução de apoptose após 6 – 17 h de tratamento com doses entre 10 – 100 ng/mL de ET-743 sem alterar a distribuição das células no ciclo celular [Gajate *et al.*, 2002].

A ausência de interferência da actinomicina D e cicloheximida na indução de apoptose sugere que a droga pode promover morte celular através de uma via independente da transcrição. Neste mesmo estudo, foi demonstrado o envolvimento da ativação de caspases na apoptose induzida por ET-743 através da utilização do inibidor de caspases z-Asp 2,6 diclorobenzoiloximetilcetona (z-D-dbmK) o qual preveniu a apoptose induzida pela ET-743. Além disso, células derivadas da linhagem MCF-7 (adenocarcinoma mamário), as quais são deficientes em caspase-3, não sofreram apoptose sob tratamento com ET-743 nas concentrações de 10 ou 100 ng/mL por 24 h. Estes dados suportam o envolvimento das caspases na morte celular induzida por ET-743 [Gajate *et al.*, 2002].

O retardo na progressão do ciclo celular é acompanhado de um aumento da proteína p53, o que é consistente com o fato de ocorrer dano no DNA celular. Entretanto, linhagens celulares com deficiência de p53 se mostraram igualmente sensíveis a ecteinascidina 743. Esta característica é terapeuticamente relevante porque sugere que a ET-743 pode ser ativa em tumores p53 deficientes, os quais representam a maioria dos carcinomas que são pobremente responsivos à quimioterapia convencional [Takebayashi *et al.*, 2001; Erba *et al.*, 2001].

#### **I.1.4.4. EFEITOS EM MICROTÚBULOS**

Microtúbulos são polímeros de tubulina envolvidos em diferentes funções celulares, incluindo determinação da morfologia celular e segregação cromossômica durante a mitose. Alterações nos mecanismos de polimerização dos microtúbulos podem, conseqüentemente, prejudicar a divisão celular.

Estudos têm mostrado que a ET-743 causa desorganização da estrutura dos microtúbulos. Células expostas a concentrações farmacologicamente relevantes, apresentaram uma distribuição perinuclear de microtúbulos agregados semelhante aos efeitos observados com o Taxol, agente anticâncer amplamente utilizado na clínica. Entretanto, em contraste com o Taxol, a ET-743 não interfere diretamente com a tubulina. Deste modo, os efeitos nos microtúbulos podem ser uma resposta celular ao dano no DNA e não um evento principal induzido pela ET-743 [Garcia-Rocha, 1996].

#### **I.1.4.5. EFEITOS SOBRE A ENZIMA TOPOISOMERASE I**

Alguns estudos mostraram que a topoisomerase I (Topo I) era um possível alvo da ET-743 [Takebayashi *et al.*, 1999; Martinez *et al.*, 1999]. Entretanto, concentrações relativamente altas de droga (4 – 10  $\mu$ M) foram requeridas para demonstrar este efeito, sugerindo que a inibição da Topo I seja somente um efeito auxiliar ao modo de ação

primário da ET-743. Um estudo comparando células normais com células que não expressavam o gene para esta enzima revelou não haver nenhuma diferença na sensibilidade à droga, indicando que a Topoisomerase I não é requerida para sua atividade citotóxica [Takebayashi *et al.*, 2001].

Adicionalmente, em um modelo de estudo onde foram utilizadas leveduras de *Saccharomyces cerevisiae* que apresentavam deleção do gene que codifica esta enzima, o efeito citotóxico da ecteinascidina 743 permaneceu inalterado [Erba *et al.*, 2001]. Em conjunto, os estudos citados indicam que a Topo I não é um alvo essencial para a atividade antitumor da ET-743.

#### **I.1.4.6. EFEITOS EM VIAS DE REPARO DE DNA**

Erba e colaboradores [2001] foram os primeiros a descrever que células deficientes no mecanismo de Reparo por Excisão de Nucleotídeos Acoplado a Transcrição (TC-NER) eram menos sensíveis à ET-743. O sistema NER está envolvido no reparo de danos ao DNA causados por exemplo, por luz ultravioleta, carcinógenos que formam adutos volumosos com o DNA e agentes anticâncer, tais como drogas alquilantes e cisplatina, sendo que estes usualmente apresentam maior toxicidade em células NER-deficientes quando comparadas às células NER-proficientes. No entanto, a droga em estudo tem demonstrado um perfil distinto. Takebayashi e colaboradores [2001] demonstraram que quando a ET-743 está ligada ao DNA, este complexo é reconhecido pelo NER, o que parece provocar a morte da célula em vez de reparar o dano.

A menor sensibilidade à ET-743 observada nas células com TC-NER defectivo, sugere que este sistema esteja implicado na morte celular promovida por esta droga. Além disso, foi demonstrado que células TC-NER proficientes produzem quebras em fita simples no DNA após exposição à ET-743, enquanto células com proteínas do TC-NER mutadas fazem pouca ou nenhuma quebra [Aune *et al.*, 2002]. Com base nestes

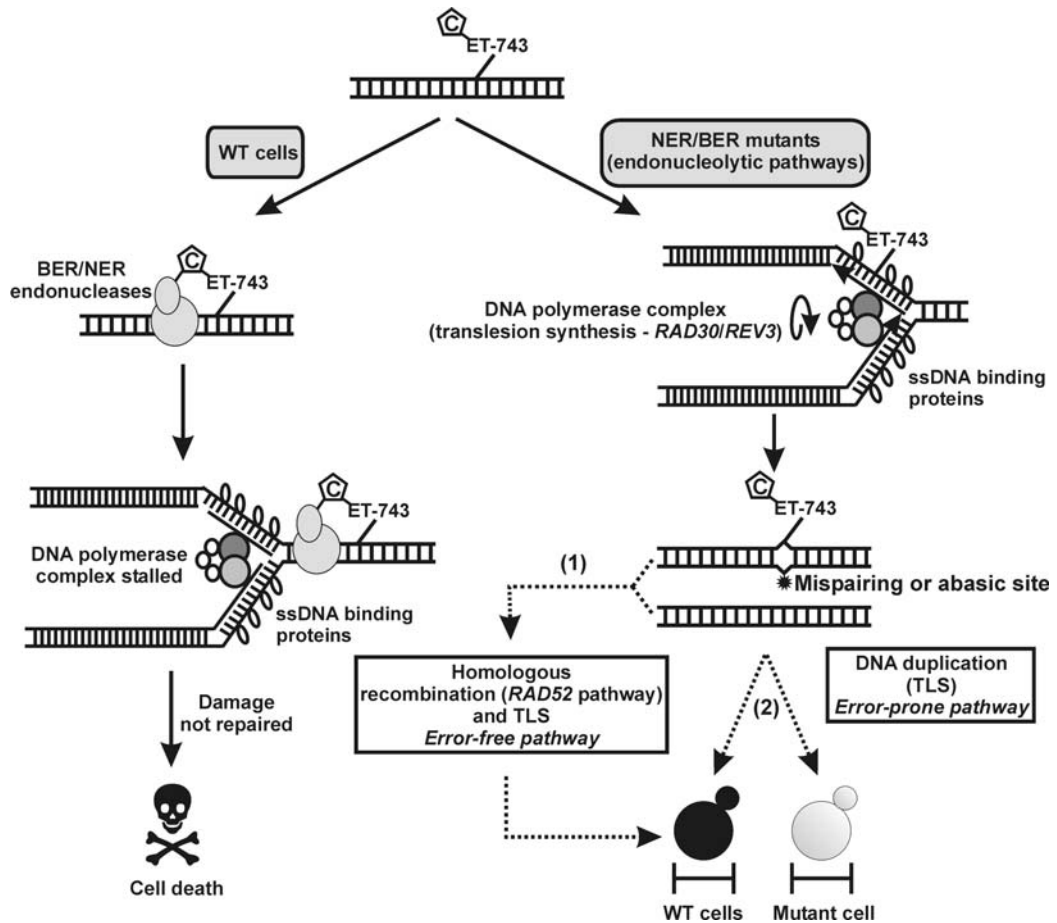


estudos, tem sido proposto que os adutos guanina-ET-743 comprometem o sistema de reparo e bloqueiam a religação da fita de DNA nos locais onde ocorreram as quebras, acarretando morte celular.

A via de reparo de DNA para quebras em fita dupla (DNA *double-strand-break*), também foi investigada quanto a sua importância para a citotoxicidade da ET-743. Através da utilização das linhagens celulares derivadas de glioblastomas humanos M059K e M059J, respectivamente proficiente e deficiente em proteína quinase dependente de DNA (DNA-PK), a ET-743 mostrou ser mais efetiva em células deficientes em DNA-PK. No entanto, através dos métodos utilizados os autores não detectaram quebras no DNA e sugeriram que a aumentada sensibilidade à droga em sistemas que apresentavam deficiência na atividade desta enzima, pode estar relacionada ao seu papel na sinalização de danos ao DNA [Damia *et al.*, 2001].

O peculiar padrão de sensibilidade da ecteinascidina 743 que é observado em células deficientes no sistema de reparo de DNA por excisão de nucleotídeos (NER), enfatiza o fato de que esta droga representa uma nova classe de agentes anticâncer capazes de interagir com o DNA de um modo diferente daqueles observados com outras drogas alquilantes, o que pode justificar sua potente atividade antitumor observada em modelos pré-clínicos e nos ensaios clínicos, contra tumores não responsivos a outras drogas antineoplásicas disponíveis.

Experimentos com *Escherichia coli* e células de mamíferos indicam que as vias de reparo por excisão de nucleotídeos (NER) estão envolvidas no mecanismo de citotoxicidade da ET-743. Por sua vez, estudos com leveduras realizados por nosso grupo, sugerem que a presença de endonucleases do sistema NER e de reparo por excisão de bases são críticas para que a ET-743 produza a sua citotoxicidade [Soares *et al.*, in press].



**Figura I.4.** Modelo teórico de ação citotóxica da ET-743 em leveduras (Soares *et al.*, in press).

### I.1.5. ESTUDOS CLÍNICOS

Ainda que exista uma enorme biodiversidade no meio aquático, a flora e fauna terrestre têm contribuído de forma mais significativa na identificação e no desenvolvimento de novos medicamentos anticâncer [Schwartzmann *et al.*, 2002]. A ET-743 é um dos primeiros compostos marinhos em desenvolvimento clínico para o tratamento do câncer.

Apesar do preciso mecanismo de ação ainda não estar completamente elucidado, o seu modo singular de interação com o DNA difere daqueles observados com outros agentes alquilantes, o que pode justificar sua atividade nos modelos pré-clínicos e ensaios clínicos em tumores não responsivos a drogas anticâncer atualmente utilizadas.

Os estudos pré-clínicos indicaram que o modo de administração da ET-743 poderia influenciar a atividade antitumor bem como a sua toxicidade. Foi demonstrado que altas doses administradas com menor frequência foram mais efetivas quando comparadas a várias administrações com baixas doses [Hendriks *et al.*, 1999]. Entretanto, a incidência e severidade dos efeitos adversos hematológicos e hepáticos, nos estudos realizados em animais, reduziram com infusões múltiplas em doses fracionadas [Jimeno *et al.*, 1996], sugerindo que a toxicidade pode estar relacionada à concentração sanguínea máxima ( $C_{max}$ ).

Deste modo, nos ensaios clínicos os esquemas de tratamento com administrações múltiplas, incluindo infusões fracionadas e prolongadas, foram selecionados para estudos clínicos em pacientes com câncer (Tabela I.1).

**Tabela I.1.** Esquemas de tratamento com ET-743 durante a fase I dos estudos clínicos.

<b>TRATAMENTO*</b>	<b>DOSES (<math>\mu\text{g}/\text{m}^2</math>)</b>	<b>TOXICIDADE DOSE LIMITANTE</b>
1 h – infusão	1000	Trombocitopenia; Fadiga
3 h – infusão	1650	Pancitopenia; Fadiga
24 h – infusão	1500	Trombocitopenia; Neutropenia
infusão por 5 dias consecutivos	325	Trombocitopenia; Neutropenia
72 h - infusão	1050	Elevações das Transaminases; Rabdomiólise

\*O tratamento era repetido a cada 3 semanas. [Adaptado de Van Kesteren *et al.*, 2003].

Devido à longa meia-vida da droga, infusões de duração prolongada pareceram não ser necessárias e poderiam ser impraticáveis na clínica. Deste modo, os esquemas de administração recomendados para a fase II dos estudos clínicos foram os que incluíam infusões de 3 h e 24 h, sendo que as doses estabelecidas tiveram de ser reduzidas no intuito de diminuir os efeitos tóxicos. Estes dois sistemas de tratamento têm sido comparados quanto a sua atividade antitumoral. Os resultados destes estudos, no entanto, estão publicados somente como dados preliminares.

O principal foco dos estudos clínicos da fase II é a avaliação da atividade da ET-743 em sarcomas de tecidos moles (tabela I.2), para os quais atualmente há limitada quimioterapia disponível. Nestes tumores, o padrão de resposta ao tratamento com ET-743 é de 18%, o que é comparável aos resultados obtidos com ifosfamida e doxorrubicina. Entretanto, a estabilização da doença foi observada mais frequentemente (42 – 50%), permanecendo por mais de 14 meses em alguns pacientes, o que é uma possível vantagem da utilização desta droga nestes tumores.

**Tabela I.2.** Espectro antitumoral e toxicidade nas fases I e II dos ensaios clínicos. [Adaptado de Aune *et al.*, 2002].

<b>FASE</b>	<b>TOXICIDADE</b>	<b>TUMORES RESPONSIVOS</b>
I	Elevação das transaminases, mielossupressão, náusea, neutropenia, trombocitopenia, vômito, fadiga.	Mesotelioma, osteosarcoma, leiomiosarcoma, liposarcoma, carcinoma de ovário.
II	Elevação das transaminases, mielossupressão, náusea, neutropenia, trombocitopenia, vômito, fadiga.	Leiomiosarcoma, liposarcoma, sarcoma sinovial, osteosarcoma, carcinoma renal e de mama.

Os tumores que estão atualmente sendo avaliados na fase III dos ensaios são osteossarcoma e sarcoma de tecidos moles, os quais apresentaram resposta satisfatória nos ensaios das fases I e II [Cvetkovic *et al.*, 2002].

## **I.2. ASPECTOS BÁSICOS SOBRE OS GLIOMAS HUMANOS**

### **I.2.1. CLASSIFICAÇÃO E EPIDEMIOLOGIA DOS GLIOMAS**

Os gliomas são tumores de origem neuroepitelial que se desenvolvem a partir de células gliais, de onde provém sua classificação em três subtipos: astrócitos – astrocitomas, oligodendrócitos – oligodendrogliomas, e endimócitos – endimoma, sendo os mais comuns aqueles de origem astrocítica [Girolami *et al.*, 2000]. Segundo a Organização Mundial de Saúde (OMS), estes tumores também podem ser classificados de acordo com suas características histológicas: presença de atipias nucleares, atividade mitótica, proliferação microvascular e necrose [Behin *et al.*, 2003]. Deste modo, pode-se graduar a malignidade dos gliomas em quatro estádios como demonstrados na tabela I.3.

**Tabela I.3.** Classificação e estadiamento dos graus de malignidade dos gliomas\*.

Tumor	Tipo de Tumor	Estádio
Ependimoma	Baixo Grau	Grau II
	Anaplásico	Grau III
Oligodendroglioma	Baixo Grau	Grau II
	Anaplásico	Grau III
Astrocitoma	Pilocítico	Grau I
	Difuso	Grau II
	Anaplásico	Grau III
	Glioblastoma	Grau IV

\* Adaptado de Louis *et al.*, 2001; Behin *et al.*, 2003.

Os tumores classificados como grau I são bem circunscritos, crescem lentamente e não apresentam nenhuma alteração celular visível ao exame histopatológico. Nestes, raramente ocorre transformação maligna e sempre que possível, a ressecção cirúrgica é indicada, promovendo cura ou longa sobrevida (80% alcançam sobrevida de 20 anos).

Ao exame histopatológico, os gliomas grau II apresentam apenas um tipo de alteração celular visível. A partir do diagnóstico, os pacientes geralmente apresentam sobrevida de aproximadamente 10 anos. Entretanto, após este período, em mais de 70% dos casos, o tumor adquire aspecto de astrocitoma anaplásico, oligodendroglioma anaplásico ou glioblastoma multiforme [Behin *et al.*, 2003]. Os tumores estágio III e IV são também chamados de astrocitomas de alto grau, os quais apresentam duas e três alterações no exame histopatológico, respectivamente.

A média da idade dos pacientes que são acometidos por astrocitoma anaplásico é de 40 anos, enquanto para os glioblastomas é de aproximadamente 53 anos. Estes tumores são incuráveis e o objetivo do tratamento é a melhora nos déficits neurológicos e aumento da sobrevida. Apesar da sua extrema malignidade, raramente se disseminam sistemicamente [Behin *et al.*, 2003].

