

UNIVERSIDADE FEDERAL DE MATO GROSSO DO SUL

CLAUDIA STUTZ ZUBIETA

**ESTUDO *in vitro* DO SINERGISMO ENTRE PRODUTOS NATURAIS E O  
IMATINIBE PARA O TRATAMENTO DA LEUCEMIA MIELÓIDE CRÔNICA**

CAMPO GRANDE, MS

2018

CLAUDIA STUTZ ZUBIETA

**ESTUDO *in vitro* DO SINERGISMO ENTRE PRODUTOS NATURAIS E O  
IMATINIBE PARA O TRATAMENTO DA LEUCEMIA MIELÓIDE CRÔNICA**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Farmácia, da Universidade Federal de Mato Grosso do Sul, como requisito parcial à obtenção do título de Mestre em Farmácia.

Orientadora: Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. Renata Trentin Perdomo

Coorientadores: Dr. André Luiz Franco Sampaio

Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. Maria de Fatima Cepa Matos

**CAMPO GRANDE, MS**

**2018**

CLAUDIA STUTZ ZUBIETA

**ESTUDO *in vitro* DO SINERGISMO ENTRE PRODUTOS NATURAIS E O  
IMATINIBE PARA O TRATAMENTO DA LEUCEMIA MIELÓIDE CRÔNICA**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Farmácia, da Universidade Federal de Mato Grosso do Sul, como requisito parcial à obtenção do título de Mestre em Farmácia.

Campo Grande, MS, 08 de junho de 2018

**COMISSÃO EXAMINADORA**



---

Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. Renata Trentin Perdomo  
Universidade Federal de Mato Grosso do Sul

---

Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. Simone Schneider Weber  
Universidade Federal de Mato Grosso do Sul

---

Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. Vania Claudia Olivon  
Universidade Anhanguera - UNIDERP

## RESUMO

O mesilato de imatinibe é um inibidor seletivo da proteína Bcr-Abl usado para tratamento dos pacientes com Leucemia Mielóide Crônica (LMC). Entretanto, sua eficácia é comprometida com o aparecimento de casos de resistência. Os produtos naturais são amplamente utilizados como alternativa terapêutica por possuírem compostos com atividades biológicas e farmacológicas variadas, dentre elas atividade antitumoral. A combinação de quimioterápicos com produtos de origem natural têm sido testadas para superar a resistência medicamentosa. Neste estudo o efeito isolado e combinado do mesilato de imatinibe com diferentes produtos naturais na proliferação celular de células leucêmicas K562 e K562-Lucena foi avaliado pelo método de MTT. O efeito da interação entre as substâncias naturais e o mesilato de imatinibe foi determinado e o índice de redução de dose calculado pelo software CompuSyn. A citometria de fluxo foi usada para investigar o efeito das substâncias teste sobre a atividade da P-gp por meio da coloração Rh123, bem como avaliar a capacidade de induzir a apoptose usando a dupla coloração de iodeto de propídeo e anexina V e quantificar a atividade de caspase-3/-7. Entre os terpenos analisados, o ácido ursólico e as substâncias FAR2015056 e FAR2016018 apresentaram citotoxicidade com IC<sub>50</sub> entre 14 µM a 32,8 µM em K562 e 13,1 µM a 86,4 µM na linhagem resistente, com destaque para o ácido betulíco que apresentou melhor resultado de IC<sub>50</sub> de 8,6 µM para a K562 e 12,5 µM para a linhagem resistente. As combinações não apresentaram toxicidade em células não tumorais NIH/3T3. A avaliação do efeito da interação entre as substâncias naturais e o mesilato de imatinibe mostrou que todas as substâncias apresentaram efeito sinérgico na totalidade das concentrações testadas, em ambas as linhagens. O ácido betulínico e a FAR2016018 apresentaram os melhores resultados de sinergismo com CI<0,8 nas 5 menores concentrações e também o melhor índice de redução de doses. Os testes de morte celular demonstraram que o tratamento combinado foi capaz de induzir morte celular por apoptose e aumento da atividade das caspases-3/-7. O ácido Betulínico e FAR2016018 apresentaram as características esperadas para uma combinação ao apresentarem maior ação farmacológica na menor dose, na linhagem resistente K562-Lucena.

**Palavras-Chave:** Resistência ao imatinibe. Ácido betulínico. Glicoproteína-P. Apoptose. Combinação.

## ABSTRACT

Imatinib mesylate is a potent and selective inhibitor of Bcr-Abl protein used for chronic myeloid leukaemia treatment (CML), despite the selectivity, some resistance have been reported for imatinib treatment, on the other hand, natural products are a rich source of bioactive compounds used in therapeutic for different conditions and diseases due to a pleiotropy of activities, including antitumoral. The combination of natural products and conventional chemotherapy is emerging as an alternative to conteract the resistance to conventional chemotherapy. Herein we have evaluated the combination of imatinib mesylate and natural products on K562 and K562 Lucena cell proliferation. Proliferation was assessed using MTT method and synergism between imatinib mesylate and natural products was calculated usin CompuSyn software. Flow cytometry was used to accsess apoptosis (annexin V and propidium iodide), Pgp activity (Rhodamine 123 extrusion assay) and caspase 3/7 activity (FLICA assay). Among the substances tested, betulinic acid, FAR2015056 and FAR2016018 have best activity on K562 cells with IC<sub>50</sub> ranging from 14mM to 32mM, on K562 Lucena the IC<sub>50</sub> was ranging from 13.1mM to 86.4mM. Betulinic acid was the compound with best performance with an IC<sub>50</sub> of 8.6mM and 12.5mM for K562 and K562 Lucena, respectively. When combined with imatinib mesylate, all compounds tested have synergistic effect on cytotoxicity on K562 and K562 Lucena cells and among tested combinations, betulinic acid and FAR2016018 in association with imatinib mesylate displayed the best combination (CI<0.8) and concentration reduction indexes. Betulinic acid and FAR2016018 association with imatinib mesylate triggered higher rate of aoptosis when compared with compounds alone, this increase was due to an increase in caspase 3/7 activity. Also, Betulinic acid and FAR2016018 combination with imatinib mesylate were effective against the MDR cell line K562 Lucena with characterist synergism with higher activity with a lower concentration.

**Key Words:** Resistance to imatinib. Betulinic acid. P-glycoprotein. Apoptosis. Combination.

Minha vizinha querida Mirinha (*in memoriam*), sei que a senhora sempre torceu muito por mim. Por bem pouco você não me viu mestra. Essa conquista também é sua! Te amo tanto que até dói!

