

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

LIDIANE VASCONCELOS DO NASCIMENTO CARVALHO

**Avaliação proteômica diferencial dos mecanismos de ação de novos agentes
antineoplásicos em células leucêmicas resistentes à quimioterapia**

Recife
2016

LIDIANE VASCONCELOS DO NASCIMENTO CARVALHO

Avaliação proteômica diferencial dos mecanismos de ação de novos agentes antineoplásicos em células leucêmicas resistentes à quimioterapia

Dissertação de Mestrado apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Inovação Terapêutica da Universidade Federal de Pernambuco, para a obtenção do Título de Mestre em Inovação Terapêutica.

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

Co-orientadoras: Profa. Dra. Patrícia Maria Guedes Paiva

Profa. Dra. Maira Galdino da Rocha Pitta

Recife

2016

UNIVERSIDADE FEDERAL DE PERNAMBUCO

Programa de Pós-Graduação em Inovação Terapêutica

REITOR

Prof. Dr. Anísio Brasileiro de Freitas Dourado

VICE-REITOR

Profa. Dra. Florisbela de Arruda Câmara e Siqueira Campos

PRÓ-REITOR(A) PARA ASSUNTOS DE PESQUISA E PÓS-GRADUAÇÃO

Prof. Dr. Ernani Rodrigues de Carvalho Neto

DIRETORA DO CENTRO DE BIOCÊNCIAS

Profa. Dra. Maria Eduarda Lacerda de Larrazábal

VICE- DIRETORA DO CENTRO DE BIOCÊNCIAS

Profa. Dra. Oliane Maria Correia Magalhães

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

Profa. Dra. Maira Galdino da Rocha Pitta

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

Prof. Dr. Luiz Alberto Lira Soares

Catálogo na fonte
Rafaela Mello
CRB 2122

Carvalho, Lidianne Vasconcelos do Nascimento

Avaliação proteômica diferencial dos mecanismos de ação de novos agentes antineoplásicos em células leucêmicas resistentes à quimioterapia / Lidianne Vasconcelos do Nascimento Carvalho - Recife: O Autor, 2016.

68 folhas: il., fig.

Orientador: Moacyr Jesus Barreto de Melo Rêgo.

Coorientadores: Patrícia Maria Guedes Paiva

Maira Galdino da Rocha Pitta

Dissertação (mestrado) – Universidade Federal de Pernambuco.

Centro de Biociências. Inovação Terapêutica, 2016.

Inclui referências.

1. Quimioterapia 2. Resistência tumoral 3. Oxazolidinas I. Moacyr Jesus Barreto de Melo Rêgo (orientador) II. Patrícia Maria Guedes Paiva (coorientador) III. Maira Galdino da Rocha Pitta (coorientador) IV. Título

615.58

CDD (22.ed.)

UFPE/CB-2017-248

FOLHA DE APROVAÇÃO

Nome: CARVALHO, Lidianne Vasconcelos do Nascimento.

Título: Avaliação proteômica diferencial dos mecanismos de ação de novos agentes antineoplásicos em células leucêmicas resistentes à quimioterapia.

Dissertação apresentada à Universidade Federal de Pernambuco para obtenção do título de Mestre em Inovação Terapêutica

Aprovada em: 12/ 08 /2016.

BANCA EXAMINADORA

Profa. Dra. Marcela Silvestre Outtes Wanderley

Instituição: Universidade de Pernambuco

Assinatura:_____

Profa. Dra. Márcia Vanusa da Silva

Instituição: Universidade Federal de Pernambuco

Assinatura:_____

Prof. Dr. César Augusto Souza de Andrade

Instituição: Universidade Federal de Pernambuco

Assinatura:_____

AGRADECIMENTOS

Ao final de mais um ciclo gostaria de agradecer primeiramente a nosso bom Deus. A certeza de sua presença em minha vida e proteção tem mostrado o quanto eu sou abençoada. Mesmo que em diversos momentos eu tenha duvidado, percebi que ‘Tudo tem o seu tempo determinado, e há tempo para todo o propósito debaixo do céu’ Eclesiastes 3:1.

À minha mãe, que é e sempre será o motivo maior do meu empenho. À senhora meu mais pleno agradecimento por toda sua criação, esforço e cuidado. Agradeço por todas as vezes que seu acalento me ensinou as melhores lições da vida. Obrigada por tudo que és e por tudo que eu desejo ser para agradá-la.

Agradeço também a pessoa que está comigo em todos os momentos, que faz minha caminhada mais leve e meu sorriso mais sincero. Meu muito obrigado ao meu companheiro, Pedro. A pessoa que escolheu estar, viver e lutar comigo nessa caminhada chamada vida. Obrigada pela sua paciência e estímulo, amo você.

Ao professor Moacyr Rêgo agradeço imensamente a confiança, disposição e ajuda. Obrigada pelo orientador que és e pelo amigo que se tornou. Sua presença na minha vida é fonte de inspiração. Agradeço por todas as vezes que me lembrou, mesmo sem perceber, a pessoa que me tornei e a profissional que posso ser.

Obrigada aos colegas de laboratório, pela ajuda na execução das técnicas. Agradeço as professoras Maira e Michelly pela oportunidade e auxílio na condução desse e de outros trabalhos.

Aos integrantes do laboratório de células Tronco do Instituto Nacional do Câncer pela paciência em me ensinar e pela maravilhosa experiência, agradeço. Agradeço também a professora Patrícia Guedes Paiva, Thiago Napoleão e a Thâmarah Albuquerque por toda ajuda.

Aos amigos que a vida me presenteou que mesmo distantes se fizeram presentes. Em especial a Manuelle, Larissa e Neto que em todas as conversas faziam questão de dizer que eu iria conseguir, mesmo quando eu mesma duvidava disso. Saibam que sua amizade me faz muito bem.

Às melhores “piores” pessoas que fazem meu dia de trabalho ser lindo e produtivo. Obrigada por todo o interesse e carinho sinceros. Obrigada por todos os momentos que compartilhamos, por todas as discussões científicas e da vida. Vocês são a prova que pessoas diferentes podem fazer dos problemas e sonhos dos outros, os seus. Eu precisaria de muitas palavras, linhas e espaços reservados para agradecimento, a fim de mostrar o quanto cada um foi importante nessa conquista.

Por fim, todas as pessoas que tive oportunidade de conhecer nessa linda caminhada e que vou levar pra sempre, Muito obrigada!

RESUMO

CARVALHO, LIDIANE. Avaliação proteômica diferencial dos mecanismos de ação de novos agentes antineoplásicos em células leucêmicas resistentes à quimioterapia. 2016. Dissertação de Mestrado. Universidade Federal de Pernambuco, Recife, Pernambuco, Brasil.

O câncer é uma doença que representa um grave problema de saúde pública em todas as nações do mundo, sua incidência tem aumentado devido à crescente exposição da população a fatores de risco e ao aumento da expectativa de vida. A quimioterapia é a modalidade de tratamento mais empregada, pois possui a vantagem de atuar de forma sistêmica. No entanto, sabe-se que a grande maioria dos agentes quimioterápicos não age exclusivamente em células tumorais, podendo levar a diferentes graus de toxicidade em células normais. Ademais, células neoplásicas adquirem a capacidade de se tornarem resistentes a vários quimioterápicos diminuindo a eficácia do tratamento, a qualidade de vida e a perspectiva de cura dos pacientes. Nesse sentido, a presente proposta teve como finalidade a elucidação do mecanismo de ação de um novo agente antineoplásico por meio da análise proteômica na linhagem leucêmica resistente, HL60/MX1. As oxazolidinas e seus derivados já possuem diversas atividades descritas na literatura entre elas potencial ação antineoplásica. No estudo foi utilizado o derivado oxazolidinico LPSF-NB-3 que em um estudo anterior do grupo apresentou ação na referida linhagem. Inicialmente buscou-se confirmar a toxicidade do novo derivado em células saudáveis e na linhagem resistente. LPSF-NB-3 não foi tóxico em células mononucleares do sangue periférico (PBMC) na maior dose testada (100 μ M) e apresentou valor de IC₅₀ de 56,33 μ M na linhagem HL60/MX1. Diante dos resultados, foi realizada cultura celular para elucidação do mecanismo de ação pela análise proteômica. Após 48 horas de tratamento, foi realizada a extração de proteínas com tampão de lise celular e inibidor de proteases e a amostra foi submetida à abordagem proteômica *gel free* e *label free* utilizando cromatografia bidimensional acoplada à espectrometria de massas (nanoUPLC). Após o processamento dos dados brutos utilizando o programa *Protein Lynks Global Sever*, foi possível identificar um total de 2.650 proteínas. Em nossa análise somente foram consideradas as proteínas identificadas em todas as replicatas experimentais, bem como as que apresentaram modulação de mais que duas vezes. Com isso, após utilizarmos este filtro, 634 proteínas, de fato, foram analisadas com a ferramenta Expression^E. Dentro do universo de proteínas consideradas para a análise quantitativa com os critérios estabelecidos, 262 estavam diferencialmente expressas, sendo 146 com expressão aumentada e 116 com expressão diminuída na amostra tratada com o derivado quando comparadas com o controle. As proteínas identificadas foram analisadas no programa MetaCore™ para que as principais funções e vias de sinalização alteradas pudessem ser identificadas. Dentre os principais processos biológicos diferencialmente expressos, destacam-se processos envolvendo regulação do citoesqueleto, dano ao DNA, transdução de sinais celulares e processos envolvendo crescimento celular e sua manutenção. Duas vias moduladas receberam destaque em nossa análise, são elas: a via de sinalização AKT e vias do sistema imune. Essa última pôde ser validada pela técnica de ELISA que evidenciou a capacidade do derivado em diminuir a expressão de IFN- γ de forma significativa ($p < 0.01$) nas doses de 50 e 100 μ M e de outras citocinas inflamatórias importantes no contexto tumoral, indicando assim seu provável mecanismo de ação.

Palavras-chave: Oxazolidinas. Resistência tumoral. Mecanismo de ação. *Label free*. *Gel free*.

ABSTRACT

CARVALHO, LIDIANE. Differential proteomics evaluation of mechanisms action of new anticancer agents in leukemia cells resistant to chemotherapy. 2016. Universidade Federal de Pernambuco, Recife, Pernambuco, Brazil.

Cancer represents a serious public health problem in every nation of the world. Its incidence has increased due growing population exposure to risk factors and life expectancy. Chemotherapy is more used as treatment because it acts systemically. However, it is known that most chemotherapeutic agents don't kill only tumor cells, leading to different degrees of normal cells toxicity. In addition, neoplastic cells can become resistant to chemotherapy reducing treatment success, quality of life and chance of cure. Therefore, this proposal aimed to elucidate the mechanism of action of a new antineoplastic agent in resistant leukemic strain (HL60 / MX1) by proteomic analysis. Oxazolidines and their derivatives have several activities described on literature including antineoplastic potential. LPSF-NB-3 is an oxazolidine derivative that presented antineoplastic activity on HL-60 / MX1 cells in an earlier study. Initially we aimed to confirm toxicity in healthy cells and in this resistant strain. LPSF-NB-3 was non-toxic in peripheral blood mononuclear cells (PBMC) at the highest tested dose (100 μ M) and presented IC₅₀ value of 56.33 μ M in HL60 / MX1 strain. Cell culture was performed to elucidate the mechanism of action by proteomic analysis. After 48 hours of treatment, a protein extraction with cellular lysis buffer and protease inhibitor was performed and sample was applied to proteomic approach gel free and label free using two-dimensional chromatography coupled to mass spectrometry (nanoUPLC). Protein Lynks Global Server program processed data and identified 2,650 proteins. In this analysis were only considered proteins identified in all experimental replicates, such as those modulated more than two times. After using this filter, 634 proteins were analyzed by Expression E tool. Within the universe of proteins considered by quantitative analysis with the established criteria, 262 were differentially expressed, being 146 increased and 116 decreased in the sample treated with the derivative when compared to control. The identified proteins were analyzed by MetaCore™ to identify changes in main functions and signaling pathways. Among the biological processes differentially expressed are those involving cytoskeletal regulation, DNA damage, cell signal transduction and cell growth and its maintenance. Two modulated pathways were highlighted in our analysis: an AKT signaling pathway and immune system pathways. The last one was validated by ELISA showing derivative capacity to reduce important inflammatory cytokines in tumor context IFN- γ decreasing was statistically significant ($P < 0.01$) at 50 and 100 μ M doses] indicating its probable mechanism of action.

Keywords: Resistance. Oxazolidines. Tumor resistance; Mechanism of action. *Label free. Gel free.*

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1	Capacidades Biológicas do Câncer	17
Figura 2	Fatores de risco para incidência de câncer	18
Figura 3	Distribuição proporcional dos dez tipos de câncer mais incidentes estimados para 2016 por sexo, exceto pele não melanoma no Nordeste	19
Figura 4	Esquema do envolvimento da glicoproteína P na mediação da resistência aos medicamentos	21
Figura 5	Esquema da maturação do sistema hematopoetico	22
Figura 6	Fase do ciclo celular na qual agem algumas classes de quimioterápicos	25
Figura 7	Estrutura química da oxazolidinas	27
Figura 8	Técnica proteômica gel free label free	30
Gráfico 1	Total de gastos hospitalares com pacientes portadores de leucemia	24

ARTIGO

Figure 1	Structure of derivative 5-(4-cloro-benzilideno)-3-etil-2-tioxo-oxazolidin-4-ona (LPSF-NB-3)	39
Figure 2	(A) 2D-chromatographic distribution of cell lines samples. For control HL60/MX1 and cell line treated with NB-3. (B) Coefficient of variation plots of exact mass retention time (EMRT) for the triplicates both conditions. (C) Peptide match distribution of the identified peptides	43
Figure 3	Distribution of proteins between the control sample (HL60/MX1) and treated (LPSF-NB-3)	44
Figure 4	Biological processes listed are those statistically most relevant using the Metacore Analysis	45
Figure 5	Via Immune response antigen presentation by MHC class I and regulation of T cell function by CTLA-4	46
Figure 6	Effects of oxazolidine derivative LPSF/NB-3 in pro-inflammatory cytokine IFN- γ levels in peripheral blood mononuclear cells (PBMC)	47
Figure 7	Effects of oxazolidine derivative LPSF-NB-3 in IL-6 (A), IL-17 (B) and IL-22 (C) pro-inflammatory cytokines and anti-inflammatory cytokine IL-10 (D) levels in peripheral blood mononuclear cells (PBMC)	48

LISTA DE ABREVIACÕES E SIGLAS

ATCC	<i>American Type Culture Cell</i>
ATP	Trifosfato de adenosina
DMSO	Dimetilsulfóxido ou sulfóxido de dimetilo
DTT	Ditiotreitol
FDA	Food and Drug Administration
HDMS	Espectometria de massas de alta resolução
IARC	<i>International Agency for Research</i>
IC ₅₀	Concentração inibitória máxima para inibir 50%
IEF	Focalização isoeletrica
IFN- γ	Interferon gama
INCA	Instituto Nacional do Câncer
IL-6	Interleucina 6
IL-17	Interleucina 17
IL-22	Interleucina 22
IL-10	Interleucina 10
IONO	Ionicina
IS	Índice de Seletividade
ISPOR	<i>International Society for Pharmacoeconomics</i>
IV	Infravermelho
kDa	Quilodaltons
LC/MS	Cromatografia líquida acoplada a espectrometria de massas
LINAT	Laboratório de imunomodulações e novas abordagens terapêuticas
LPSF	Laboratório de Síntese e Planejamento de Fármacos
MDR	Resistência a Múltiplas Drogas
MHCI	Complexo de Histocompatibilidade maior do tipo I
MTT	3-(4,5-dimetil-2-tiazol)-2,5-difenil-2-H-brometo de tetrazolium
MP	Metilprednisolona
NUPIT	Núcleo de pesquisa em Inovação Terapêutica
OMS	Organização Mundial de Saúde
PBMC	Células mononucleadas do sangue periférico
PI	Ponto isoeletrico

PI3K	Do inglês, Phosphoinositide 3-kinase
PMA	Forbol 12-Miristato 13-Acetato
Pgp	Glicoproteína P de membrana
PPAR γ	Receptor Ativado da Proliferação de Peroxissomo
PVDF	Fluoreto de polivinilideno
SDS-PAGE	Dodecil sulfato de sódio de poliacrilamida
TCLE	Termo de Consentimento Livre e Esclarecido
TOF	Do ingles Time of flight (tempo de voo)
WHO	Do inglês World Health Organization

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	13
2 OBJETIVOS	15
2.1 GERAL	15
2.2 ESPECÍFICO	15
3 REVISÃO DA LITERATURA.....	16
3.1 CÂNCER.....	16
3.1.1 <i>Visão geral</i>	16
3.1.2 <i>Incidência e Tratamento do câncer</i>	19
3.2 LEUCEMIAS	22
3.3 QUIMIOTERÁPICOS E ALVOS TERAPÊUTICOS	25
3.4 OXAZOLIDINAS	26
3.5 PROTEÔMICA.....	28
4 MÉTODOS	32
4.1 AGENTE ANTINEOPLÁSICO.....	32
4.2 LINHAGEM E CULTIVO CELULAR.....	32
4.3 TESTES DE SELETIVIDADE E CITOTOXICIDADE	32
4.4 EXTRAÇÃO PROTEICA E DIGESTÃO TRÍPTICA.....	33
4.5 QUANTIFICAÇÃO PROTEICA <i>LABEL-FREE</i> POR ESPECTOMETRIA DE MASSAS	34
4.6 PESQUISA DE BANCO DE DADOS.....	34
4.7 AVALIAÇÃO DE CITOCINAS	35
5 RESULTADOS	36
5.1 ARTIGO.....	36
6 DISCUSSÃO	54
7 CONCLUSÕES	57
9 REFERÊNCIAS	58

1 INTRODUÇÃO

Câncer, também chamado de neoplasia ou tumor maligno, é o conjunto de doenças caracterizadas pelo crescimento descontrolado de células transformadas (GLOBOCAN, 2012). Segundo o instituto Oncoguia, existem quase 200 tipos de neoplasias que correspondem aos vários sistemas de células do corpo, os quais se diferenciam pela capacidade de invadir tecidos e órgãos, vizinhos ou distantes. Um dos principais problemas relacionado à doença é a resposta ao tratamento. As principais formas utilizadas atualmente envolvem cirurgia, quimioterapia e radioterapia as quais são usadas em conjunto, variando apenas quanto à importância em cada caso e a ordem de sua indicação (SHEWACH; KUCHTA, 2009). A combinação dessas terapias têm resultado na diminuição da mortalidade e da morbidade (SAWADA et al., 2016).

A maioria de mortes causadas por câncer se dá principalmente por dois fatores: falta de diagnóstico precoce e insucesso no tratamento. O primeiro só pode ser sanado com a realização rotineira de exames, avaliação clínica periódica e acompanhamento dos casos de risco. Já o segundo fator, abrange diversas facetas da terapia. O conhecimento acerca do mecanismo de ação das drogas administradas durante a quimioterapia são componentes fundamentais para eficácia da terapêutica e isso impulsiona a busca por alternativas mais efetivas que garantam maior sucesso para o paciente e melhor qualidade de vida (SMITH et al., 2013; GUPTA et al., 2014).

A quimioterapia é a forma de tratamento mais empregado, pois possui a vantagem de atuar de forma local, mas também de se distribuir por todos os locais do corpo. O objetivo primário da quimioterapia é destruir as células neoplásicas, preservando as normais. Entretanto, sabe-se que a maioria dos agentes quimioterápicos utilizados atualmente na prática clínica não atua de forma específica, lesando tanto células malignas quanto as não transformadas levando a diferentes graus de toxicidade (ALMEIDA et al., 2005; SHANG et al., 2011; LEYVA-PERALTA et al., 2015). Muitos compostos vêm sendo utilizados na prática clínica principalmente na associação com mais de um fármaco, uma vez que, com frequência, o câncer desenvolve resistência à terapia (CHEN et al., 2012).