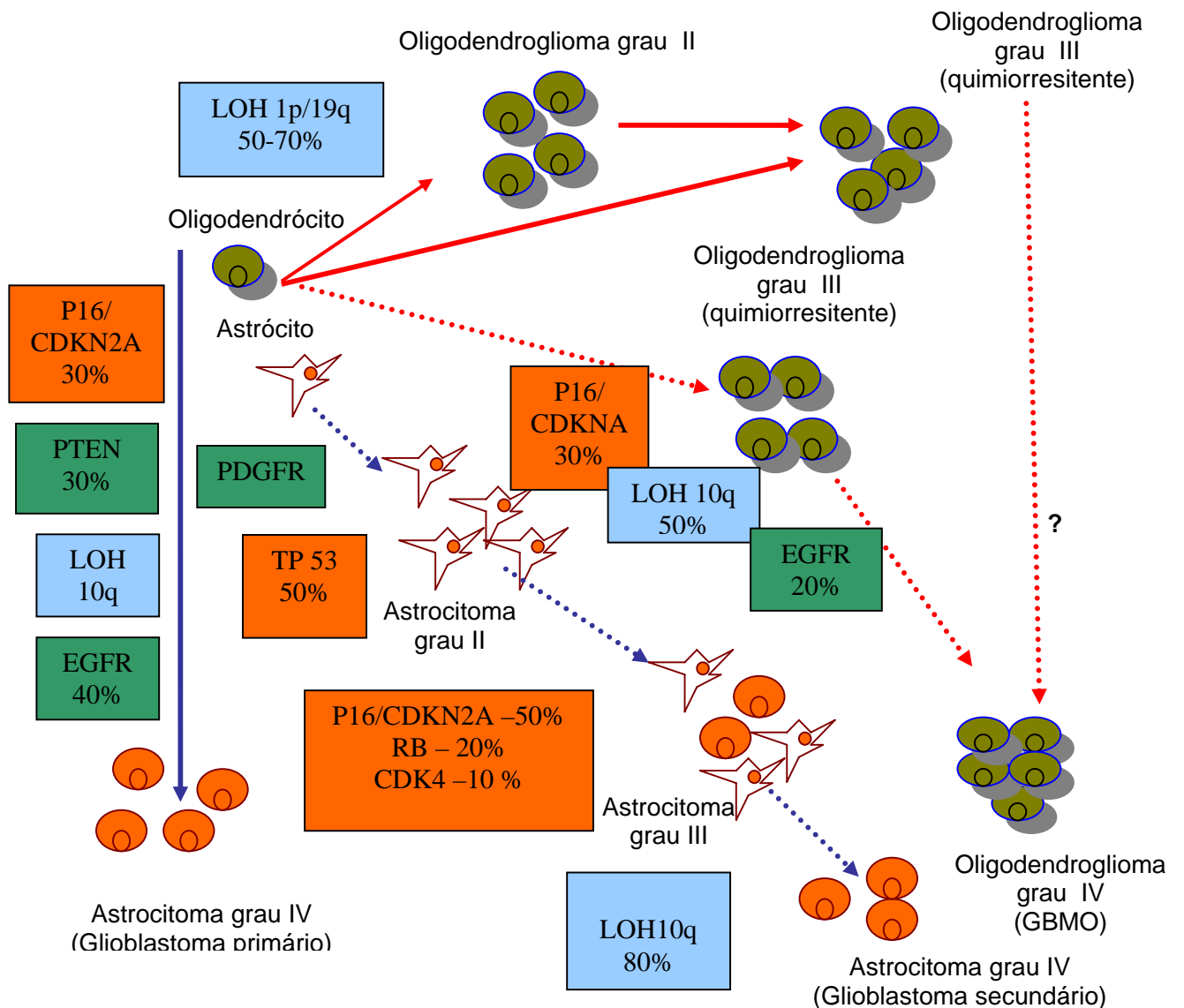
Os tumores primários do Sistema Nervoso Central (SNC) representam apenas 2% de todas as neoplasias humanas, mas estão entre as mais prevalentes neoplasias sólidas em crianças, sendo a segunda maior causa de morte relacionada ao câncer em pessoas com menos de 15 anos de idade [Levin *et al.*, 1997; Rocha *et al.*, 2002].

Entretanto, a maior incidência destes tumores ocorre em pessoas com idade acima de 45 anos onde há o predomínio de gliomas mais agressivos como astrocitoma anaplásico e glioblastoma multiforme. Os astrocitomas malignos ou de alto grau são os gliomas mais comuns, sendo que os glioblastomas correspondem a 25% de todos os tumores primários do SNC em adultos. [Kleihues & Cavenee, 2000; Rocha *et al.*, 2004].

A incidência mundial dos gliomas é cerca de 5 a 10 casos/100.000 indivíduos/ano, correspondendo a aproximadamente metade de todas as neoplasias cerebrais [Behin *et al.*, 2003]. No Brasil, segundo dados do SUS, os Tumores Primários do SNC representam a sétima causa de morte por todas as neoplasias e a terceira causa de morte entre as patologias que acometem este sistema, ficando atrás apenas de causas externas (trauma) e das afecções cerebrovasculares.

### **I.2.2. ASPECTOS MOLECULARES DOS GLIOMAS**

Os gliomas, assim como outros cânceres, são patologias caracterizadas pela presença de anormalidades na expressão de genes que codificam proteínas reguladoras das vias de proliferação celular, diferenciação, apoptose, adesão, migração e angiogênese [Weinberg, 1996]. As principais alterações genéticas encontradas nos gliomas até o momento estão demonstradas na tabela I.4. A figura I.4 esquematiza a formação dos astrocitomas de baixo grau e a progressão neoplásica até glioblastoma multiforme primário ou secundário, destacando as principais alterações moleculares identificadas.



**Figura I.5.** Vias genéticas da progressão de gliomas (modificado de Behin *et al.*, 2003).

LOH = perda de heterozigidade; GBMO = glioblastoma multiforme com componente oligodendroglial. Quadros em laranja, correspondem a alterações genéticas no controle do ciclo celular. p53 = mutação; RB = mutação; P16/CDKN2A = deleção homozigose; CDK4 = amplificação. Quadros verdes, correspondem à alteração genética que afetam as vias na transdução de sinais. EGFR = amplificação; PDGFR = superexpressão; PTEN = mutação. Quadros azuis correspondem à perda de heterozigidade nos cromossomos 1p/19q ou 10q.



**Tabela I.4.** Principais alterações genéticas dos gliomas.

<b>Tipo de Tumor</b>	<b>Alta Frequência</b>	<b>Baixa Frequência</b>
Glioblastoma Multiforme Primário	LOH 10q Alterações PTEN Amplificação EGFR Deleções CDKN2A	Mutação p53
Glioblastoma Multiforme Secundário	LOH 10q Mutação P53 Amplificação PDGFRA	Alterações PTEN Amplificação EGFR Deleções CDKN2A
Oligodendroglioma	LOH 1q LOH 19q Deleções CDKN2A	LOH 10q Alterações PTEN
Oligoastrocitoma	Mutação p53	

Os genes críticos para o desenvolvimento e a progressão tumoral podem ser agrupados em duas grandes classes: os *proto-oncogenes*, que codificam proteínas que estimulam a proliferação celular, inibem a diferenciação celular e bloqueiam a apoptose; e os *genes supressores de tumor* (também chamados anti-oncogenes), os quais inibem a proliferação celular através da regulação de outros genes envolvidos no crescimento celular [Alberts *et al.*, 2002]. Quando ocorrem mutações nos proto-oncogenes transformando-os em oncogenes e nos genes supressores de tumor, acarretando a perda de suas funções regulatórias, há um descontrole da proliferação celular que contribui para o desenvolvimento dos tumores malignos [Osborne *et al.*, 2001; Behin *et al.*, 2003]. As tabelas I.5 e I.6 referem-se a exemplos de oncogenes e genes supressores de tumor, respectivamente.

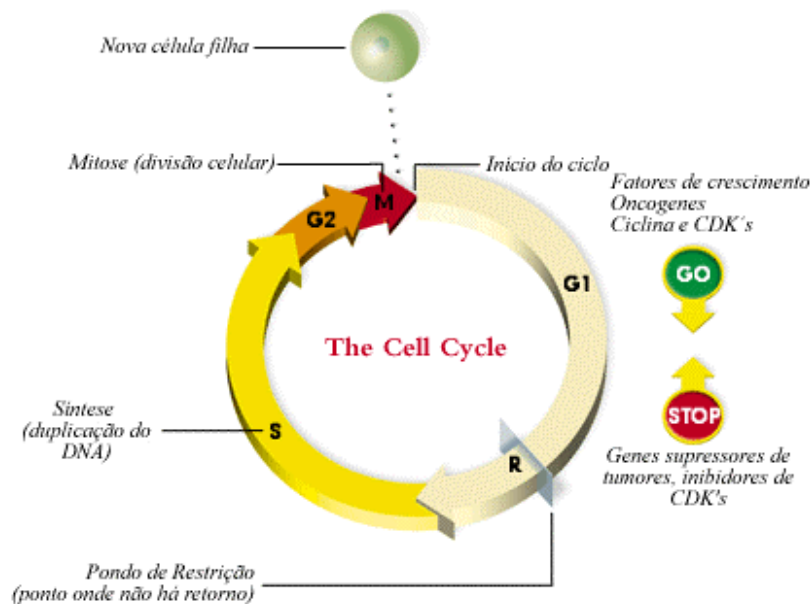
Tabela I.5. Exemplos de Oncogenes.

<b>Fatores de Crescimento e Receptores</b>		INT-2	<i>Her/neu</i>	ROS		
		SIS	KIT	RET		
		<i>ErbB</i>	<i>MAS</i>	SEA		
		FMS	<i>MET</i>	TRK		
<b>Transdutores de sinais</b>		ABL	<i>LCK</i>	H-ras	<i>FGR</i>	
		<i>FES</i>	<i>MOS</i>	K-ras	YES	
		<i>GSP</i>	<i>PIM</i>	N-ras		
		<i>GLP</i>	<i>RAF</i>	Src		
<b>DNA binding</b>		<i>erb A</i>	<i>Fos</i>	<i>Myb</i>	L-myc	REL
		ETS	<i>Jun</i>	C-myc	N-myc	<i>SKI</i>
<b>Apoptose/ Ciclo celular</b>	<b>BAX</b>	<i>CYCLIND</i>				
		1	<i>bcl2</i>	<i>PBX1</i>	<i>RARa</i>	
	<b>Genes de Fusão</b>	ALL/MLL				
			<i>BCR</i>	<i>RARa</i>		
<b>Outros</b>	AKT	<i>CRB</i>	<i>FIM1,2</i>	<i>HST</i>	MAF	<i>QIN</i>
	<i>CBL</i>	<i>EYK</i>	FPS	INT- 1,2	MIL	

Tabela I.6. Exemplos de Genes de Supressão Tumoral.

<b>Gene</b>	<b>Síndrome hereditária</b>	<b>Neoplasias esporádicas</b>
<b>APC</b>	Polipose adenomatosa familiar	Câncer de cólon
<b>BRCA 1,2</b>	Câncer de mama e ovário	Desconhecida
<b>DCC</b>	Desconhecida	Câncer de cólon
<b>Rb1</b>	Retinoblastoma familiar	Câncer de bexiga, mama
<b>P53</b>	Síndrome de Li-Fraumeni	Muitas neoplasias, 50-70% das neoplasias humanas

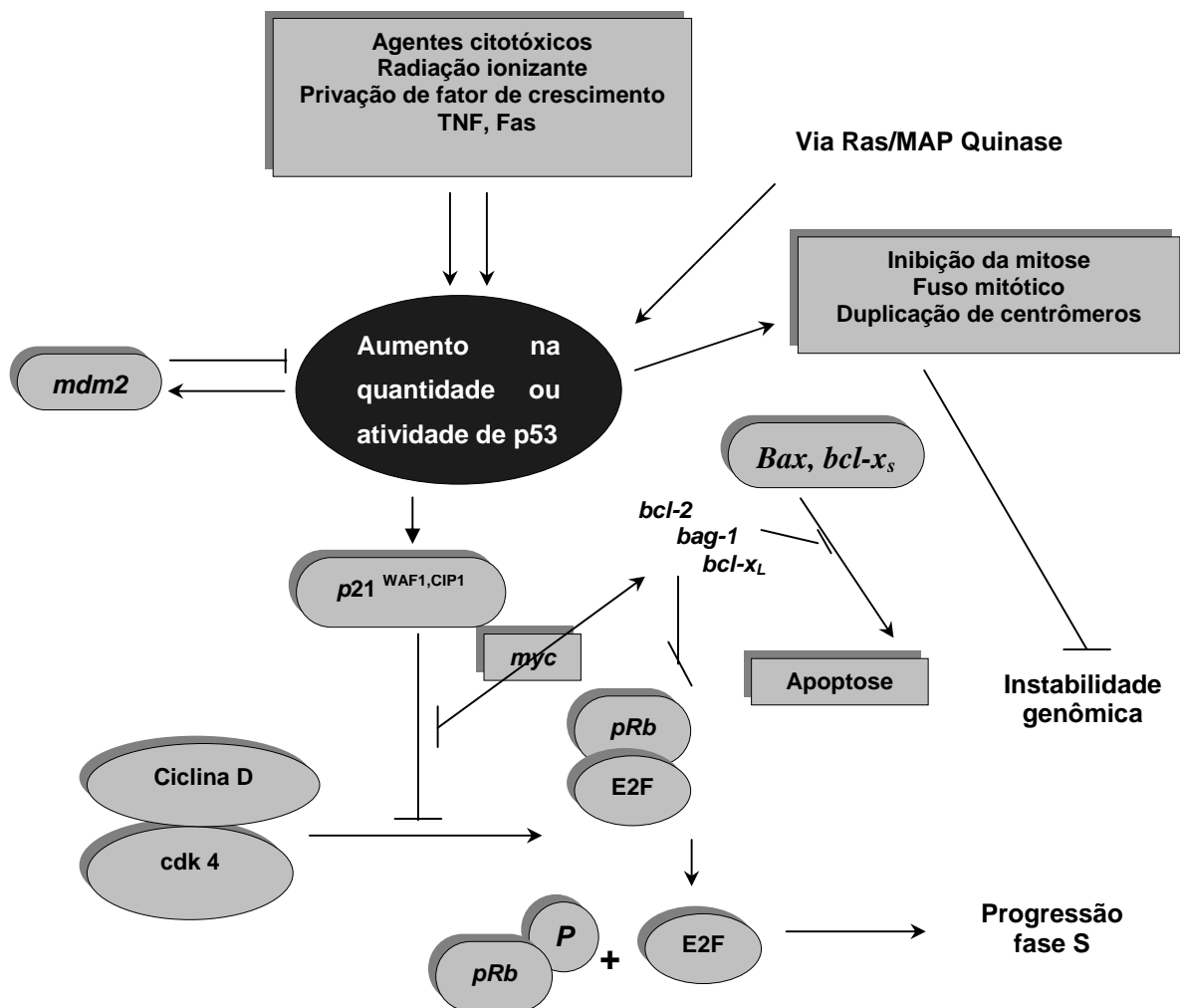
O gene supressor de tumor p53, o qual atua nos *checkpoints*  $G_1$  e  $G_2$  promovendo retardo no ciclo celular em resposta ao estresse genotóxico, encontra-se mutado em cerca de 60% dos gliomas de todos os graus. A inativação deste gene promove divisão celular anormal e parece facilitar a transformação anaplásica através da instabilidade genômica, a qual não apenas cria condições para futuras mutações oncogênicas, mas também pode induzir resistência às drogas citotóxicas e radiação ionizante [Behin *et al.*, 2003]. De fato, a perda do p53 funcional, assim como a superexpressão do gene antiapoptótico bcl-2, têm sido associada à resistência a tais tratamentos nos glioblastomas [Newcomb *et al.*, 1997; Watanabe *et al.*, 1997].



**Figura I.6.** Representação esquemática do Ciclo Celular. O ciclo celular é continuamente regulado por ciclinas e suas quinases associadas (CDKs). As ciclinas são as subunidades reguladoras e as CDKs as unidades catalíticas. Esses complexos são ativados quando as CDKs estão fosforiladas, enquanto a sua desfosforilação converte este complexo em unidade funcionalmente inativa. Cada ciclina tende a atuar em etapas diferentes do ciclo celular, fazendo com que as transições entre as diversas etapas do ciclo sejam bem delineadas.

O *checkpoint*  $G_1$  representa um ponto de controle estratégico do ciclo celular, onde a integridade do DNA é verificada. Quando o DNA encontra-se danificado, há um aumento transitório dos níveis da proteína p53, o que induz parada em  $G_1$  e bloqueio da DNA polimerase via inibidor de cdk (*cyclin-dependent kinase*) – p21<sup>WAF1/CIP1</sup>,

impedindo a fosforilação da pRb, necessária para a entrada da célula na fase de síntese (S) (Figura I.6). Deste modo, são estabelecidas as condições para que se inicie o reparo das lesões de DNA envolvendo um complexo sistema enzimático, dentre eles a proteína de 45 kD – GADD45 (*Growth Arrest upon DNA Damage*) e a subunidade da DNA polimerase PCNA (*Proliferating Cell Nuclear Antigen*).



**Figura I.7.** Componentes envolvidos na sinalização da p53 (Agarwal *et al.*, 1998).

Ao término deste processo, o avanço para a fase S é promovido quando a proteína mdm-2 (*murine double minute*) se associa a p53, revertendo o bloqueio do

ciclo [Rubin & Farber, 1999]. Quando os danos no DNA não podem ser reparados, a ativação do *checkpoint* G<sub>1</sub> pode levar a apoptose.

### I.2.3. MODALIDADES DE TRATAMENTO

Os tumores gliais caracterizam-se por alta invasividade aos tecidos normais adjacentes tornando limitada a sua completa ressecção cirúrgica, que consiste no tratamento de primeira linha para os tumores cerebrais [Brandes *et al.*, 2000]. Deste modo, os principais benefícios desta modalidade terapêutica são o estabelecimento do diagnóstico e a descompressão do cérebro decorrente da redução do volume tumoral, além de facilitar a ação da radioterapia e quimioterapia pós-operatória [Levin *et al.*, 1997].