*“Eu entendi que a saudade é como o amor, nunca para de crescer. Porque aqueles que amamos fazem parte do que nós somos, mesmo estando longe”.*

(autor desconhecido)

## **AGRADECIMENTOS**

Enfim, é chegada a hora de agradecer a todos aqueles que me ajudaram nesse momento de muito trabalho, esforço e sacrifício. Vocês não têm ideia como a família e os amigos foram importantes! Durante esses dois anos reencontrei amigos de longa data e fiz novos. Conheci pessoas maravilhosas (que guardarei pra sempre em meu coração) e outras nem tanto, mas que também foram essenciais pra me fazer mais forte e poder superar os obstáculos que me impuseram nesta difícil caminhada. Não sei se tudo o que fiz foi suficiente, mas tenham a certeza que dei o meu melhor sempre. O aprendizado foi imenso! A todos que me fizeram sentir querida neste momento, o meu obrigada, de coração!

Agradeço a Deus por ter me permitido ficar em pé e me dado força nos momentos de tristeza e desânimo e em ter me guiado para conquistar esse sonho guardado há anos, que eu na verdade nem achava que iria mais realizá-lo. A Ele toda honra e toda glória!

Ao meu marido Denis e meu filho Gustavo pela mega paciência que tiveram comigo no decorrer desse estressante mestrado, compartilhando minhas alegrias e frustrações. Desculpem a minha chatice maior do que de costume e obrigada por me apoiarem e aturarem! Amo vocês além da conta!

Aos meus pais Angela e Adilson por todo amor e por sempre batalharem para dar a melhor educação para mim e meus irmãos. Que vocês sempre possam se orgulhar de mim! Amo muito vocês!

Aos meus irmãos, minhas sobrinhas, cunhadas e cunhados pela torcida e companheirismo, em especial minha maninha Biela que me ouviu reclamar e chorar tantas vezes.

Aos meus sogros João e Crilzete pelo carinho, atenção e incentivo em todos os momentos. Vocês são muito especiais!

Ao meu amigão de quatro patas Théo, que sempre me recebe com tanto amor e alegria ao chegar em casa, além de ter passado várias madrugadas ao meu lado, enquanto eu escrevia esta dissertação. Nunca imaginei te amar tanto!

A todos os meus familiares: tias, tios e primos que, apesar da distância, sempre torcem por mim. Amo todos vocês!

Ana Tereza Guerrero, como te agradecer por tanto apoio e dedicação? Esse mestrado só aconteceu graças a você que me deu aquele empurrãozinho para fazer a inscrição no mestrado. Me inscrevi tão timidamente e sem muita esperança e quando vi já tinha sido aprovada. Pensou que sua contribuição tivesse acabado ali, né? Claro que não! Me ajudou em cada passo: pré-qualificação, qualificação e defesa. Desculpa tanto trabalho! Você é super especial! Te devo essa e muitas outras! O "caféum" é por minha conta!



Aos meus orientadores André e Renata por terem aceitado o desafio de me orientar. Cheguei meio perdida no início, com muitas incertezas e medo, e, apesar dos momentos difíceis e muito choro, no final tudo se ajeitou. Obrigada pela oportunidade e ensinamentos.

À professora Fátima por abrir as portas do laboratório para que eu pudesse desenvolver este projeto.

Aos membros da banca, prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. Vania Claudia Olivon e prof<sup>a</sup> Dr<sup>a</sup> Simone Schneider Weber por aceitarem participar da banca avaliadora e contribuir para melhorar este estudo.

Ao secretário do Programa de Pós-Graduação em Farmácia, Luiz Fernando Dall Onder, por sempre me atender tão bem e tentar me acalmar nas datas das apresentações.

Aos amigos da Bahia e Recife, representados aqui pelo Márcio, Dionei e Elisângela. Agradeço o carinho, a torcida e as palavras de incentivo, essenciais nos momentos mais difíceis desta caminhada. Vocês são muito importantes para mim!

Aos amigos do Laboratório de Farmacologia Molecular: Renata, Marcitcha Vidal, Marcinha, Léo e Priscila. Obrigada por me fazerem entender que o que importa é fazermos o nosso melhor, mesmo que nem sempre as coisas aconteçam como planejamos. Renata, agradeça ao seu esposo Rafael por mim! Ele foi dez!

À super, mega, power, advanced, the best, Ana Paula Fontão. Obrigada pelo apoio, explicações e ajudas nos experimentos. O que seria de mim sem sua ajuda? Muito, muito, muito obrigada por tudo e esse muito ainda é pouco perto do que você fez!

Andréa Surrage, você ressurgiu em minha vida na hora que mais precisava. Te agradeço imensamente pelo tempo disponibilizado para ler meu trabalho, pelas colocações super bem-vindas e pelos longos anos de amizade. Valeu também por toda brincadeira e carinho. Te admiro muito!

Aos amigos da Farmacologia Aplicada que me socorreram quando tive problemas com meus experimentos: André "Chuxu" (é assim mesmo, com ch e x!), Fátima, Thadeu, Tatiana, Mariana, Carmen, Elaine e Léo Seito. Desculpa ter te deixado sem almoçar, Léo! Muito obrigada por todas as dicas e ajuda!

Aos amigos "ex" Farmacologia Aplicada que também torceram muito por mim e sempre me deram palavras de incentivo, representados aqui por Carlitos Bizarro e Maria do Socorro (Soc).

Às amigas do Laboratório de Cultivo Celular e Biologia Molecular da UFMS: Kamylla, Carol, Magali, Mel, Giovanna, Lanna, Alessandra, Stephanie e Camilla. Meninas, vocês são maravilhosas!

Destaco aqui a parceria de peso com minha querida amiga de turma do mestrado e de laboratório, Camilla Nantes. Você fez toda a diferença na minha vida acadêmica. Muito obrigada!

A todas as minhas amigas de turma de mestrado, em especial à minha eterna dupla Raíssa! Tamojunto duplaaaa! Valeu merrmo!

Aos amigos da Fiocruz Mato Grosso do Sul pela imensa torcida e carinho! Em especial à Maria Tereza e ao Thiago que passaram a pouco pelo sufoco do mestrado e me encorajaram a seguir em frente, apesar de todas as dificuldades e à amiga Zoraida por dedicar seu precioso tempo e ler meu trabalho todas as vezes que antecederam as apresentações. Muito obrigada por todas as correções, dicas e ombro amigo nos momentos de chororô!

Às amigas do IFF-Fiocruz/RJ, Dudinha e Julieta, pelo carinho e palavras de incentivo em todos os momentos! Saudades de vcs!

Aos amigos e professores da Escola Politécnica de Saúde Joaquim Venâncio – Fiocruz/RJ, local aonde tudo começou. Não imaginaria a importância que um curso técnico teria na minha vida pessoal e profissional. Fiz amigos para vida toda e aprendi muito! Agradeço a cada um!

Aos amigos do Departamento de Patologia do IOC-Fiocruz/RJ, primeiro local que estagiei e me fez apaixonar pela vida científica! Agradeço em especial aos meus mestres Dr. Henrique Lenzi (*in memoriam*) e Luzia Caputo.

A todos que direta ou indiretamente contribuíram para que este projeto se realizasse. Serei eternamente grata!