Entre estes compostos estão os agentes citotóxicos clássicos que agem diretamente no DNA e podem ser subdivididos de acordo com o mecanismo de ação: agentes intercalantes, agentes alquilantes, agentes inibidores da topoisomerase I e II, dentre outros (CRUZ, 2013). Os problemas associados ao uso desses medicamentos tais como efeitos colaterais, resistência e baixa biodisponibilidade, têm estimulado a busca por modificações estruturais que levem a

uma melhor atividade e menor toxicidade associada (KETRON et al., 2012; BUONDONNO et al., 2016).

O desenvolvimento de novos agentes antitumorais, particularmente aqueles com modos de ação até então inexplorados, é fortemente defendida porque ainda não há nenhum tratamento eficaz para muitos tipos de câncer e o número de pacientes oncológicos continua a aumentar com o envelhecimento da população do mundo (KOJIMA, 2015). Diversas substâncias sintéticas são obtidas a partir de derivações de anéis heterocíclicos e são alvos de vários estudos, com ação antimicrobiana, anti-inflamatória e antitumoral. Dentre as quais, destacam-se as oxazolidinas devido à sua potencialidade como protótipos para o desenvolvimento de novos fármacos (OLIVEIRA et al., 2013).

Apesar de muitas moléculas apresentarem alvos preferenciais, a maioria das drogas anticâncer alteram vias de sinalização celular. Assim, torna-se essencial o conhecimento acerca das vias celulares que são ativadas e inibidas por novas moléculas candidatas a fármacos, pois elas podem ser inseridas em um determinado esquema terapêutico de acordo com seu mecanismo de ação. Particularmente, no caso de novas moléculas desenvolvidas para tratar células resistentes à quimioterapia convencional, o estudo do mecanismo de ação se torna ainda mais relevante, pois indica as vias de resistência que a nova molécula é capaz de inibir ou desviar. Nesse sentido a presente proposta visa avaliar por meio da análise proteômica, os mecanismos de ação de um novo derivado anticâncer em células leucêmicas resistentes a quimioterapia.

2 OBJETIVOS

2.1 Geral

Avaliar os mecanismos de ação utilizando a técnica proteômica de um novo derivado oxazlidinico candidato a fármaco anticâncer em células leucêmicas resistentes a quimioterapia.

2.2 Específico

- Avaliar a citotoxicidade das novas moléculas frente à linhagem leucêmica resistente, HL60-MX1 bem como sua seletividade em células humanas mononucleares do sangue periférico;
- Investigar as proteínas e vias celulares que são positivamente e negativamente moduladas pelo derivado através de análise proteômica;
- Validar os resultados obtidos na proteômica por meio da técnica de ELISA.

3 REVISÃO DA LITERATURA

3.1 CÂNCER

3.1.1 Visão geral

O corpo humano é formado por milhares de células que funcionam de forma ordenada propiciando a manutenção da homeostasia. Para que essa ordem seja mantida faz-se necessário que as células dupliquem seus componentes sob um processo celular autorregulado. O processo de regulação do ciclo celular é efetuado basicamente, pela ação de proteínas-chave que quando estimuladas formam uma rede intra e extracelular complexa, que coordena não apenas a proliferação, mas também a diferenciação e a morte celular. Algumas células, porém, podem escapar desse processo regulatório, crescendo e se dividindo descontroladamente (BORGES-OSÓRIO & ROBINSON 2013).

A mudança que culmina no crescimento desregulado chama-se carcinogênese e resulta nas neoplasias. A definição mais utilizada até hoje para esse termo foi dada pelo oncologista britânico Rupert Allan Willis em 1948. Segundo ele: “neoplasia é a massa anormal de tecidos, cujo crescimento excede aquele dos tecidos normais e não está coordenado com ele, persistindo da mesma maneira excessiva após o término do estímulo que induziu a alteração”. Atualmente, a definição de câncer refere-se ao termo neoplasia, como sendo o conjunto de doenças que têm em comum o crescimento desordenado de células que eventualmente invadem os tecidos e órgãos, podendo espalhar-se para outras regiões do corpo (INCA 2016).

As neoplasias são consideradas uma das maiores causas de morbidade e mortalidade no mundo, ficando atrás apenas das doenças cardiovasculares. Com aproximadamente 596 mil novos casos esperados, sendo cerca de 295.200 em homens e 300.870 entre as mulheres no ano de 2016 (WHO, 2014). A estimativa mundial realizada em 2012, pelo projeto Globocan, apontou que 60% das neoplasias ocorreram em países em desenvolvimento. Quando se trata de mortalidade, a situação agrava-se, pois dos 8 milhões de óbitos previstos, 70% ocorreram nesses mesmos países. No Brasil, a estimativa do biênio 2016-2017 do Instituto Nacional do Câncer, aponta a ocorrência de 600 mil novos casos de câncer. O número de novos casos deverá aumentar em cerca de 70% ao longo das próximas duas décadas e o de mortes deve subir de 8,2 milhões para 13 milhões no mesmo período (INCA 2016).

Diante do grande número de ocorrência, gravidade e sua complexidade o câncer é certamente muito mais que uma proliferação de células malignas e não pode ser entendido sem englobar seu microambiente tumoral. Para isso, foram propostas capacidades biológicas

ou “determinantes” para seu desenvolvimento, progressão, agressividade e resistência chamadas, no inglês, de “*Hallmarks do câncer*” (Figura 1). Essas capacidades foram identificadas e divididas inicialmente em seis: insensibilidade a sinais de inibição de crescimento, evasão da morte celular programada, potencial de replicação ilimitado, angiogênese sustentada, invasão de tecidos e metástase (HANAHAH; WEINBERG, 2011).

Figura 1- Capacidades Biológicas do Câncer.



Fonte: Adaptado de Hanahan e Weinberg, 2011, p 658.

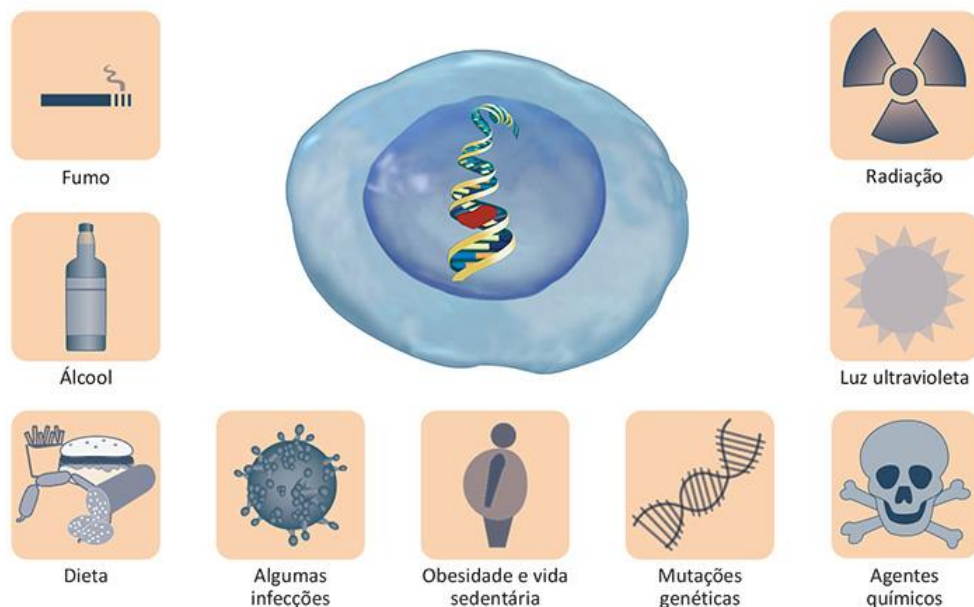
Mais recentemente, outras capacidades biológicas foram caracterizadas e incluídas nesta lista, expandindo o papel funcional para a biologia do tumor. Neles, torna-se claro que o desenvolvimento tumoral está alicerçado em outras novas características, sendo a primeira as instabilidades genômicas, que geram mutações aleatórias e aberrações cromossômicas que potencialmente conduzem a progressão do tumor (STATZ et al., 2017). Há também o envolvimento do estado inflamatório das lesões pré-malignas. Já é sabido que o correto funcionamento do sistema imune é capaz de promover uma maior e mais efetiva resposta antitumoral, erradicando os tumores primários e as possíveis lesões metastáticas. O escape

desse sistema promovido pelas células neoplásicas permite e até mesmo promove a progressão tumoral (LINCH; MICHAEL; WILLIAM, 2015).

O metabolismo energético celular vem sendo alvo de diversos estudos, pois a maioria das células neoplásicas substituem o programa metabólico que opera nos tecidos normais por outro que possa ser mais benéfico para sua sobrevivência (NEGRINI et al., 2010, LUO et al., 2009; COLOTTA et al., 2009). Essa última característica reconhecida por Otto Warburg, consiste na transformação das células malignas associada com um aumento da taxa de importação intracelular de glicose, uma maior taxa de glicólise associado com a redução da oxidação do piruvato e aumento da produção de ácido láctico, dentre outras características. Essa reprogramação do metabolismo permite a sobrevivência de células neoplásicas sob condições adversas dentre elas a hipóxia, culminando em sua proliferação, progressão, invasividade, e subseqüentes metástases à distância (WALLACE, 2012).

Todas essas capacidades quando reunidas facilitam o desenvolvimento, progressão e manutenção das muitas neoplasias existentes. Além desses, há também os fatores extrínsecos, tais como: abuso de álcool, uso de tabaco, má alimentação e sedentarismo. Aproximadamente 80% dos casos de câncer estão relacionados a fatores externos, podendo, em algum nível, ser evitados. Assim, fica claro que o processo de adoecimento por câncer possui relação direta com fatores tanto físicos, químicos quanto biológicos (Figura 2) (WHO, 2010).

Figura 2. Fatores de risco para incidência de câncer.



Fonte: <http://maisacaomenoscancer.org.br/wp-content/uploads/2014/07/FATORES-DE-RSCO>.
Acessado em 10 de Agosto de 2016.

3.1.2 Incidência e Tratamento do câncer

De acordo com estimativas mundiais da Agência Internacional para Pesquisa em Câncer (Iarc, do inglês *International Agency for Research on Cancer*), da Organização Mundial da Saúde (OMS), a incidência de câncer continuará aumentando nos países em desenvolvimento e crescerá ainda mais em países desenvolvidos se medidas preventivas não forem amplamente aplicadas.

O câncer de pele do tipo não melanoma será o mais incidente na população brasileira. Excluindo estes, em homens, os tipos mais incidentes serão os cânceres de próstata, pulmão, cólon e reto, estômago e cavidade oral; e, nas mulheres, os de mama, cólon e reto, colo do útero, pulmão e glândula tireoide, panorama comum a todos as regiões do Brasil inclusive no Nordeste (Figura 3). Entre crianças e adolescentes de 1 a 19 anos, o câncer já representa a primeira causa de morte (7% do total), sendo as leucemias o tipo de câncer mais comum, responsáveis pela morte de 34,5% de pacientes (INCA, 2016).

Ainda segundo o INCA, até 2030 os gastos com o tratamento de pessoas doentes em função de algum tipo de câncer provavelmente chegarão a US\$ 8 bilhões. A assistência à saúde da população é um problema enfrentado por vários países. Nos últimos anos, tem crescido a necessidade de estudos que permitam avaliar o impacto econômico de ações em saúde em cada região (BÓCOLI et al., 2013).

Figura 3. Distribuição proporcional dos dez tipos de câncer mais incidentes estimados para 2016 por sexo, exceto pele não melanoma no Nordeste.

Localização primária	casos novos	%	Homens	Mulheres	Localização primária	casos novos	%
Próstata	14.290	27,1%			Mama Feminina	11.190	20,5%
Estômago	2.940	5,6%			Colo do Útero	5.630	10,3%
Traqueia, Brônquio e Pulmão	2.690	5,1%			Cólon e Reto	2.530	4,6%
Cólon e Reto	1.940	3,7%			Traqueia, Brônquio e Pulmão	2.100	3,9%
Cavidade Oral	1.880	3,6%			Estômago	1.940	3,6%
Laringe	1.430	2,7%			Glândula Tireoide	1.810	3,3%
Esôfago	1.340	2,5%			Ovário	1.420	2,6%
Sistema Nervoso Central	1.260	2,4%			Corpo do Útero	1.320	2,4%
Leucemias	1.210	2,3%			Cavidade Oral	1.190	2,2%
Linfoma não Hodgkin	1.010	1,9%			Leucemias	1.070	2,0%

Fonte: INCA, 2016.

O tratamento do câncer pode ser realizado mediante várias modalidades terapêuticas dependendo do tipo e localização do tumor. Tem como objetivo agir no tumor primário, nas células neoplásicas circulantes, nas metástases, diminuir a possibilidade de recorrência, aumentar as taxas de cura e de sobrevida e melhorar a qualidade de vida do paciente

(BONASSA, 2005). As modalidades terapêuticas mais usadas são a quimioterapia, radioterapia, cirurgia, hormonioterapia e imunoterapia, que podem ser utilizadas combinadas ou não.

A quimioterapia sistêmica é o tratamento mais empregado, pois possui a vantagem de se distribuir por todos os locais do corpo. Consiste no emprego de substâncias químicas, isoladas ou em combinação, com o objetivo de tratar os tumores malignos. As medicações utilizadas nessa terapia interferem, muitas vezes, no processo de divisão e crescimento celular. Justamente por esse motivo, sua ação não se dá exclusivamente em células tumorais, podendo levar a diferentes graus de toxicidade em células não transformadas (SHEWACH & KUCHTA, 2009).

A principal dificuldade do tratamento do câncer e por consequência, efeito adverso da quimioterapia, se dá pelo fato das células neoplásicas e normais guardarem semelhanças genéticas. Embora as primeiras possuam uma ou mais mutações que afetam a divisão celular e contribuam para a gênese do tumor as células normais partilham com elas o mesmo DNA e vias metabólicas. Assim, os compostos quimioterápicos tradicionais que atacam a replicação do DNA ou a divisão celular de uma célula tumoral também atacam uma célula em divisão normal, resultando em graves efeitos colaterais, tais como toxicidade da medula óssea, gastrointestinais, pulmonares, cardíacos, hepáticos, neurológicos, renais, disfunções reprodutivas e alterações metabólicas (SHEWACH; KUCHTA, 2009; ANDRADE et al., 2012).

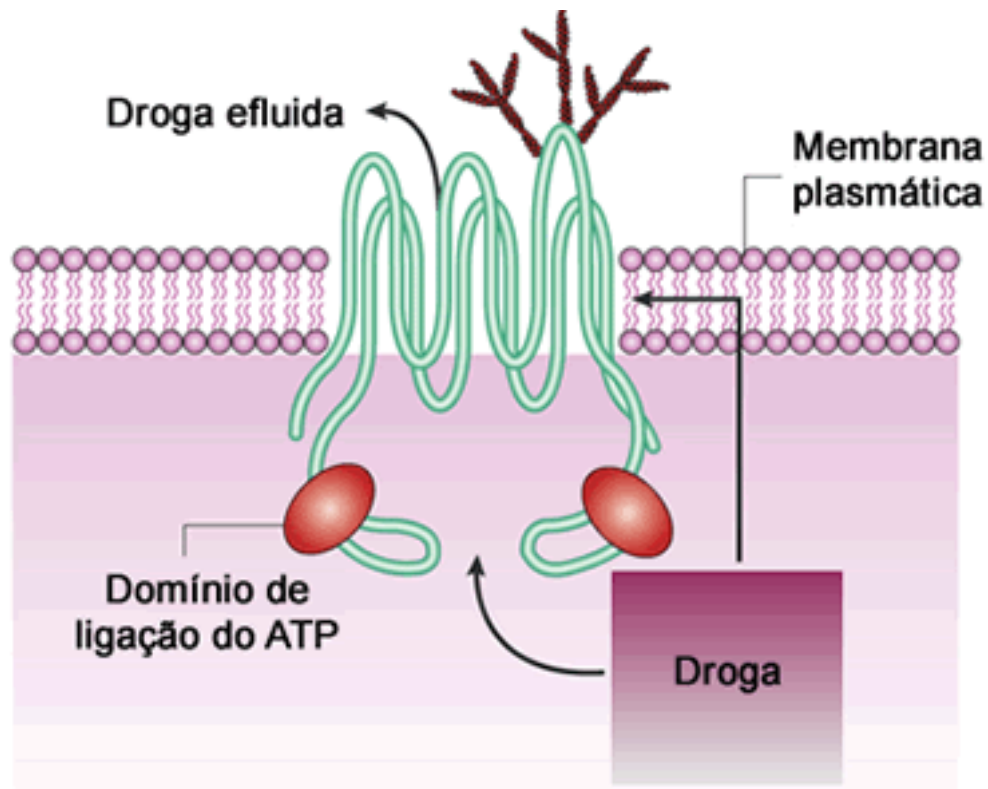
Apesar dos avanços significativos no tratamento do câncer, resistência a múltiplas drogas (MDR) continua sendo um grande problema clínico e leva a opções terapêuticas limitadas e maus resultados para os pacientes em um número ilimitado de cânceres, incluindo a leucemia (MUNOZ et al., 2007). A resistência é conferida por bombas de efluxo de membrana, que, essencialmente, removem os agentes citotóxicos da célula e, assim, evitam que esses alcancem os seus alvos celulares (YIN; ZHANG, 2015).

A multirresistência esta associada à glicoproteína P (Pgp), também conhecida como ABCB1 produto do gene MDR-1. Trata-se de uma proteína de 170 kDa, pertencente a família das proteínas ABC (cassete de ligação ATP), que são proteínas envolvidas na transferência de moléculas biológicas através da membrana contra um gradiente de concentração, com alta expressão em tecidos tumorais previamente expostos a fármacos (HODGES et al., 2011).

A Pgp induz multirresistência a drogas, por reconhecer diferentes agentes quimioterápicos e os transportar para fora da célula, levando as drogas a uma redução da concentração intracelular, até níveis não letais (Figura 4). A superexpressão de Pgp também

promove sobrevivência da célula por vias independentes de efluxo de drogas tais como: inibição de caspases na via de apoptoses, absorção reduzida de drogas, parada e alteração no *checkpoint* durante e sequestro dos fármacos antineoplásicos em lisossomos, bem como em organelas intracelulares e vesículas intercelulares (FLORÉZ et al., 2014; LI; PAN; SHI, 2015).

Figura 4. Esquema do envolvimento da glicoproteína P na mediação da resistência aos medicamentos. A Pgp transporta diversos quimioterápicos para fora da célula através de uma bomba de efluxo intracelular dependente de ATP. O aumento do efluxo diminui a biodisponibilidade do medicamento e reduz a absorção do mesmo.