A radioterapia pós-operatória promove aumento na sobrevida dos pacientes para aproximadamente 35 semanas, enquanto a cirurgia utilizada como única modalidade de tratamento, aumenta em média 14 semanas quando comparada a nenhuma terapia [Vives & Piepmeier, 1999; Botturi & Fariselli, 1998]. Uma exceção para a indicação de radioterapia pós-operatória é em pacientes com gliomas de baixo grau como astrocitoma pilocítico, os quais podem ser tratados exclusivamente com cirurgia podendo promover sobrevida de cerca de 5 anos após sua ressecção total. A radioterapia nesses casos é reservada apenas para casos de progressão da doença.

Quimioterápicos como a carmustina (também denominada BCNU), procarbazina, dacarbazina, cisplatina e a combinação destes têm sido empregados no tratamento dos tumores do SNC. Contudo, estes agentes demonstraram eficácia limitada especialmente em astrocitomas de alto grau, provavelmente em decorrência da falta de especificidade terapêutica destas drogas citotóxicas contra tais neoplasias, da quimiorresistência intrínseca destes tumores e da baixa tolerância do tecido nervoso normal aos efeitos tóxicos da terapia. Além disso, a barreira hemato-cefálica limita a entrada dos quimioterápicos no SNC [Levin *et al.*, 1997; Nagane *et al.*, 1999].

Bloqueadores da angiogênese como batimastat, marimast e talidomida também têm sido testados em pacientes com astrocitoma de alto grau recorrente. Considerando que a neovascularização representa uma condição *sine que non* para a proliferação de tumores acima de 1-2 mm<sup>3</sup> [Folkman, 1996], a supressão da angiogênese pode representar uma nova estratégia anticâncer [Brown & Giavazzi, 1997]. Os resultados preliminares destas investigações têm sido promissores, porém indicam a necessidade de se formular uma metodologia adequada de avaliação da eficácia terapêutica desta modalidade.

Apesar da utilização combinada das três modalidades terapêuticas citadas acima promover aumento da sobrevida para aproximadamente 50 semanas [Rocha *et al.*, 2002] e reduzir os efeitos secundários aos tratamentos, ainda há necessidade da busca de novas drogas e estratégias anticâncer, além de um melhor entendimento acerca dos aspectos moleculares destas neoplasias para tornar mais efetivas as terapias utilizadas.

### **I.3 O MECANISMO DE APOPTOSE (MORTE CELULAR PROGRAMADA)**

O termo apoptose que se refere à morte celular programada, ou morte celular fisiológica, foi introduzido em 1972 por Kerr e colaboradores e hoje é um dos processos mais vigorosamente investigados devido à sua correlação com a carcinogênese e resposta a terapias anticâncer [Kerr *et al.*, 1972].

A apoptose é a forma mais generalizada de morte celular, pois ocorre tanto no desenvolvimento embrionário-fetal como ao longo da vida adulta, sendo alguns exemplos: eliminação de neurônios que não estabeleceram conexões periféricas, eliminação de células para que a forma dos órgãos seja esculpida e morte celular induzida por uma variedade de estímulos lesivos incluindo lesão térmica branda, radiação e drogas anticâncer citotóxicas.

Morfologicamente, a apoptose caracteriza-se por retração celular decorrente da clivagem das proteínas do citoesqueleto, formação de bolhas citoplasmáticas, condensação da cromatina, fragmentação internucleossomal do DNA e eventualmente há formação de corpos apoptóticos. Por não haver derrame do conteúdo celular não ocorre reação inflamatória e lesão dos tecidos adjacentes [Reed, 2000; Herr & Debatin, 2001].

A apoptose é definida como um programa de morte celular influenciada, tanto de forma positiva como negativa por diversos genes, muitos dos quais estão mutados ou funcionalmente desregulados em cânceres humanos. De fato, o desenvolvimento de tumores malignos resulta da proliferação desregulada e/ou da inabilidade das células tumorais em sofrer apoptose [Steller, 1995; Herr & Debatin, 2001]. Sabendo-se que a apoptose tem um papel central na morte celular provocada por agentes anticâncer, estudos têm sugerido que mutações no gene supressor de tumor p53, níveis celulares elevados da proteína anti-apoptótica bcl-2, entre outras alterações genéticas, podem conferir resistência das células tumorais ao tratamento antineoplásico [Reed *et al.*, 1996; Brown & Wounters, 1999].

As drogas anticâncer podem ser classificadas como agentes danificadores do DNA, antimetabólitos, inibidores mitóticos ou nucleotídeos análogos, mas independente da sua classe, atuam inibindo a proliferação celular e induzindo apoptose em células tumorais sensíveis. Este desequilíbrio na homeostase celular designada comumente como estresse celular, inicia uma cascata complexa de moléculas sinalizadoras induzidas por estresse, na tentativa de retornar ao equilíbrio celular prévio.

Como exemplo, em resposta ao dano do DNA, pode haver regulação do ciclo celular e mecanismos de reparo. O tipo e dose do estresse, dentro do contexto da célula, parecem ditar a resposta celular, que é convertida em complexas vias mediando o controle do ciclo celular e/ou morte celular. A apoptose parece ser induzida quando o dano excede a capacidade dos mecanismos de reparo [Herr & Debatin, 2001].

Nos últimos anos, a maquinaria molecular responsável pela apoptose têm sido aos poucos desvendada, revelando uma família de cisteína-proteases intracelular denominadas caspases, que são responsáveis direta ou indiretamente pelas alterações morfológicas e bioquímicas que caracterizam este fenômeno. O processo de morte celular programada pode ser dividido em quatro fases principais: a) Vias sinalizadoras – onde ocorre o estímulo apoptótico; b) Fase de controle e integração – onde moléculas reguladoras inibem ou estimulam a apoptose; c) Fase de execução comum – que consiste na efetivação da morte celular, realizada basicamente por caspases; d) Remoção de células mortas por fagocitose [Stewart, 1994; Vaux & Strasser, 1996; Cotran *et al.*, 2000].

**a) Vias Sinalizadoras:** Há duas vias iniciadoras independentes, imediatamente *upstream* dos eventos efetores das caspases que podem desencadear a resposta apoptótica: Via de Sinalização através dos Receptores de Morte, também chamada de Via Extrínseca; e a Via de Sinalização Mitocondrial ou Via Intrínseca (Figuras I.8 e I.9).

A via de sinalização através dos receptores de morte consiste na ligação de receptores de membrana, que contém um domínio intracelular de morte, com seus respectivos ligantes, o que leva à trimerização do receptor e recrutamento de proteínas adaptadoras para o domínio de morte citoplasmático. São exemplos de receptores de morte e seus ligantes: CD95 (APO-1/Fas) - CD95-L (APO-1-L/Fas-L); receptores e ligantes da família do Fator de Necrose Tumoral (TNF): TNF-R1 - TNF- $\alpha$ ; DR4 (TRAIL-R1) ou DR5 (TRAIL-R2) - TRAIL (*TNF-related apoptosis-inducing ligand*).

Assim, há formação de um complexo de sinalização indutor de morte (DISC – *Death-inducing signaling complex*), onde as proteínas adaptadoras FADD (*Fas-associated death domain*) para CD95, DR4 e DR5, e TRADD (*TNF-R-associated death domain*) para TNF-R1, ligam-se aos domínios de morte do seu respectivo receptor, fazendo com que ocorra o recrutamento da procaspase-8 para o DISC, a qual é ativada proteoliticamente. Esta por sua vez cliva outras proteínas incluindo a procaspase-3,



iniciando a cascata de caspases [Vaux & Strasser, 1996; Reed, 2000; Herr & Debatin, 2001].

A via de sinalização intrínseca consiste na liberação mitocondrial do citocromo *c* em resposta a drogas anticâncer e outros tipos de estresse, através de aberturas de canais na membrana externa ou devido ao inchamento organelar e aumento da permeabilidade mitocondrial. A liberação de citocromo *c* no citosol resulta na ativação de uma proteína adaptadora de caspase (Apaf-1) e da procaspase-9, os quais formam um complexo holoenzimático denominado apoptossoma. A caspase-9 na sua forma de holoenzima ativa caspases *downstream*, como caspase-3 e caspase-8 o que por fim resultará em fragmentação do DNA e apoptose.

Também são liberados da mitocôndria sob estímulos de estresse o Fator Indutor de Apoptose (IAF) e Smac/DIABLO (*second mitochondria-derived activator of caspases/direct IAP-binding protein with a low isoelectric point*), uma molécula com função de inibir as proteínas inibidoras de apoptose (IAP), as quais exibem potente atividade apoptótica de um modo aparentemente independente das caspases [Herr & Debatin, 2001; Ferreira *et al.*, 2002]. Deste modo, diferentes estímulos ativam vias distintas que em algumas circunstâncias podem se correlacionar, mas na maioria das vezes agem de forma independente e convergem para um mecanismo efetor de morte celular comum.

**b) Fase de Controle e Integração:** Esta fase consiste na detecção do sinal apoptótico e na transdução deste sinal à maquinaria de morte celular [Vaux & Strasser, 1996]. Diversas moléculas podem interferir de forma positiva ou negativa no decorrer do programa apoptótico. Os agonistas de morte geram sinais que afetam as mitocôndrias de duas maneiras: favorecendo a redução do potencial de membrana, resultando em transição de permeabilidade mitocondrial interna e aumentando a permeabilidade da membrana mitocondrial externa, liberando o citocromo *c* para o citosol [Cotran *et al.*, 2000].

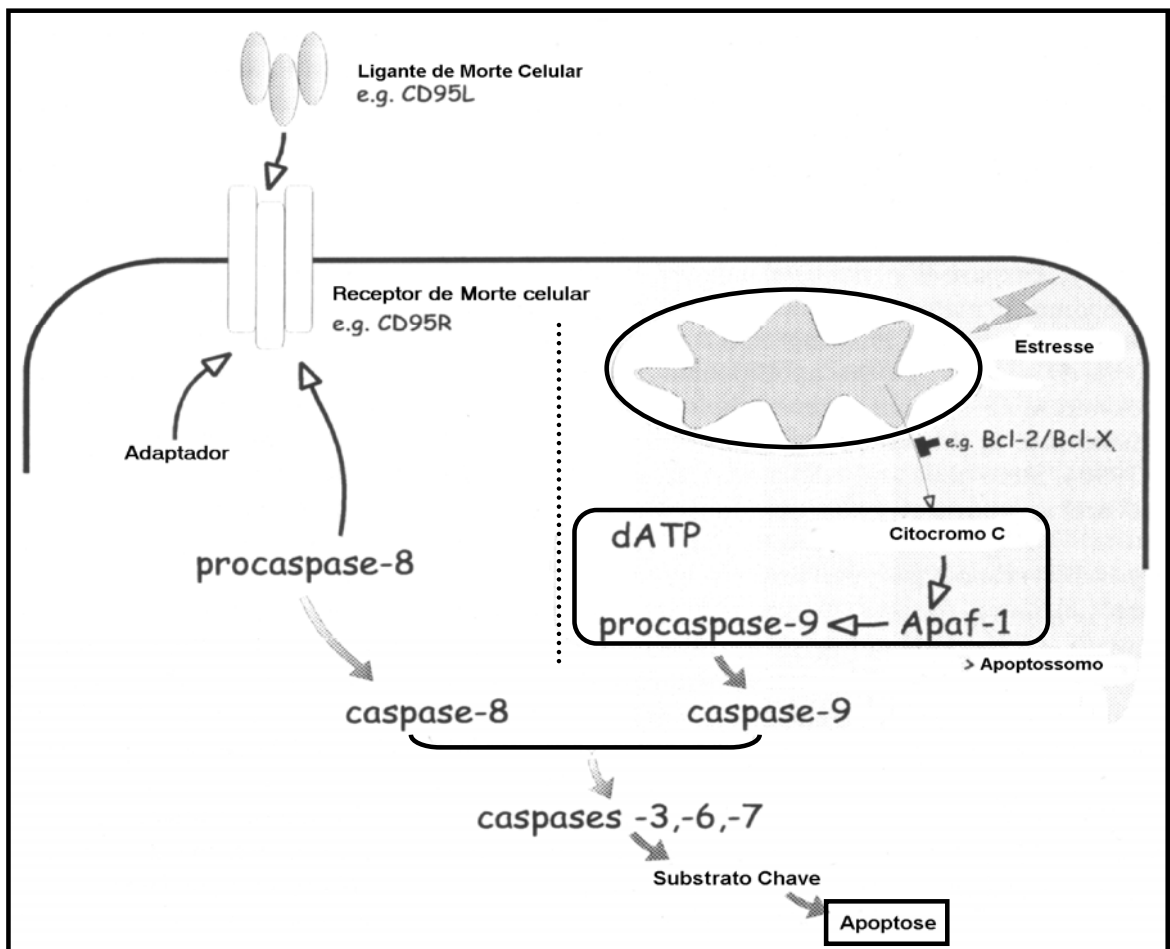
Os membros da família Bcl-2 desempenham um papel central no controle da via mitocondrial, inibindo (Bcl-2, Bcl-xl, Mcl-1, Bfl-1/A1, Bcl-w, Bcl-g) ou promovendo (Bax, Bak, Bok, Bad, Bid, Bik, Bim, Bcl-xs, Krk, Mtd, Nip3, Nix, Noxa, Bcl-b) a apoptose através da regulação da permeabilidade da membrana interna ou externa. Além disso, estas proteínas são capazes de interagir fisicamente formando homodímeros ou heterodímeros e funcionando como agonistas ou antagonistas umas das outras. Tem sido relatado que a Bcl-XL é capaz de se ligar à Apaf-1 inativa, enquanto membros proapoptóticos podem deslocar a Bcl-XL da Apaf-1, permitindo que esta ative a procaspase-9 e desencadeie a apoptose [Cotran *et al.*, 2000; Reed, 2000; Herr & Debatin, 2001].

Diversos estudos experimentais e clínicos têm relacionado os altos níveis de proteínas pró-apoptóticas como Bax com resposta favorável à quimioterapia, enquanto resistência à quimioterapia foi encontrada em tumores expressando altos níveis das proteínas antiapoptóticas Bcl-2 e Bcl-XL [Campos *et al.*, 1993; Minn *et al.*, 1995; Zhang *et al.*, 2000].

**c) Fase Efetora:** A efetivação da apoptose é dependente da degradação de proteínas celulares por uma família de cisteína-proteases aspartato específicas denominadas caspases. As caspases estão constitutivamente presentes nas células como procaspases (inativas), podendo ser ativadas por processo autocatalítico ou por outras caspases de modo hierárquico.

A cascata de caspases inclui proteases *iniciadoras* como caspase-8 (ativada pela via extrínseca), caspase-9 (ativada pela via intrínseca) e caspase-10, as quais ativam as caspases *executoras* como caspase-3 e caspase-7. As caspases executoras ativam endonucleases citoplasmáticas e proteases que degradam proteínas do citoesqueleto e do núcleo, promovendo condensação da cromatina e degradação do DNA [Vaux & Strasser, 1996; Ferreira *et al.*, 2002].

**d) Remoção das Células Mortas:** A quarta fase da morte celular é a fase *postmortem* no qual a cromatina celular condensa e o DNA é degradado, e eventualmente há formação de corpos apoptóticos. A preservação da integridade da membrana plasmática até o fim do processo, permite que ocorra fagocitose das células mortas ou corpos apoptóticos por células vizinhas ou macrófagos, sem indução de resposta inflamatória [Vaux & Strasser, 1996; Cotran *et al.*, 2000].



**Figura I.8.** Vias de Ativação da Morte Celular Programada.

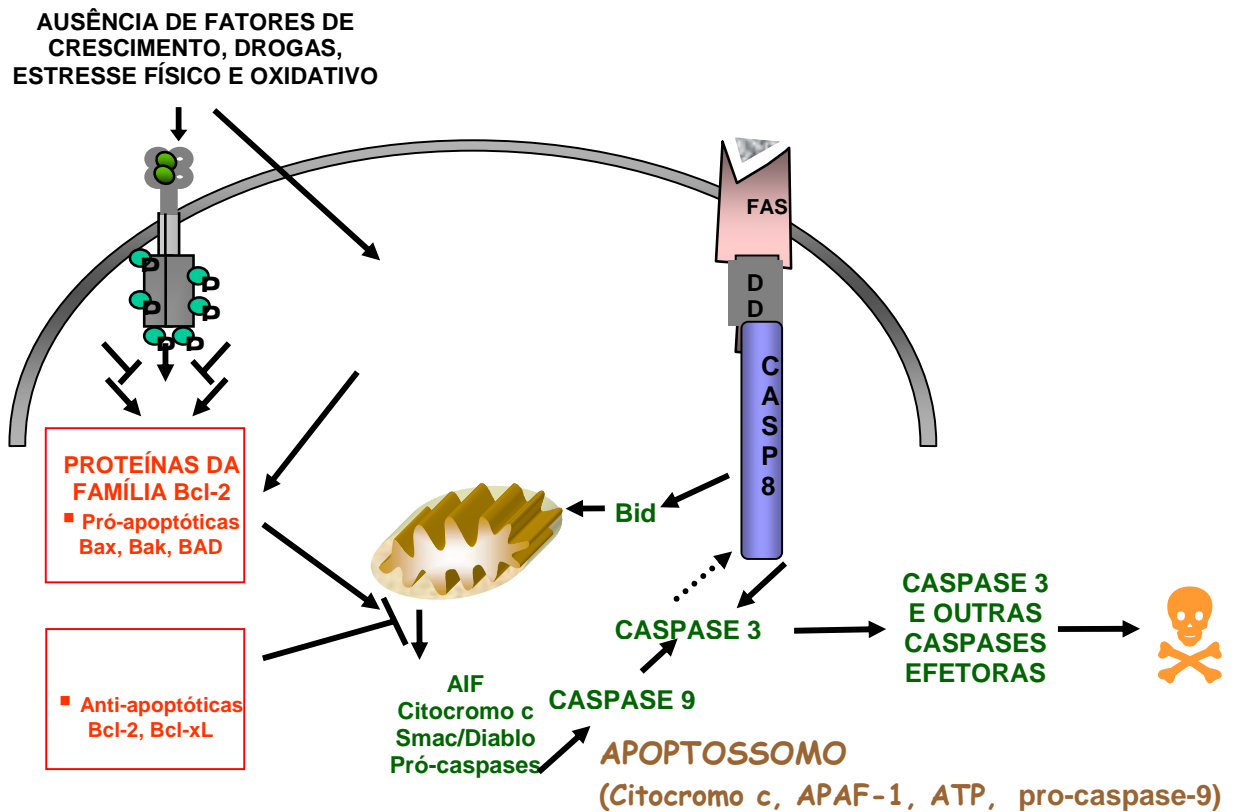


Figura I.9. Via Intrínseca de Ativação da Apoptose.