*“Podemos dizer que o cientista vive em dois mundos. De um lado, o mundo ordinário, o mundo público, que ele divide com os outros seres humanos. De outro, um mundo privado onde a pesquisa transcorre; um mundo com paixões, exaltações, desesperos; mundo onde se pode subir aos céus ou descer aos infernos”.*

(François Jacob)

## LISTA DE TABELAS

- Tabela 1:** IC<sub>50</sub> das substâncias teste frente as linhagens K562 e K562- Lucena. Valores obtidos a partir dos ensaios de citotoxicidade com tratamento de 48h.....42
- Tabela 2:** Índice de combinação (CI) e índice de redução de dose (DRI) de cada combinação nas linhagens K562 e K562-Lucena.....51

## LISTA DE FIGURAS

- Figura 1:** Estimativa de Câncer no Brasil por região e por gênero, para o biênio 2018/2019.....20
- Figura 2:** Representação espacial das taxas brutas de incidência de leucemia no Brasil, estimadas para o ano de 2018/2019, segundo a Unidade da Federação.....21
- Figura 3:** Formação do cromossomo Philadelphia (Ph), resultante da translocação dos cromossomos 9 (gene ABL) e 22 (gene BCR).....23
- Figura 4:** Estrutura química do mesilato de imatinibe.....27
- Figura 5:** Mecanismo de ação do mesilato de imatinibe.....28
- Figura 6:** Gráfico representativo do crescimento celular nas linhagens leucêmicas K-562 e K562-Lucena.....43
- Figura 7:** Atividade das substâncias teste sobre a atividade da glicoproteína P em células K562-Lucena.....44
- Figura 8:** Avaliação da viabilidade celular nas linhagens K562 e K562-Lucena após tratamento de 48 h com diferentes concentrações do mesilato de imatinibe, ácido betulínico e combinações.....46
- Figura 9:** Avaliação da indução de apoptose das células K562-Lucena pelo ensaio de dupla coloração anexina V / PI.....47
- Figura 10:** Dosagem dos níveis de caspase -3 / -7 para detecção do efeito apoptótico do tratamento isolado ou combinado do mesilato de imatinibe e ácido betulínico (6,5  $\mu$ M + 6,5  $\mu$ M) por 6 h e 24 h, em células K562-Lucena. ... 48
- Figura 11:** Avaliação da viabilidade celular nas linhagens K562 e K562-Lucena após tratamento de 48h com diferentes concentrações do mesilato de imatinibe, FAR2016018 e combinações.....49
- Figura 12:** Avaliação da indução de apoptose das células K562-Lucena pelo ensaio de dupla coloração anexina V / PI. ....53
- Figura 13:** Dosagem dos níveis de caspase -3/-7 para detecção do efeito apoptótico do tratamento isolado ou combinado do mesilato de imatinibe e ácido betulínico (6,5  $\mu$ M + 6,5  $\mu$ M) por 6h e 24h, em células K562-Lucena.....54

## LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

$\mu$ -bcr	<i>Micro breakpoint cluster region</i>
$\mu$ g	Micrograma
$\mu$ L	Microlitro
$\mu$ M	Micromolar
$^{\circ}$ C	Grau <i>Celsius</i>
ABL	gene <i>v-abl</i> Abelson murine Leukemia Viral 1
ACBET	Ácido betulínico
AIF	Fator Indutor de Apoptose
ANAXV	Anexina V
ANVISA	Agência Nacional de Vigilância Sanitária
ATCC	<i>American Type Culture Collection</i>
ATP	Adenosina trifosfato
Bak	Antagonista de Bcl-2 associado a morte celular
Bax	Proteína X associada à Bcl-2
Bid	Agonista de domínio de morte associado a BH3
BCR	<i>Breakpoint Cluster Region</i>
Caspase	<i>Cysteine aspartic acid proteases</i>
CDB	Convenção da Diversidade Biológica
CI	Índice de Combinação ( <i>Combination Index</i> )
CO <sub>2</sub>	Dióxido de carbono
DMSO	Dimetilsulfóxido
DNA	Ácido desoxiribonucleico
DRI	Índice de redução de dose
ECL	<i>Enhanced Chemiluminescence</i>
ELN	<i>European Leukemia Net</i>
Fa	Fração afetada
FDA	<i>United States Food and Drug Administration</i>

Fiocruz	Fundação Oswaldo Cruz
FITC	Isotiocianato de fluoresceína ( <i>Fluorescein-5-isothiocyanate</i> )
FS	Fosfatidilserina
GIST	<i>Gastrointestinal Stromal Tumor</i>
IC <sub>50</sub>	Concentração inibitória do crescimento de 50% da população celular ( <i>Inhibitory Concentration</i> )
INCA	Instituto Nacional do Câncer
IFN- $\alpha$	Interferon-alfa
IS	Índice de Seletividade
LLA	Leucemia Linfóide Aguda
LMA	Leucemia Mielóide Aguda
LMC	Leucemia Mielóide Crônica
M-bcr	<i>Major breakpoint cluster region</i>
m-bcr	<i>Minor breakpoint cluster region</i>
MDR	<i>Multidrug Resistance</i>
MESIMA	Mesilato de imatinibe
MFI	Média de Intensidade de Fluorescência
mg	Miligrama
mL	Mililitro
mM	Milimolar
MRP	<i>Multi-drug Resistance Protein</i>
MTT	Brometo de (3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difeniltetrazólio
nm	Nanômetro
OD	Densidade óptica ( <i>Optical Density</i> )
PBS	Tampão fosfato ( <i>Phosphate Buffer Saline</i> )
P-gp	Glicoproteína P
Ph	Cromossomo <i>Philadelphia</i>
PI	Iodeto de Propídio
Rh 123	Rodamina 123
rpm	Rotações por minuto

RPMI-1640	Meio de cultivo celular (Roswell Park Memorial Institute)
SAS/MS	Secretaria de Atenção à Saúde/Ministério da Saúde
SBF	Soro Bovino Fetal
SDS	Dodecil sulfato de sódio
SDS-PAGE	<i>SDS-poliacrylamide gel electrophoresis</i>
SUS	Sistema Único de Saúde
STAURO	Staurosporina
TBS	Salina tamponada com Tris
TBST	TBS com Tween-20
TRAIL	<i>TNF-related apoptosis-inducing ligand</i>
UFMS	Universidade Federal de Mato Grosso do Sul
WCRF	<i>World Cancer Research Found</i>