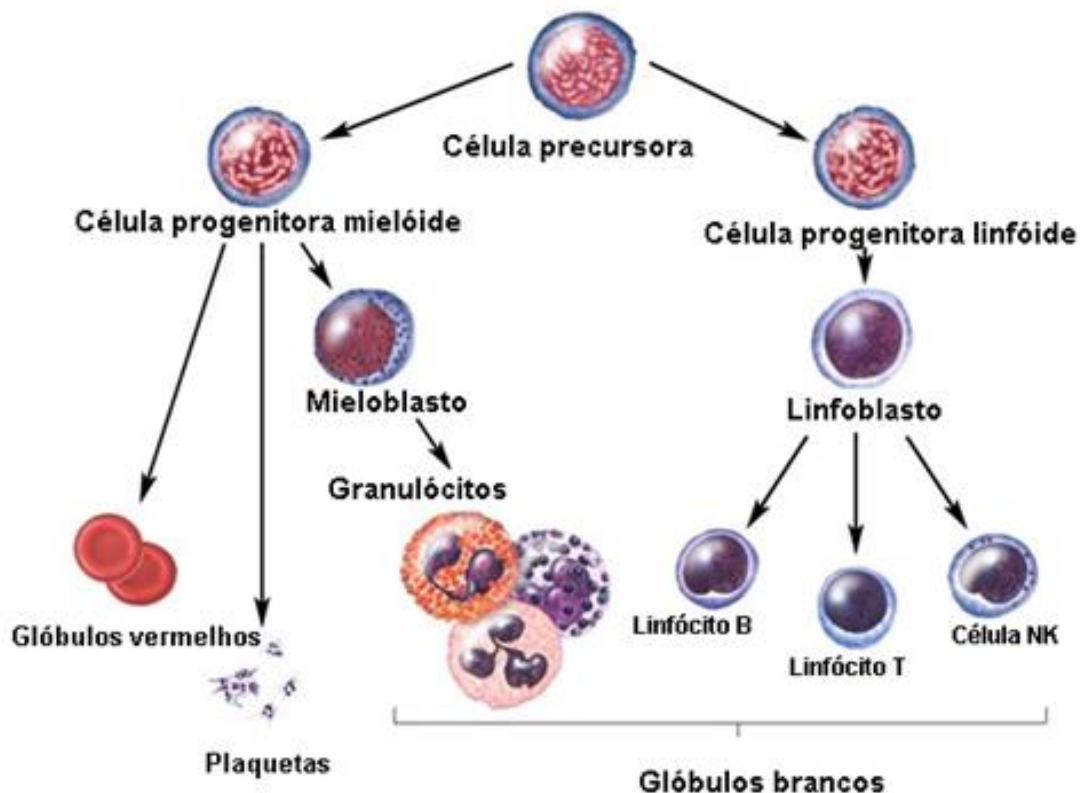
Fonte: SILVA, 2009 Disponível em:

<http://www.uff.br/sbqrio/novidades/Novidades2009/Anticancer%20Isatina%20Tiossemicarbazonas.html>. Acessado em 20 de Fevereiro de 2017.

3.2 LEUCEMIAS

As leucemias são doenças monoclonais resultantes de uma anormalidade que ocorre em uma célula progenitora do sistema hematopoiético (Figura 5), na maioria das vezes essa anormalidade é de origem não conhecida. São caracterizadas pela proliferação de células hematopoiéticas anormais na medula óssea, nos nódulos linfáticos, no baço e outros órgãos e no sangue. Acometem qualquer tipo de célula sanguínea, como hemácias, leucócitos e plaquetas, prejudicando suas funções normais (WOOD, 2006; KROETZ; CZLUSNIAK, 2003; SILVEIRA; ARRAES, 2008). No Brasil, de acordo com o Instituto Nacional do Câncer, o ano de 2017 terá um total de 10.070 novos casos de leucemia, sendo 5.540 homens e 4.530 mulheres. Esses valores correspondem a um risco estimado de 5,63 novos casos a cada 100 mil homens e 4,38 para cada 100 mil mulheres.

Figura 5. Esquema de maturação do sistema hematopoiético. A formação e desenvolvimento das células sanguíneas ocorre a partir de um precursor comum pluripotente. A hematopoese compreende a eritropoese, a leucopoeia e a trombopoese.



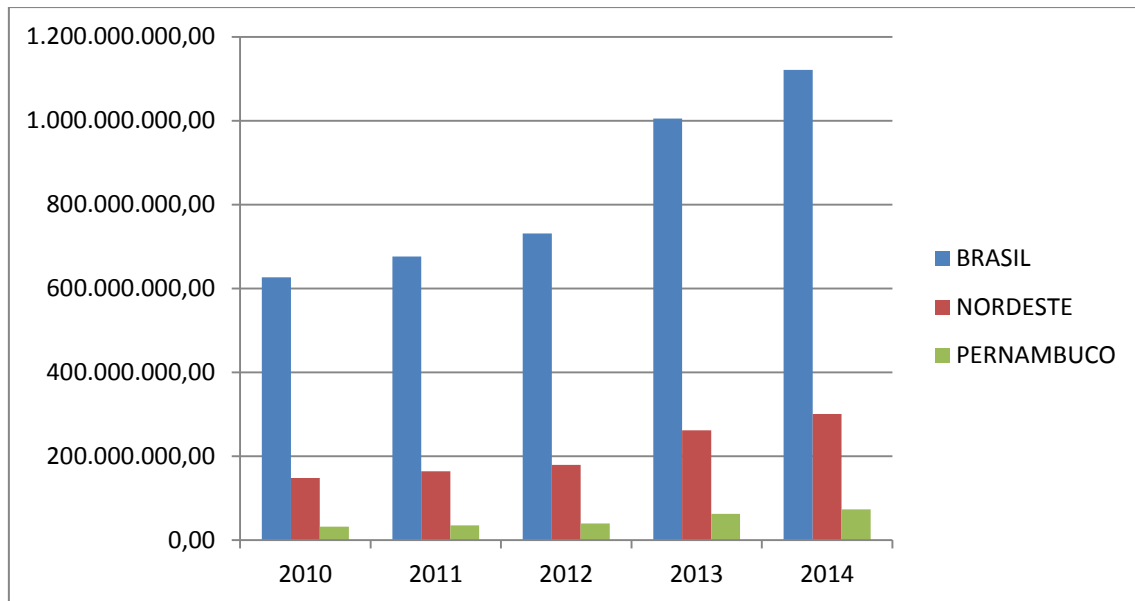
Fonte: Adaptado de <http://www.cancer.gov/images/cdr/live/CDR553603-750.jpg>. Acessado em 10 de Agosto de 2016.

Do ponto de vista clínico e patológico, as leucemias são subdivididas em grandes grupos. A primeira divisão é feita levando em conta a célula progenitora acometida, separando-as em mielóide e linfóide. São classificadas também de acordo com a velocidade de divisão dessas células, em leucemia crônica e leucemia aguda. O primeiro caso se dá quando essa divisão é mais lenta e as células envolvidas são mais parecidas com as células normais, o que permite que os doentes mantenham algumas funções comuns do organismo. Já as leucemias agudas, são de progressão rápida e afetam as células jovens ainda não completamente formadas (blastos). Estas células não preservam suas funções e afetam de forma importante a capacidade de defesa do organismo (ZAGO, 2013).

Temos assim quatro principais grandes grupos de entidades, são elas: leucemias mielóides crônicas, leucemias mielóides agudas, leucemias linfóides crônicas e leucemias linfóides agudas. As leucemias agudas são as principais estudadas, pois apresentam uma taxa de sobrevida reservada, sem tratamento, 95% dos pacientes portadores de leucemia aguda morrerão em até um ano após o diagnóstico (SILVEIRA; ARRAES, 2008).

As leucemias são responsáveis por grande parcela dos gastos dos tratamentos oncológicos. A área de consultoria da Orizon em um estudo apresentado no congresso da ISPOR – International Society for Pharmacoeconomics em 2013, apresentou os dados de custos para tratamento desta doença para o setor privado da saúde e revelou que o valor médio gasto por paciente é de R\$ 85 mil durante os ciclos de tratamento, sendo 73% dos gastos apenas com drogas quimioterápicas, 11% com outros medicamentos, 11% com custos e taxas hospitalares, 3% com honorários médicos e 2% com exames (FERREIRA et al., 2013). Essa realidade também é vista aqui no Brasil, onde apenas o estado de Pernambuco é responsável por quase metade dos gastos públicos com leucemias em todo o nordeste (Gráfico 1). Mesmo com o aumento significativo no diagnóstico e tratamento, no Brasil entre 2010 e 2013, segundo o Sistema de Informações sobre Mortalidade do Ministério da Saúde a sobrevida relativa em cinco anos de adultos portadores de leucemia foi de apenas 20%.

Gráfico 1. Total de gastos hospitalares com pacientes portadores de leucemia no sistema público de saúde (SUS) entre os anos de 2010 e 2013.



Fonte: Próprio autor, 2016.

A estratégia de tratamento considerada mais eficaz é o transplante de medula óssea, porém, nem todos os pacientes são elegíveis ao transplante e mesmo os que são podem apresentar recidivas (KAYSER et al., 2016). Diante desse empecilho o tratamento é feito basicamente por quimioterapia. Vários esquemas podem ser utilizados, desde os que envolvem apenas um tipo de droga até os que contam com dez ou mais quimioterápicos em combinação. A escolha do protocolo a ser usado depende do diagnóstico, da idade e da estratificação de risco de cada paciente, na maioria das vezes na prática clínica se faz associação de mais de um fármaco. (CAZÉ et al., 2010; NETO et al., 2013).

Alguns impedimentos comuns causados durante o tratamento culminam em profunda mielosupressão, efeitos colaterais pesados, frequentes recaídas, má resposta terapêutica, e especialmente, desenvolvimento do fenótipo de resistência às múltiplas drogas administradas (MDR) (CHEN et al., 2012; NARASIMHAN; LEE; LIM, 2015). Apesar do grande número de fármacos anticancer disponíveis atualmente, a quimioterapia não é completamente eficaz em erradicar as leucemias. Não raramente os pacientes se tornam resistentes aos medicamentos e continuam a serem significativos os problemas associados, tais como nefrotoxicidade e neurotoxicidade (BORGES et al., 2016).

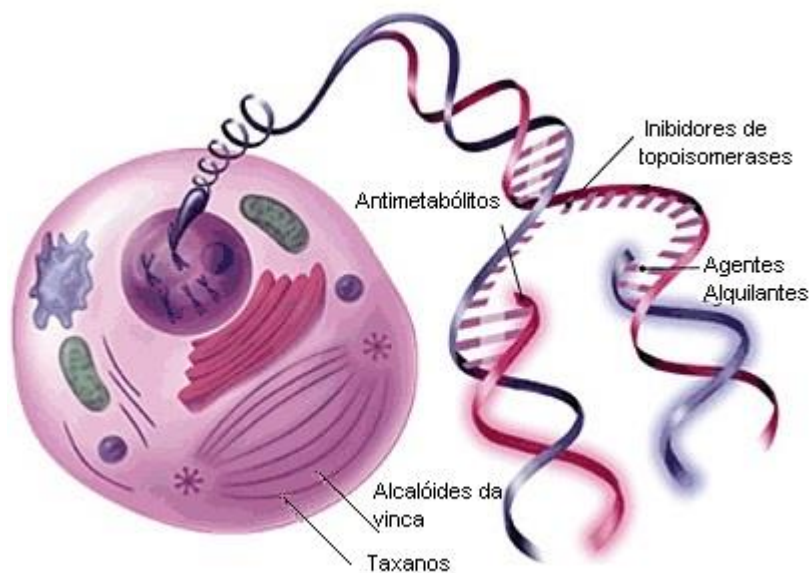
Pacientes portadores de leucemias agudas e com níveis aumentados de RNA mensageiro (RNAm) de ABCB1 revelam fracas respostas à quimioterapia bem como pior

prognóstico (BARTHOLOMAE et al., 2016). P-gp está presente em 50% das células de leucemia e o RNAm ABCB1/MDR1 é altamente expresso em linhagem multirresistente de leucemia aguda (CEM/ADR5000 e HL60/MX1). (EFFERTH et al., 2003; MAJUMDER et al., 2006; OOKO et al., 2016).

3.3 QUIMIOTERÁPICOS E ALVOS TERAPÊUTICOS

Cerca de 60-70% das neoplasias necessitam de uma abordagem sistêmica, o que torna a busca por combinações de diversos agentes antineoplásicos que garantam maior eficiência urgente (ALMEIDA et al., 2005). Muitos agentes antineoplásicos eficazes podem ser classificados considerando a fase do ciclo celular em que atuam (Figura 6). Fármacos que agem diretamente sobre uma fase do ciclo celular são conhecidos como agentes ciclo-celular específico, já os que apresentam ação independentemente da fase do ciclo celular são chamados de agentes de ciclo-celular não específico. Essa classificação não é absoluta, pois alguns agentes atuam em mais de uma fase do ciclo ou utilizam múltiplos mecanismos de ação (MURAD; KATZ, 2000; MACHADO, 2000).

Figura 6. Fase do ciclo celular na qual agem algumas classes de quimioterápicos.



Fonte: Modificado de CAMPOS, 2013, p14.

Dentre as várias classes de fármacos antineoplásicos disponíveis na prática clínica, os mais antigos e mais usados são aqueles que, comprovadamente, interagem quimicamente com o DNA e não são ativos somente no processo de divisão celular (ALMEIDA et al, 2005).

Alguns exemplos de classes de quimioterápicos que agem diretamente no DNA são os alquilantes, que adicionam metil ou outros grupos alquila no DNA, impedindo o anelamento correto de bases. O DNA é consequentemente fragmentado por enzimas de reparo que tentam substituir as bases alquiladas (NASSAR; WISNEWSKI; KING, 2016). Agentes de ligação cruzada que impedem que as hélices do DNA sejam separadas para a síntese ou transcrição, esse impedimento é “entendido” como um dano e a célula é então encaminhada a morte. (CHVÁLOVÁ et al., 2007). Agentes intercalantes, exemplo a doxorrubicina, ligam-se fortemente ao DNA, encaixando-se entre os pares de bases da dupla hélice e formando complexos de transferência de carga com os nucleotídeos (ALCARO et al, 2004). Já os inibidores de topoisomerase impedem a atividade das topoisomerases, e consequentemente bloqueiam a divisão celular (NEPALI et al., 2016). Antibióticos fragmentam o DNA através da formação de radicais livres (ALMEIDA et al., 2005).

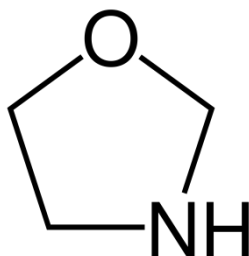
Agentes antimetabólicos ou antitubulina são fármacos ciclo-específicos que agem na fase da mitose. Interferem com a dinâmica dos microtúbulos, bloqueando a divisão do núcleo e levando à morte celular (ALMEIDA et al., 2005; NUSSBAUMER et al., 2011). Os exemplos dessa família incluem os alcalóides da vinca e os taxanos (docetaxel e paclitaxel). Os antimetabólitos interagem com rotas essenciais de biossíntese, ou interferem em processos enzimáticos essenciais. Análogos estruturais de purina e pirimidina são incorporados pelas células e interrompem a síntese dos ácidos nucleicos (NUSSBAUMER et al., 2011). A busca de novos alvos moleculares permite o desenvolvimento de tratamentos novos tendo como a base a descoberta de novas moléculas potencialmente mais eficazes e com efeitos secundários consideravelmente mais baixos (SERKOVA; ECKHARDT, 2016).

3.4 OXAZOLIDINAS

As oxazolidinas aparecem no cenário da química orgânica como uma classe de moléculas alternativas com diversas atividades terapêuticas. Pertencem a uma classe de azóis e contém em sua estrutura básica um átomo de oxigênio na posição 1 e um átomo de nitrogênio na posição 3 (Figura 7) (PANDIT et al., 2012). Esta classe de compostos é comumente classificada de acordo com a quantidade e a posição dos grupos carbonilos presentes no anel, chama-se oxazolidina quando não há; oxazolidina-2-ona (ou oxazolidinona) quando tem um carbonilo na posição 2; oxazolidina-2,4-diona (ou oxazolidinodiona) quando existem dois carbonilos, um na posição 2 e um na posição 4. Além disso, também pode ser chamado 2-tioxooxazolidinona quando o anel tem uma ligação dupla

a um átomo de enxofre na posição 2 e um carbonilo na posição 4. (BRANCO-JUNIOR et al., 2017).

Figura 7. Estrutura geral das oxazolidinas.



Fonte: Modificada de Pandit et al., 2012, p2.

A linezolida (ZYVOX®) foi a primeira oxazolidina disponível na clínica, desenvolvida nos anos 1980. É utilizada para o tratamento de infecções de organismos gram-positivos, atuando através da sua ligação no sítio P da subunidade 50S do ribossomo bacteriano, impedindo a formação do complexo t-RNA/m-RNA/ribossomo (PANDIT et al., 2012; DEANE et al., 2013). O segundo derivado oxazolidínico aprovado, até o momento, pela FDA é o fosfato de tedizolida utilizada no tratamento de infecções bacterianas resistentes à Linezolida, assim como a linezolida, o fosfato de tedizolida atua inibindo a síntese de proteínas bacterianas (ZHANEL et al., 2015).

Além da atividade antibacteriana atribuída a esses derivados é descrito na literatura sua ação antifúngica (KAMAL et al, 2013; RODRIGUES-JUNIOR, et al. 2016), e anti-inflamatória atuando como agonista do PPAR- γ (PAL et al., 2014) Em 2014, Naresh e colaboradores estudaram sua ação antitumoral e relataram a indução de apoptose e senescência na linhagem DU145 (câncer de próstata) induzida pela ação de novos derivados oxazolidínicos (NARESH et al., 2014). Recentemente, a atividade antitumoral de uma série de nove derivados oxazolidínicos foi demonstrada em linhagem de mama (MCF-7 e MDA231) mostrando capacidade de reduzir em até 70% a proliferação destas, alguns derivados retardaram a motilidade e invasão de células MDA231 e exibiram atividade citostática potente contra as células (HEDAYA et al., 2016).

Os derivados oxazolidínicos representam uma alternativa terapêutica nova e mais eficiente, uma vez que muitos investimentos estão sendo feitos e novos alvos terapêuticos estão sendo descobertos. No entanto, devido à descoberta relativamente nova de sua atividade

antitumoral ha necessidade de mais estudos para uma melhor compreensão de seus mecanismos de ação.

3.5 PROTEÔMICA

O termo “ômicas” é um termo geral que corresponde à análise global dos sistemas biológicos, que visa identificar, quantificar, caracterizar e mapear as interações comparativas de biomoléculas, tais como DNA, proteínas e metabólitos (KEERSMAECKER et al., 2006; ESPINDOLA et al., 2010). Diferentes áreas são abrangidas, a saber, ciências intituladas genômica, transcriptômica, proteômica, metabolômica, entre outras. (BARALLOBRE-BARREIRO; CHUNG; MAYR, 2013; ALBENICE, 2014).

O estudo de expressão gênica nos permite obter um perfil molecular e fornece identificação de importantes alterações que ocorrem no nível de RNA. Entretanto, a análise dos transcritos é limitada, pois informações sobre processos como modificações pós traducionais, interações proteína-proteína, transporte e degradação são perdidas nessa análise (GSTAIGER; AEBERSOLD 2009). Por esse motivo, é importante que em além dos dados derivados do genoma e do transcriptoma sejam também obtidas informações sobre as diferenças proteicas entre amostras normais e alteradas para entendimento dos mecanismos envolvidos em doenças humanas com consequentes benefícios para os pacientes (BARBOSA et al., 2012).

O termo proteoma foi criado em 1995 e refere-se ao conjunto de proteínas que podem ser encontrado em uma célula, tecido ou organismo. A sua complexidade é enorme. Enquanto o genoma humano compreende aproximadamente 25.000 genes, o proteoma humano é estimado abranger 100.000 proteínas. (KUSSMANN; RAYMOND; AFFOLTER, 2006; NING et al., 2011). Além da complexidade da composição e do intervalo de concentração, proteínas são dinâmicas, isto é, a expressão de proteínas muda ao longo do tempo, o que aumenta a complexidade de um proteoma. Destarte, as proteínas são moléculas bastante afetadas quando um organismo é acometido por uma doença, e, por isso, apresentam-se como promessa na descoberta de biomarcadores e para a elucidação do mecanismo de ação dos tratamentos.

As ferramentas proteômicas tem desempenhado um papel particularmente importante na melhoria da nossa compreensão sobre composições de proteínas, o que nos fornece informações diversas sobre os mecanismos de biogênese, funções fisiopatológicas e facilita a descoberta de um biomarcador baseado na assinatura das proteínas nas células originárias (RAIMONDO et al 2011; D’SOUZA-SCHOREY; CLANCY, 2012).

A análise proteômica pode ser definida como o conjunto de metodologias analíticas empregadas para caracterizar quali e quantitativamente essas moléculas responsáveis direta ou indiretamente pelo controle de todos os processos biológicos. Segundo Valledor e Jorin a proteômica —oferece a possibilidade de estudar simultaneamente o conjunto de espécies de proteínas presentes em uma unidade biológica, a sua catalogação, a determinação de abundâncias, variações genótipo-dependente, mudanças de resposta no meio, modificações pós-traducionais e interações com outras proteínas e entidades moleculares. Em suma, através da utilização proteômica, o objetivo é descobrir "como", "onde", "quando", e "para quê" são as várias centenas de milhares de proteínas produzidas durante determinados acontecimentos num organismo vivo e como elas interagem umas com as outras (VALLEDOR; JORIN, 2011).