#### I.4. AS PROTEÍNAS DO SISTEMA DE CHOQUE TÉRMICO

As proteínas de choque térmico (Hsps) foram observadas pela primeira vez em *Drosophila melanogaster* por Ritossa no ano de 1962 em resposta a temperaturas elevadas [Ritossa, 1962; Ciocca *et al.*, 1993<sup>2</sup>; Rokutan *et al.*, 1998; Jolly & Morimoto, 2000]. Estas proteínas são altamente conservadas e estão presentes em todos os

organismos, desde bactérias até plantas e animais, como um essencial mecanismo de defesa celular contra diversos tipos de injúrias.

Além de temperaturas elevadas, uma variedade de insultos metabólicos incluindo metais pesados, estresse oxidativo ou condições patológicas como isquemia e reperfusão, febre, inflamação, infecção, dano tecidual e câncer resultam em indução da expressão das Hsps que podem funcionar como chaperonas moleculares ou proteases [Chen *et al.*, 1999; Jolly & Morimoto, 2000].

Chaperonas moleculares são uma classe de proteínas que interagem com outras proteínas para assegurar o seu correto dobramento. Além disso, cooperam no transporte de polipeptídeos recém sintetizados para as respectivas organelas, para que seja feito o acondicionamento final, degradação ou reparo das proteínas danificadas. Desta forma, as chaperonas constituem um sistema de triagem, sendo o principal fator no mecanismo de controle de qualidade protéico [Sarto *et al.*, 2000].

As Hsps possuem um papel crítico durante o estresse celular por prevenir o mal dobramento protéico e auxiliar na eliminação de proteínas danificadas, desempenhando função crucial na recuperação do estresse e na manutenção da homeostase protéica, promovendo sobrevivência celular. Entretanto, a expressão de Hsps não é limitada a células sob estresse e vários membros da família das Hsps são constitutivamente expressas. Além disso, são também induzidas em diversas condições fisiológicas, como durante a divisão celular, apoptose, diferenciação celular, desenvolvimento tecidual e estímulos hormonais [Ciocca *et al.*, 1993<sup>1</sup>; Rokutan *et al.*, 1998; Sarto *et al.*, 2000].

As proteínas de choque térmico são classificadas de acordo com suas características eletroforéticas em três grupos: As do primeiro grupo têm massa molecular de 60, 70, 90 e 110 kDa. O segundo grupo é composto por Hsps induzidas por privação de glicose e inclui proteínas reguladas por glicose (GRP), 34, 47, 56, 76, 78, 94, e 174 kDa. As Hsps de pequeno peso molecular (shsp) pertencem ao terceiro

grupo, juntamente com Hsp27, ubiquitina e alfa-cristalina [Sarto *et al.*, 2000; Rokutan *et al.*, 1998].

A expressão das Hsps é regulada por fatores de transcrição (HSF), os quais se ligam a sítios específicos denominados elementos de choque térmico (HSE) em uma região promotora do gene que codifica a Hsp [Morimoto *et al.*, 1992]. Sob condição não estressada o HSF e a Hsp permanecem ligados no citosol da célula.

Quando o estresse ocorre, o HSF é separado da Hsp e fosforilado pela PKC ou outra cinase e estruturado como homotrímero. O homotrímero entra no núcleo, se liga ao HSE localizado na região promotora do gene da Hsp e é novamente fosforilado por HSF cinases. Assim, a transcrição é iniciada e é seguida de tradução protéica. As Hsps recém sintetizadas ligam-se ao HSF para prevenir que mais Hsps sejam sintetizadas. O grau de indução depende do nível e duração da exposição ao estresse. Após o estímulo, os níveis de Hsp permanecem elevados acima dos valores basais por dias ou semanas dependendo do tipo celular [Sarto *et al.*, 2000].

A resposta induzida ao choque térmico envolve vias de sinalização que conduzem à ativação de fatores de transcrição, mas ainda não são conhecidas todas as modificações pós-traducionais destas proteínas, particularmente em estados patológicos. Neste trabalho, nos deteremos principalmente na Hsp70 que tem sido amplamente investigada quanto às suas implicações na patologia do câncer.

Hsp70 é a principal chaperona induzida por estresse e é abundantemente expressa em tumores humanos e linhagens celulares derivadas de tumores humanos [Ciocca *et al.*, 1993<sup>1</sup>; Ciocca *et al.*, 1993<sup>2</sup>; Jäättelä, 1995; Hermisson *et al.*, 2000]. O papel da Hsp70 na tumorigênese é baseado na sua habilidade em transformar células e/ou nas suas propriedades anti-apoptóticas [Jäättelä, 1995; Nylandsted *et al.*, 2002].

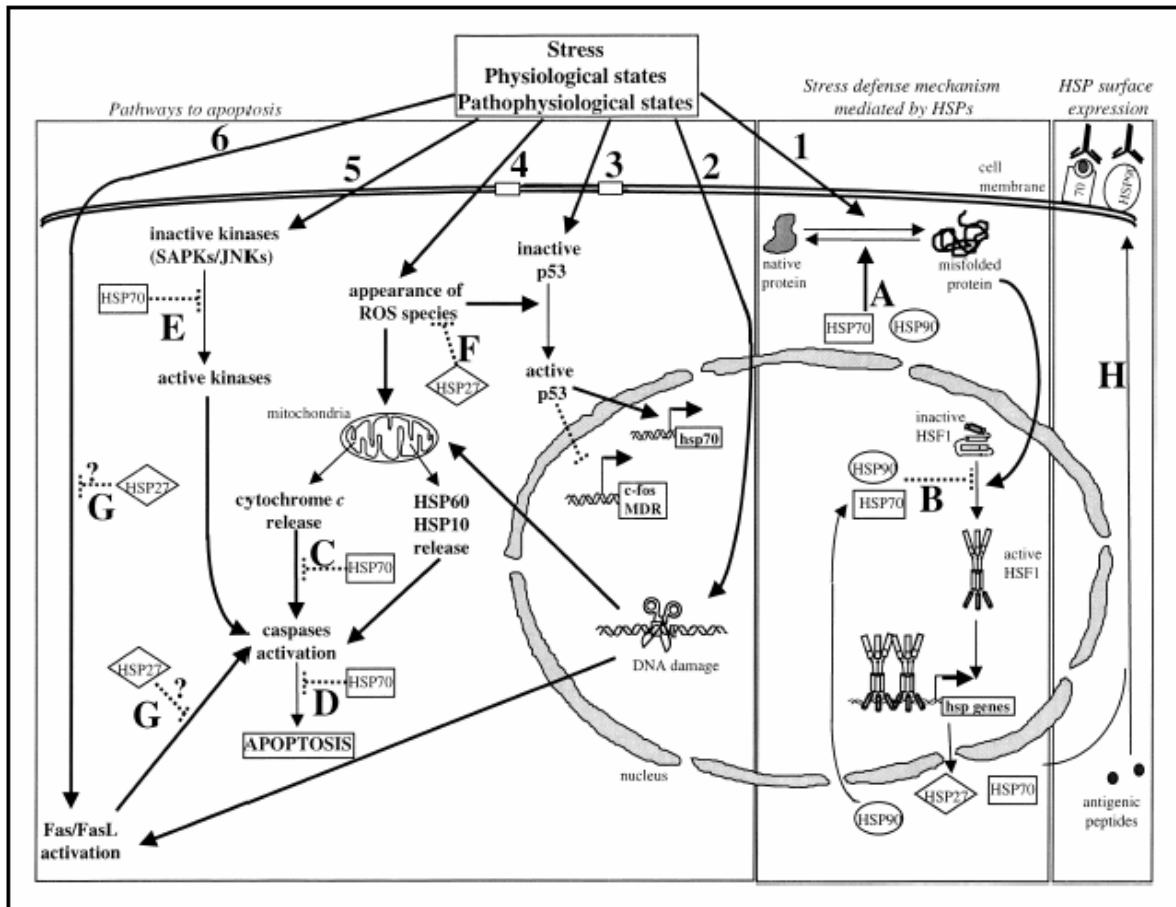
A superexpressão de Hsps *per se* não é suficiente para causar transformação celular. Entretanto, tem sido sugerido que os altos níveis destas proteínas podem

complementar o fenótipo de células transformadas por alterar a atividade de proteínas reguladoras. É provável que o processo de transformação celular utilize componentes da maquinaria de resposta ao estresse, para alterar a conformação e/ou as atividades de proteínas supressoras de tumor mutantes.

Deste modo, níveis aberrantes de chaperonas moleculares podem potencializar a atividade de transformação de oncogenes, tais como p53, e interferir com os mecanismos sinalizadores de estresse, perturbando um mecanismo de defesa celular que, em condições normais, levaria à eliminação de células transformadas por apoptose.

Apesar de o preciso mecanismo pelo qual a indução de Hsp70 promove citoproteção contra estímulos apoptóticos não estar completamente elucidado, alguns mecanismos têm sido propostos. A nível celular, a Hsp70 pode estar envolvida na regulação da via mitocondrial de apoptose [Jolly & Morimoto, 2000]. Nesta via, o sinal de morte celular induz liberação de citocromo c a partir da mitocôndria, o qual liga-se ao Apaf-1, induzindo oligomerização e eventual recrutamento da procaspase-9.

A formação do apoptossoma resulta na ativação da caspase-9, a qual dispara a via das caspases [Saleh *et al.*, 2000; Rocha *et al.*, 2004]. De fato, tem sido mostrado que a direta interação entre a Apaf-1 e Hsp70 previne a formação do apoptossoma [Saleh *et al.*, 2000; Beere *et al.*, 2000]. Na figura I.7 estão esquematizadas as principais vias de sinalização ativadas por estresse.



**Figura I.10.** Principais vias de sinalização ativadas por estresse e mecanismos de defesa mediados por Hsps [Jolly & Morimoto, 2000]. **Setas Sólidas:** Eventos de Ativação; **Setas Pontilhadas:** Eventos Inibitórios. **VIA 1:** O estresse ambiental, fisiológico e patofisiológico estão associados ao aparecimento de proteínas mal dobradas, cujo acúmulo, resulta na ativação do HSF no núcleo, que ativa a transcrição de genes de Hsps. **VIA 2:** Radiação UV pode resultar em apoptose mediado pela liberação de citocromo *c* mitocondrial e ativação das caspases. **VIA 3:** A p53 pode ser ativada resultando no aumento da transcrição de genes como Hsp70, e na diminuição da transcrição de *c-fos*. **VIA 4:** O acúmulo de ROS, causa liberação de citocromo *c*, ativando as caspases. **VIA 5:** Proteínas cinases podem tornar-se ativas resultando em ativação da via apoptótica. **VIA 6:** O Fas/FasL pode aumentar ocasionando apoptose independente do envolvimento mitocondrial.

Citoproteção das Hsps: **VIA A:** Atuam no dobramento das proteínas mal dobradas; **VIA B:** Regulação negativa de sua própria síntese; **(VIA C):** A Hsp70 é capaz de bloquear a via apoptótica em diversos níveis: Inibir a liberação de citocromo *c*, impedindo o recrutamento das pró-caspases; **(VIA D):** Bloquear eventos metabólicos que ocorrem após a ativação das caspases; **(VIA E):** Inibir a ativação de SAPKs/JNKs; **(VIA F)** A Hsp27 também pode inibir o aparecimento de ROS e; **(VIA G):** bloquear a apoptose induzida por Fas; **(VIA H):** Hsps podem ser expressas na superfície celular onde desempenham o papel de antígeno, ou mais comumente, de moléculas apresentadoras de antígeno.



Sabe-se que defeitos nas vias de apoptose estão associados com a manutenção de células no estado transformado no câncer. Em células tumorais, o balanço entre proliferação e morte celular está alterado no sentido do crescimento celular continuado devido à expressão de proteínas anti-apoptóticas como Bcl-2, membros da família de proteínas inibidoras de apoptose e Hsps, especialmente Hsp70 e Hsp27, o que confere às células tumorais resistência à apoptose [Jäättelä, 1999; Adams & Cory, 1998].

Diversas evidências têm estabelecido o papel citoprotetor da Hsp70 através de interferência nas vias de sinalização apoptótica. Sua alta expressão, identificada em quase todos os tipos de tumores, está correlacionada à resistência à terapia e ao pobre prognóstico [Jäättelä, 1999; Rocha *et al.*, 2004]. Por outro lado, dados experimentais demonstram que a depleção da Hsp70 por tecnologia anti-senso induz massiva morte celular semelhante à apoptose em células tumorais, mas não em células epiteliais normais e embriogênicas [Wei *et al.*, 1995; Nylandsted *et al.*, 2000; Nylandsted *et al.*, 2002]. Adicionalmente, tem sido relatado que a apoptose induzida pelo TNF- $\alpha$  pode ser prevenida pela alta expressão da Hsp70 [Jäättelä, 1992]. Assim, em algumas circunstâncias a atividade protetora da Hsp70 pode, pelo menos em parte, envolver interferência direta com o programa apoptótico.

Considerando que a resistência à morte celular é uma característica proeminente das células tumorais e tendo em vista a habilidade das Hsps em proteger a célula da apoptose, um maior conhecimento das bases moleculares desta ação pode se tornar uma valiosa ferramenta no desenvolvimento de novas estratégias de combate ao câncer.

## **II – OBJETIVOS**

### **II.1. OBJETIVO GERAL**

Estudar aspectos relacionados à atividade antiproliferativa da ET-743 em células derivadas de glioma maligno humano U-251, com ênfase no ciclo celular, apoptose e na proteína Hsp70.

### **II.2. OBJETIVOS ESPECÍFICOS**

Investigar os efeitos da ET-743 no que se refere aos seguintes aspectos:

- a) proliferação celular;
- b) formação de colônias;
- c) distribuição das células no ciclo celular;
- d) indução de apoptose;
- e) conteúdo de Hsp70.

### III – MATERIAIS E MÉTODOS

#### III.1. MATERIAIS

A linhagem celular derivada de glioma maligno humano U-251 MG (glioblastoma) foi adquirida da *American Type Culture Collection - ATCC* (Rackville, MD, EUA). O meio de cultura utilizado na manutenção do cultivo celular bem como na realização dos experimentos foi *Dulbecco's Modified Eagle's Medium* (D-MEM) (Gibco BRL, Grand Island, NY, EUA), contendo glutamina 2 mM (Sigma Chemical Co, St. Louis, MO, EUA) e suplementado com 15% de soro fetal bovino (FCS) (Cultilab Campinas, SP, Brasil), anfotericina B (Gibco BRL, Grand Island, NY, EUA) e gentamicina (Ariston).

A droga ecteinascidina-743 foi adquirida da empresa biofarmacêutica PharmaMar S. A., Três Cantos, Espanha. Está comercialmente disponível na forma de liofilizado estéril, contendo 250 µg de substância ativa. A reconstituição foi realizada adicionando 5 mL de água para injeção e a solução foi estocada à temperatura de -20° C.

O D-MEM, a Solução Salina Tamponada de Hank (HBSS) (Sigma Chemical Co, St. Louis, MO, EUA) e a Tripsina/EDTA (ácido etileno diamino tetracético) (Sigma Chemical Co, St. Louis, MO, EUA) utilizadas nas culturas, foram preparadas com água obtida do sistema de purificação Milli-Q Plus (Millipore Indústria e Comércio Ltda., São Paulo, SP, Brasil) e esterilizadas através de filtração em membrana de 0,2 µm. Após o preparo destas soluções, a esterilidade foi confirmada através de teste microbiológico utilizando-se caldo triptona de soja (Unipath Ltda., Hampshire, Reino Unido) por 24h a 37°C.

O material utilizado nas culturas foi lavado com Extran Alcalino (Merck, Rio de Janeiro, RJ, Brasil), enxaguado com água da torneira (6 vezes), seguido de 6 passagens de água destilada de 1h cada. Posteriormente, o material foi autoclavado a 120°C, 1 atm por 40, 30 ou 20 minutos para vidraria, material plástico e filtro com membrana de 0,2 µm, respectivamente. Após a esterilização em autoclave, os materiais foram mantidos em estufa a 120°C (vidraria) ou 50°C (plástico) até o momento de sua utilização. A autoclave foi periodicamente monitorada para identificação de microorganismos com *Kit* para teste de autoclave ATTESTE 1252 (3M Healthcare, St. Paul, MN, EUA).