## SUMÁRIO

<b>1</b>	<b>INTRODUÇÃO</b>	18
<b>2</b>	<b>REVISÃO DE LITERATURA</b>	20
2.1	CÂNCER	20
2.2	LEUCEMIA	21
2.3	LEUCEMIA MIELÓIDE CRÔNICA	22
2.4	ONCOGENE <i>bcr-abl</i>	23
2.5	MORTE CELULAR	24
2.6	TRATAMENTO DA LMC	26
2.7	MESILATO DE IMATINIBE	27
2.8	PRODUTOS NATURAIS	31
2.9	SUBSTÂNCIAS TESTE	32
<b>3</b>	<b>OBJETIVOS</b>	34
3.1	OBJETIVO GERAL	34
3.2	OBJETIVOS ESPECÍFICOS	34
<b>4</b>	<b>MATERIAIS E MÉTODOS</b>	35
4.1	SUBSTÂNCIAS TESTE E QUIMIOTERÁPICO	35
4.2	LINHAGENS CELULARES	35
4.3	AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE ANTIPROLIFERATIVA <i>in vitro</i>	36
4.4	ENSAIO DE SINERGISMO	37
4.5	AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE DA GLICOPROTEÍNA P	38
4.6	ÍNDICE DE SELETIVIDADE	38
4.7	DETECÇÃO DE MORTE CELULAR	39
4.7.1	Anexina V / PI	39
4.7.2	Caspases -3/-7	40
4.8	ANÁLISE ESTATÍSTICA	40
<b>5</b>	<b>RESULTADOS</b>	41
5.1	AVALIAÇÃO DA CITOTOXICIDADE DAS SUBSTÂNCIAS ISOLADAS OU EM COMBINAÇÃO	41
5.2	AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE DA GLICOPROTEÍNA-P (P-gp)	44
5.3	COMBINAÇÃO DO MESILATO DE IMATINIBE COM AS SUBSTÂNCIAS FAR2015056, FAR2016018 E OS ÁCIDOS BETULÍNICO E URSÓLICO	45

5.3.1 Proliferação das células leucêmicas K562 e K562-Lucena tratadas com as combinações com o mesilato de imatinibe .....	45
5.3.2 Comparação do desempenho sinérgico das combinações nas duas linhagens .....	50
5.3.3 Proliferação das células NIH/3T3 - Índice de Seletividade .....	51
5.4 MORTE CELULAR .....	52
5.4.1 Anexina V / PI .....	52
5.4.2 Caspase -3/-7 .....	54
<b>6 DISCUSSÃO .....</b>	<b>55</b>
<b>7 CONCLUSÕES .....</b>	<b>61</b>
<b>8 REFERÊNCIAS .....</b>	<b>64</b>

## 1 INTRODUÇÃO

Nos dias atuais, o câncer constitui, incontestavelmente, um problema de saúde pública mundial, responsável pela segunda maior causa de morte, contabilizando 8,8 milhões de mortes em 2015 (WHO, 2018). Cerca de 11 milhões de pessoas são diagnosticadas a cada ano e estima-se mais de 16 milhões de novos casos para 2020 (STEWART; WILD, 2014).

Dentre os casos de câncer no Brasil, podemos destacar as leucemias. Esta doença ocorre pelo desequilíbrio entre proliferação, maturação e apoptose das células hematopoiéticas (ODENIKE et al., 2011). Estas podem ser classificadas de acordo com suas características citológicas em mielóide e linfóide, e ainda em aguda ou crônica de acordo com a velocidade de sua evolução (TEFFERI; VARDIMAN, 2008).

A leucemia mielóide crônica (LMC) representa aproximadamente 15% de todas as leucemias e é uma doença mieloproliferativa desencadeada por uma alteração cromossômica específica que dá origem ao oncogene *bcr-abl*, responsável pela progressão da doença (ROSKOSKI JR., 2015; FRIZZO; DICK; TRACHYNSKY, 2016).

O tratamento padrão estabelecido para a LMC é o mesilato de imatinibe, primeiro inibidor de alvo molecular de proteinocinases a receber aprovação pelo U.S Food and Drug Administration (FDA) (COHEN et al., 2002). Inicialmente apresentou alta eficácia no tratamento (KANTARJIAN et al., 2002) e relativa baixa resistência quando comparado a outras terapias. No entanto, alguns mecanismos de resistência foram descritos (SHAH et al., 2004; THOMAS et al., 2004; APPERLEY, 2007; MELO; CHUAH, 2007; BIXBY; TALPAZ, 2009; JABBOUR et al., 2011).

Atualmente, muitas pesquisas têm sido realizadas para compreensão dos mecanismos que envolvem este problema. Neste contexto, estudos demonstraram que alguns produtos derivados de espécies vegetais combinados a fármacos existentes, podem atuar de forma sinérgica, aumentando a ação destes fármacos lançando luz para outra forma de uso destas substâncias naturais (LESGARDS et al., 2014; ZHOU et al., 2014).

Estudos recentes demonstraram sinergismo de produtos naturais de origem vegetal com agentes antitumorais como a Cisplatina sobre células de câncer cervical (HUSSAIN et al., 2015) e o TRAIL (*TNF-related apoptosis-inducing ligand*) sobre células de mama (ABDELHAMED et al., 2013). É possível citar ainda resultados

positivos de sinergismo entre o mesilato de imatinibe e outros quimioterápicos como o paclitaxel e a carboplatina, na diminuição da proliferação de células de câncer de ovário e indução de atividade pró-apoptótica (MUNDHENKE et al., 2008).

Fundamentado nas evidências de que produtos de origem natural tem ação citotóxica ou podem interferir no fenótipo de células tumorais (CRAGG; PEZZUTO, 2016; FUZER et al, 2017), alterando a sua susceptibilidade a fármacos, analisamos neste estudo, o efeito do tratamento combinado de alguns produtos naturais com o imatinibe nas linhagens leucêmicas K562 (mielóide crônica) e K562-Lucena (mielóide crônica resistente – MDR).

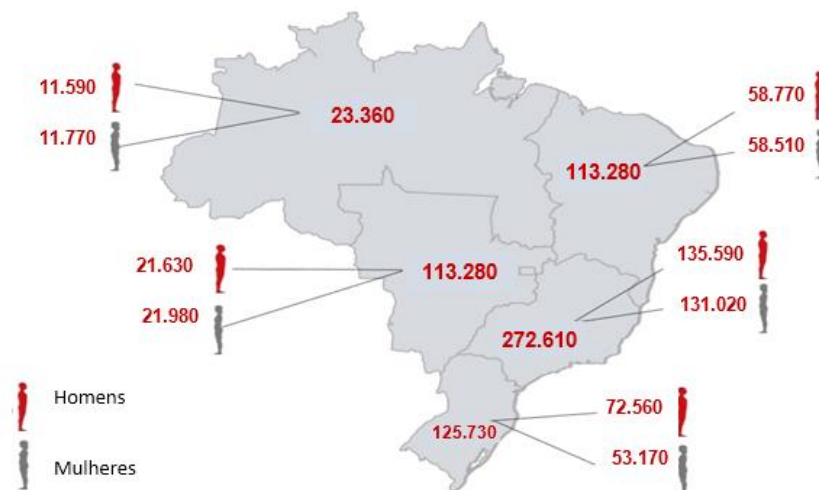
## 2 REVISÃO DE LITERATURA

### 2.1 CÂNCER

O câncer é um conjunto de diferentes alterações patológicas, em especial a proliferação contínua e desordenada de células com capacidade de invasão de outros órgãos e tecidos. Transcorre também com alterações no ciclo celular e resistência à morte celular, dando origem a tumores malignos que favorecem a progressão da doença (LUO; SOLIMINI; ELLEDGE, 2009; HANAHAN; WEINBERG, 2011; OMS, 2017).