A análise de proteínas em amostras biológicas é um algo desafiador. Além do proteoma não ser estático, as proteínas se apresentam em grande variedade e diferentes concentrações. Diante disso, faz-se necessário a utilização de métodos de separação analíticos robustos e que permitam alta resolução para esses tipos de amostras. Dentre as técnicas mais utilizadas em análise proteômica destacam-se eletroforese unidimensional (1-DE ou SDS-PAGE) e bidimensional (2-DE), eletroforese em gel diferencial (2D-DIGE) e a cromatografia líquida acoplada à espectrometria de massas (LC-MS) (ALBENICE, 2014).

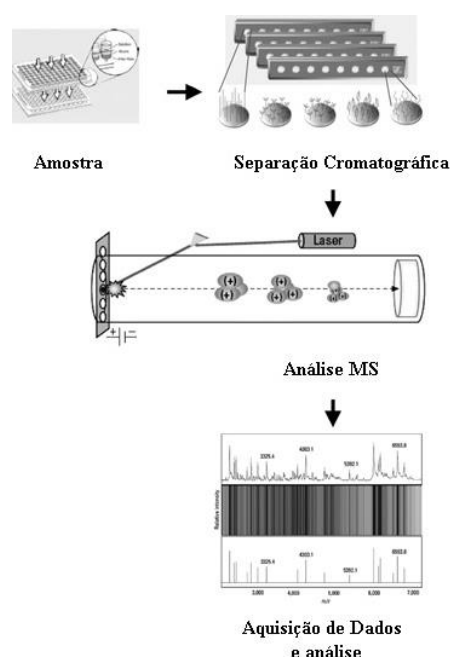
Na eletroforese bidimensional usual, as proteínas são separadas levando em conta suas massas e cargas. Esses parâmetros são usados em duas etapas. Na primeira, denominado focalização isoeletrica (IEF), as moléculas migram em gel de poliacrilamida com gradiente de pH imobilizado até atingirem seu ponto isoeletrico (PI). Na segunda etapa, as proteínas são diretamente aplicadas no gel SDS-PAGE e separadas de acordo com seu tamanho. O resultado da eletroforese bidimensional é a separação de misturas complexas com melhor resolução que são vistos pela formação de pontos (*spots*) por proteínas únicas ou misturas simples de proteínas (BJELLQVIST et al., 1982; PENNINGTON; DUNN, 2001). Após a corrida 2D os analitos necessitam de identificação, o que pode ser realizado por espectrometria de massas. A espectrometria fornece não somente um perfil proteico quali e quantitativamente, mas também é capaz de identificar proteínas e caracterizar modificações pós-traducionais.

Outras tecnologias proteômicas foram desenvolvidas e podem detectar simultaneamente grandes painéis de biomarcadores com mais robustez e de forma mais eficaz. Essas abordagens fornecem detecção do vasto numero de proteínas moduladas e sua técnica não faz uso de gel (*gel free*) e marcação (*label free*) (LUNDGREN, 2010) (Figura 9).

Estas abordagens usam cromatografia líquida capilar acoplada à espectrometria de massa (LC-MS) para separar e identificar os peptídeos obtidos a partir da digestão enzimática utilizando enzimas proteolíticas e, subsequentemente, estes peptídeos são separados e sujeitos a análise por espectrometria de massa em tandem. A identificação por espectrometria de massa destes permite a determinação do teor de proteínas da amostra inicial uma vez que a separação dos peptídeos ocorre de forma mais barata e mais facilmente que em uma análise completa à base de gel (ABDALLAH et al., 2012).

LC-MS baseia-se na comparação quantitativa de íons provenientes de amostras experimentais, desenvolvido usando um sistema de separação cromatográfica reproduzível, juntamente com a espectrometria de massas de alta resolução e exatidão do tempo ortogonal de voo (TOF) desses íons. Neste método, o instrumento alterna entre baixas e altas energias de colisão em análise por MS, conduzindo à determinação precisa das massas e fragmentação dos íons gerados (KOTA; GOSHE, 2011). O uso de fragmentação multiplex de LC-MS produz informações de produção uniforme de todos os peptídeos e seus picos cromatográficos, que fornece dados contínuos ao longo de toda a aquisição MS. Os íons dos produtos são correlacionados e alinhados para gerar uma lista de assinaturas com o exato tempo de retenção de massa (ETRM). As áreas de pico integradas de ETRM são comparados em diferentes repetições biológicas para determinar as diferenças na abundância de proteína (SILVA et al., 2005).

Figura 8. Técnica proteômica gel free label free.



Fonte: Adaptado de ABDALLAH et al., 2012.

Estas tecnologias impulsionam o campo de diagnóstico à base de multianalitos e abrem caminho para a determinação das expressões moleculares, para manejo do câncer e sua detecção em estágio precoce, fornecendo ao médico maiores informações sobre o estado real do paciente permitindo uma intervenção clínica mais eficaz (CHATTERJEE et al 2007; SKVORTSOV, 2014). Vemos com isso a importância do emprego das tecnologias proteômica por pelo menos três motivos: Primeiro, é a chance de desvendar os caminhos metabólicos gerando um conhecimento sem precedentes na biologia celular. Tornando possível identificação de novos alvos farmacológicos específicos, relacionados, por exemplo, a determinada etapa de desenvolvimento de uma célula cancerosa. Segundo, ela viabiliza a identificação de novas moléculas bioativas ao desenvolvimento de novos medicamentos. Terceiro, permite a identificação e caracterização de marcadores biológicos (PIMENTA 2003).

Em uma era de rápidos avanços na biomedicina e melhor compreensão da base genética da doença as tecnologias avançadas podem identificar variações moleculares específicas de um paciente individual, que posteriormente podem ser alvo de tratamento. Esses testes são fundamentais para desbloquear a promessa de medicina de precisão. Os testes de biomarcador para terapias molecularmente direcionadas representam uma área crucial de foco para o desenvolvimento de métodos que poderiam ser aplicados posteriormente a outras áreas da medicina de precisão (LYMAN; MOSES, 2016).

4 MÉTODOS

4.1 AGENTE ANTINEOPLÁSICO

Foi utilizado nesse estudo o derivado oxazolidinico, LPSF-NB-3 (5-(4-chloro-benzylidene)-3-ethyl-2-thioxo-1,3-oxazolidin-4-one) para avaliar o efeito anticâncer em linhagem leucêmica resistente. Sintetizado pelo Laboratório de Planejamento e Síntese de Fármacos (LPSF) do Núcleo de Pesquisa em Inovação Terapêutica (NUPIT-SG), Universidade Federal de Pernambuco UFPE. O derivado teve sua estrutura química confirmadas através da técnica espectroscópica de ressonância magnética nuclear de hidrogênio (RMN¹H) e carbono treze (RMN¹³C), espectrofotometria de absorção no infravermelho (IV) e espectrometria de massa (MS).

4.2 LINHAGEM E CULTIVO CELULAR

Obtidas da *American Type Cell Culture* (ATCC, USA) a linhagem de estudo, HL60/MX1, é uma linhagem leucêmica que exibe resistência ao mitoxantrona (39nM), resistência a múltiplas drogas (MDR) atípica, atividade catalítica de topoisomerase II alterada e níveis reduzidos das telomerasas II α e β . Apresenta ainda, resistência cruzada a etoposida, teniposida, bisantreno, actinomicina, daunorrubicina e doxorubicina (HL60/MX1 (ATCC CRL2258TM). As células foram mantidas a 37°C contendo 5% de CO₂ em meio RPMI 1640 com 10% de soro fetal bovino. A troca de meio foi realizada sempre que necessário para manter a viabilidade das células.

4.3 TESTES DE SELETIVIDADE E CITOTOXICIDADE

Para avaliar a seletividade e citotoxicidade, foi utilizado o método de MTT, que consiste em uma análise colorimétrica baseada na conversão do sal 3-(4,5-dimetil-2-tiazol)-2,5-difenil-2-H-brometo de tetrazolium (MTT) em azul de formazan, essa conversão é feita partir de enzimas mitocondriais presentes somente nas células metabolicamente ativas.

A princípio, avaliou-se a seletividade do derivado. Para isso, foi realizada coleta das células mononucleadas do sangue periférico (PBMC's) de voluntários sadios, livres de álcool por no mínimo 48 horas e de drogas por 15 dias. As PBMCs foram isoladas através de método padrão de centrifugação por gradiente de densidade com Ficoll-Hypaque (GE Healthcare), contadas em Câmara de Neubauer, e a viabilidade foi determinada pelo método de exclusão azul de tripam. Posteriormente, foram plaqueadas na concentração de 5×10^5 células/100 μ l em seguida foram adicionados em triplicata o composto testado nas concentrações de 10, 50, 75 e

100 μ M. As placas foram então incubadas por 48 horas em estufa a 5% de CO₂ e a 37°C. Ao término deste período, foram adicionados 20 μ L de MTT e as placas foram novamente incubadas, permanecendo por mais três horas. Logo após esse período foi aplicado 130 μ L de SDS a 20%, com o objetivo de solubilizar os cristais formados pelas células viáveis. A absorbância foi lida após o período de 24 horas em leitora de placas (EL808, Biotek, EUA), no comprimento de onda de 570 nm

A avaliação da citotoxicidade frente à linhagem leucêmica resistente HL60-MX1 foi feita usando o mesmo protocolo, diferindo apenas a quantidade de células plaqueadas, 1x10⁴ células/100 μ l e o tempo de incubação de 72 horas. Cada dosagem de composto foi feita em triplicata, e a média da viabilidade de cada experimento foi calculada com base no valor obtido para o controle contendo DMSO a 0,1%.

Os ensaios foram realizados em triplicata e as análises estatísticas foram feitas a partir do test t (GraphPad Prism 6). A concentração inibitória 50% (IC₅₀) foi calculada com os programas Origin 8 e Microsoft Office Excel 2007 e o índice de seletividade (IS) foi calculado a partir da razão entre IC₅₀ de cada composto em PBMC e a linhagem neoplásica HL60/MX1 (IS= IC₅₀ cél.normais/ IC₅₀cél. neoplásicas).

4.4 EXTRAÇÃO PROTEICA E DIGESTÃO TRÍPTICA

Os extratos proteicos das células tratadas com o derivado oxazolidinico LPSF-NB-3 foram obtidos a partir da homogeneização com 200 μ L de tampão de lise frio contendo 50 mM Tris-HCl (pH 7.5), 5 mM EDTA, 10 mM EGTA, 50 mM NaF, 20 mM KCl, and 250 mM NaCl suplementado com 1 μ L de coquetel inibidor de protease (GE Healthcare, Life Sciences, Piscataway, NJ) e inibidor de fosfatase (20 mM ortovanato de sódio (Na₃VO₄) e 1 μ M ácido ocaídoico). Depois de 1 hora a 4 °C, a suspensão foi congelada e descongelada duas vezes em nitrogênio líquido. Os extratos totais foram centrifugados a 12000g durante 30 min, e os sobrenadantes foram recolhidos para armazenamento a -80°C. Após quantificação de proteína de Bradford, as amostras foram concentradas 39 $\times$ e tiveram o tampão trocado por bicarbonato de amônio (NH₄HCO₃ 50 mM) usando um dispositivo de ultrafiltração de 3kDa (Millipore, Billerica, MA). No total, 200 μ g de proteína foi desnaturada (0,1% RapiGest SF a 60 ° C durante 15 min) (Waters, Milford, MA), reduzida com DTT 10 mM a 60 ° C durante 30 min, alquiladas com iodoacetamida 10 mM durante 30 min temperatura ambiente no escuro, e digerido enzimaticamente com tripsina a uma proporção de 1:50 enzima/ proteína (Promega, Madison, WI). A digestão foi parada pela adição de 10 μ L de 5% de TFA. Álcool

desidrogenase de levedura foi utilizado como um padrão interno para quantificação absoluta. (ADH; P00330, Waters) e adicionada a uma concentração final de 10 fmol/uL.

4.5 QUANTIFICAÇÃO PROTEICA *LABEL-FREE* POR ESPECTOMETRIA DE MASSAS

Os experimentos qualitativos e quantitativos nano UPLC ESI HDMS^E foram conduzidos com um sistema ACQUITY UPLC (Waters), com ligeiras modificações. Para a primeira dimensão, foi usada uma coluna de troca catiônica forte (SCX) (Waters) com enchimento de um 5 um *polySulfoethyl aspartamida* (PolyLC, Columbia, MD). As amostras foram eluídas em nove frações a partir da coluna SCX utilizando um gradiente de sal (2 ul de sal tampões contendo 50, 100, 150, e 200 de formiato de amônio mM (NH₄FA) com 5% de ACN, seguido por um gradiente de fase inversa (RP). Os peptídeos libertados foram capturados por uma coluna RP de armadilha (180 um x 20 mm, 5 um Simetria C18, Waters). Depois de todos os peptídeos foram capturados, a coluna armadilha foi colocada em linha com uma outra coluna analítica RP (100 um x 100 mm, 1,8 um C18, nanoACQUITY UPLC HSS T3, Waters). RP um gradiente de 5-40% de ACN (contendo 0,1% de ácido fórmico v / v) em 58 min foi usado para a segunda dimensão com uma taxa de fluxo de 600 nL • min⁻¹. Todas as análises foram realizadas utilizando ionização do tipo nanoelectrospray em modo de íons positivo nanoESI (+) e uma fonte de ionização NanoLockSpray (Waters). O espectrômetro de massa foi calibrado com uma solução de peptídeo *Glu-1-fibrinopeptídeo B (Glu-Fib)* (Sigma-Aldrich) (100 fmol • mL⁻¹) entregue através do pulverizador de referência da fonte NanoLockSpray. A aceleração ortogonal do tempo de voo (OA-TOF) MSE foi adquirida a partir de m/z 50 até 2000. O perfil de MS foi ajustado para garantir que os dados de LC-MS de baixa energia foi efetivamente adquiridos a partir de m/z 400-2000.

4.6 PESQUISA DE BANCO DE DADOS

Identificação das proteínas foram gerados por algoritmos adequados e pesquisando contra um banco de dados específico humano. As bases de dados utilizadas foram randomizadas "on-the fly" durante as consultas de banco de dados e anexados ao banco de dados original para acessar a taxa de falso-positivo de identificação. Os valores foram considerados FDR até 1%. As condições adequadas de processamento e procurando banco de dados espectrais, foi utilizado um v.2.5.2 ProteinLynxGlobalServer (PLGs) com a informática ExpressionE v.2.5.2. UniProtKB (liberar 2013_11) . Apenas as proteínas identificadas presentes em todas as repetições de cada condição, obtido no passo de análise IdentityE PLGs

foram consideradas para análise de expressão utilizando ferramenta ExpressionE. As proteínas obtidas foram organizadas pelo algoritmo ferramenta PLGs ExpressionE em uma lista estatisticamente significativa correspondente ao aumento e diminuição da regulação entre os diferentes grupos em comparação com amostras de controle. Procedimento de filtragem adicional foi realizado para selecionar apenas as proteínas que apresentaram níveis de expressão diferenciais com p valor inferior a 0,05. As interações entre as proteínas foram analisados usando o software GeneGo MetaCore (GeneGo, Encinitas, CA).

4.7 AVALIAÇÃO DE CITOCINAS

PBMC (1×10^6 células/poço) foram cultivadas em placas de 24 poços. As células foram estimuladas com Forbol 12-Miristato 13-Acetato (PMA) e Ionomicina (IONO) nas doses de 100ng/mL e 1µg/mL, respectivamente, e em seguida tratadas com o derivado LPSF/NB-3 nas concentrações de 1, 10, 50 e 100µM. Como controle, foram utilizados poços contendo apenas células e outros com o fármaco de referência Metilprednisolona (MP) na concentração de 100µM. As placas foram incubadas em estufa de atmosfera úmida a 37°C e 5% de CO₂. Após 48 horas de exposição, o sobrenadante de cultura foi recolhido e armazenado em microtubos (Eppendorf) para a dosagem de citocinas. Foram utilizados kits ELISA sanduíche humano para a dosagem das citocinas IFN-γ (BD Biosciences), IL-17 (Ebiosciences), IL-22 (R&D Systems), IL-6 (BD Biosciences) e IL-10 (BD Biosciences) de acordo com as instruções recomendadas pelo fabricante. Os limites de detecção para cada citocina dosada foi de 4.68, 3.90, 15.62, 4.68 e 3.90pg/mL, respectivamente. Para este experimento, foram utilizados quatro voluntários saudáveis.

5 RESULTADOS

5.1 ARTIGO

INVESTIGATION OF A NEW OXAZOLIDINE DERIVATIVE IN HUMAN RESISTANCE ACUTE LEUKEMIA CELLS: DECIPHERING ITS MECHANISM OF ACTION BY LABEL-FREE PROTEOMIC

Lidiane Vasconcelos do Nascimento Carvalho¹, Júlia Campos¹, Wanessa Layssa Batista de Sena¹, Eliana Abdelhay², Michelly Cristinny Pereira¹, Maira Galdino da Rocha Pitta¹, Maria do Carmo Alves de Lima³, Luciana Pizzatti⁴, Ivan da Rocha Pitta¹, Moacyr Jesus Barreto de Melo Rêgo¹

¹Research Center for Therapeutic Innovation (NUPIT-SG), *Federal University of Pernambuco*, Recife, PE, Brazil.

²Bone Marrow Transplant Center, Nacional Institute of Cancer, INCA, Rio de Janeiro, Brazil.

³*Drug Planning and Synthesis Laboratory, Federal University of Pernambuco*, Recife, Brazil.

⁴Molecular Biology and Proteomics of Blood Laboratory, LBCD-LADETEC, *Institute of Chemistry, Federal University of Rio de Janeiro*, Rio de Janeiro, Brazil.

Corresponding author:

Moacyr Jesus Barreto de Melo Rêgo

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

Email: moacyr.rego@gmail.com

[Tel. +55 81 2126-8947](tel:+558121268947)

ABSTRACT

The present study aimed to evaluate the mechanism of action antineoplastic activity of oxazolidine derivative, LPSF-NB-3 (5-(4-cloro-benzilideno)-3-etil-2-tioxo-oxazolidin-4-ona). Cytotoxicity assays were performed in Peripheral Blood Mononuclear Cells (PBMC) and resistant acute leukemia cell line (HL-60/MX1) by MTT method. NB-3 exhibited cytotoxicity in HL-60/MX-1, but was not toxic to healthy cells in the highest dose tested (100 μ M). The protein extract of HL60/MX1 cells treated with NB-3 was subjected to proteomic analysis using two-dimensional chromatography coupled to mass spectrometry. We could identify a total of 2652 proteins, in which 633 were modulated. Within the universe of protein considered for the quantitative analysis with the established criteria, 262 were differentially expressed, 146 with increased expression and 116 with decreased expression in the sample treated with LPSF-NB-3 compared to the control. The following differentially expressed pathways were found: involving regulation of the cytoskeleton, DNA damage and transduce cellular signals. Networks that were highlighted are related to the immune system. The ELISA technique was used to assess the immunomodulatory potential of NB-3 in PBMC. We observed significant decrease of IFN γ ($p < 0.01$) and dose response pattern of the cytokines IL-6, IL-17A, IL-22 and IL-10. These data suggest that the mechanisms of action which LPSF-NB-3 is involved.

Keywords: cancer, cytokines, immunomodulation, *molecular prospecting*.

1 Introduction

Hematopoiesis is defined as the process of blood cell renewal starts in the bone marrow by proliferation and differentiation of a small population of pluripotent hematopoietic stem cells [1]. A network of hematopoietic cytokines determines the destination of several hemotopietic cells, thus maintaining steady-state levels of the cells in the periphery or induces an increase in specific cell types to meet the physiological needs. Abnormalities in this homeostatic program results in a variety of malignancies, including leukemias [2].