### **III.2. A LINHAGEM CELULAR U-251 MG E SEU CULTIVO**

A linhagem celular U-251 MG foi cultivada em frascos estéreis de 25 cm<sup>2</sup> ou 75 cm<sup>2</sup> com o meio de cultura DMEM à temperatura de 37°C em atmosfera úmida de 95% de ar e 5% de CO<sub>2</sub>. A fim de preservar o crescimento exponencial, as células foram divididas sempre que atingissem a confluência nos frascos de cultivos. Para tanto, as células eram lavadas com HBSS e após, removidas do frasco pela ação da tripsina/EDTA.

Em alguns experimentos as células foram removidas dos frascos através de raspagem com escova. A densidade celular foi escolhida baseada no tempo de duplicação, de modo que ao final do experimento as células se encontrassem em subconfluência (Griffths, 1992). A troca do meio de cultivo era realizada sempre a cada dois dias.

### III.3. AVALIAÇÃO DA CITOTOXICIDADE DA ET-743

As células foram inoculadas em placas de 96 *wells* na densidade de 3000 células/*well* em triplicata e após 24 horas tratadas com doses crescentes da droga ET-743: 0; 0,05; 0,1; 0,2; 0,5; 1,0; 1,5; e 2,0 nM por 48 e 72 horas. Após o tratamento, a inibição do crescimento celular foi determinada através do método sulforodamida-B (SRB) conforme descrito previamente (Skehan *et al.*, 1990), onde as células foram fixadas com ácido tricloroacético (TCA) 50%, gelado por 1 h e coradas com SRB 0,4% (Sigma Chemical Co.).

Após 30 minutos de incubação, as placas foram lavadas com solução de ácido acético 1%, o SRB solubilizado com trizma base 10mM, pH 10,5 (Sigma Chemical Co.) e a leitura, realizada no leitor de placas Multiskan EX (Labsystems, New England) a 540 nm. Através deste método pode-se determinar as respectivas doses que promoveram 50% de inibição do crescimento celular (IC<sub>50</sub>) em 48 h e 72 h de tratamento, as quais foram utilizadas nos experimentos posteriores.

### III.4. DETERMINAÇÃO DA DISTRIBUIÇÃO DAS CÉLULAS NAS FASES DO CICLO CELULAR

As células (U-251 MG) em crescimento exponencial foram tratadas com a droga ecteinacidina 743 por 48 h e 72 h com as respectivas doses de IC<sub>50</sub> determinadas pelo método sulforodamina-B.

Ao final do tratamento, a distribuição das células nas fases do ciclo celular foi determinada através de citometria de fluxo por coloração com iodeto de propídio. Para isto, o meio de cultivo foi coletado e as células que permaneceram aderidas no frasco foram lavadas com HBSS, removidas pela ação da tripsina/EDTA e o conteúdo celular total foi centrifugado a 150 x g por 10 minutos, lavado duas vezes com PBS gelado e fixado em etanol 70% a 4°C.

No dia da análise, as amostras foram descongeladas, centrifugadas e lavadas duas vezes com PBS. A seguir foram tratadas com 1 mL de solução contendo citrato de sódio 3,4 mM, iodeto de propídio 20 µg/mL e RNase A (ICN Biomedicals inc., Ohio, EUA) 100 µg/mL por 30 minutos, ao abrigo da luz. A análise foi realizada em *software* MODFIT 2.0 (Becton Dickinson, CA, EUA).

### **III.5. AVALIAÇÃO DO EFEITO DA DROGA ET-743 SOBRE A INDUÇÃO DE APOPTOSE**

A morte celular foi avaliada através de citometria de fluxo considerando-se o percentual de células acumuladas na fase subdiploide (sub-G1). Este método, entretanto, não permite distinguir células necróticas de apoptóticas. Para identificar o percentual de apoptose, as células foram tratadas com 50 µM do inibidor de caspase z-*Val-Ala-DL-Asp-fluoromethylketone* (z-VAD-fmk) (Bachem Bubendorf, Suíça) e imediatamente submetidas ao tratamento com a droga ET-743 por 48 h e 72h. Após este período, as células foram preparadas para citometria de fluxo conforme descrito no item III.4.

### **III.6. AVALIAÇÃO DO EFEITO DA DROGA ET-743 NA FORMAÇÃO DE COLÔNIAS**

#### **III.6.1. FRAÇÃO DE SOBREVIVÊNCIA CELULAR APÓS TRATAMENTO COM ET-743**

As células foram tratadas com a droga ET-743 por 48 h e 72 h e após este período inoculadas em placas de cultivo de 6 *wells* (400 células/*well*), as quais foram mantidas em incubadora, à temperatura de 37°C, em atmosfera de 95% de ar e 5% de CO<sub>2</sub> por 14 dias, sendo realizada a troca do meio de cultivo a cada 48 horas.

Ao final dos 14 dias, as células foram fixadas com etanol 70% a 4°C e coradas com cristal violeta 0,1%. Foram contadas as colônias com mais de 50 células, e a

fração de sobrevivência (SF) foi calculada de acordo com a seguinte fórmula (Berens *et al.*, 1988):

$$SF = \frac{\text{Número de colônias nas células tratadas}}{\text{Número de colônias nas células controle}} \times 100$$

### III.7. DETERMINAÇÃO DO CONTEÚDO CELULAR DE Hsp70 APÓS TRATAMENTO COM ET-743

O conteúdo de Hsp70 na linhagem celular U-251 MG foi determinado com o *kit StressXpress<sup>TM</sup> Hsp70 ELISA* (Stressgen Biotechnologies Corp., BC, Canadá). Inicialmente as células foram submetidas ao tratamento com a droga *Ecteinascidin 743* por 48 h e 72 h, mantidas em incubadora à temperatura de 37°C em atmosfera úmida de 95% de ar e 5% de CO<sub>2</sub>. Ao término do tratamento o meio de cultivo foi removido, as células foram lavadas três vezes com PBS gelado, removidas dos frascos de cultura através de raspagem com escova e centrifugadas a 150 x g por 10 min. O sobrenadante foi descartado e o *pellet* congelado à -70°C até o momento da análise.

Para realização da técnica, as amostras foram descongeladas e ressuspensas com reagente de extração de Hsp70 suplementado com *cocktail* inibidor de protease. As amostras foram mantidas durante 30 minutos no gelo com agitações periódicas e após, centrifugadas a 21.000 x g por 10 minutos em centrífuga refrigerada à 4°C. O sobrenadante (lisado celular) foi coletado e utilizado na análise para determinação do conteúdo de Hsp70.

Na placa de imunoensaio de Hsp70 foi pipetado 100 µL/*well* das amostras e dos padrões e incubado por 2 horas à temperatura ambiente. Após este período, a placa foi lavada 6 vezes com tampão de lavagem, adicionado 100 µL Anti-Hsp70:Biotina em cada *well*, e incubada por 1 hora à temperatura ambiente. A placa foi lavada novamente 6 vezes com tampão de lavagem, foi adicionado 100 µL de conjugado avidina-HRP a

cada well e incubado por 1 hora. Após lavar 6 vezes com tampão de lavagem, foi adicionado 100  $\mu$ L do substrato TMB a cada *well*, e incubado por 10 minutos à temperatura ambiente. Na etapa seguinte foi adicionado 100  $\mu$ L da solução de bloqueio a cada *well* e então a leitura foi realizada no leitor de placas Multiskan EX (Labsystems) a 450 nm.

### **III.8. ANÁLISE ESTATÍSTICA**

Os experimentos foram realizados pelo menos três vezes em triplicata. A análise estatística dos dados foi realizada de acordo com a situação apresentada, através do teste *t Student*, análise de variância (ANOVA de uma via) e comparações múltiplas de Tukey. Foram considerados significantes os resultados com  $p < 0,05$ . Os dados foram analisados através do programa estatístico SPSS.

### **III.9. LOCAL DE REALIZAÇÃO DOS ESTUDOS**

Os cultivos celulares e as análises experimentais foram realizadas no Centro de Pesquisas em Ciências Médicas (CPCM), Ulbra, Canoas.



## IV – RESULTADOS

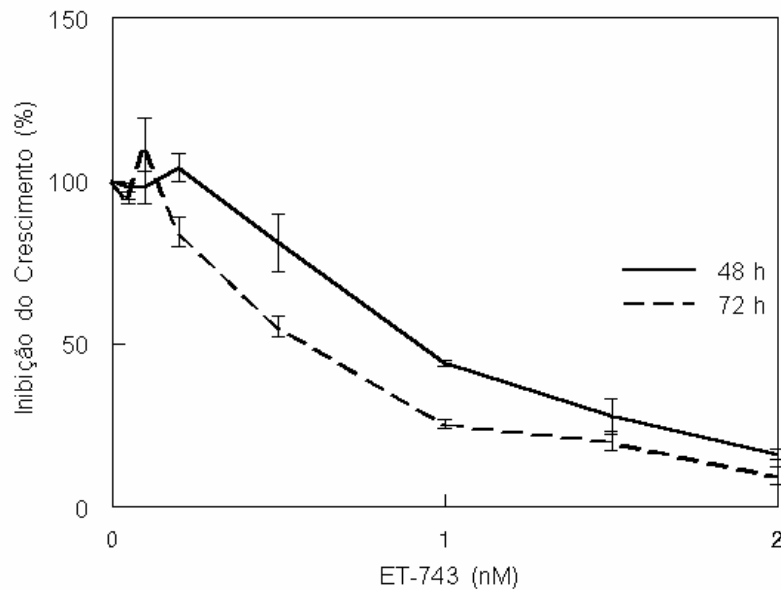
### IV.1. EFEITOS CITOTÓXICOS DA ET-743 SOBRE A PROLIFERAÇÃO CELULAR

Inicialmente, foram realizados ensaios colorimétricos através do método Sulforodamina B, com o objetivo de determinar as respectivas doses de ET-743 capazes de inibir 50% da proliferação celular ( $IC_{50}$ ), após 48 h e 72 h de tratamento.

Os resultados obtidos nestes experimentos demonstraram grande sensibilidade da linhagem celular U-251 MG à ET-743, sendo que os valores de  $IC_{50}$  foram aproximadamente 0,9 nM e 0,58 nM para 48 h e 72 h de exposição respectivamente, de acordo com a tabela e gráfico abaixo. Estas foram as doses de escolha para os experimentos posteriores.

**Tabela IV.1.** Valores de  $IC_{50}$  para a linhagem derivada de glioma maligno humano U-251 MG após 48 h e 72 h de exposição à ET-743.

Valores de $IC_{50}$	
ET-743 48 h (nM)	0,90 ± 0,01
ET-743 72 h (nM)	0,58 ± 0,05



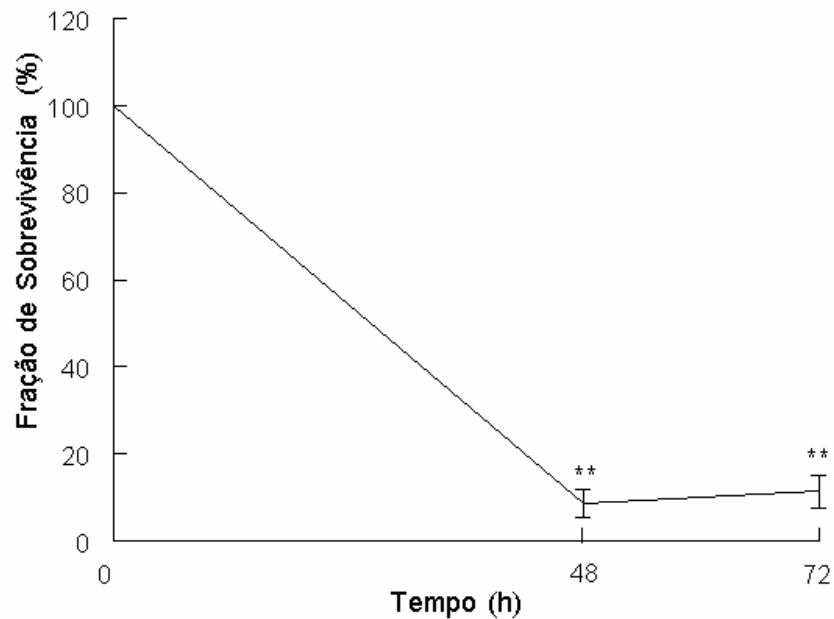
**Figura IV.1.** Efeitos citotóxicos da ET-743 sobre a linhagem celular U-251MG. Após 48 h e 72 h de exposição à ET-743 em concentrações de 0 a 2 nM, a inibição da proliferação celular foi determinada pelo método de SRB. Os resultados estão representados como média  $\pm$  DP de 4 experimentos independentes.

#### IV.2. EFEITO DA ET-743 SOBRE A FORMAÇÃO DE COLÔNIAS CELULARES

Para avaliar o efeito da ET-743 sobre o crescimento celular da linhagem em estudo, foi utilizado o ensaio clonogênico. Para isso, as células tratadas com 0,9 nM de ET-743 por 48h e 0,6 nM de ET-743 por 72 h, foram inoculadas (400 células/ *well*) em placas de 6 *wells* e cultivadas por 14 dias adicionais. A densidade celular foi escolhida de acordo com experimentos prévios realizados em nosso laboratório, os quais determinaram a eficiência de formação de colônias (EFC) para a linhagem U-251 MG, que representa a razão entre o número de colônias formadas pelo número de células inoculadas [Berens *et al.*, 1988].

Após este período, o número de colônias celulares foi quantificado, considerando aquelas com 50 células ou mais. Após, a fração de sobrevivência foi calculada a partir da razão entre o número de colônias no grupo de células tratadas e o número de colônias no grupo controle. Como pode ser observado na figura IV.2, houve acentuada

queda na fração de sobrevivência nas células tratadas por 48 h bem como nas tratadas por 72 h quando comparadas ao controle,  $p < 0,001$ . Entretanto, não houve diferença significativa na fração de sobrevivência entre os dois tipos de tratamento.



**Figura IV.2.** Curva de sobrevivência da linhagem U-251 MG após tratamento com ET-743. As células foram cultivadas por 14 dias adicionais após tratamento com 0,9 nM e 0,6 nM de ET-743 por 48 h e 72 h, respectivamente. Os dados são apresentados como fração de sobrevivência obtida a partir da razão do número de colônias tratadas pelo número de colônias não tratadas (controle) expresso em percentual, de 3 experimentos independentes. \*\* Valor considerado significativamente diferente do controle, para  $p < 0,001$ .

### IV.3. EFEITO DA ET-743 SOBRE A DISTRIBUIÇÃO DAS CÉLULAS NO CICLO CELULAR

Considerando que um dos efeitos da ET-743 descritos na literatura é sua interação com o DNA, e que em algumas linhagens celulares estudadas foi demonstrado alterações na distribuição das células no ciclo celular, investigamos o efeito da droga em estudo sobre a linhagem celular derivada de glioma humano U-251 MG através das análises de citometria de fluxo por coloração com iodeto de propídio.

Nestes experimentos as células foram tratadas com doses próximas ao valor de IC50 (0,1; 0,5; 1,0 e 1,5 nM) por 48 h e 72h, e após, analisadas através de citometria de fluxo. Conforme os dados apresentados nas tabelas IV.2 e IV.3 e no gráfico IV.3, nenhum efeito significativo foi observado nas células tratadas com 0,1 nM de ET-743 em ambos os tempos de tratamento. Entretanto, nas células tratadas com 0,5, 1,0 e 1,5 nM de ET-743 pode ser observado um acúmulo de células na fase G2M do ciclo celular, bem como um aumento da população celular sub-G1, a qual representa as células mortas, de modo proporcional ao aumento da dose.

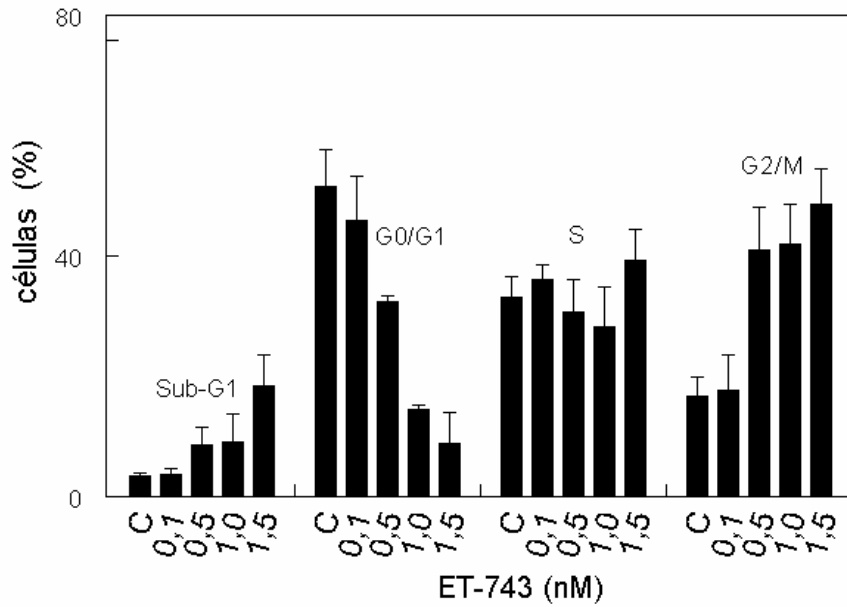
**Tabela IV.2.** Distribuição das células no ciclo celular após tratamento com ET-743 por 48 h e quantificação das células com conteúdo de DNA inferior a G1 (hipodiploidia). Os valores representam média  $\pm$  DP de 4 experimentos independentes. \*  $p < 0,05$  e \*\*  $p < 0,001$  em relação ao grupo controle.