Segundo a World Cancer Research Found (WCRF), a incidência de câncer cresceu 20% na última década. Cerca de 11 milhões de pessoas são diagnosticadas a cada ano e estima-se mais de 16 milhões de casos novos para 2020 (WHO, 2018). No Brasil, as estimativas para o biênio 2018-2019 apontam a ocorrência de aproximadamente 600 mil novos casos, reforçando a magnitude do problema do câncer no país (Figura 1) (INCA, 2018).

**Figura 1: Estimativa de Câncer no Brasil por região e por gênero, para o biênio 2018/2019.** Em vermelho observamos a quantidade de pessoas do gênero masculino e em cinza pessoas do gênero feminino.



Fonte: Adaptado de INCA/MS

O desenvolvimento do câncer ocorre por diversos fatores. Dentre eles ressaltamos fatores genéticos e ambientais acumulados ao longo da vida, como, por exemplo, a exposição à radiação, a má alimentação, o tabagismo as e condições de

trabalho, sendo estes últimos, associados ao processo de globalização industrial (WATERS, 2001; ASHKENAZI, 2008; BENSON; LIAU, 2008; WHO, 2018).

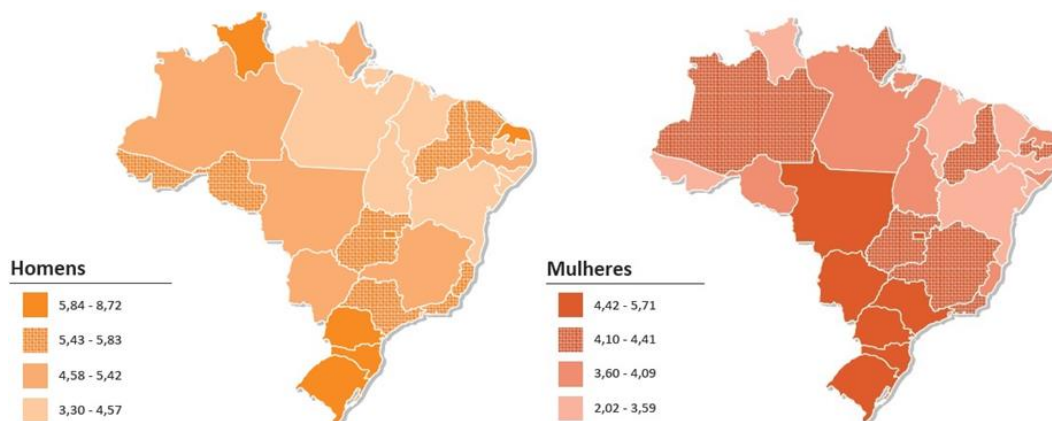
Diante de todos esses fatores, e das condições que envolvem a resistência ao tratamento (HARJES, 2017; ZUCCALA, 2017), o estudo do câncer se faz necessário e tem crescido no Brasil e no mundo, visando um maior controle da doença, seja na prevenção, no diagnóstico precoce, na assistência ao paciente ou nas ações do Sistema Único de Saúde (SUS) (GONÇALVES et al., 2016; KALIKS et al., 2017).

## 2.2 LEUCEMIA

Dentre os diversos tipos de câncer podemos destacar as leucemias, uma doença maligna dos glóbulos brancos, que possui como principal característica o acúmulo de células anormais na medula óssea, substituindo as células sanguíneas normais, ocasionando desequilíbrio nos estímulos proliferativos e/ou de maturação celular (ODENIKE et al., 2011; SMITH; HILLS; GRIMWADE, 2011).

Dos casos de câncer no Brasil, as leucemias representam o nono câncer mais comum entre os homens e o décimo entre as mulheres. Os números estimados de novos casos para o ano de 2018/2019 são de 5.940 em homens e de 4.860 em mulheres, que correspondem a um risco previsto de 5,75 casos novos a cada 100 mil homens e 4,56 para cada 100 mil mulheres (Figura 2) (INCA, 2018).

**Figura 2: Representação espacial das taxas brutas de incidência de leucemia no Brasil, estimadas para o ano de 2018/2019, segundo a Unidade da Federação.** Os dados referem-se à incidência de leucemias por 100 mil homens (laranja) ou mulheres (vermelho).



Fonte: INCA

Quanto às características biológicas, as leucemias podem ser classificadas de acordo com seus aspectos citológicos em mielóide e linfóide, as quais são posteriormente divididas em aguda ou crônica de acordo com o nível de evolução e gravidade da doença (TEFFERI; VARDIMAN, 2008).

Na fase crônica, as células leucêmicas ainda executam o trabalho de uma célula sanguínea normal e a doença se agrava lentamente, apresentando evolução dos sintomas, enquanto na fase aguda há um agravamento rápido da doença pela crescente proliferação das células leucêmicas, que não conseguem mais realizar a função de uma célula normal, apresentando vários sintomas ao mesmo tempo (SOSSELA; ZOPPAS; WEBER, 2017).

### 2.3 LEUCEMIA MIELÓIDE CRÔNICA

A leucemia mielóide crônica (LMC) é um distúrbio clonal das células tronco hematopoiéticas, caracterizada pela excessiva proliferação dos glóbulos brancos no sangue periférico, baço e na medula óssea, com perda progressiva da diferenciação celular, apresentando por fim, um quadro de leucemia aguda, conhecida como crise blástica (INCA/MS).

A LMC apresenta incidência de aproximadamente dois casos por cada cem mil habitantes, afetando mais frequentemente adultos com idade média de 55 anos, com leve predominância do sexo masculino, mas todas as faixas etárias, incluindo crianças são afetadas (FRAZER; IRVINE; MCMULLIN, 2007; BORTOLHEIRO; CHIATTONE, 2008).

Os sintomas típicos da doença são fadiga, anorexia e perda de peso, mas cerca de 40% dos pacientes são assintomáticos, e nesses pacientes, o diagnóstico é baseado unicamente em um hemograma anormal, com leucocitose ( $>25.000/\text{mm}^3$ ), aumento de plaquetas e presença de basófilos (FADERL et al., 1999; SAWYERS, 1999).