Acute leukemia (AL) is characterized by the accumulation of immature cells (blasts) and reduced production of healthy hematopoietic elements [3]. The main treatment strategy for AL involves chemotherapy, which combines several antineoplastic agents. However, profound myelosuppression, poor therapeutic response and development of resistance to the drugs used are common impediments to current treatment strategies [4].

Drug resistance is a pleiotropic phenomenon that includes various mechanisms at different levels of drug activity major resistance mechanisms include: abnormal transport and increased drug efflux from the cell, involving the multidrug resistance proteins such as P-glycoprotein (P-gp) [5]. In patients with AL, overexpression of these transporters is associated with poor response to treatment and shorter overall survival rate. [6]. Thus, it is essential to search for new agents that can be used in combination with clinic in order to ensure more effective therapeutic approaches.

Oxazolidinones are a class of azoles, formed of a heterocyclic five-membered ring used to prepare a number of other compounds. They are present in many molecules of pharmaceutical interest like have potential medicinal properties preferred antibacterial activity [7].

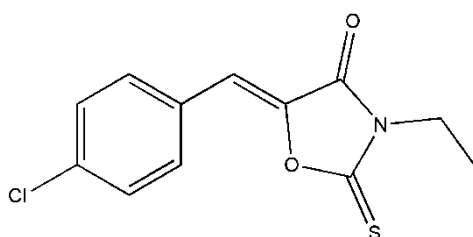
The antineoplastic activity of the oxazolidinones derivatives has been reported in the literature in various tumor cell lines *in vitro*, including A2058 (melanoma), MCF-7 (breast adenocarcinoma), HT-29 (colon carcinoma) and DU145 [8-10]. Singh et al. 2011 [11] reported cytotoxic activity oxazolidinones 3,4-disubstituted cell line HL-60 (promyelocytic leukemia) cell death occurred by apoptosis, correlating them to DNA fragmentation.

In a previous study by our group, five new oxazolidinones derivatives were synthesized and had their antineoplastic activity evaluated against resistant leukemic line HL60/MX1 [12]. The LPSF-NB-3 derived showed the more promising activity and was selected for the elucidation of its mechanism of action by proteomic analysis.

2 Experimental

2.1 Chemistry. Oxazolidine derivative, LPSF-NB-3 (5-(4-chloro-benzilideno)-3-ethyl-2-thioxo-oxazolidin-4-one) (Figure 1) was synthesized in Laboratory of Planning and Synthesis of Drugs (LPSF) Federal at University of Pernambuco. The structures were confirmed by ^1H and ^{13}C NMR, the route of synthesis and the spectroscopic characteristics previously described Campos and collaborators (2013).

Figure 1. Structure of derivative 5-(4-chloro-benzilideno)-3-ethyl-2-thioxo-oxazolidin-4-one (LPSF-NB-3).



2.2 Cell culture. HL-60/MX1 (acute leukemia resistant) were obtained from American Type Cell Culture (ATCC®, USA). Cells were cultured in RPMI-1640 medium (Gibco®, UK) supplemented with 10% fetal bovine serum (Gibco®, UK), 10 mM HEPES (Gibco®, UK), 200 U/mL streptomycin and penicillin (Gibco®, UK) and incubated in a humid atmosphere of 5% CO_2 at 37°C.

2.3 Cytotoxicity assay. HL-60/MX1 cells (1×10^4 cells) were plated in 96-well plates. After 24 hours, cells were treated with the compound LPSF-NB-3 at different concentrations (25, 50 and 75 μM) for 72 hours at 37°C with 5% CO_2 . Amsacrine (Sigma-Aldrich®, USA) was used as a positive control. At the end of 72 h of incubation 20 μL of (3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide (MTT) at 5 mg/mL were added in each well and, three hours later, 130 μL of 20% SDS. The absorbance was measured 24 hours later using ELx808 Microplate Reader (Biotek®, USA) at 570 nm. Experiments were performed three independent times in triplicate. the calculation of viable cells were made in relation to control treated with vehicle (DMSO 0,1%).

2.4 Cytotoxicity assay in healthy cells. Peripheral blood mononuclear cells (PBMC) were obtained from whole heparinized blood of healthy non-smoking donors (n=3), that do not

make use of medication of continuous use and was not taking alcoholic for at least 72 hours before harvest. All volunteers signed a consent form and the study was approved by Human Research Ethics Committee from Federal University of Pernambuco (CEP/CCS/UFPE N° 11006/12). Cells isolation was made using a density-gradient centrifugation method over Ficoll-Paque PLUS (GE Healthcare®, UK). PBMCs were counted in a Neubauer chamber, and viability was determined by the trypan blue exclusion method. Cells were only used when viability was >98%. At the end of the process, cell pellet was resuspended in RPMI-1640 medium supplemented with 10% fetal bovine serum (Gibco®, UK), 10 mM HEPES (Gibco®, UK) and 200 U/mL streptomycin and penicillin (Gibco®, UK). Cells were seeded in 96-well plates (5×10^5 cells per well) and treated with LPSF-NB-3 (25, 50, 75 and 100 μ M) for 48 hours. After incubation, steps were performed as previously described at item 2.3.

2.5 Protein Extraction and in-Solution Tryptic Digestion. The protein extracts from cell culture were obtained from homogenization with 200 μ L of cold lysis buffer containing 50 mM Tris-HCl (pH 7.5), 5 mM EDTA, 10 mM EGTA, 50 mM NaF, 20 mM KCl, and 250 mM NaCl supplemented with 1 μ L of protease inhibitor cocktail (GE Healthcare, Life Sciences, Piscataway, NJ) and phosphatase inhibitors (20 mM sodium orthovanadate (Na_3VO_4) and 1 μ M okadaic acid). After 1 h at 4 °C, the suspension was frozen and thawed twice in liquid nitrogen. The total extracts were centrifuged at 12 000g for 30 min, and the supernatants were collected for storage at –80 °C. After Bradford quantification of protein, the samples were concentrated 39 $\times$ and exchanged with 50 mM NH_4HCO_3 using a 3 kDa ultrafiltration device (Millipore, Billerica, MA). In total, 200 μ g of protein was denatured (0.1% RapiGEST SF at 60 °C for 15 min) (Waters, Milford, MA), reduced with 10 mM DTT at 60 °C for 30 min, alkylated with 10 mM iodoacetamide for 30 min at room temperature in the dark, and enzymatically digested with trypsin at a 1:50 w/w enzyme/protein ratio (Promega, Madison, WI). Digestion was stopped by adding 10 μ L of 5% TFA, and yeast alcohol dehydrogenase (ADH; P00330, Waters) was added to the digests to a final concentration of 10 fmol/ μ L as an internal standard for absolute quantification.

2.6 Label-Free Protein Quantitation by Mass Spectrometry. Qualitative and quantitative nano UPLC tandem nano ESI HDMSE experiments were conducted with a nano ACQUITY UPLC system (Waters), with slight modifications as previously described by Panis [25].

2.7 Database Searching and Quantification. Protein identification and quantitative data packaging were generated by appropriate algorithms and searching against a human-specific

database. The databases used were randomized “on-the fly” during database queries and appended to the original database to access the false-positive rate of identification. The FDR values up to 1% were considered. For proper spectral processing and database searching conditions, a ProteinLynxGlobalServer v.2.5.2 (PLGS) with ExpressionE informatics v.2.5.2 was used. UniProtKB (release 2013_11). Only the identified proteins present in all replicates of each condition obtained in the IdentityE step of PLGS analysis were considered for expression analysis using ExpressionE tool. The proteins obtained were organized by the PLGS ExpressionE tool algorithm into a statistically significant list corresponding to increased and decreased regulation ratios between the different groups compared with control samples. Additional filtering procedure was performed to select only those proteins that presented differential expression levels (ratios) with p value less than 0.05. Protein interactions were analyzed using GeneGO MetaCore software (GeneGO, Encinitas, CA).

2.8 Enzyme-linked immunosorbent assay. PBMC (1×10^6 cells / well) were cultured in 24-well plates. Stimulated with Phorbol 12-myristate 13-acetate (PMA) and ionomycin (IONO) at doses of 100ng/ml and 1 μ g/ml respectively, and then treated with LPSF / NB-3 at concentrations of 1, 10, 50 and 100 μ M. As a control, wells were used containing only cells and others with the reference drug Methylprednisolone (MP) at a concentration of 100 μ M. The plates were incubated in humid atmosphere incubator 48 hours at 37 and 5% CO₂. Cytokines concentrations IFN- γ (BD Biosciences), IL-17 (Ebiosciences), IL-22 (R&D Systems), IL-6 (BD Biosciences) and IL-10 (BD Biosciences) in culture supernatants were measured by commercial ELISA kits according to the manufacturer’s recommendation. Detection limits were: 4.68, 3.90, 15.62, 4.68 e 3.90pg/mL, respectively. Plates were read at 450 and 570 nm (EL808, Biotek, VT, USA).

2.9 Statistical analysis. IC₅₀ values and their 95% confidence intervals were obtained by nonlinear regression with OriginPro program (Version 8.0). GraphPad Prism® 6 software was used for analysis of the cytokines evaluated. After normality test the non-parametric Wilcoxon test was applied and differences were considered significant when $p < 0.05$.

3 Results

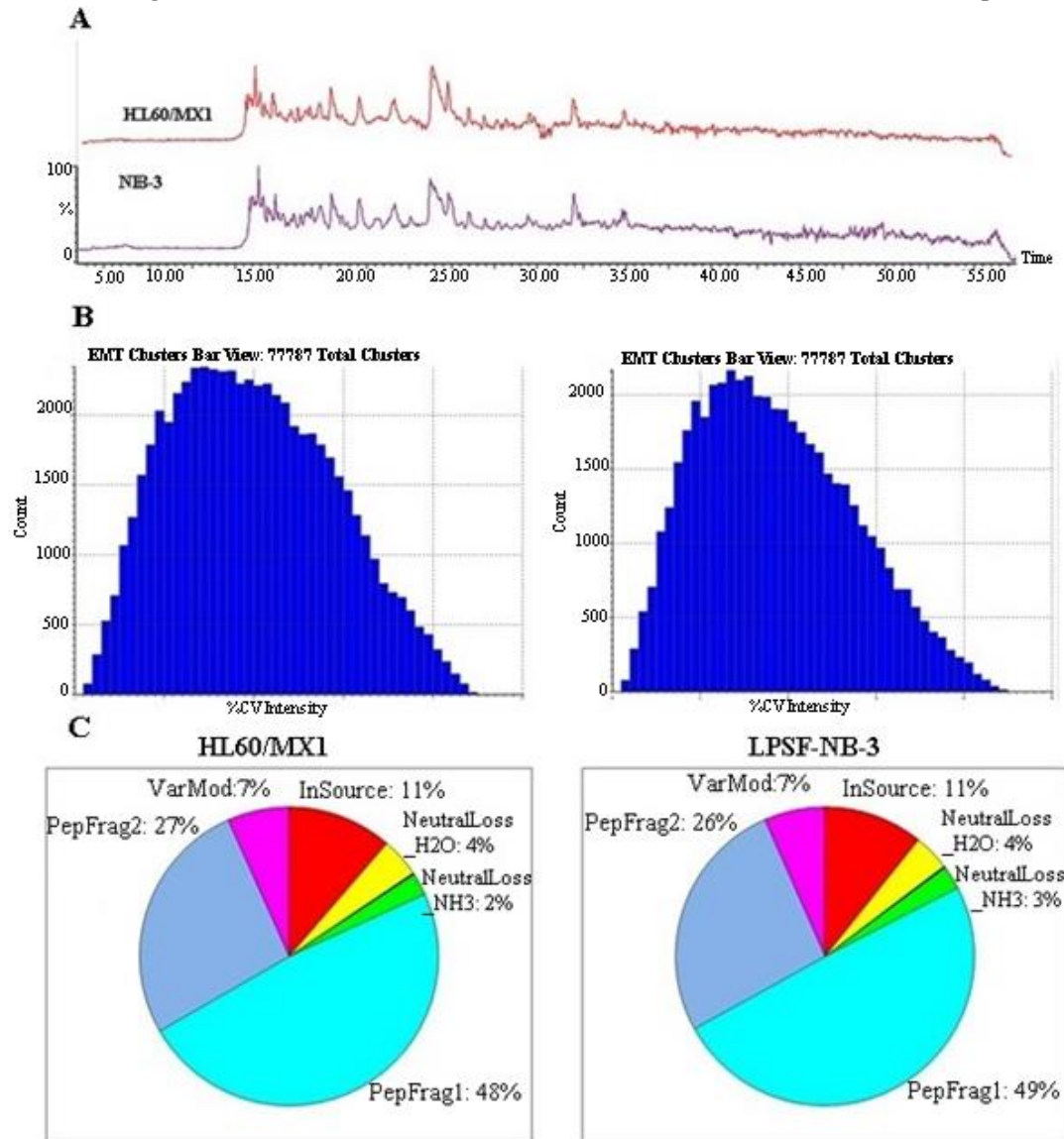
3.1 Selectivity and cytotoxicity assays

Cytotoxicity assays performed in neoplastic cells showed that NB-3 exhibited toxicity in HL-60/MX1 (resistant acute leukemia cells) value IC_{50} 56,33 μ M. In order to determinate the selectivity of compound, toxicity assays were performed in Peripheral Blood Mononuclear Cells (PBMC). NB-3 presented no toxicity against PBMC (viability > 100 μ M) (data not shown).

3.2 Label-Free analysis.

With the aim to identify the altered protein expression profile in the samples treated with LPSF-NB-3 compared with resistant cells without treatment, we performed a quantitative label-free proteomic analysis. In figure 2 the analytical results obtained from the proteomic analysis are shown. In figure 2A, the bidimensional chromatographic distribution, In figure 2B, the coefficient of variation plots of exact mass retention time (ERMT) of the triplicates. The peptide match distribution of the identified peptides obtained demonstrates the reproducible results after the normalization of triplicates of injections. In figure 2C are shown the fragmentation results for control and treated samples. For control samples (48% + 27% = 75%) and for treated samples (49% + 26% = 69%).

Figure 2. (A) 2D-chromatographic distribution of cell lines samples. For control HL60/MX1 and cell line treated with NB-3. (B) Coefficient of variation plots of exact mass retention time (EMRT) for the triplicates both conditions. (C) Peptide match distribution of the identified peptides. PepFrag1 and PepFrag2: peptide matches when compared with database by PLGS; VarMod: variable modifications; InSource: fragmentation that occurred on ionization source; neutral loss H₂O: water precursor loss.

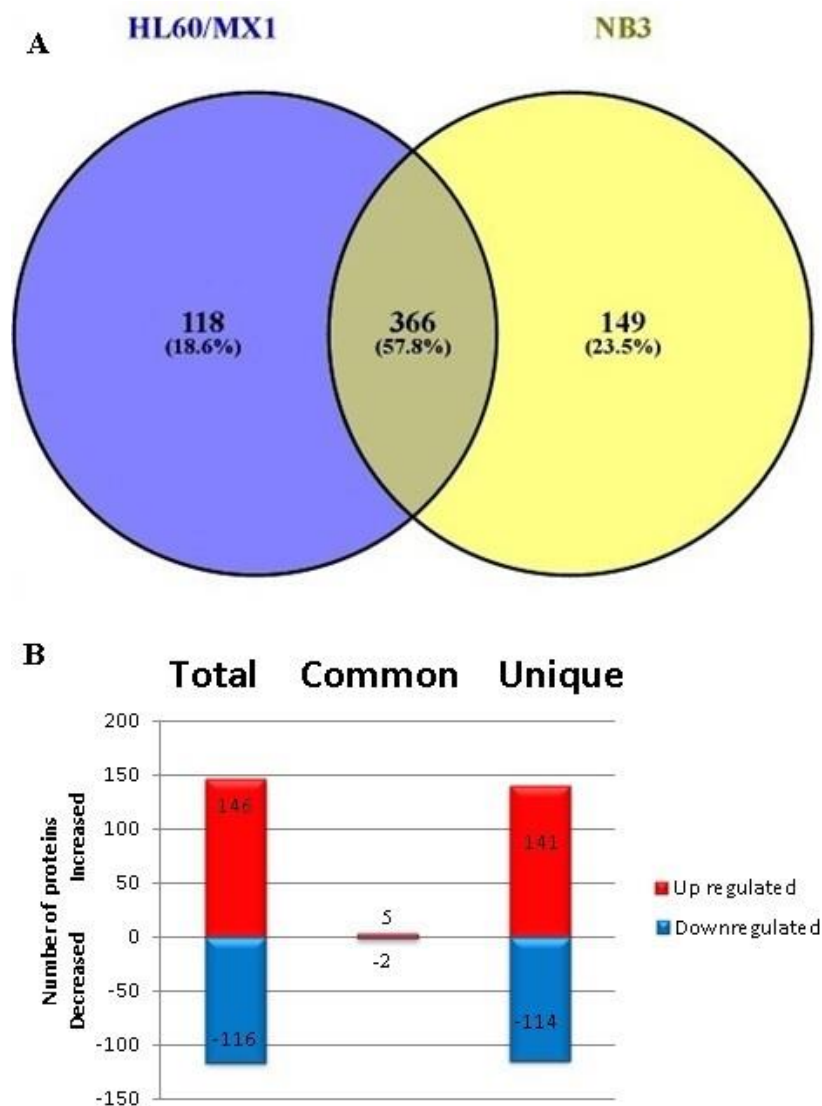


3.3 Differential protein expression analysis in HL60/MX1 untreated and treated with NB-3 compound

The quantitative label-free proteomic approach used was able to identify 2652 proteins in both samples with an FDR (false discovery rate), below 4%. These proteins were

considered for expression analysis in PLGS (Waters) software. The comparative analysis included only the proteins identified in all replicates. Thus, after the comparative analysis 633 proteins were analyzed with the Expression E (Waters) tool. In figure 3A the Venn diagram illustrates the number of proteins exclusively expressed in controls and in samples, as well as, the number of proteins identified in both samples. The comparative analysis identified 262 differentially expressed proteins, among these, 146 over expressed proteins and 116 with reduced expression compared with control samples (Figure 3B).

Figure 3. Distribution of proteins between the control sample (HL60/MX1) and treated (LPSF-3-NB). A) Venn diagram 633 representing the modulated proteins being 366 (57.8%) present in the two samples. Only present in the sample control and treated 18.6% and 23.5% respectively. B) Of the 262 differentially expressed proteins according to the established criteria, 146 were covered up while 116 were down.



3.4 In Silico analysis of biological processes and signaling pathways

The 262 identified proteins were analysed in the MetaCore gene GO software to shed light in the biological processes, functions and pathways altered with the NB-3 treatment . The main biological processes identified among the differential expressed proteins, the processes related to cytoskeleton regulation, cell communication and DNA damage appears as the most prone altered processes. Moreover in silico reveals immune system pathways modulated by the treatment (Figure 4). Among the overexpressed proteins the pathways described as “immune response_Antigen presentation by MHC class I” and “immune response_Regulation of T cell function by CTLA-4” were identified (Figure 5A e 5B).