Doses (nM)	<b>Fases do Ciclo Celular (%)</b>			
	G0/G1	S	G <sub>2</sub> M	Sub G1
Controle	51,7 $\pm$ 6,1	33,2 $\pm$ 3,2	16,7 $\pm$ 3,3	3,5 $\pm$ 0,5
0,1	46,0 $\pm$ 7,3	36,2 $\pm$ 2,3	17,6 $\pm$ 5,8	3,6 $\pm$ 0,9
0,5	32,5 $\pm$ 0,8**	30,8 $\pm$ 5,3	40,9 $\pm$ 7,1**	8,5 $\pm$ 2,9*
1,0	14,6 $\pm$ 0,7**	28,3 $\pm$ 6,5	41,9 $\pm$ 6,6**	9,1 $\pm$ 4,7*
1,5	8,8 $\pm$ 5,2**	39,4 $\pm$ 5,1	48,6 $\pm$ 5,8**	18,4 $\pm$ 5,2**

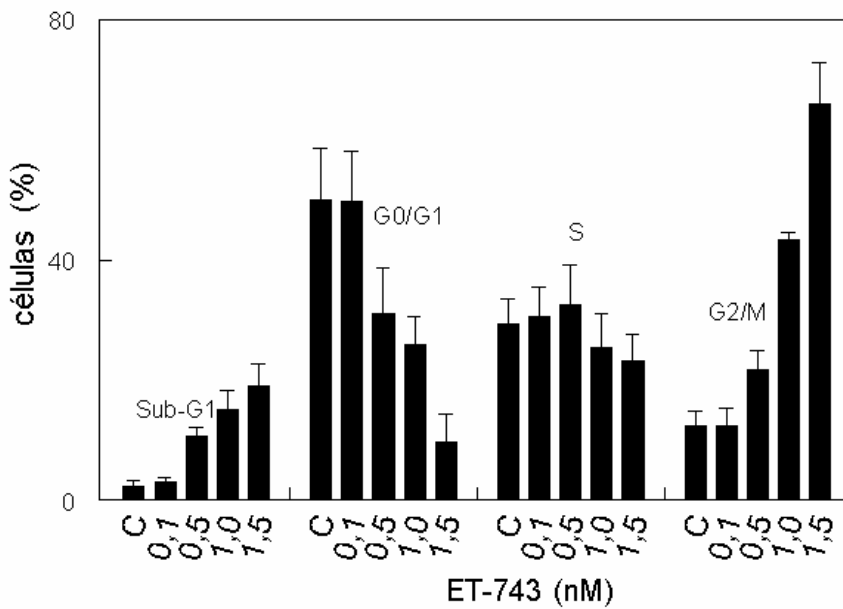
**Tabela IV.3.** Distribuição das células no ciclo celular após tratamento com ET-743 por 72 h e quantificação das células com conteúdo de DNA inferior a G1 (hipodiploidia). Os valores representam média  $\pm$  DP de 4 experimentos independentes. \*  $p < 0,05$  e \*\*  $p < 0,001$  em relação ao grupo controle.

Doses (nM)	<b>Fases do Ciclo Celular (%)</b>			
	G0/G1	S	G <sub>2</sub> M	Sub G1
Controle	49,9 $\pm$ 8,6	29,2 $\pm$ 4,2	12,2 $\pm$ 2,4	2,3 $\pm$ 0,8
0,1	49,6 $\pm$ 8,4	30,5 $\pm$ 5,0	12,4 $\pm$ 2,9	3,0 $\pm$ 0,7
0,5	30,9 $\pm$ 7,7*	32,5 $\pm$ 6,6	21,8 $\pm$ 3,2*	5,7 $\pm$ 1,5*
1,0	25,8 $\pm$ 4,7*	25,4 $\pm$ 5,5	43,2 $\pm$ 1,2**	10,5 $\pm$ 3,3*
1,5	9,6 $\pm$ 4,5**	23,2 $\pm$ 4,4	66,0 $\pm$ 6,8**	19,0 $\pm$ 3,7**

(A)



(B)



**Figura IV.3.** Distribuição das células nas fases do ciclo celular após tratamento com ET-743 com diferentes doses por 48h e 72 h. A proporção de células em cada fase do ciclo celular foi determinada através de citometria de fluxo. Os resultados estão expressos em média  $\pm$  DP de 4 experimentos independentes.

#### IV.4. EFEITO DA ET-743 SOBRE A INDUÇÃO DE APOPTOSE

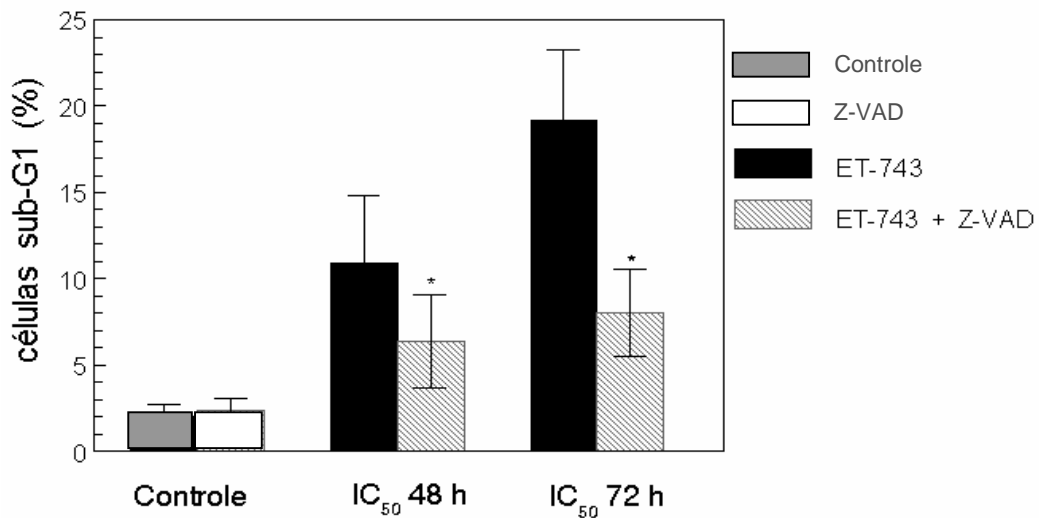
Como pode ser observado na figura IV.3, ET-743 aumenta significativamente a população sub-G1. Entretanto, através das análises de citometria de fluxo, não é possível discriminar células que sofreram morte por necrose das que morreram por apoptose.

Deste modo, resolvemos avaliar se o tipo de morte celular desencadeada pela ET-743 era devido à apoptose. Assim, as células derivadas da linhagem celular U-251 MG foram pré-tratadas com o inibidor geral de caspases z-VAD-fmk e imediatamente após, tratadas com a dose equivalente ao IC<sub>50</sub> de ET-743 por 48 h e 72 h. Após este período, as células foram analisadas através de citometria de fluxo.

A adição do inibidor de caspases z-VAD-fmk não alterou a distribuição das células nas fases do ciclo celular (dados não mostrados). Entretanto, diminuiu significativamente o percentual de células em sub-G1 conforme demonstrado na figura IV. 4.

**Tabela IV.4.** Efeito *in vitro* da ET-743 na presença ou ausência do inibidor de caspases z-VAD-fmk. Valores apresentados como média  $\pm$  DP, em porcentagem. \* Valor considerado significativamente diferente do grupo tratado apenas com ET-743, para  $p < 0,05$ .

	População de Células Sub-G1 (%)	
	48 h	72 h
Controle	1,5 $\pm$ 0,3	2,1 $\pm$ 0,7
z-VAD-fmk	1,6 $\pm$ 0,4	2,3 $\pm$ 0,8
ET-743	10,9 $\pm$ 3,9	19,2 $\pm$ 4,1
ET-743+z-VAD-fmk	6,5 $\pm$ 2,7*	8,0 $\pm$ 2,5*

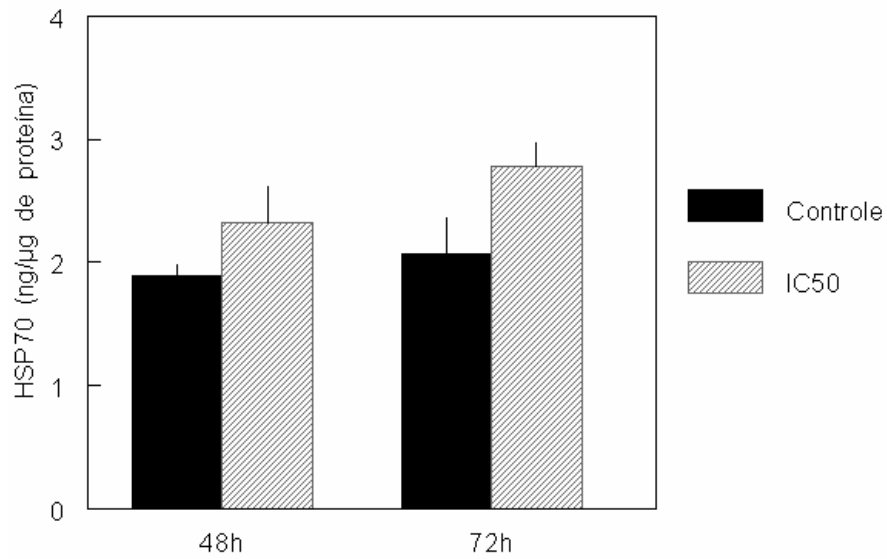


**Figura IV.4.** Envolvimento das caspases na morte celular promovida pela ET-743. Células da linhagem celular derivada de glioma humano U-251 MG foram tratadas com 0,9 nM e 0,6 nM de ET-743 por 48 h e 72 h, respectivamente, na presença ou ausência do inibidor de caspases z-VAD-fmk e analisadas através de citometria de fluxo. Os dados estão apresentados como média  $\pm$  DP de 4 experimentos independentes. \* Valor considerado significativamente diferente do grupo tratado apenas com ET-743, para  $p < 0,05$ .

#### IV.5. EFEITO DA ET-743 SOBRE O CONTEÚDO CELULAR DE HSP70

Hsp70 é a principal proteína chaperona induzida por estresse, a qual é abundantemente expressa em tumores humanos e linhagens celulares derivadas de tumores humanos [Ciocca *et al.*, 1993<sup>1</sup>; Ciocca *et al.*, 1993<sup>2</sup> Jäättelä, 1995; Hermisson *et al.*, 2000]. Sua alta expressão está freqüentemente relacionada a resistência à terapia anticâncer e pobre prognóstico [Hermisson *et al.*, 2000]. Desse modo, nós investigamos se o mecanismo de citotoxicidade da ET-743 sobre a linhagem celular derivada de glioma humano U-251 MG pode envolver alterações no conteúdo celular de Hsp70. Conforme demonstrado na figura IV.5, o tratamento com ET-743 não alterou significativamente os níveis de Hsp70.





**Figura IV.5.** Efeito da ET-743 sobre o conteúdo celular de Hsp70. As células derivadas da linhagem U-251 MG foram tratadas com 0,9 nM e 0,6 nM de ET-743 por 48 h e 72 h, respectivamente, e após o conteúdo celular de Hsp70 foi determinado. Nenhuma alteração significativa nos níveis de Hsp70 foi encontrada após tratamento com ET-743, em relação ao controle.

## V – DISCUSSÃO

Derivados de produtos naturais representam a maioria das drogas atualmente utilizadas na quimioterapia do câncer [Schwartzmann *et al.*, 2002]. Até meados de 1960, a investigação de produtos marinhos essencialmente inexistia. Entretanto, durante a última década, a importância de organismos marinhos como fonte de novas drogas anticâncer tem aumentado significativamente. Em 1995, segundo dados do NCI (*National Cancer Institute*), foi estimado que cerca de 4% dos extratos marinhos (principalmente animais) continham compostos antitumorais, quantidade equivalente às espécies terrestres (principalmente plantas) [Schwartzmann *et al.*, 2001].

A ET-743 é um dos primeiros compostos marinhos em desenvolvimento clínico para o tratamento do câncer. Apesar de seu mecanismo molecular de ação não estar completamente elucidado, tem sido demonstrado que a ET-743 forma aductos com o DNA ligando-se ao N2 da guanina através de suas subunidades A e B enquanto a subunidade C projeta-se para fora da dobra menor, fazendo contato limitado com o DNA, o que resulta no dobramento da hélice do DNA em direção à dobra maior [Pommier *et al.*, 1996; Zewail-Foote & Hurley, 1999].

Estas mudanças estruturais desencadeadas pela droga podem prejudicar o reconhecimento e a ligação de fatores de transcrição e proteínas ligantes da cromatina, conduzindo a alterações da expressão gênica [Minuzzo *et al.*, 2000]. O modo peculiar com que a ET-743 interage com o DNA, difere de outros agentes alquilantes o que pode ser uma explicação plausível para sua atividade observada tanto em modelos pré-clínicos quanto em ensaios clínicos em tumores não responsivos a drogas antineoplásicas atualmente utilizadas na clínica.

A ET-743 tem demonstrado potente atividade citotóxica *in vitro* e *in vivo* em uma

variedade de tumores incluindo melanoma, células não-pequenas de pulmão, carcinoma ovariano, renal, prostático e mamário [Valoti *et al.*, 1997; Izbicka, *et al.*, 1998; Hendriks *et al.*, 1999].

No presente estudo investigamos o efeito *in vitro* da ET-743 sobre a proliferação da linhagem celular derivada de glioma maligno humano U-251 MG, após exposição a concentrações clinicamente aceitáveis da droga (nM). Com o intuito de melhor entender as bases de sua atividade antiproliferativa, avaliamos alguns parâmetros que podem estar envolvidos no desempenho de sua atividade antitumoral, como inibição da formação de colônias celulares, distribuição das células nas fases do ciclo celular, indução de apoptose e determinação do conteúdo celular de Hsp70.

Com a realização do ensaio colorimétrico de citotoxicidade sulforodamina B (SRB), pode-se avaliar os efeitos imediatos da ET-743, bem como determinar os valores de IC<sub>50</sub> para a linhagem U-251 MG. Os resultados mostraram uma grande sensibilidade desta linhagem celular à ET-743.

Para avaliarmos o efeito tardio da droga, utilizamos o ensaio clonogênico no qual as células foram cultivadas por 14 dias adicionais, após o tratamento com ET-743. Através deste método, é possível demonstrar os efeitos da droga quando as células entram em processo de divisão, podendo, após vários ciclos mitóticos, ocorrer morte reprodutiva [Fornace *et al.*, 2001]. Os resultados apresentados como fração de sobrevivência, demonstram que as células apresentaram menos de 20% da sua capacidade de crescimento em ambos os tratamentos, o que reforça o perfil de sensibilidade desta linhagem aos efeitos tóxicos da ET-743.

Em nosso estudo, através de análises de citometria de fluxo, observamos que a partir da dose de 0,5 nM de ET-743, (aproximadamente metade da dose de IC<sub>50</sub> para 48 h de exposição) ocorre acúmulo das células na fase G<sub>2</sub>M do ciclo celular em ambos os tratamentos. Estes dados estão de acordo com trabalhos prévios mostrando que a ET-743, assim como outras drogas que interagem com o DNA, causa forte perturbação

no ciclo celular promovendo retardo na progressão de G1 para G2, inibição da síntese de DNA e acúmulo das células na fase G<sub>2</sub>M [Erba *et al.*, 2001].

Além disso, também pode ser observado um significativo aumento da população sub-G1 quando as doses a partir de 0,5 nM de ET-743 foram utilizadas. A população sub-G1 consiste em células que apresentam conteúdo de DNA inferior a 2n, o que caracteriza morte celular. Entretanto, através do método de citometria de fluxo não é possível determinar se a morte celular ocorre por necrose ou por apoptose.

Com o objetivo de investigar se a ET-743 promove morte celular através das vias apoptóticas, utilizamos o inibidor geral de caspases z-VAD-fmk. O modelo de inibidor de caspases utilizado neste trabalho indica a ocorrência de apoptose, sem detalhar o modo como ela acontece. Os resultados mostraram que o pré-tratamento com inibidor de caspases preveniu significativamente a morte celular promovida pela ET-743.

Nossos resultados corroboram com o estudo realizado por Gajate e colaboradores [2002] o qual sugeriu que, quando utilizada em concentrações de 1 – 10 ng/mL em células tumorais, a ET-743 provoca retardo na proliferação celular dependente da transcrição de proteínas, com acúmulo de células nas fases S e G<sub>2</sub>/M do ciclo celular com subsequente apoptose.

Neste mesmo estudo, também foi demonstrado o envolvimento da ativação das caspases na apoptose induzida pela ET-743 através da utilização do inibidor de caspases z-D-dbmK, o qual preveniu a apoptose induzida pela ET-743 nas linhagens HL-60 e HeLa. Adicionalmente, células derivadas da linhagem MCF-7, as quais são deficientes em caspase-3, não sofreram apoptose sob tratamento com ET-743. Estes dados em conjunto, suportam o envolvimento das caspases na morte celular induzida por ET-743.