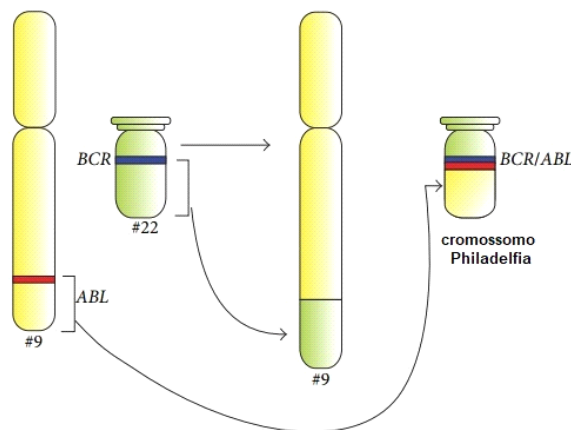
Clinicamente, a doença pode se desenvolver em três fases: crônica, acelerada e blástica. A primeira fase, chamada de crônica, é a qual a maioria dos pacientes é diagnosticada e apresenta uma boa resposta à terapia. A fase acelerada pode aparecer meses ou anos após o diagnóstico da doença e caracteriza-se pela perda

da capacidade de diferenciação, presença de blastos na circulação, sintomas acentuados e resistência à terapêutica. A fase blástica é caracterizada pelo aumento de células jovens (aproximadamente 30% de blastos) com capacidade metastática, invadindo demais órgãos (CORTES, 2004; ERNEST; HOCHAUS, 2012). Nesta fase ou na transformação para a fase aguda muitos pacientes são refratários à maioria dos tratamentos (TALPAZ et al., 2002).

A LMC foi a primeira doença associada a uma anomalia citogenética característica, chamada de cromossomo Philadelphia (Ph) (Figura 3), descoberto por Nowell e Hungerford em 1960. Este cromossomo é encontrado em mais de 95% dos casos de LMC, sendo também achado na leucemia linfóide aguda (LLA) (20-30% das LLA) (WANG et al., 2018) e na leucemia mielóide aguda (LMA). (KANG et al., 2016).

O cromossomo Ph é resultante da translocação entre os braços longos dos cromossomos 9 (*abl*) e 22 (*bcr*), formando o gene de fusão *bcr-abl* (figura 3) (ROWLEY 1973).

**Figura 3: Formação do cromossomo Philadelphia (Ph), resultante da translocação dos cromossomos 9 (gene *abl*) e 22 (gene *bcr*).**



Fonte: TRELA et al., 2014.

## 2.4 ONCOGENE *bcr-abl*

O gene *bcr-abl* tem como produto uma proteína anormal que apresenta aumento da atividade tirosina quinase, responsável pela proliferação desordenada de



células neoplásicas e inibição da morte celular por apoptose e, conseqüentemente, pela patogênese da doença (ROSKOSKI JR., 2015).

A biologia molecular é uma importante ferramenta de diagnóstico da LMC nos casos em que a análise citogenética não é capaz de detectar o cromossomo Ph, sendo possível a identificação do *bcr-abl* e diferenciação das demais doenças mieloproliferativas (BAO et al., 2007).

O local de quebra da região *bcr* é variável, assim como as proteínas codificadas pelos oncogenes formados e estão relacionadas com a resposta ao tratamento e prognóstico (CHEREDA; MELO, 2015). Na grande maioria dos pacientes com LMC, a quebra ocorre na região principal, chamada de *major breakpoint cluster region* (M-bcr), que dá origem à proteína p210. As outras duas regiões secundárias são a *minor breakpoint cluster region* (m-bcr) e *micro breakpoint cluster region* ( $\mu$ -bcr), formando as proteínas p190 e p230, respectivamente. A proteína p230 está associada à LNC e a p190 a um pior prognóstico da LMC e está presente em 90% das crianças e 50-80% dos adultos LLA Ph+ (LEE et al., 2011; NEVIANI et al., 2007; DEININGER, GOLDMAN e MELO, 2000).

## 2.5 MORTE CELULAR

A morte celular é quando a célula perde sua integridade da membrana plasmática, tornando-a incapaz de executar suas funções e não sendo possível corrigir este problema. Diversos são os tipos de morte e são classificados por seus aspectos morfológicos, mecanismos imunológicos e critérios moleculares, bioquímicos e funcionais (fisiológicos ou patológicos), podendo ser ainda de forma programada ou induzida (GALLUZZI, 2018).

Dentre os tipos de morte celular mais estudados estão a necrose e a apoptose.

A necrose é um processo degenerativo, desencadeado por causas fisiológicas, traumatismos, agentes infecciosos ou câncer, provocando lesão celular ou tecidual, levando à perda da integridade da membrana plasmática com extravasamento do conteúdo intracelular e conseqüente processo inflamatório, atingindo as células vizinhas (GALLUZZI, 2018).

Até os anos de 1970, a necrose foi o termo utilizado para todos os tipos de morte celular. Em 1972, Kerr, Wyllie e Currie sugeriram o termo apoptose para indicar

a morte não patológica, sendo inicialmente chamada de necrose controlada e posteriormente conhecida como apoptose.

A apoptose é um tipo de morte celular programada que visa garantir a preservação da homeostase tecidual. Para tal, elimina as células que já completaram seu ciclo biológico, assim como células potencialmente perigosas que apresentam danos, impedindo assim, que estas células defeituosas sejam perpetuadas e alterem a integridade do organismo, acarretando no aparecimento de doenças auto-imunes, neurodegenerativas e o desenvolvimento de tumores (FUCHS; STELLER, 2015).

As alterações morfológicas típicas deste tipo de morte são: retração celular; condensação da cromatina; fragmentação nuclear, externalização da fosfatidilserina e formação de corpos apoptóticos (KERR, WYLLIE e CURRIE, 1972). Essas alterações apoptóticas são desencadeadas por um complexo processo que implica muitas vias de sinalização geneticamente reguladas, ativando várias vias (GUAMÁN-ORTIZ; ORELLANA; RATOVIITSK 2017).

As duas vias principais para ativação do processo apoptótico são: a via extrínseca (citoplasmática), mediada pela ativação de receptores específicos de morte situados na superfície celular e a via intrínseca (mitocondrial), ativada por estresse intra ou extracelulares que convergem para a mitocôndria (ICHIM; TAIT, 2016; DASGUPTA, 2016).

As duas vias podem ser mediadas pela ativação de caspases (*cysteine aspartate-especific proteases*), uma família de proteases responsáveis pelo desencadeamento da morte celular. Inicialmente as caspases são sintetizadas como precursores inativos, chamados de pró-caspases, sendo então ativados.

As caspases são classificadas em iniciadoras (2, 8, 9 e 10) ou efetoras (3, 6 e 7), de acordo com sua posição e função na cascata de sinalização da apoptose. Após um sinal de morte celular as caspases iniciadoras são ativadas e, por sua vez, ativam as caspases efetoras, responsáveis pela clivagem dos substratos celulares causando, dessa forma, as alterações morfológicas e bioquímicas da apoptose (PARRISH et al., 2013).