Figure 4. Biological processes listed are those statistically most relevant using the Metacore Analysis

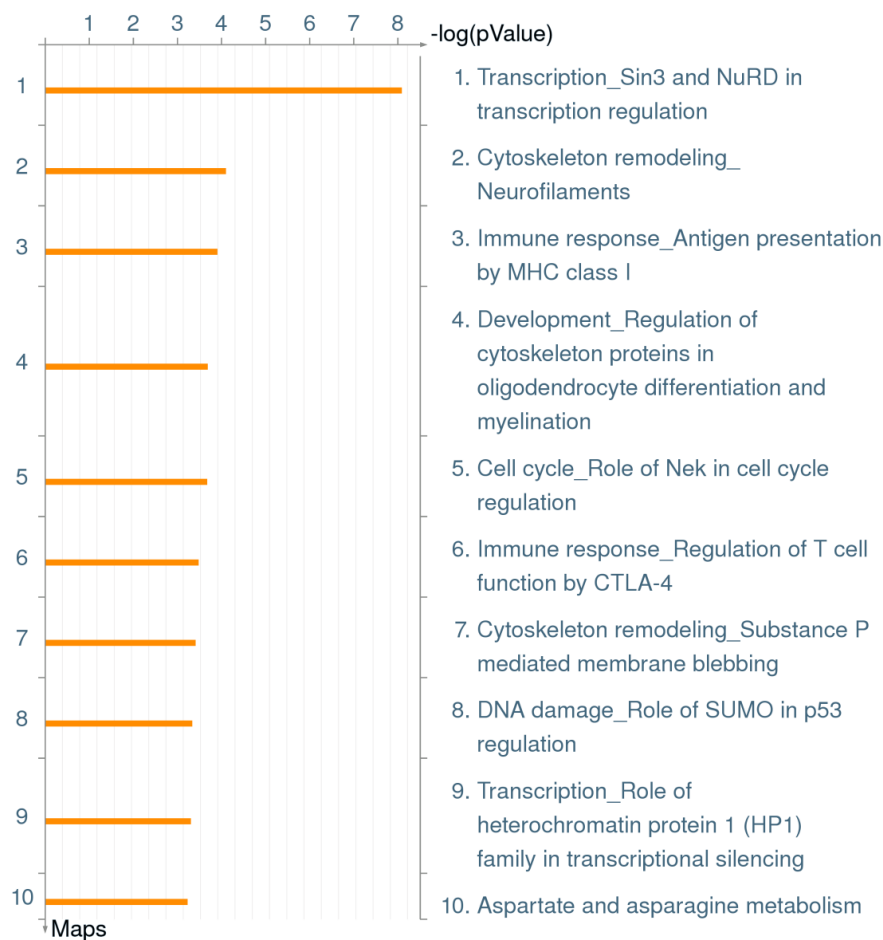
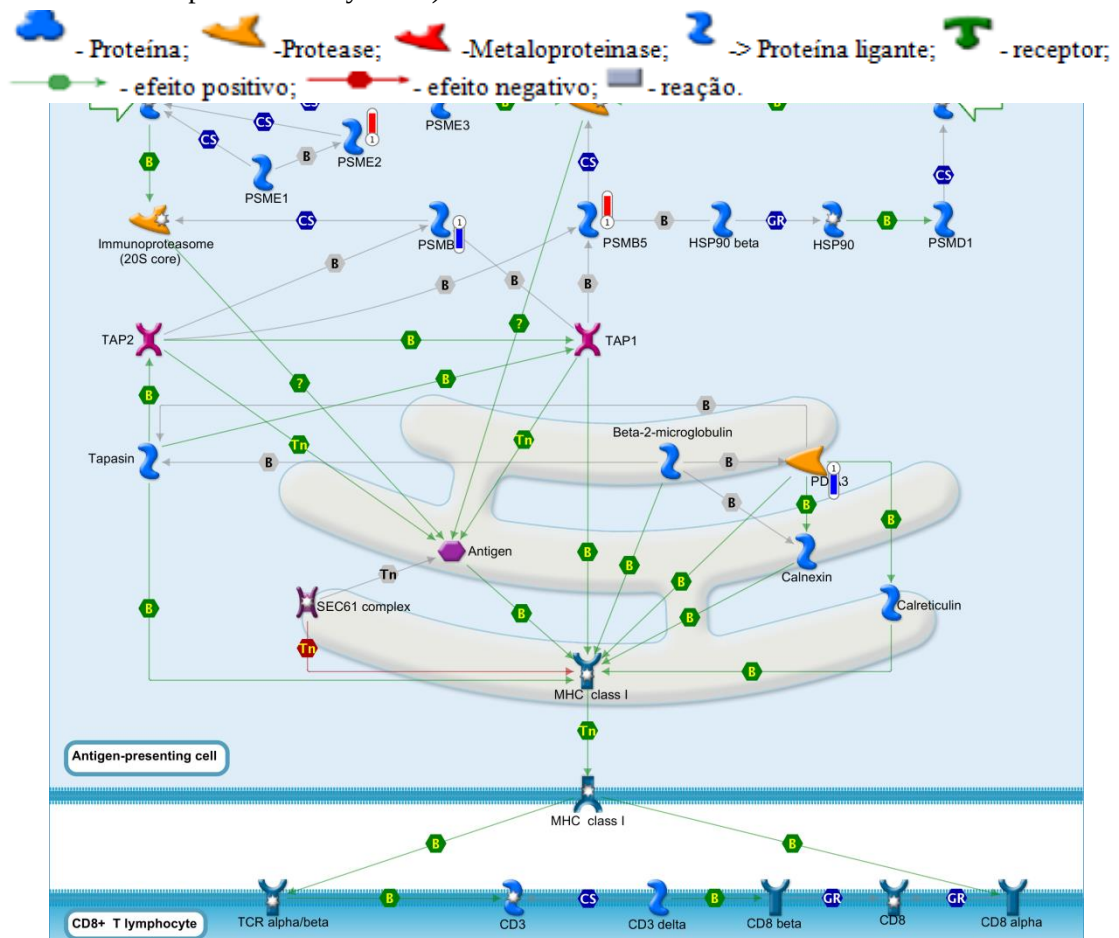
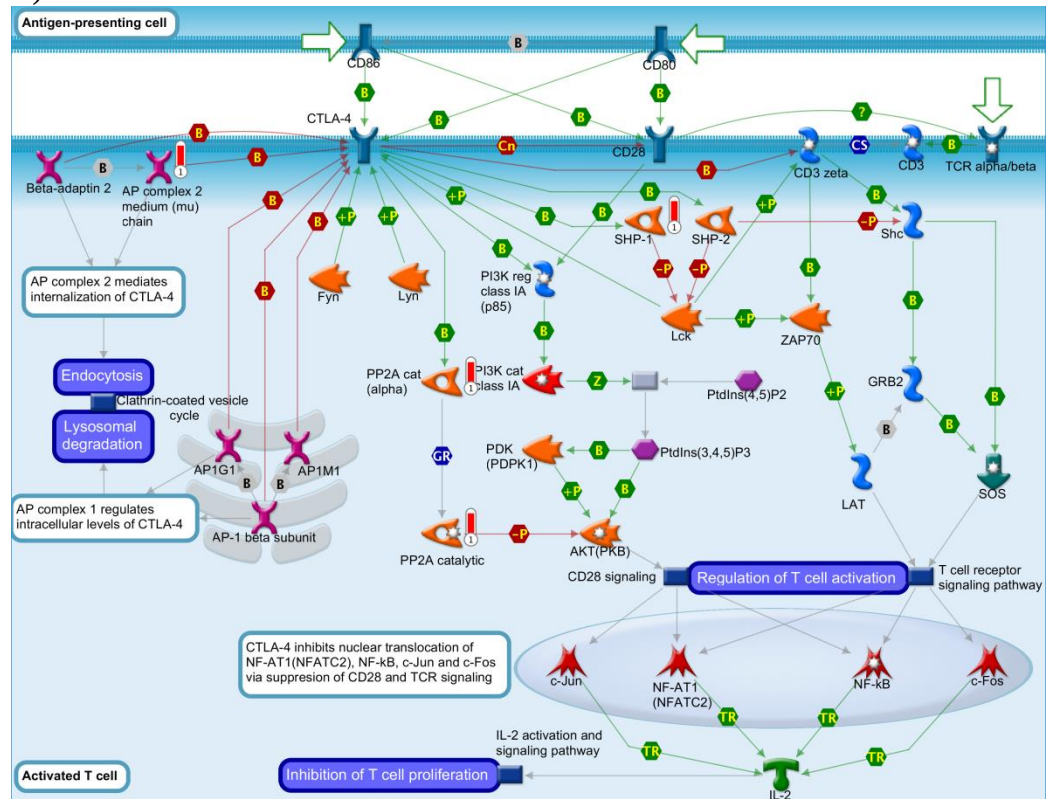


Figure 5. Immune response_Regulation of T cell function by CTLA-4” The red thermometers represent proteins with increased expression and blue proteins identified with decreased expression. (Attached to full caption for all symbols)



A)

B)



3.5 Enzyme immunosorbent assay

Treatment with NB-3 was derived protein capable of modulating the immune system related pathways, the next step was to evaluate the expression of cytokines in PBMC's culture supernatant of healthy volunteers treated with LPSF-NB-3. There was a significant decrease in cytokine IFN- γ ($P < 0.01$) (Figure 6) as well as a decrease pattern following the dose-response model for IL-6 pro-inflammatory cytokines IL-17A and IL-22, as well as the anti-inflammatory cytokine IL-10 (Fig. 7).

Figure 6. Effects of oxazolidine derivative LPSF-NB-3 in pro-inflammatory cytokine IFN- γ levels in peripheral blood mononuclear cells (PBMC) (n=4). [NT= Non-treated control; PMA = phorbol-12-myristate-13-acetate; IONO = Ionomycin; MP = Metilprednisolone 100 μ M]. ** $p < 0.01$.

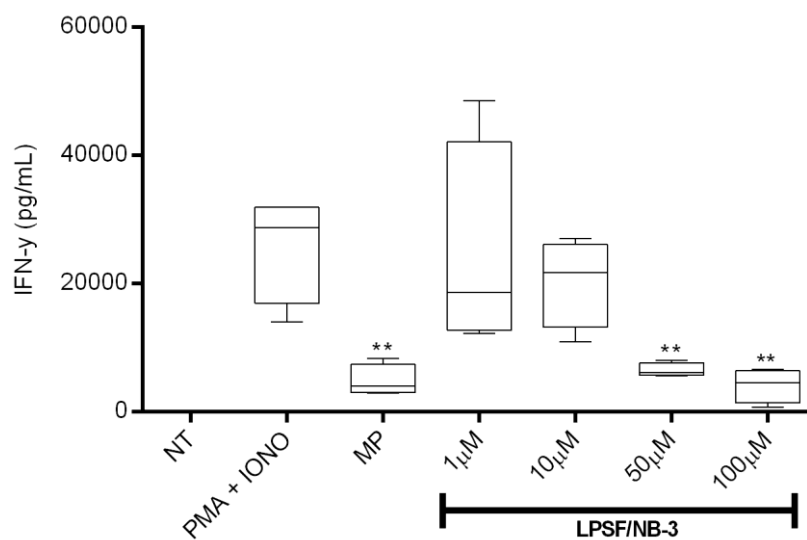
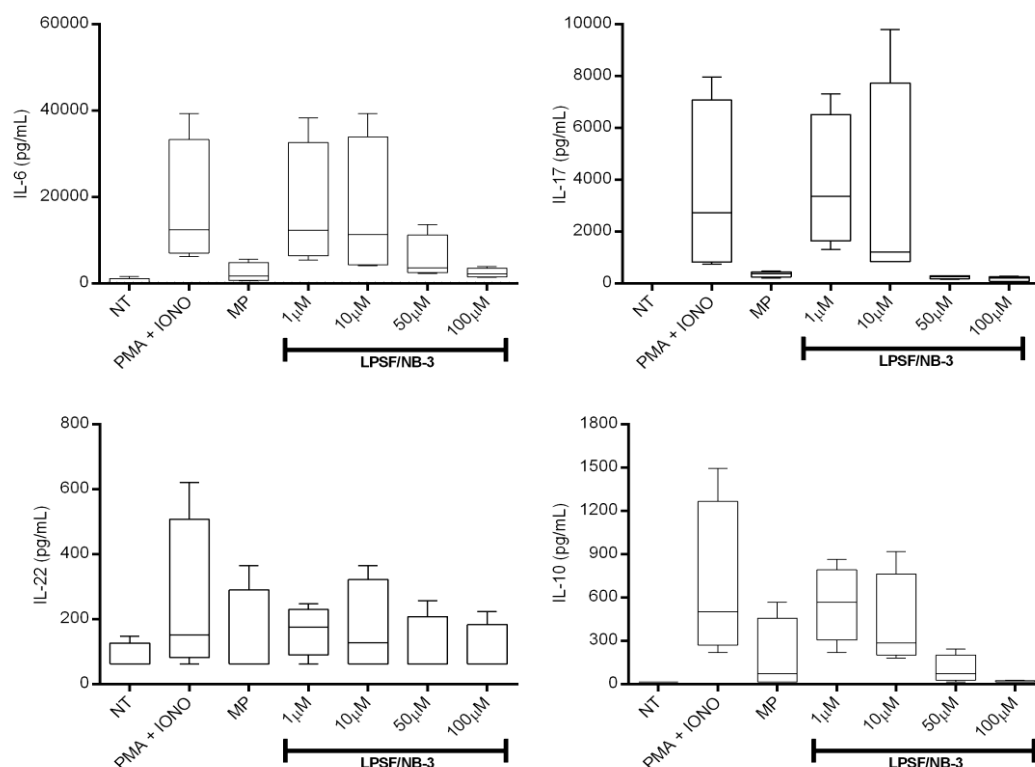


Figure 7. Effects of oxazolidine derivative LPSF-NB-3 in IL-6 (A), IL-17 (B) and IL-22 (C) pro-inflammatory cytokines and anti-inflammatory cytokine IL-10 (D) levels in peripheral blood mononuclear cells (PBMC) (n=4). [NT= Non-treated control; PMA = phorbol-12-myristate-13-acetate; IONO = Ionomycin; MP = Metilprednisolone 100 μ M].



4 Discussion

This paper shows the evaluation of the *in vitro* antineoplastic activity and the mechanism of action by proteomic analysis of LPSF/NB-3 (3-ethyl-2-thioxo-oxazolidin-4-one 5- (4-chloro-benzylidene)), an oxazolidinone derivative in resistant acute leukemia cells. Previous studies have evaluated the anticancer activity of new oxazolidinone derivatives in several tumor cell lines, including leukemias [13-15]. In our study, LPSF-NB-3 derivative exhibit cytotoxicity activity in HL-60/MX-1 cells (IC_{50} = 56,33 μ M).

Andrad et al., 2014 [16] describe the synthesis of a novel series of 25 oxazolidinecarboxylate derivatives. Among them, seven had an antiproliferative effect in HL60 leukemic cell line without affecting healthy cells (PBMC) and one of them induced DNA fragmentation in almost 50% of treated leukemic cells. A study conducted by Campos in 2013 [12] evaluated the activity of LPSF-NB-3 in acute leukemia cell line sensitive to

chemotherapy (HL60), with an IC₅₀ value of 17,84Mm. Until now, there are no studies in the literature that evaluate the cytotoxic potential of LPSF-NB-3 in leukemia resistant cell.

The cell line used in this study, HL60/MX1, exhibits resistance to mitoxantrone (39nM); these cells also have a multidrug resistance (MDR) profile, presenting resistance to etoposide, teniposide, bisantrene, actinomycin, daunorubicin and doxorubicin, making it a MDR model for this study (ATCC CRL2258™). The cytotoxic effect of LPSF-NB-3 in this cell line is extremely important because chemotherapy resistance is still the leading cause of death in cancer patients [17]. The resistance phenotype observed in tumor cells may be due to different cellular changes [5]. Elucidation of the mechanism of action of new drug candidates in resistant cells indicates which roads are diverted or activated and can be studied as a target for therapy.

Among the proteins and pathways modulated by LPSF-NB-3 are those involved in DNA damage, cell cycle and cytoskeletal remodeling. These pathways are commonly reported to be involved in tumor installation and progression [18]. Another important process identified after in silico analysis is related to immune response. The immune system plays a crucial role in tumor prevention, but also in tumor initiation and progression. The tumors are subjected to immune surveillance, but cancerous cells produce an immunosuppressive microenvironment favoring their escape from the immune system [19]

The regulation of immune response via T-cell function by CTLA-4 was shown to be modulated after treatment with our oxazolidine derivative. This pathway is particularly interesting, CTLA-4 is a transmembrane inhibitory receptor expressed in activated T lymphocytes, including activated T-cells, memory T-cells, and Treg-cells. It was recently discovered that CTLA-4 may be expressed in tumor microenvironment [20]. The interaction of MHCI, CTLA-4 and cytokines has been reported in a study by Stojanovic 2014 [21]. CTLA-4 was able to inhibit the expression of IFN γ produced by Nk cells. In our study, all cytokines were reduced in a dose-dependent manner. However, IFN γ levels were significantly reduced ($p < 0.01$) after treatment.

A cohort of previously vaccinated patients with melanoma and ovarian carcinoma was treated with CTLA-4 blocking antibody (MDX-CTLA-4). Reduced tumor markers were observed in two patients with ovarian carcinoma, and there was evidence of tumor necrosis in three patients with metastatic melanoma [22]. CTLA-4 blockage with Ipilimumab, a monoclonal antibody, in prostate cancer patients showed a decline $\geq 50\%$ of prostate specific antigen in 2 of 14 patients [23]. These and other studies indicate that CTLA-4 blockade is safe and clinically interesting. Ipilimumab is used in clinical for metastatic melanoma [24].

The association between immune system and cancer has been described. Much of the evidence for this implication involves inflammatory process and cytokines [25]. Our data show the immunomodulatory potential of LPSF-NB3 derivative, reducing the levels of proinflammatory cytokines. Traditionally, chemotherapy has been known to cause immunosuppression, but recently there has been evidence supporting that various chemotherapies may regulate tumor immunity against neoplastic cells [26]. Immunotherapy opens doors to new chemotherapeutic agent discovery and its use in combination can increase antitumor immunity, causing immune recognition of tumor cells and cell death [27].

LPSF-NB-3 derivative was also able to modulate PI3K/Akt protein. Recently, involvement of PI3K/Akt signaling pathway in MDR has attracted increased attention. Studies show that PI3K/Akt pathway is closely associated with modulation of MDR mediated by P-gp in several types of cancer, including human leukemia [28-30]

Previous studies indicates that PI3K/Akt pathway is excessively activated in a wide variety of hematologic malignancies and is responsible for tumorigenesis by simultaneously promoting proliferation and apoptosis inhibition [31]. Related studies suggest that Akt is involved in the regulation of MDR1 gene and that P-gp is one of the downstream key factors of PI3K/Akt pathway [32-34] The results presented here suggest that our compound is the first oxazolidine derivative in the literature with those activities, in addition of the classical modulation of PPAR. LPSF-NB-3 acts in two crucial pathways for tumor establishment and progression, the immune system and AKT pathways.

5 Conclusions

Oxazolidine derivative, LPSF-NB-3 (5- (4-chloro-benzylidene) -3-ethyl-2-thioxo-oxazolidin-4-one) showed antineoplastic effect in vitro / MX-1 cells HL-60. Analyze proteomics provides data that indicate your mechanism of action. LPSF-NB-3 modified proteins involved in maintaining and tumor progression, was effective immunomodulator in reducing inflammatory cytokines. Thus, the oxazolidine derivative is a candidate to be used in new therapies effective in the treatment of resistant cells.

6 Conflict of interest

The authors declare no conflict of interest.