Muitos trabalhos têm sido realizados no sentido de se compreender melhor os mecanismos envolvidos na resistência dos tumores ao tratamento antineoplásico. Neste

contexto, a superexpressão da proteína Hsp70 identificada em quase todos os tipos de tumores, tem sido comumente relacionada à resistência a terapias e ao pobre prognóstico [Jäättelä, 1999; Rocha *et al.*, 2004].

Modulações na expressão das Hsps podem ocorrer por diversas condições que desencadeiam a apoptose, o que está associado a vários estados patológicos, incluindo as neoplasias [Strik *et al.*, 2000]. Estas proteínas podem ser classificadas como uma classe de genes antiapoptóticos, capazes de diminuir a atividade das caspases. Além disso, também podem ser importantes mediadores de resistência a diversos estímulos apoptóticos [Hermisson *et al.*, 2000].

Durante a fase indutora, uma série de sinais direciona a via de morte celular programada através do balanço entre proteínas apoptóticas e antiapoptóticas, que determinam resistência ou suscetibilidade a apoptose [Jolly & Morimoto, 2000]. Portanto, o efeito antiapoptótico destas proteínas pode ocasionar resistência a esta importante via de morte celular.

A expressão das Hsps é regulada por fatores de transcrição (HSF) que se ligam a sítios específicos denominados elementos de choque térmico (HSE) em uma região promotora do gene que codifica a Hsp [Morimoto *et al.*, 1992]. Considerando que a ET-743 tem sido freqüentemente relatada como potente inibidor da transcrição de proteínas, e que a Hsp70 é a principal chaperona induzida por estresse a qual encontra-se abundantemente expressa em tumores malignos humanos e linhagens celulares derivadas de tumores humanos [Ciocca *et al.*, 1993<sup>1</sup>; Ciocca *et al.*, 1993<sup>2</sup>; Jäättelä, 1995; Hermisson *et al.*, 2000], nós investigamos se o mecanismo de citotoxicidade da ET-743 envolve alteração da expressão desta proteína.

Nossos resultados demonstraram que o tratamento *in vitro* com ET-743 nas doses capazes de inibir 50% da proliferação celular, não alterou significativamente o conteúdo celular de Hsp70 na linhagem celular derivada de glioma humano U-251MG. Estudos prévios tem demonstrado que a ET-743 difere de outros inibidores

transcricionais por sua capacidade de inibir a transcrição ativada e exercer mínimos efeitos sobre a transcrição não induzida [Friedman *et al.*, 2002], o que pode explicar a ausência de diminuição dos níveis celulares desta proteína após exposição à ET-743.

Sob condições de estresse, incluindo a presença de drogas citotóxicas, normalmente há ativação transcricional e aumento da expressão de Hsp70, como um essencial mecanismo de defesa celular, sendo que após o estímulo, os níveis de Hsp permanecem elevados acima dos valores basais por dias ou semanas dependendo do tipo celular [Sarto *et al.*, 2000].

Uma possível explicação para a inalteração dos níveis desta proteína observada após o tratamento com ET-743, é que a droga esteja afetando negativamente a transcrição ativada de Hsp70. Portanto, a falta deste mecanismo de proteção pode estar contribuindo para que a célula sofra apoptose.

Nossos achados são consistentes com o trabalho realizado por Minuzzo e colaboradores [2000] o qual demonstrou que, sob indução de calor, a ET-743 inibe *in vivo* a transcrição da proteína Hsp70, sugerindo que esta droga possui um específico efeito negativo na transcrição que não é compartilhado por outros agentes alquilantes da dobra menor do DNA.

Diversas evidências têm estabelecido que a Hsp70 desempenha múltiplos papéis na citoproteção contra a apoptose [Sarto *et al.*, 2000; Strik *et al.*, 2000; Hermisson *et al.*, 2000]. De fato, a depleção de Hsp70 por tecnologia anti-senso induz massiva morte celular semelhante à apoptose em células tumorais (mama, cólon, próstata e glioblastoma) [Nylandsted *et al.*, 2000; Gibbons *et al.*, 2000; Hwang *et al.*, 2003; Liu *et al.*, 1996] mas não em células epiteliais normais e embriogênicas [Wei *et al.*, 1995; Nylandsted *et al.*, 2000]. Adicionalmente, tem sido relatado que a apoptose induzida pelo fator de necrose tumoral  $\alpha$  (TNF- $\alpha$ ) pode ser prevenida pela alta expressão da Hsp70 [Jäättelä, 1992].

Por outro lado, em um estudo realizado em nosso laboratório, foi observado um aumento no conteúdo celular de Hsp70 na linhagem celular derivada de glioma humano radioresistente U-87 MG após tratamento com radiação, enquanto nenhuma alteração nos níveis celulares desta proteína foi observada nas linhagens radiosensíveis também derivadas de gliomas humanos, M059J e U-251MG, sugerindo que possivelmente o acúmulo de Hsp70 proteja a célula de sofrer apoptose [Rocha *et al.*, 2004].

A partir da observação de que o efeito primário da ecteinascidina 743 consiste na formação de adutos com o DNA, os resultados apresentados neste trabalho em conjunto com outros estudos prévios, conduzem-nos a sugerir que a falha no mecanismo citoprotetor da chaperona molecular induzida por estresse Hsp70, pelo menos em parte, está relacionada a citotoxicidade da ET-743, contribuindo na indução de apoptose.

O preciso mecanismo pelo qual a indução de Hsp70 promove citoproteção contra estímulos apoptóticos não está completamente elucidado. Entretanto, alguns estudos têm demonstrado que a Hsp70 está envolvida na regulação da via mitocondrial de apoptose [Takayama *et al.*, 2003; Zylitz *et al.*, 2001; Jolly & Morimoto, 2000]. Nesta via, sinais de morte celular induzem a liberação de citocromo *c* da mitocôndria, o qual se liga ao Apaf-1 induzindo oligomerização e recrutamento da procaspase-9. A formação do apoptossoma resulta na ativação da caspase-9, que por sua vez dispara a via das caspases [Saleh *et al.*, 2000]. De fato, a direta interação entre o Apaf-1 e a Hsp70 tem mostrado prevenir a formação do apoptossoma [Saleh *et al.*, 2000; Beere *et al.*, 2000]. Estas observações sugerem que as proteínas de choque térmico atuam anteriormente à ativação das caspases [Takayama *et al.*, 2003; Rocha *et al.*, 2004].

No entanto, a superexpressão de Hsp70 também pode inibir eventos dependentes de caspases que ocorrem em etapas mais avançadas da via apoptótica tais como ativação da fosfolipase citosólica A2 e alterações na morfologia nuclear. Desse modo, as Hsps também inibem eventos que ocorrem após a ativação das caspases [Rocha *et al.*, 2004].

Em conjunto, os resultados apresentados neste trabalho mostram que a ET-743 apresenta potente atividade antiproliferativa em linhagem celular de glioma humano, promovendo morte celular apoptótica, uma vez que esta foi significativamente prevenida através da utilização de inibidor de caspases. Contudo, não foi observado aumento significativo nos níveis de Hsp70 após tratamento com ET-743, sugerindo que a droga inibe a transcrição ativada desta proteína, o que pode contribuir para a sua citotoxicidade.

Estas observações podem ser úteis no desenvolvimento de novas estratégias terapêuticas para o tratamento de tumores resistentes às terapias convencionais, seja através de combinação de drogas ou simplesmente da modulação deste mecanismo de resistência (superexpressão de Hsp70). Entretanto, questões como o modo e o quanto esta proteína contribui para a citotoxicidade da ET-743, necessitam melhores investigações para serem respondidas.



## **VI – CONCLUSÕES**

### **VI.1. CONCLUSÃO GERAL**

Nossos resultados mostram que a ET-743 apresenta atividade antiproliferativa, promovendo acúmulo das células na fase G<sub>2</sub>M do ciclo celular e subsequente apoptose de maneira dose-dependente, sem que haja alteração nos níveis da proteína de choque térmico Hsp70.

### **VI.2. CONCLUSÕES ESPECÍFICAS**

Os resultados apresentados neste trabalho demonstram que a ET-743:

- a) promove inibição da proliferação celular na linhagem estudada, em doses entre 0,5 e 1,5 nM;
- b) inibe a formação de colônias celulares mantendo uma fração de sobrevivência inferior a 20% após tratamento por 48 h e 72 h;
- c) provoca acúmulo das células na fase G<sub>2</sub>M do ciclo celular e aumento da população sub-G1;
- d) desencadeia morte celular principalmente através da via de apoptose;
- e) não altera o conteúdo celular da proteína Hsp70.

## VI. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ADAMS, J. M. and CORY, S. The Bcl-2 protein family: arbiters of cell survival. *Science*. 281: 1322-1326, 1998.

AGARWAL, M. L.; TAYLOR, W. R.; CHERNOV, M. V.; CHERNOVA, O. B.; STARK, G. R. The p53 network. *The Journal of Biological Chemistry*. 273: 1-4, 1998.

ALBERTS, B.; JOHNSON, A.; LEWIS, J.; FAFF, M.; ROBERTS, K.; WALTER, P. *Molecular Biology of the Cell*. 4 ed. New York: Garland Science, 2002.

AUNE, G. J.; FURUTA, T.; POMMIER, Y. Ecteinascidin 743: a novel anticancer drug with a unique mechanism of action. *Anti-cancer Drugs*. 13: 545-555, 2002.

BEEERE, H. M.; WOLF, B. B.; CAIN, K.; MOSSER, D. D.; MAHBOUBI, A.; KUWANA, T.; TAILOR, T.; MORIMOTO, R. I.; COHEN, G. M.; GREEN, D. R. Heat shock protein 70 inhibits apoptosis by preventing recruitment of procaspase-9 to the Apaf-1 apoptosome. *Nature Cell Biology*. 2: 469-475, 2000.

BEHIN, A.; HOANG-XUAN, K.; CARPENTIER, A. F.; DELATTRE, J. Y. Primary brain tumours in adults. *Lancet*. 361: 323-331, 2003.

BERENS, M. E.; GIBLIN, J. R.; DOUGHERTY, D. V.; HOIFODT, H. K.; TVEIT, K., ROSENBLUM, M. L. Comparison of *in vitro* cloning assay for drugs sensitivity testing of human brain tumours. *British Journal of Neurosurgery*. 2: 227-234, 1988.

BOTTURI, M.; FARISELLI, L. Clinical results of unconventional fractionation radiotherapy in central nervous system tumours. *Tumori*. 84: 76-87, 1998.

BRANDES, A. A.; PASETTO, L. M.; MONFARDINI, S. New Drugs in Recurrent High Grade Gliomas. *Anticancer Research*. 20: 1913-1920, 2000.

BROWN, P. D. and GIAVAZZI, R. Matrix metalloproteinase inhibition: a review of anti-tumor activity. *Annals of Oncology*. 6: 967-974, 1997.

BROWN, J. M. and WOUNTERS, B. G. Apoptosis, p53, and Tumor Cell Sensitivity to Anticancer Agents. *Cancer Research*. 59: 1391-1399, 1999.

CAMPOS, L.; ROUAULT, J. P.; SABIDO, O; ORIOL, P.; ROUBI, N.; VASSELON, C.; ARCHIMBAUD, E.; MAGAUD, J. P.; GUYOTAT, D. High expression of Bcl-2 in acute myeloid leukemia cells is associated with poor response to chemotherapy. *Blood*. 81: 3091-3096, 1993.

CHEN, H. C.; GUH, J. Y.; TSAI, J. H.; LAI, Y. H. Induction of heat shock protein 70 protects mesangial cells against oxidative injury. *Kidney International*. 56: 1270-1273, 1999.

CIOCCA<sup>1</sup>, D. R.; CLARK, G. M.; TANTON, A. K.; FUQUA, S. A. W.; WELCH, W. J.; MCGUIRE, W.L. Heat Shock Protein HSP70 in Patients with Axillary Lymph Node-Negative Breast Cancer: Prognostic Implications. *Journal of the National Cancer Institute*. 85: 570-573, 1993.

CIOCCA<sup>2</sup>, D. R.; OESTERREICH, S.; CHAMNESS, G. C; MCGUIRE, W.L.; FUQUA, S. A. W. Biological and Clinical Implications of Heat Shock Protein 27.000 HSP27: A Review. *Journal of the National Cancer Institute*. 85: 1558-1566, 1993.

COTRAN, R. S.; KUMAR, V.; TUCKER, C. Patologia Celular I: Lesão e Morte da Célula. In: Cotran, R. S.; Kumar, V.; Tucker, C. S. *Robbins. Patologia Estrutural e Funcional*. 6 ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan. P. 233-295, 2000.

COREY, E. J.; GIN, D. Y.; KANIA, R. S. Enantioselective total synthesis of ecteinascidin 743. *Journal of the American Chemical Society*. 118: 9202-9203, 1996.

CUEVAS, C.; PÉREZ, M.; MARTIN, M. J.; CHICHARRO, J. L.; FERNANDEZ-RIVAS, C.; FLORES, M.; FRANCESCH, A.; GALLEGO, P.; ZARZUELO, M.; DE LA CALLE, F.; GARCIA, J.; POLANCO, C.; RODRIGUEZ, I.; MANZANARES, I. Synthesis of ecteinascidin (ET-743) and phthalascidin (Pt-650) from cyanosafracin B. *Organic Letters*. 2:2545-2548, 2000.

CVETKOVIC, R. S.; FIGGITT, D. P.; PLOSKER, G. L.; Ecteinascidin-743. *Drugs*. 62:1185-1192, 2002.

DAMIA, G.; SILVESTRI, S.; CARRASSA, L.; FILIBERTI, L.; FAIRCLOTH, G.; LIBERI, G.; FOIANI, M.; D'INDALCI, M. Unique pattern os ET-743 activity in different cellular systems with defined deficiencies in DNA-repair pathways. *International Journal of Cancer*. 92: 583-588, 2001.

D'INCALCI, M.; ERBA, E.; DAMIA, G.; GALLIERA, E.; CARRASSA, L.; MARCHINI, S.; MANTOVANI, R.; TOGNON, G.; FRUSCIO, R.; JIMENO, J.; FAIRCLOTH, G. Unique features of the mode action of ET-743. *The Oncologist*. 7:210-216, 2002.

ERBA, E.; BERGAMASCHI, D.; BASSANO, L.; DAMIA, G.; RONZONI, S.; FAIRCLOTH, G. T.; D'INDALCI, M. Ecteinascidin-743 (ET-743), a natural marine compound, with a unique mechanism of action. *European Journal of Cancer*. 37:97-105, 2001.

FERREIRA, C. G.; EPPING, M.; KRUYT, F. A. E.; GIACCONE, G. Apoptosis: Target of Cancer Therapy. *Clinical Cancer Research*. 8: 2024- 2034, 2002.

FOLKMAN, J. Tumor angiogenesis and tissue factor. *Nature Medicine*. 2: 167-168, 1996.

FORNACE, A. J. Jr.; FUCKS, Z.; WEICHSELBAUM, R. R.; MILAS, L. Radiation Therapy. In: Mendelsohn, J.; Howley, P. M.; Israel, M. A.; Liotta, L. A. *The Molecular Basis of Cancer*. 2. ed. Philadelphia: W. B. Saunders Company. p. 423-454, 2001.

FRIEDMAN, D.; HU, Z.; KOLB, E. A.; GORFAJN, B.; SCOTTO, K. W. Ecteinascidin-743 Inhibits Activated but not Constitutive Transcription. *Cancer Research*. 62: 3377-3381, 2002.

GAJATE, C.; AN, F.; MOLLINEDO, F.; Differential cytostatic and apoptotic effects of ecteinascidin-743 in cancer cells. *The Journal of Biological Chemistry*. 277: 41580-41589, 2002.

GARCIA-ROCHA, M.; GARCIA-GRAVALOS, M. D.; AVILA, J. Characterization of antimitotic products from marine organisms that disorganise the microtubule network: ecteinascidin 743, isohomohalichondrin-B and LL-15. *British Journal of Cancer*. 73:875-883, 1996.

GIBBONS, N. B.; WATSON, R. W.; COFFEY, R. N. T.; BRADY, H. P. and FITZPATRICK, J. M. Heat-shock proteins inhibit induction of prostate cancer cell apoptosis. *Prostate*. 45: 58-65, 2000.

GIROLAMI, U.; ANTHONHY, D. C.; FROSH, M. P. O Sistema Nervoso Central. In: Cotran, R. S.; Kumar, V.; Tucker, C. *Robbins Patologia Estrutural e Funcional*. 6 ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan. P. 1155-1211, 2000.

GRIFFITHS, B. Scaling-up of animal cell cultures. In: FRESHNEY RI ed. *Animal cell culture: A practical approach*. 2 ed., New York: IRL Press, 47-93, 1992.

HENDRIKS, H. R.; FIEBIG, H. H.; GIVAZZI, R.; LANGDON, SP.; JIMENO, J. M.; FAIRCLOTH, G. T. High antitumor activity of ET-743 against human tumor xenografts

from melanoma, non-small-cell lung and ovarian cancer. *Annals Oncology*. 10: 1233-1240, 1999.

HERMISSON, M.; STRIK, H.; RIEGER, J.; DICHGANS, J.; MEYERMANN, R.; WELLER, M. Expression of functional activity of heat shock proteins in human glioblastom multiforme. *Neurology*. 54: 1357-1365, 2000.

HERR, I. and DEBATIN, K. M. Cellular stress response and apoptosis in cancer therapy. *Blood*. 98: 2603-2614, 2001.