Dependendo da via de execução da apoptose, diferentes caspases são ativadas. Na via extrínseca ocorre a ativação dos receptores de membrana por ligantes específico, podendo ativar as pró-caspases-8 ou 10, levando assim, à ativação da caspase efetora 3 ou 7 ou ativar a via intrínseca (GALLUZZI, 2018).

A via intrínseca é desencadeada após diferentes sinais de lesão e estresse, que interagem com os fatores pró-apoptóticos, como por exemplo Bax/Bak (DASGUPTA, 2016; ICHIM; TAIT, 2016), levando a alterações conformacionais que vão recrutar a pró-caspase-9, que ativa a caspase-9 e em seguida cliva a pró-caspase-3 que ativa as caspases executoras 3, 6 ou 7, desencadeando a morte celular (TOWER, 2015).

Há ainda um outro tipo de apoptose, independente de caspases, no qual estão incluídos o fator indutor de apoptose (AIF) e a endonuclease-G. A liberação de AIF pela mitocôndria é induzida pela ativação de PARP-1, que é estimulada por diferentes mecanismos de sinalização celular e ainda não é totalmente esclarecido. Tanto o fator AIF quanto a EndoG, após serem liberados pela mitocôndria sofrem translocação para o núcleo levando à fragmentação do DNA (KANG et al., 2010).

Sabendo que a apoptose possui papel fundamental no desenvolvimento dos tumores e que a oncoproteína BCR-ABL inibe a apoptose, a indução deste tipo de morte celular é considerada um alvo importante para o tratamento da LMC e de diversos tipos de câncer (WONG, 2011).

## 2.6 TRATAMENTO DA LMC

O tratamento da LMC leva em consideração três tipos de resposta: a hematológica, que compreende a normalização na contagem de leucócitos; a citogenética, que quantifica a proporção de cromossomo Ph<sup>+</sup>; e a molecular, definida pela diminuição da proporção de transcritos do *bcr-abl* detectados (KHOURY; BIXBY, 2015).

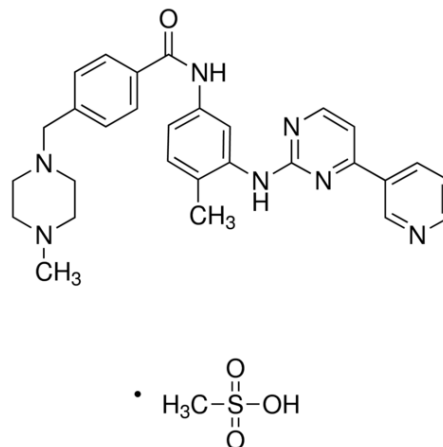
Ao longo dos anos, o tratamento da LMC passou por diversos marcos terapêuticos de eficácia crescente. Podemos citar o uso de arsênicos em 1865, a irradiação esplênica por volta de 1900; a quimioterapia com o bussulfan em 1953 e a hidroxiuréia em 1960, ambos com efeito citostático, agindo de modo paliativo no controle da proliferação das células leucêmicas e normais, pela inibição da síntese do DNA e indução da apoptose (LOPES; ABREU, 2009).

No início dos anos de 1980, o interferon-alfa (IFN- $\alpha$ ) foi introduzido no tratamento da LMC, com ação imunomoduladora e anti-proliferativa do clone leucêmico, diminuindo dessa forma, a proporção de células Ph<sup>+</sup> (KURAMATO et al.,

2006). Também houve a associação do IFN-  $\alpha$  com hidroxiuréia ou citarabina na tentativa de uma maior sobrevida dos pacientes, porém sem muito sucesso, devido aos elevados níveis de toxicidade (HELMANN; SCHIFFER, 2007). Nessa mesma década, surgiu o transplante alogênico de células tronco hematopoiéticas, sendo este o único tratamento com possibilidade curativa. Entretanto, sua aplicação é limitada devido à média de idade elevada dos pacientes inicialmente acometidos e por existir dificuldade em conseguir doador compatível (FUNKE et al., 2010).

Em 2001, surgiu o mesilato de imatinibe (Figura 4), especialmente projetado contra a proteína BCR-ABL, com excelentes efeitos terapêuticos, revolucionando o tratamento da LMC por apresentar melhora nas três fases da doença e por ser bem tolerável devido aos efeitos colaterais geralmente leves, aumentando a sobrevida dos pacientes para aproximadamente 83,3% (HOCHHAUS et al., 2017).

**Figura 4: Estrutura química do mesilato de imatinibe.**



Fonte: Sigma-Aldrich

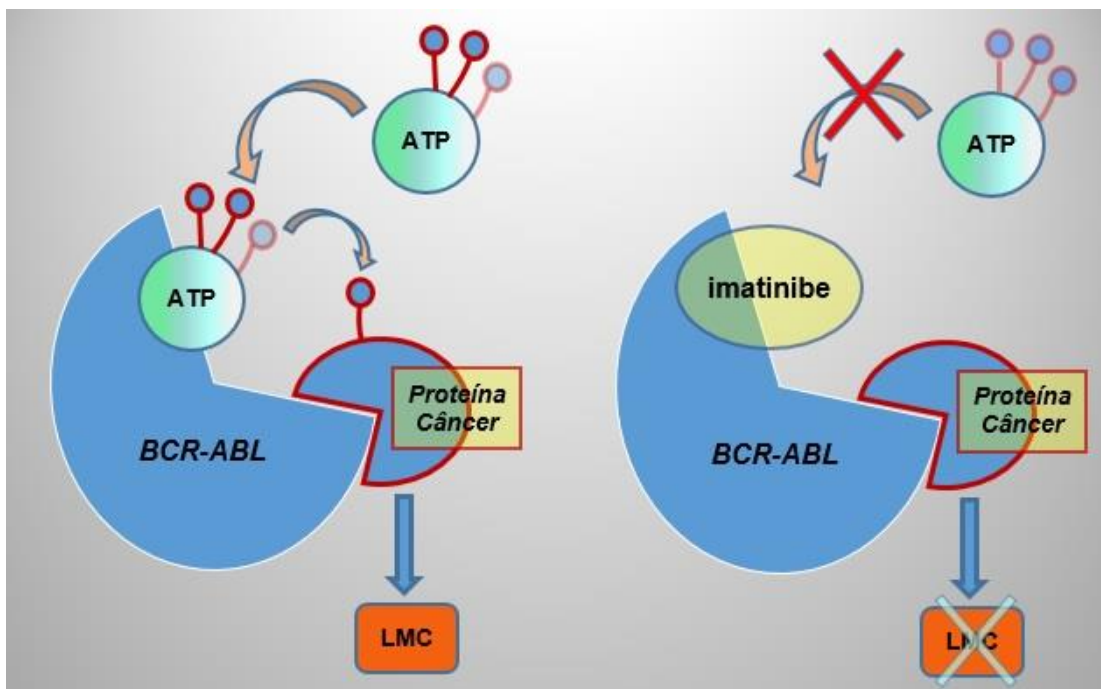
## 2.7 MESILATO DE IMATINIBE

O mesilato de imatinibe foi o primeiro inibidor de alvo molecular de proteinocinases a receber aprovação pelo FDA (COHEN et al., 2002). No Brasil, foi aprovado em 2001 pela ANVISA (Agência Nacional de Vigilância Sanitária), sob a portaria SAS/MS 431, de 03/10/2001.