7 Acknowledgments

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

8 References

- [1] B. Gottgens, Regulatory network control of blood stem cells, *Blood*. 125 (2015) 2614–2620.
- [2] L. Springuel, J-C Renauld, L Knoops, JAK kinase targeting in hematologic malignancies: a sinuous pathway from identification of genetic alterations towards clinical indications, *Haematologica*. 100(2015) 1240-1253.
- [3] C Bodet-Milin, F Kraeber-Bodéré, T Eugène, F Guérard, J Gaschet, C Bailly, M Mougin, M Bourgeois, A Faivre-Chauvet, M Chérel, P Chevallier. Radioimmunotherapy for treatment of acute leukemia, *Semin Nucl Med*, 46 (2016) 135-146.
- [4] K Narasimhan, YM Lee, TK Lim, Genistein exerts anti-leukemic effects on genetically different acute myeloid leukemia cell lines by inhibiting protein synthesis and cell proliferation while inducing apoptosis – molecular insights from an iTRAQ™ quantitative proteomics study, *Oncoscience*. 2 (2015) 111-124.
- [5] J Laskowska, J Lewandowska-Bieniek, J Szczepanek, J Styczyński, A Tretyn, Genomic and transcriptomic profiles and in vitro resistance to mitoxantrone and idarubicin in pediatric acute leukemias. *J Gene Med*. (2016).
- [6] S Bartholomae, B Gruhn, K-M Debatin, M Zimmermann, U Creutzig, D Reinhardt, D Steinbach, Coexpression of Multiple ABC-Transporters is Strongly Associated with Treatment Response in Childhood Acute Myeloid Leukemia. *Pediatr Blood Cancer*, 63 (2016) 242-247.
- [7] N Pandit, R K Singla, B Shrivastava, Current Updates on Oxazolidinone and Its Significance. *International Journal of Medicinal Chemistry*. (2012).
- [8] M Tadesse, J Svenson, M Jaspars, M B Strom, M H Abdelhaman, J H Andersen, E Hansen, P E Kristiansen, K Stensvag, T Haug, Synoxazolidinone C; a bicyclic member of the synoxazolidinone family with antibacterial and anticancer activities. *Tetrahedron Letters*. 52 (2011) 1804–1806.
- [9] N A Annavareddi, R A Maddimsetti Venkateswara, Sudha S K, Ramesh U, Batchu V R, Oxazolidinone derivatives: Cytosaxone/Linezolid hybrids induces apoptosis and senescence in DU145 prostate cancer cells, *Eur J Med Chem*. 80 (2014) 295-307.
- [10] V. A. Mumyatova, A. A. Balakina, N. V. Filatova, V. D. Sen', A. G. Korepin, and A. A. Terentev, Effect of Cytotoxic Compounds on Activity of Antioxidant Enzyme System in MCF-7 and H1299 Cells, *Bull Exp Biol Med*. 161 (2016) 179-83.

- [11] A Singh, H J Ha, J Park, J H Kim, W K Lee, 3,4-Disubstituted oxazolidin-2-ones as constrained ceramide analogs with anticancer activities. *Bioorg Med Chem.* 19 (2011) 6174-81.
- [12] J.C Furtado, Síntese e atividade anticâncer de novos derivados 2-tioxo-oxazolidínicos (2013).
- [13] I Ortín, J F González, E de la Cuesta, C Avendaño, Cytotoxicity of new pyrazino[1,2-b]isoquinoline and 6,15-iminoisoquino[3,2-b]3-benzazocine compounds. *Bioorg Med Chem.* 18 (2010) 6813-21.
- [14] F A R Rodrigues, I S Bomfim, B C Cavalcanti, C Pessoa, R S B Goncalves, J L Wardell, S M S V Wardell, M V N Souza, Mefloquine–Oxazolidine Derivatives: A New Class of Anticancer Agents. *Chem Biol Drug Des.* 83 (2014) 126-31.
- [15] R M Mohareb, A E Abdallah, M H Helal, S M Shaloof, Synthesis and structure elucidation of some novel thiophene and benzothiophene derivatives as cytotoxic agents. *Acta Pharm.* 66 (2016) 53-68.
- [16] S F Andrad, E F Campos, C S Teixeira, C C Bandeira, S N Lavorato, N C Romeiro, C M Bertollo, M C Oliveira, E M Souza-Fagundes, R J Alves, Synthesis of novel 2,3,4-trisubstituted-oxazolidine derivatives and in vitro cytotoxic evaluation. *Med Chem.* 10 (2014) 609-18.
- [17] E Hutchinson, M A Pujana, J Arribas, Cancer Therapeutic Resistance: Progress and Perspectives. *Drugs Today (Barc).* 52 (2016) 347-54.
- [18] D Hanahan, R A Weinberg. Hallmarks of Cancer: The Next Generation. *Cell.* 144, (2011) 646-674.
- [19] M R Galdiero, G Varricchi, G Marone, The Immune networking thyroid. *Cancer Oncoimmunology.* 5 (2016).
- [20] E B Ehlerding, C G England, D G McNeel, W Cai, Molecular Imaging of Immunotherapy Targets in Cancer. *J Nucl Med.* 2016.
- [21] A Stojanovic, N Fiegle, M Brunner-Weinzierl, A Cerwenka. CTLA-4 is expressed by activated mouse NK cells and inhibits NK Cell IFN- γ production in response to mature dendritic cells. *J Immunol.* 192 (2014).
- [22] F S Hodi, M C Mihm, R J Soiffer, F G Haluska, M Butler, M V Seiden, T Davis, R Henry-Spires, S MacRae, A Willman, R Padera, M T Jaklitsch, S Shankar, T C Chen, A Korman, J P Allison, G Dranoff, Biologic activity of cytotoxic T lymphocyte-associated antigen 4 antibody blockade in previously vaccinated metastatic melanoma and ovarian carcinoma patients. *Proc Natl Acad Sci.* 100 (2003) 4712–4717.
- [23] E J Small, N S Tchekmedyian, B I Rini, L Fong, I Lowy, J P Allison, A pilot trial of CTLA-4 blockade with human anti-CTLA-4 in patients with hormone-refractory prostate cancer. *Clin Cancer Res.* 13 (2007) 1810–1815.
- [24] E Buchbinder, F S Hodi, Cytotoxic T lymphocyte antigen-4 and immune checkpoint blockade. *J Clin Invest.* 125 (2015) 3377-83.

- [25] C Panis , L Pizzatti, AC Herrera, S Corrêa, R Binato, E Abdelhay. Label-free proteomic analysis of breast cancer molecular subtypes. *J Proteome Res.* 13 (2014) 4752-72.
- [26] M Joshi, S K Pal, J J Drabick, Novel approaches in cancer immunotherapy a light at the end of the tunnel. *Discov Med.*118 (2016) 479-87.
- [27] L A Emens, G Middleton, The interplay of immunotherapy and chemotherapy: harnessing potential synergies. *Cancer Immunol Res* 5 (2015) 436-443.
- [28] Z Mao, J Zhou, J Luan, W Sheng, X Shen, X Dong, Tamoxifen reduces P-gp-mediated multidrug resistance via inhibiting the PI3K/Akt signaling pathway in ER-negative human gastric cancer cells. *Biomed Pharmacother* 68 (2014) 179-183.
- [29] P L Tazzari, A Cappellini, F Ricci, C Evangelisti, V Papa, T Grafone, G Martinelli, R Conte, L Cocco, J A McCubrey, A M Martely, Multidrug resistance-associated protein 1 expression is under the control of the phosphoinositide 3 kinase/Akt signal transduction network in human acute myelogenous leukemia blasts. *Leukemia* 21 (2007) 427-438.
- [30] N Morishita, H Tsukahara, K Chayama, T Ishida, K Washio, T Miyamura, N Yamashita, M Oda, T Morishima, Activation of Akt is associated with poor prognosis and chemotherapeutic resistance in pediatric B-precursor acute lymphoblastic leukemia. *Pediatr Blood Cancer* 59 (2012) 83-89.
- [31] X Zhang, W Dong, H Zhou, H Li, N Wang, X Miao, L Jia, α -2,8-Sialyltransferase Is Involved in the Development of Multidrug Resistance via PI3K/Akt Pathway in Human Chronic Myeloid Leukemia. *IUBMB Life.* 67 (2015) 77-87.
- [32] Z Han, L Hong, Y Han, K Wu, S Han, H Shen, C Li, L Yao, T Qiao and D Fan, Phospho Akt mediates multidrug resistance of gastric cancer cells through regulation of P-gp, Bcl-2 and Bax. *J Exp Clin Cancer Res* 26: (2007) 261-268.
- [33] H Wang, X H Jia, J R Chen, J Y Wang, Y J Li, Osthole shows the potential to overcome P-glycoprotein-mediated multidrug resistance in human myelogenous leukemia K562/ADM cells by inhibiting the PI3K/Akt signaling pathway. *Oncol Rep.*35 (2016) 3659-68.
- [34] Cheng L, Luo S, Jin C, Ma H, Zhou H and Jia L: FUT family mediates the multidrug resistance of human hepatocellular carcinoma via the PI3K/Akt signaling pathway. *Cell Death Dis* 4: e923, 2013.

6 DISCUSSÃO

O câncer é um grave problema de saúde pública, pois não raramente os pacientes desenvolvem resistência à terapia utilizada para o tratamento. As células cancerígenas que escapam à terapia de indução são uma das principais causas de recaída. Essas células que são mais adaptáveis ou resistentes ao tratamento resultam em doença recorrente frequentemente associada com pior prognóstico. Entender as alterações metabólicas associadas com resistência às drogas como também os mecanismos de ação de novos compostos abre oportunidades para o desenvolvimento de novas estratégias terapêuticas (STÄUBERT et al., 2015). Visto que o desenvolvimento de resistência ao fármaco continua a ser um dos maiores obstáculos para a quimioterapia com sucesso, vários tipos de agentes têm sido alvos na busca de inibidores da resistência múltipla a fármacos (MDR), entre as quais novos derivados vêm sendo investigados (FOROUGHINIA et al., 2008; BADOWSKA-ROSLONEK et al., 2016).

O objetivo geral do trabalho consistiu na análise proteômica dos mecanismos de ação desse novo agente em células leucêmica resistente, HL60/MX1. A linhagem HL-60/MX1 é um derivado resistente da linhagem de leucemia aguda HL-60. As células foram selecionadas e subclonadas para resistência a mitoxantrona, uma antracenediona sintética, potente agente antineoplásico utilizado no tratamento de leucemias. A exposição subsequente das células HL-60/MX1 a concentrações mais elevadas de mitoxantrona levou ao surgimento de células capazes de crescimento em altas doses. As células de HL-60/MX1 possuem resistência cruzada a antitumorais como o etoposido, teniposido, bisantreno, actinomicina, daunorubicina e doxorubicina demonstrando assim um fenótipo multidroga resistente (MDR) (ATCC, 2015).

No estudo anterior realizado pelo grupo, o LPSF-NB-3 apresentou ação citotóxica na linhagem leucêmica sensível, HL-60 com valor de IC_{50} de 17,84 μM , bem como na linhagem resistente HL60/MX o que pôde ser confirmado nesse estudo. Adicionalmente, o derivado não foi tóxico em células de doadores saudáveis (CAMPOS et al., 2017). Apesar de muitos estudos já evidenciarem as diversas atividades dos novos derivados oxazolidinônicos, ainda há poucos estudos que retratam atividade antitumoral. Em 2014, Pitta e colaboradores desenvolveram derivados de 2-tioxo-oxazolidinona com alta atividade citotóxica. Utilizando uma 3-etil-2-tioxo-oxazolidinona comercial, realizou-se uma reação de adição de Michael com ésteres de Cope e morfina como catalisador para se obter oxazolidinonas 2-tioxo-5-substituídas. Todos os derivados mostraram atividade citotóxica contra estirpes de leucemia promielocítica aguda (HL-60) e leucemia de células T (Jurkat), Além disso, nenhum destes

derivados mostrou citotoxicidade contra células mononucleares de sangue periférico de indivíduos saudáveis (PBMC), o que possibilita sua administração em humanos (PITTA et al 2015).

Após confirmar a toxicidade do derivado prosseguiu-se com avaliação do mecanismo de ação pela análise proteômica. Descobertas sem precedentes foram geradas na área da oncologia devido à emergência de tecnologias que melhoram a nossa compreensão genômica, transcricional, proteômica e epigenética. Este conhecimento estimulou a pesquisa translacional e a descoberta de novas drogas que melhoraram o prognóstico de pacientes com câncer. O uso da proteômica permite a análise molecular de tumores e a descoberta de terapias direcionadas com o uso de agentes direcionados (TSIMBERIDOU, 2017). Ademais conclusões com base no proteoma podem ser úteis para identificação do mecanismo de ação de novos fármacos e monitoramento do surgimento do fenômeno de resistência (SKVORTSOV, 2014).

No presente estudo, a avaliação proteômica evidenciou a capacidade do derivado em atuar em vias do sistema imune, modulando a expressão de citocinas envolvidas no contexto inflamatório. Já é bem relatada a associação existente entre a inflamação e carcinogênese, os principais mecanismos de sobrevivência apresentados e desenvolvidos pelas células tumorais para escapar ao sistema de imuno-vigilância são: redução do nível de expressão das moléculas do complexo de histocompatibilidade maior (MHC), pobre expressão de moléculas coestimuladoras; ausência de reconhecimento de antígenos tumorais, secreção de substâncias imunossupressoras.

Além desses, a desregulação das citocinas induzidas pela quimioterapia estão associados diversos danos orgânicos (ALUISE et al., 2010; JANELSINS et al., 2012). Estudos clínicos têm sugerido uma associação entre níveis de citocinas inflamatórias e fármacos quimioterápicos (SALIGAN; KIM, 2012; SCHUBERT et al., 2007). Além disso, os macrófagos liberam citocinas pró-inflamatórias em resposta ao cancer ou ao tratamento e conduzem a respostas imunitárias estimuladas (CLEELAND et al., 2003).

O estresse psicológico e físico (GLASER; KIECOLT-GLASER, 2005) dos pacientes devido ao diagnóstico de câncer, tratamentos a longo prazo também são propostos por causar distúrbio nos níveis das citocinas. Além disso, a morte de ambas células normais e tumorais, causada pela quimioterapia pode desencadear alterações dos níveis de citocinas (WANG et al., 2015). A metástase tumoral também envolve a secreção de citocinas das células cancerosas aos tecidos circundantes (LEE et al., 2004). Os múltiplos fatores mencionados

acima podem afetar os níveis de citocinas, exigindo delineamento experimental e considerações para diferentes situações.

A associação entre o sistema imunológico e o câncer tem sido descrita. Grande parte da evidência desta implicação envolve processo inflamatório e citocinas (PANIS et al., 2014). Nossos dados mostram o potencial imunomodulador do derivado LPSF-NB3, reduzindo os níveis de citocinas pró-inflamatórias. Tradicionalmente, a quimioterapia tem sido conhecida por causar imunossupressão, mas recentemente tem havido evidências de que várias quimioterapias podem regular a imunidade tumoral contra células neoplásicas (JOSHI; PAL; DRABICK, 2016).

A imunoterapia abre as portas para a descoberta de novos agentes quimioterápicos e seu uso em combinação pode aumentar a imunidade antitumoral, causando o reconhecimento imune de células tumorais e morte celular (EMENS, L. A.; MIDDLETON, 2017).

O derivado LPSF-NB-3 também foi capaz de modular a proteína PI3K / Akt. Recentemente, o envolvimento da via de sinalização de PI3K / Akt na MDR atraiu maior atenção. Estudos mostram que PI3K / Akt caminho está intimamente associada com a modulação de MDR mediada por P-gp em vários tipos de câncer, incluindo a leucemia humana (MAO et al., 2014; TAZZARI et al., 2007; MORISHITA et al., 2012).

Estudos anteriores indicam que a via PI3K / Akt é excessivamente ativada numa grande variedade de neoplasias hematológicas e é responsável pela tumorigênese, promovendo simultaneamente a proliferação e a inibição da apoptose (ZHANG et al., 2015). Estudos relacionados sugerem que a Akt está envolvida na regulação do gene MDR1 e que a P-gp é um dos factores-chave a jusante da via PI3K / Akt (HAN et al., 2007; CHENG et al., 2013; WANG et al., 2016). Os resultados apresentados aqui sugerem que o nosso composto é o primeiro derivado oxazolidinico na literatura com essas atividades, além da modulação clássica do PPAR. O LPSF-NB-3 atua em duas vias cruciais para o estabelecimento e progressão do tumor, o sistema imunológico e as vias AKT.

7 CONCLUSÃO

Confirmamos que o derivado oxazolidinico propostos não apresentara citotoxicidade em células mononucleares do sangue periférico (PBMC) de indivíduos saudáveis, em contrapartida possui ação antineoplásica frente à linhagem leucêmica resistente HL60/MX1.

A análise proteômica do mecanismo de ação indicou que o mesmo atua em vias imunes importantes no contexto tumoral, tais como a via do MHCI, CTL4-A e Pi3k foram moduladas com o tratamento. LPSF-NB-3 tem a capacidade de reduzir significativamente citocinas inflamatórias envolvidas na instalação, progressão e manutenção tumoral.

9 REFERÊNCIAS

ABDALLAH, C et al. Gel-Based and Gel-Free Quantitative Proteomics Approaches at a Glance. **Internat Journ of Plant Gen.**2012..

ALBERICE, Juliana Vieira. **Avaliação Analítica de Potenciais Biomarcadores para Câncer de Bexiga em Urina**. São Carlos: IQSC-USP. 2014.123p. Tese (Doutorado)-Programa de Ciências, Universidade de São Paulo, São Carlos. 2014.

ALCARO, S et al. Design and synthesis of DNA-intercalating 9-fluoren-beta-O-glycosides as potential IFN-inducers, and antiviral and cytostatic agents. **Bioorg Med Chem.** 1;12(7):1781-91. 2004.

ALMEIDA, V.L et al. Câncer e agentes antineoplásicos ciclo-celular específicos e ciclo-celular não Específicos que interagem com o dna: uma introdução. **Quim. Nova**, 28(1), 118-129, Setembro, 2005.

ALUISE, C.D. Chemo brain (chemo fog) as a potential side effect of doxorubicin administration: role of cytokine-induced, oxidative/nitrosative stress in cognitive dysfunction. **Adv Exp Med Biol.** 678:147-56. 2010.

ANDRADE, V.; SAWADA, M.O.; BARICHELO, E. Qualidade de vida de pacientes com câncer hematológico em tratamento quimioterápico. **Rev Esc Enferm USP.** 47(2):355-61, Agosto, 2012.

BADOWSKA-ROŚŁONEK et al. Synthesis and cytotoxic activity of new 5h-indolo[2,3-b]quinoline o-aminoglycosides. **Acta Pol Pharm.** May-Jun;73(3):683-92. 2016.

BARALLOBRE-BARREIRO, J.; CHUNG, Y.; MAYR, M. Proteomics and metabolomics for mechanistic insights and biomarker discovery in cardiovascular disease. **Revista Española de Cardiología**, v. 66, p. 657–661, 2013.

BARBOSA, E.B. et al. Proteômica: metodologias e aplicações no estudo de doenças humanas. **Rev Assoc Med Bras** ; 58(3):366-375, 2012.

BARTHOLOMAE, S. Coexpression of Multiple ABC-Transporters is Strongly Associated with Treatment Response in Childhood Acute Myeloid Leukemia. **Pediatr Blood Cancer**.;63(2):242-7, 2016.

BJELLQVIST, R et al. Isoelectric in immobilized pH gradients: principle, methodology and some applications. **J Biochem Biophys Methods**.6(4):317-39.1982.

BÓCOLI, K.H et al. Tratamento cirúrgico de carcinomas cutâneos pelo Sistema Único de Saúde: análise de custo. **Rev Col Bras Cir**.40(6), 2013. Disponível em URL: <http://www.scielo.br/rcbc>. Acesso em: 12 de agosto de 2015.

BONASSA, E.M.A. **Enfermagem em terapêutica oncológica**. 3ª ed. São Paulo: Atheneu.p. 538-40. 2005.

BORGES, L.J et al. In vitro and in vivo studies of the antineoplastic activity of copper (II) compounds against human leukemia THP-1 and murine melanoma B16-F10 cell lines. **Eur J Med Chem**. 123:128-140, 2016.

BORGES-OSÓRIO, M.R; ROBINSON, W.M. **Genética Humana**. 3ª edição. Artmed, 2013.128.

BRANCO-JUNIOR, J.F et al. The Role of Oxazolidine Derivatives in the Treatment of Infectious and Chronic Diseases. **Current Bioactive Compounds**. Vol. 13, No. 00, 2017.

BUONDONNO, I et al. Mitochondria-targeted doxorubicin: a new therapeutic strategy against doxorubicin-resistant osteosarcoma. **Mol Cancer Ther**. 2016 Jul 27, 2016.

CAMPOS, JÚLIA FURTADO. **Síntese e atividade anticâncer de novos derivados 2-tioxo-oxazolidínicos**. Recife: UFPE, 2013.83p. Tese (Doutorado) Programa de Pós Graduação em Inovação Terapêutica, Universidade Federal de Pernambuco, Recife, 2013.