HWANG, T. S.; HAN, H. S.; CHOI, H. K.; LEE, Y. J.; KIM, Y.; HAN, M. and PARK, Y. Differential, stage-dependent expression of Hsp70, Hsp110 and Bcl-2 in colorectal cancer. *Journal of Gastroenterology and Hepatology*. 18: 690-700, 2003.

IZBICKA, E.; LAWRENCE, R.; RAYMOND, E.; ECKHARDT, G.; FAIRCLOTH, G.; JIMENO, J.; CLARK, G.; VON HOFF, D. D. In vitro antitumor of the novel marine agent, ecteinascidin-743 (ET743, NSC-648766) against human tumors explanted from patients. *Annals Oncology*. 9: 981-987, 1998.

JÄÄTTELÄ, M.; WISSING, D.; BAUER, P. A.; LI, G. C. Major heat shock protein hsp70 protects tumor cells from tumor necrosis factor cytotoxicity. *The EMBO Journal*. 11: 3507-3512, 1992.

JÄÄTTELÄ, M. Overexpression of Hsp70 confers tumorigenicity to mouse fibrosarcoma cells. *International Journal of Cancer*. 60: 689-693, 1995.

JÄÄTTELÄ, M. Heat shock proteins as cellular lifeguards. *Annals of Medicine*. 31: 261-271, 1999.

JIMENO, J. M.; FAIRCLOTH, G.; CAMERON, L.; MEELY, K.; VEGA, E.; GOMEZ, A.; FERNANDEZ SOUSA-FARO, J. M.; RINEHART, K. Progress in the acquisition of new

marine-derived anticancer compounds: development of ecteinascidin-743 (ET-743). *Drugs Future*. 21: 1155-1165, 1996.

JIN, S.; GORFAJN, B.; FAIRCLOTH, G.; SCOTTO, K. W. Ecteinascidin 743, a transcription-targeted chemotherapeutic that inhibits MDR1 activation. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the USA*. 97: 6775-6779, 2000.

JOLLY, C. and MORIMOTO, R. Role of the Heat Shock Response and Molecular Chaperones in Oncogenesis and Cell Death. *Journal of the National Cancer Institute*. 92: 1564-1572, 2000.

KERR, L. F.; WYLLIE, A. H.; CURRIE, A.R. Apoptosis: A basic biological phenomenon with wide-ranging implications in tissue kinetics. *British Journal of Cancer*. 26: 239, 1972.

KLEIHUES, P.; CAVENEE, W. K. Pathology and genetics of tumours of the nervous system. Lyon: IARC Press, 2000.

LEGLER, J. M.; GLOECKLER RIES, L. A.; SMITH, M. A.; et al. Brain and other central nervous system cancers: recent trends in incidence and mortality. *Journal of the National Cancer Institute*. 91: 2050-2051, 1999.

LEVIN, V. A.; LEIBEL, S. A.; GUTIN, P. H. Neoplasms of the Central Nervous System. In: DEVITA, Jr. V. T.; Hellman, S.; Rosemberg, A. S. (eds). *Cancer: Principles and Practice of Oncology*. 5ed. Philadelphia: Lippincott-Raven. p. 2022-2082, 1997.

LIU, F. F.; MILLER, N.; LEVIN, W.; ZANKE, B.; COOPER, B.; HENRY, M.; SHERAR, M. D.; PINTILIE, M.; HUNT, J. W. and HILL, R. P. The potential role of Hsp70 as an indicator of response to radiation and hyperthermia treatments for recurrent breast cancer. *International Journal of Hyperthermia*. 12: 197-208, 1996.

LOUIS, D. N.; HOLLAND, E. R.; CAIRNCROSS, J. G. Glioma classification. A molecular Reappraisal. *American Journal of Pathology*. 159: 779-786, 2001.

MARTINEZ, E. J.; OWA, T.; SCHREIBER, S. L.; COREY, E. J. Phthalascidin, a synthetic antitumor agent with potency and mode of action comparable to ecteinascidin 743. *Chemistry*. 96: 3496-3501, 1999.

MARTINEZ, E. J.; COREY, E. J. A new, more efficient, and effective process for the synthesis of a key pentacyclic intermediate for production of ecteinascidin and phthalascidin antitumor agents. *Organic Letters*. 2: 993-996, 2000.

MINUZZO, M.; MARCHINI, S.; BROGGINI, M.; FAIRCLOTH, G.; D'INCALCI, M.; MANTOVANI, R. Interference of transcriptional activation by the antineoplastic drug ecteinascidin-743. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the USA*. 97: 6780-6784, 2000.

MINN, A. J.; RUDIN, C. M.; BOISE, L. H.; THOMSON, C. B. Expression of Bcl-2 can confer a multidrug resistance phenotype. *Blood*. 86: 1903-1910. 1995.

MOORE, I. I.; SEAMAN, F. C.; HURLEY, L. H. NMR-based model of an ecteinascidin 743-DNA adduct. *Journal of the American Chemical Society*. 119: 5475-5476, 1997.

MORIMOTO, R.; SARGE, K. D.; ABRAVAYA, K. Transcriptional regulation of heat shock genes. A paradigm for inducible genomic responses. *The Journal of Biological Chemistry*. 267: 21987-21990, 1992.

NAGANE, M.; ASAI, A.; SHIBUI, S.; OYAMA, H.; NOMURA, K.; KUCHINO, Y. Expression pattern of chemoresistance-related genes in human malignant brain tumors: a working knowledge for proper selection of anticancer drugs. *Japanese Journal of Clinical Oncology*. 29: 527-534, 1999.



NEWCOMB, E. W.; BHALLA, S. K.; PARRISH, C. L.; HAYES, R. L.; COHEN, H.; MILLER, D. C. Bcl-2 expression in astrocytomas in relation to patient survival and p53 status. *Acta Neuropathologica*. 94: 369-375, 1997.

NYLANDSTED, J.; ROHDE, J. M.; BRAND, K.; BASTHOLM, L.; ELLING, F.; JÄÄTTELÄ, M. Selective depletion of heat shock protein 70 (Hsp70) activates a tumor-specific death program that is independent of caspases and bypasses Bcl-2. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the USA*. 97: 7871-7876, 2000.

NYLANDSTED, J.; WICK, W.; HIRT, U. A.; BRAND, K.; ROHDE, J. M.; LEIST, M.; WELLER, M.; JÄÄTTELÄ, M. Erradication of Glioblastoma, and Breast and Colon Carcinoma Xenografts by Hsp70 Depletion. *Cancer Research*. 62: 7139-7142, 2002.

OSBORNE, R. H.; M. P. W. A.; TIJSSEN, C. C.; COEBERGH, J. W. W.; VAN DUIJN, C. M. The genetic epidemiology of glioma. *Neurology*. 57: 1751-1755, 2001.

POMMIER, Y.; KOHLHAGEN, G.; BAILLY, C.; WARING, M.; MAZUMBER, A.; KOHN, K. W. DNA sequence- and structure-selective alkylation of guanine N2 in the DNA minor groove by ecteinascidin 743, a potent antitumor compound from the caribbean tunicate *Ecteinascidia turbinata*. *Biochemistry*. 35: 13303-13309, 1996.

REED, J. C.; MIYASHITA, T.; TAKAYAMA, S.; WANG, H. G.; HANADA, M. Bcl-2 family proteins: regulators of cell death involved in the pathogenesis of cancer and resistance to therapy. *Journal of Cellular Biochemistry*. 60: 23-32, 1996.

REED, J. C. Mechanisms of apoptosis. *American Journal of Pathology*. 157: 1415-1430, 2000.

RINEHART, K. L.; HOLT, T. G.; FREGEAU, N. L.; STROH, J.G.; KEIFER, P. A.; SUN, F.; LI, L. H.; MARTIN, D. G. Potent antitumor agents from the Caribbean tunicate *Ecteinascidia turbinata*. *The Journal of Organic Chemistry*. 55: 4512- 4515, 1990.

RITOSSA, F. A new puffing pattern induced by temperature shock and DNP in *Drosophila*. *Experientia*. 18: 571-573, 1962.

ROCHA, A. B.; MANS, D. R. A.; REGNER, A; SCHWARTSMANN, G. Targeting protein kinase C : New therapeutic opportunities against high-grade malignant gliomas? *The Oncologist*. 7: 17-33, 2002.

ROCHA, A. B.; REGNER, A; GRIVICICH, I.; SCHUNEMANN, D. P.; DIEHL, C.; KOVALESKI, G.; FARIAS, C. B.; MONDADORI, E.; ALMEIDA, L.; FILHO, A. B.; SCHWARTSMANN, G. Radioresistance is associated to increase Hsp70 content in human glioblastoma cell lines. *International Journal of Oncology*. 25: 777-785, 2004.

ROKUTAN, K.; HIRAKAWA, T.; TESHIMA, S.; NAKANO, Y.; MIYOSHI, M.; KAWAI, T.; KONDA, E.; MORINAGA, H.; NIKAWA, T.; KISHI, K. Implications of heat shock / stress protein for medicine and disease. *The Journal of Medical Investigation*. 44: 137-146, 1998.

RUBIN, E.; FARBER, J. L. Neoplasia. In: Rubin, E.; Farber, J. L. *Pathology*. 3 ed. Philadelphia: Lippincott Raven. 155-211, 1999.

SAKAI, R.; JARES-ERIJMAN, E.; MANZANARES, I.; SILVA ELIPE, M. V.; RINEHART, K. L. Ecteinascidins: putative biosynthetic precursors and absolute stereochemistry. *Journal of the American Chemical Society*. 118: 9017-9023, 1996.

SAKAI, R.; RINEHART, K. L.; GUAN, Y.; WANG, A. H. J. Additional antitumor ecteinascidins from a Caribbean tunicate: Crystal structures and activities *in vivo*. *Chemistry*. 89:11456-11460, 1992.

SALEH, A.; SRINIVASULA, S. M.; BALKIR, L.; ROBBINS, P. D.; ALNEMRI, E. S. Negative regulation of the Apaf-1 apoptosome by Hsp70. *Nature Cell Biology*. 2: 476-483, 2000.

SARTO, C.; BINZ, P. A.; MOCARELLI, P. Heat shock proteins in human cancer. *Electrophoresis*. 21: 1218-1226, 2000.

SEAMAN, F. C.; HURLEY, H. Molecular basis for the DNA sequence selectivity of ecteinascidin 736 and 743: evidence for the dominant role of direct readout via hydrogen bonding. *Journal of the American Chemical Society*. 120: 13028-13041, 1998.

SKEHAN, P.; STORENG, R.; MONKS, A.; MCMAHON, J.; VISTICA, D.; WARREN, J. T.; BOKESCH, H.; KENNY, S.; BOYD, M. R. New Colorimetric Cytotoxicity assay for anticancer drug screening. *Journal of National Cancer Institute*. 82: 1107-1112, 1990.

STELLER, H. Mechanisms and genes of cellular suicide. *Science*. 267: 1445-1449, 1995.

STEWART, B. W. Mechanisms of apoptosis: integration of genetic, biochemical, and cellular indicators. *Journal of National Cancer Institute*. 86: 1286- 1296. 1994.

SCHWARTSMANN, G.; ROCHA A. B.; BERLINCK, R.G.; JIMENO, J. Marine organisms as a source of new anticancer agents. *The Lancet Oncology*. 2 :221-225, 2001.

SCHWARTSMANN, G.; RATAIN, M. J.; CRAGG, G. M.; WONG, J. E.; SAIJO, N. PARKINSON, D. R.; FUJIWARA, Y.; PAZDUR, R.; NEWMAN, D. J.; DAGHER, R.; DI LEONE, L. Anticancer drug discovery and development throughout the world. *Journal of Clinical Oncology*. 15;20 (18 Suppl):47S-59S, 2002.

SCHWARTSMANN, G.; ROCHA, A.B.; MATTEI, J.; LOPES, R. Marine-derived anticancer agents in clinical trials. *Expert Opinion on Investigational Drugs*.12 :1367-1383, 2003.

SOARES, D. G.; POLETTO, N. P.; BONATTO, D.; SALVADOR, M.; SCHWARTSMANN, G.; HENRIQUES, J. A. P. Low cytotoxicity of Ecteinascidin 743 in yeast lacking the

major endonucleolytic enzymes of base and nucleotide excision repair pathways. *Biochemical pharmacology*, In Press.

STRIK, H. M.; WELER, M.; FRANK, B.; HERMISSON, M.; DEININGER, M. H.; DICHGANS, J; MEYERMANN, R. Heat shock protein expression in human gliomas. *Anticancer Research*. 20: 4457-4462, 2000.

TAKAHASHI, J. A.; SUZUI, H.; YASUDA, Y. ITO, N.; OHTA, M.; JAYE, M.; FUKUMOTO, M.; ODA, Y.; KIKUCHI, H.; HATANAKA, M. Gene expression of fibroblast growth factor receptors in the tissues os human gliomas and meningiomas. *Biochemical and Biophysical Research Communications*. 177: 1-7, 1991.

TAKAYAMA, S.; REED, J. C.; HOMMA, S. Heat-shock proteins as regulators of apoptosis. *Oncogene*. 22: 9041-9047, 2003.

TAKEBAYASHI, Y.; POURQUIER, P.; YOSHIDA, A.; KOHLHAGEM , G.; POMMIER, Y. Poisoning of human DNA topoisomerase I by ecteinascidin 743, an anticancer drug that selectively alkylates DNA in the minor groove. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the USA*. 96: 7196-7201, 1999.

TAKEBAYASHI, Y.; POURQUIER, P.; ZIMINJIC, D. B.; NAKAYAMA, K.; EMMERT, S.; UEDA, T.; URASAKI, Y.; KANZAKI, A.; AKIYUAMA, S. I.; POPESCU, N.; KRAEMER, K. H.; POMMIER, Y. Antiproliferative activity of ecteinascidin 743 is dependent upon trancription-coupled nucleotide-excision repair. *Nature Medicine*. 7: 967-966, 2001.

TAKEBAYASHI, Y.; GOLDWASSER, F.; URASAKI, Y.; KOHLHAGEM, G.; POMMIER, Y. Ecteinascidin 743 induces protein-linked DNA breaks in human colon carcinoma HCT116 cells and is cytotoxic independently of topoisomerase I expression. *Clinical Cancer Research*. 7: 185-191, 2001.

VALOTI, G.; NICOLETTI, M. I.; PELLEGRINO, A.; JIMENO, J.; HENDRIKS, H.; D'INCALCI, M.; FAIRCLOTH, G.; GIAVAZZI, R. Ecteinascidin-743, a new marine natural product with potent antitumor active on human ovarian carcinoma xenografts. *Clinical Cancer Research*. 4: 1977-1983, 1998.

VAN KESTEREN, C. H.; VOOGHT, M. M. M.; LÓPEZ-LÁZARO, L.; MATHÔT, R. A. A.; SCHELLENE, J. H. M.; JIMENO, J. M.; BEIJNEN, J. H. Yondelis<sup>®</sup> (trabectin, ET-743): the development of an anticancer agent of marine origin. *Anti-Cancer Drugs*. 14; 487-502, 2003.

VAUX, D. L.; STRASSER, A. The molecular biology of apoptosis. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the USA*. 93: 2239-2244, 1996.

VIVES, K. P.; PIEPMEIER, J. M. Complications and expected outcome of glioma surgery. *Journal of Neurooncology*. 42: 289-302, 1999.

WATANABE, K.; TACHIBANA, O.; SATO, K.; YONEKAWA, Y.; KLEIHUES, P.; OHGAKI, H. Overexpression of the EGF receptor and p53 mutations are mutually exclusive in the evolution of primary and secondary glioblastomas. *Brain Pathology*. 6: 217-223, 1996.

WATANABE, K.; SATO, K.; BIERNAT, W.; TACHIBANA, O.; VON AMMON, K.; OGATA, N.; YONEKAWA, Y.; KLEIHUES, P.; OHGAKI, H. Incidence and timing of p53 mutations during astrocytoma progression in patients with multiple biopsies. *Clinical Cancer Research*. 3: 523-530, 1997.

WEI, Y.; ZHAO, X.; KARIYA, Y.; TESHIGAWARA, K.; UCHIDA, A. Inhibition of proliferation and induction of apoptosis by abrogation of heat-shock protein (HSP) expression in tumour cells. *Cancer Immunology, Immunotherapy*. 40: 73-78, 1995.

WEINBERG, R. A. How cancer arises. *Scientific American*. 275: 32-40, 1996.

ZEWAIL-FOOTE M.; HURLEY, L. H. Ecteinascidin 743: a minor groove alkylator that bends DNA toward the major groove. *Journal of Medicinal Chemistry*. 42: 2493-2497, 1999.

ZEWAIL-FOOTE M.; HURLEY, L. H. Differential rates of reversibility of ecteinascidin 743-DNA covalent adducts from different sequences lead to migration to favored bonding sites. *Journal of the American Chemical Society*. 123: 6485-6495, 2001.

ZHANG, L.; YU, J.; PARK, B. H.; KINZLER, K. W.; VOGELSTEIN, B. Role of Bax in the apoptotic response to anticancer agents. *Science*. 290: 989-992, 2000.

ZHANG, Y.; ZHAO, W.; ZHANG, H. J.; DOMANN, F. E.; OBERLEY, L. W. Overexpression of copper zinc superoxide dismutase suppresses human glioma cell growth. *Clinical Cancer Research*. 62: 1205 – 1212, 2002.

ZYLICZ, M.; KING, F. W.; WAWRZYNOW, A. Hsp70 interactions with the p53 tumour suppressor protein. *The EMBO Journal*. 20: 4634-4638, 2001.