CAMPOS, J.M et al. Synthesis and *in vitro* anticancer activity of new 2-thioxo-oxazolidin-4-one derivatives. **Pharmacological Reports**. Available online 18 March 2017. Acesso em: 20 de abril de 2017.

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

CHATTERJEE, M et al. Pathways to implementation of serum proteomics for câncer. **Expert Opin. Med. Diagn.** 1(1):3-15, 2007.

CHEN, Y. et al. Nuclear receptors in the multidrug resistance through the regulation of drug-metabolizing enzymes and drug transporters **Biochem Pharmacol**, 15;83(8): p1112-26, 2012.

CHENG, L et al. FUT family mediates the multidrug resistance of human hepatocellular carcinoma via the PI3K/Akt signaling pathway. **Cell Death Dis** 4: e923, 2013.

CHO, W.C.S et al. Proteomics in translational câncer research: biomarker discovery for clinical applications. **Expert Rev. Proteomics**.11(2), 131-133, Abril, 2014.

CHVÁLOVÁ, K. et al. Mechanism of the formation of DNA–protein cross-links by antitumor cisplatin. **Nucleic Acids Res.** 35(6): 1812–1821. 2007.

CLEELAND, C.S et al. Are the symptoms of cancer and cancer treatment due to a shared biologic mechanism? **Cancer**, 97 , pp. 2919–2925, 2003.

COLOTTA, F et al. Cancer-related inflammation, the seventh hallmark of cancer: links to genetic instability. **Carcinogenesis**. 30 (7), 1073–1081, Maio, 2009. .

CRUZ, Anne Cecília Nascimento. **Avaliação da atividade antitumoral in vitro e in vivo da nitrofurantoína**. Recife: UFPE, 2013. 92p. Dissertação (Mestrado)- Programa de Pós Graduação em Ciências Farmacêuticas, Universidade Federal de Pernambuco, Recife, 2013..

DEANE, J et al. Activity of tedizolid (TZD) and linezolid (LZD) against key bacterial pathogens associated with respiratory, skin/wound infections, and bacteremia [abstract no. C2-090 plus poster]. In: 53rd Annual Interscience Conference on Antimicrobial Agents and Chemotherapy: Denver; 2013.

D'SOUZA-SCHOREY, C., CLANCY, J. W., Tumor-derived microvesicles: shedding light on novel microenvironment modulators and prospective cancer biomarkers. **Genes Dev.** 26, 1287–1299.2012.

EFFERTH, T et al. Analysis of single nucleotide polymorphism C3435T of the multidrug resistance gene MDR1 in acute lymphoblastic leukemia. **Int J Oncol.** 23(2):509-17.2003.

EMENS, L. A.; MIDDLETON, G. The Interplay of Immunotherapy and Chemotherapy: Harnessing Potential Synergies. **Cancer immunology research** 3.5 (2015): 436–443. PMC. Web. 25 Apr. 2017.

ESPINDOLA, F.S et al. Recursos de bioinformática aplicados às ciências Ômicas como genômica, transcriptômica, proteômica, interatômica e metabolômica. **Bioscience J.** 26(3):463-77.2010.

FERREIRA, C.N et al. Treatment Patterns and Costs Associated with Chronic Lymphocytic Leukemia Chemotherapy Under the Brazilian Private Health Care Perspective: A Retrospective Analysis of the Orizon Database. In: ISPOR 22nd Annual International Meeting, **PCN83**, Boston, USA, 2013.

FLÓREZ, L.M.M et al. Canine transmissible venereal tumor: expression of MDR-1, and TP53 and BCL-2 family genes and its implications in biological and therapeutic behavior. **Ces. Med. Vet. Zootec.** vol.9 no.2, 2014.

FOROUGHINIA, F et al. Design and synthesis of new symmetrical derivatives of dihydropyridine containing a pyridyl group on the 3, 5-positions and evaluation of their cytotoxic and multidrug resistance reversal activity. **J Pharm Pharmacol.** 60(11):1481-9.2008.

GLASER, R.; KIECOLT-GLASER, J.K. Stress-induced immune dysfunction: implications for health. **Nat. Rev. Immunol.**, 5 , pp. 243–251 , 2005.

GLOBOCAN 2012: estimated cancer incidence, mortality and prevalence worldwide in 2012. Available from: [http:// globocan.iarc.fr/Pages/fact_sheets_cancer. aspx](http://globocan.iarc.fr/Pages/fact_sheets_cancer.aspx).

GSTAIGER, M.; AEBERSOLD, R. Applying mass spectrometry-based proteomics to genetics, genomics and network biology. **Nature Review Genetics.** 10(9):617-27.2009.

GUPTA, S.; VENKATESH, A, RAY S, SRIVASTAVA, S. Challenges and prospects for biomarker research: A current perspective from the developing world. **Biochim Biophys Acta**, pii:S1570-9639(14)00002-8, 2014.

HAN, Z et al. Phospho Akt mediates multidrug resistance of gastric cancer cells through regulation of P-gp, Bcl-2 and Bax. **J Exp Clin Cancer Res.** 26: 261-268. 2007.

HANAHAN, D.; WEINBERG, R.A. Hallmarks of Cancer: The Next Generation. **Cell**. 144, 646-674, Março, 2011.

HEDAYA, O. M et al. Antiproliferative activity of a series of 5-(1H-1,2,3-triazolyl) methyl- and 5-acetamidomethyl-oxazolidinone derivatives. **Molecular Medicine Reports** 13.4.3311-3318. 2016.

HODGES, L.M et al. Very important pharmacogene summary: ABCB1 (MDR1, Pglycoprotein). **Pharmacogenet. Genomics** 21(3): 152–161, 2011.

INSTITUTO NACIONAL DE CANCER JOSÉ ALENCAR GOMES DA SILVA. **INCA - Instituto Nacional de Câncer - Estimativa 2016**. [s.l: s.n.].

JANELSINS, M.C et al. K.M. Differential expression of cytokines in breast cancer patients receiving different chemotherapies: implications for cognitive impairment research Support. **Care Cancer**, 20 , pp. 831–839, 2012.

JOSHI, M.; PAL, S.K.; DRABICK, J.J. Novel approaches in cancer immunotherapy a light at the end of the tunnel. **Discov Med**. 118, 479-87. 2016.

KAMAL, A et al. Synthesis, biological evaluation of new oxazolidino-sulfonamides as potential antimicrobial agents. **Eur J Med Chem**. 62:661-9. 2013.

KAYSER, S et al. Pretransplant NPM1 MRD levels predict outcome after allogeneic hematopoietic stem cell transplantation in patients with acute myeloid leukemia. **Blood Cancer Journal**. 29;6(7):e449, 2016.

KEERSMAECKER, S.C.; THIJS, I.M.; VANDERLEYDEN, J.; MARCHAL, K. Integration of omics data: how well does it work for bacteria?. **Molecular Microbiol**. 62(5):1239-50.2006.

KETRON, A.C. et al. Amsacrine as a topoisomerase II poison: importance of drug-DNA interactions. **Biochemistry**, 51:1730–1739, 2012. .

KOJIMA, N et al. Synthesis of dansyl-labeled probe of thiophene analogue of annonaceous acetogenins for visualization of cell distribution and growth inhibitory activity toward human cancer cell lines. **Bioorganic & Medicinal Chemistry**. 23, 1276-1283, 2015.

KOTA, U.; GOSHE, M.B. Advances in qualitative and quantitative plant membrane proteomics. **Phytochemistry**. vol. 72, no. 10, pp. 1040–1060, 2011.

KROETZ, F.M.; CZLUSNIAK, G.D. Alterações bucais e condutas terapêuticas em pacientes infantojuvenis submetidos a tratamentos antineoplásicos. UEPG **Ci Biol Saúde**, Ponta Grossa,;9(2):41-8, 2003.

KUSSMANN. M.; RAYMOND, F.; AFFOLTER, M. OMICS-driven biomarker discovery in nutrition and health. **Journal of Biotechnology**, v. 124, p. 758–787, 2006.

LEE, B.N et al. A cytokine-Based neuroimmunologic mechanism of cancer-related symptoms. **Neuroimmunomodulation**, 11, pp. 279–292 , 2004.

LEYVA-PERALTA, M.A et al. In vitro anti-proliferative activity of Argemone gracilentia and identification of some active components. **BMC Complement Altern Med**. Feb 5;15:13, 2015.

LI, X.; PAN, L.; SHI, J. Nuclear-Targeting MSNs-Based Drug Delivery System: Global Gene Expression Analysis on the MDR-Overcoming Mechanisms. **Adv. Healthcare Mater**. 4: 2641–2648, 2015.

LINCH, S.N.; MICHAEL, J.M.; WILLIAM, L.R. OX40 Agonists and Combination Immunotherapy: Putting the Pedal to the Metal. **Front Oncol**. 16;5:34, 2015.

LUNDGREN, D.H et al. “Role of spectral counting in quantitative proteomics,”**Expert Review of Proteomics**, vol. 7, no. 1, pp. 39–53, 2010.

LUO, J.; SOLIMINI, N.L.; ELLEDGE, S.J. Principles of Cancer Therapy: Oncogene and Non-oncogene Addiction. **Cell**. 136(5): 823–837, Março, 2009.

LYMAN, G.H.; MOSES, H.L. Biomarker tests for molecularly targeted therapies—the key to unlocking precision medicine. **N Engl J Med** 375(1):4–6. 2016.

MACHADO, A.E.D.; **Quim. Nova** . 23, 237.2000.

MAJUMDER et al. Reversal of drug resistance in P-glycoprotein-expressing T-cell acute lymphoblastic CEM leukemia cells by copper N-(2-hydroxy acetophenone) glycinate and oxalyl bis (N-phenyl) hydroxamic acid. **Cancer Lett.** 28;244(1):16-23, 2006.

MAO, Z et al. Tamoxifen reduces P-gp-mediated multidrug resistance via inhibiting the PI3K/Akt signaling pathway in ER-negative human gastric cancer cells. **Biomed Pharmacother.** 68, 179-183. 2014.

MORISHITA, N et al. Activation of Akt is associated with poor prognosis and chemotherapeutic resistance in pediatric B-precursor acute lymphoblastic leukemia. **Pediatr Blood Cancer.** 59, 83-89. 2012.

MUNOZ, M et al. Role of the MRP1/ABCC1 Multidrug Transporter Protein in Cancer. **IUBMB Life.**;59(12):752-7, 2007.

MURAD, A.M.; KATZ, A.; **Oncologia Bases Clínicas do Tratamento**; Guanabara; Rio de Janeiro, p. 41.2000.

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

NARESH, A et al. Oxazolidinone derivatives: cytoxazone-linezolid hybrids induces apoptosis and senescence in DU145 prostate cancer cells. **Eur J Med Chem.** 10;80:295-307, 2014.

NASSAR, A.E.; WISNEWSKI, A.V.; KING, I. Biotransformation and Rearrangement of Laromustine. **Drug Metab Dispos.** ;44(8):1349-63. 2016.

NEGRINI, S.; GORGOULIS, V.G.; HALAZONETIS, T.D. Genomic instability — an evolving hallmark of câncer. **Molecular cell Biology.** 11, 220-228, Março, 2010

NEPALI, K et al. Topoisomerase I and II Inhibitors: A Patent Review. **Recent Pat Anticancer Drug Discov.** 2016.

NETO, MC et al. **Guia de Protocolos e Medicamentos para Tratamento em Oncologia e Hematologia.** São Paulo, Hospital Albert Einstein, 516p. 2013. Disponível em:

https://medicalsuite.einstein.br/pratica-medica/guias-e-protocolos/Documents/Guia_Oncologia_Einstein_2013.pdf. Acessado em 23 de Agosto de 2016.

NING, Z et al. Analytical aspects of proteomics: 2009_2010. **Analytical Chemistry**, v. 83, p. 4407–4426, 2011.

NUSSBAUMER, S. et al. Analysis of anticancer drugs: a review. **Talanta**. 85(5):2265-89. 2011.

OLIVEIRA, Thiago Bento. **Síntese, determinação estrutural e avaliação biológica de novos derivados hidrazínicos e tiazolidinônicos tiofênicos**. Recife: UFPE, 2013.63p. Tese (Doutorado) Programa de Pós Graduação em Ciências Farmacêuticas, Universidade Federal de Pernambuco, Recife, 2013.

OOKO, E et al. Modulation of P-glycoprotein activity by novel synthetic curcumin derivatives in sensitive and multidrug-resistant T-cell acute lymphoblastic leukemia cell lines. **Toxicol Appl Pharmacol**. 15;305:216-33, 2016.

PAL, T et al. Design and development of oxazol-5-ones as potential partial PPAR- γ agonist against cancer cell lines. **Anticancer Agents Med Chem**.14(6):872-83. 2014.

PANDIT, N et al. Current Updates on Oxazolidinone and Its Significance. **International Journal of Medicinal Chemistry**. Vol. 2012.

PANIS, C et al. Label-free proteomic analysis of breast cancer molecular subtypes. **J Proteome Res**. 13, 4752-72, 2014.

PENNINGTON, S.R.; DUNN, M.J. Proteomics: from protein sequence to function. New York: Springer-Verlag e BIOS scientific Plubishers.v1.2001.

PIMENTA, A.M.C. Os desafios do proteoma. **Ciência Hoje**, 32, 16-22, Abril, 2003.

PITTA, I.R et al. Novos derivados 2-tioxo-oxazolidínicos potencialmente úteis na terapia anticâncer. BR. **Patent** 20150160607 July 07, 2015.

RAIMONDO, F et al. Advances in membranous vesicle and exosome proteomics improving biological understanding and biomarker discovery. **Proteomics**. 11, 709–720. 2011.

RODRIGUES-JUNIOR, V.S et al. Mefloquine and its oxazolidine derivative compound are active against drug-resistant *Mycobacterium tuberculosis* strains and in a murine model of tuberculosis infection. **Int J Antimicrob Agents**. 48(2):203-7. 2016.

SALIGAN, L.; KIM, H. A systematic review of the association between immunogenomic markers and cancer-related fatigue. **Brain. Behav. Immun.**, 26 pp. 830–84, 2012.

SAWADA, N. O. et al. Quality of life of Brazilian and Spanish cancer patients undergoing chemotherapy: an integrative literature review. **Rev. Latino-Am. Enfermagem**. São Paulo, 24: e2688, 2016. Disponível em: http://www.scielo.br/pdf/rlae/v24/pt_0104-1169-rlae-24-02688.pdf. Acesso em 15de Janeiro de 2017.

SCHUBERT, C et al. The association between fatigue and inflammatory marker levels in cancer patients: a quantitative review. **Brain. Behav. Immun.**, 21, pp. 413–427. 2007.

SERKOVA, N.J.; ECKHARDT, S.G. Metabolic Imaging to Assess Treatment Response to Cytotoxic and Cytostatic Agents. **Front Oncol**. 15;6:152. 2015.

SHANG, W et al. Anticancer activity of an extract from needles and twigs of *Taxus cuspidata* and its synergistic effect as a cocktail with 5-fluorouracil. **BMC Complement and Altern Med**. v. 11, n. 1, p123-133, 2011.

SHEWACH, D. S.; KUCHTA, R.D. Introduction to Cancer Chemotherapeutics. **Chemical Reviews**. v109, n7, p2859–2861, 2009.

SKVORTSOV, S et al. Putative biomarkers and therapeutic targets associated with radiation resistance. **Expert Rev Proteomics**. 11(2):207-14.2014.

SMITH, R. A; BROOKS, D.; COKKINIDES, V et al. Cancer screening in the United States, 2013: a review of current American Cancer Society guidelines, current issues in cancer screening, and new guidance on cervical cancer screening and lung cancer screening. **A Cancer Journal for Clinicians**, 63(2),88-105,2013.

STATZ, C.M.; PATTERSON, S.E.; MOCKUS, S.M. Barriers preventing the adoption of comprehensive cancer genomic profiling in the clinic. **Expert Rev Mol Diagn.** Apr 18:1-7. 2017

STÄUBERT, C et al. Rewired metabolism in drug-resistant leukemia cells: a metabolic switch hallmarked by reduced dependence on exogenous glutamine. **J Biol Chem.** Mar 27;290(13):8348-59, 2015.

STEWART, B. W.; WILD, C. **World cancer report 2015.** [s.l: s.n.].

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

SILVA, J.C et al. Quantitative proteomic analysis by accurate mass retention time pairs. **Analytical Chemistry.** vol. 77, no. 7, pp. 2187–2200, 2005.

SILVA, V. B. Uma nova promessa para o tratamento do câncer, Novidades na Ciência – SBQ Rio, 29 de Julho de 2009. Disponível em: <<http://www.uff.br/sbqrio/>>. Acessado em 20 de Fevereiro de 2017.

TAZZARI, P.L et al. Multidrug resistance-associated protein 1 expression is under the control of the phosphoinositide 3 kinase/Akt signal transduction network in human acute myelogenous leukemia blasts. **Leukemia.** 21, 427-438. 2007.

TSIMBERIDOU, A.M. Initiative for Molecular Profiling and Advanced Cancer Therapy and challenges in the implementation of precision medicine. **Curr Probl Cancer.** 2017.

VALLEDOR, L.; JORRIN, J. Back to the basics: maximizing the information obtained by quantitative two dimensional gel electrophoresis analyses by an appropriate experimental design and statistical analyses. **Journal Proteomics.**74(1):1-18.2011.

WALLACE, D.C. Mitochondria and Cancer. **Nature reviews.** Cancer 12.10: 685–698. 2012.

WANG, X.M et al. Chemobrain A critical review and causal hypothesis of link between cytokines and epigenetic reprogramming associated with chemotherapy. **Cytokine,** 72, pp. 86–96, 2015.

WANG, H et al. Osthole shows the potential to overcome P-glycoprotein-mediated multidrug resistance in human myelogenous leukemia K562/ADM cells by inhibiting the PI3K/Akt signaling pathway. **Oncol Rep.** 35, 3659-68. 2016.

WEN, L et al. Overcoming ABC transporter-mediated multidrug resistance: Molecular mechanisms and novel therapeutic drug strategies. **Drug Resist Updat.** 2016 Jul;27:14-29.2016.

WILLIS, R.A. Pathology of Tumours. London : Butterworth & Co. (Publishers) Ltd. 63s. net.. **Br J Surg**, 35: 446, 1948.

WOOD, B.L et al. Bethesda International Consensus Recommendations on the Immunophenotypic Analysis of Hematolymphoid Neoplasia by Flow Cytometry: Optimal Reagents and Reporting for the Flow Cytometric Diagnosis of Hematopoietic Neoplasia. Cytometry Part B (Clinical Cytometry). 2007;728:S14-S22.2006.

WORLD HEALTH ORGANIZATION. **Cancer** . WHO, 2010.

WORLD HEALTH ORGANIZATION. **Cancer** . WHO, 2015.

YIN, J; ZHANG, J. Multidrug resistance-associated protein 1 (MRP1/ABCC1) polymorphism: from discovery to clinical application. **Zhong Nan Da Xue Xue Bao Yi Xue Ban.** 36(10):927-38, 2011.

ZAGO, M.A.; FALCAO, R.P.; PASQUINI, R. **Tratado de Hematologia**. São Paulo, Ed. Atheneu, 2013.

ZHANEL,G.G et al. Tedizolid: a novel oxazolidinone with potent activity against multidrug-resistant gram-positive pathogens. **Drugs.** 75(3):253-70. 2015.

ZHANG, L et al. Design, synthesis and evaluation of the multidrug resistance-reversing activity of pyridine acid esters of podophyllotoxin in human leukemia cells. **Bioorg Med Chem Lett.** Sep 15;26(18), 2016.

ZHANG, X et al. α -2,8-Sialyltransferase Is Involved in the Development of Multidrug Resistance via PI3K/Akt Pathway in Human Chronic Myeloid Leukemia. **IUBMB Life.** 67, 77-87. 2015.