É um derivado da fenilaminopirimidina e um inibidor potente e seletivo da tirosina quinase BCR-ABL, que inibe diferentes vias de sinalização celular ativadas por esta proteína (BERGANTINI, 2005), induzindo assim, altas taxas de remissão hematológica e citogenética (> 90%) e o aumento de sobrevida dos pacientes, livre da doença (DOS SANTOS; MORRONE, 2014).

O mesilato de imatinibe se liga ao receptor BCR-ABL dependente de ATP, inibe todas as vias de fosforilação e de sinalização dependentes de BCR-ABL, inibindo assim, a atividade tirosina quinase, evitando a proliferação das células leucêmicas e levando à apoptose celular (Figura 5) (GAMBACORTI-PASSERINI et al., 2003; FORCE, KRAUSE; VAN ETTEN, 2007).

**Figura 5: Mecanismo de ação do mesilato de imatinibe.** O fármaco se liga ao receptor de ATP da BCR -ABL, impedindo a proliferação das células leucêmicas.



Fonte: Adaptado de Zaharieva et al., 2013.

O fármaco é bem absorvido após administração oral e os níveis séricos máximos são alcançados de 2 a 4 horas após a administração. A vida média de eliminação é de aproximadamente 18 horas e a eliminação é predominantemente pelas fezes. Os efeitos adversos mais comuns são náusea, diarreia, retenção hídrica,

edema, mielossupressão, fadiga, câimbras e artralgia (DOS SANTOS; MORRONE, 2014).

Além da LMC, o mesilato de imatinibe também é usado para tratamento da LLA positiva para o cromossomo Ph, e ainda alguns tipos específicos de leucemia mielomonocítica crônica, leucemia eosinofílica crônica e tumor gastro intestinal (GIST) (FORCE; KRAUSE; VAN ETTEN, 2007).

Apesar da sua significativa eficácia no tratamento da LMC, alguns mecanismos de resistência ao fármaco foram descritos (JABBOUR et al., 2011).

A resistência ao imatinibe ocorre, na maioria das vezes, por mutações no gene BCR-ABL (JABBOUR et al., 2006).

A European LeukemiaNet (ELN) considera três grupos para definir eficácia ou não do tratamento: o grupo Ótimo - quando o paciente apresenta um excelente resultado ao tratamento; o grupo Falha - quando o tratamento deve ser alterado porque a resposta não é suficiente e há risco de progressão da doença, podendo levar à morte; e o terceiro grupo denominado Cuidado, onde há uma resposta, mas que poderia ser melhor com a alteração do tratamento (BACCARANI et al., 2013).

Existem vários fatores associados à resistência ao imatinibe, como, por exemplo, fatores citogenéticos, hematológicos e refratários. Clinicamente, a resistência ao imatinibe pode ser definida como primária, quando a droga é ineficaz desde o início do tratamento e que consiste na impossibilidade de atingir uma resposta hematológica ou citogenética significativa; ou secundária, caracterizada pelo reaparecimento do cromossomo Filadélfia após resposta inicial ao Imatinibe (SHAH et al., 2005; GOLDMAN 2007; DIAMOND e MELO, 2011).

Os mecanismos de resistência ao Imatinibe podem ainda ser classificados como *bcr-abl* dependente ou independente. O mecanismo dependente compreende as mutações do domínio tirosina quinase e/ou a superexpressão da proteína Bcr-Abl por amplificação gênica e ativação de vias Bcr-Abl (RUMJANECK; VIDAL e MAIA, 2013; DIAMOND; SILVA, 2013; CHEREDA; MELO, 2015). Na resistência independente, as células leucêmicas não dependem do *bcr-abl* para dirigir sua capacidade proliferativa, elas entram em divisão em consequência de mudanças secundárias em seus próprios oncogenes (TAUCHI; OHYASHIKI, 2004), incluindo defeitos nas bombas de influxo e efluxo de fármacos, como a superexpressão da

glicoproteína P (P-gp) (DIAMOND; MELO, 2011; NESTAL DE MORAES et al., 2012; OHANIAN et al., 2012).

Dentre os fenômenos mais associados à resistência a quimioterápicos, destaca-se a superexpressão da P-gp, produto do gene MDR1 (*Multi-drug Resistance 1*), presente na membrana citoplasmática (JULIANO; LING, 1976). Esta proteína age como uma bomba de efluxo que transporta fármacos e xenobióticos para o meio extracelular causando toxicidade ou subtratamento.

Desde a descoberta de que a presença de P-gp está inversamente relacionada à eficácia do tratamento, tem havido um esforço contínuo para desenvolver terapias que poderiam bloquear ou inativar sua atividade e, assim, aumentar a concentração do quimioterápico no meio intracelular (KATHAWALA et al., 2015). Atualmente, são reconhecidos vários substratos, inibidores e moduladores da P-gp. Os substratos, como por exemplo o imatinibe, interagem com a P-gp e são jogados para fora da célula, enquanto os inibidores se ligam à P-gp e ficam retidos dentro da célula, aumentando o acúmulo intracelular do fármaco. Os moduladores podem agir por diferentes vias e, dependendo da concentração utilizada, podem atuar como substratos ou inibidores (SHAROM, 2011).

Diante disso, torna-se importante identificar antagonistas da P-gp e comparar a eficácia deles para entender o mecanismo de resistência das células neoplásicas no tratamento do câncer. Para tal, o uso de linhagens celulares com fenótipo de múltipla resistência a drogas (MDR) é frequentemente utilizado por apresentar um ou mais fatores de resistência supracitados (MOREIRA et al., 2014; RUMJANECK; VIDAL; MAIA, 2013).

Outra valiosa estratégia na busca de uma maior eficácia no tratamento em oncologia é o estudo do potencial sinérgico entre quimioterápicos e substâncias bioativas derivadas de produtos naturais vegetais. Essa combinação de agentes antiproliferativos pode potencializar os efeitos terapêuticos e, assim, diminuir a concentração/dose de utilização e a toxicidade, podendo dessa forma, anular um ou mais mecanismos de resistência (ABDELHAMED et al., 2013; ZHOU et al., 2014; HUSSAIN et al., 2015).

As combinações de fármacos podem apresentar três efeitos: antagonismo, quando há redução/ausência da resposta de uma substância, apresentando efeito combinado das duas drogas menor do que o efeito de cada droga usada

isoladamente; efeito aditivo, quando as substâncias apresentam o mesmo mecanismo de ação e o efeito combinado é igual a soma dos efeitos de cada substância individualmente; e, sinergismo, quando a ação conjunta de duas ou mais substâncias potencializa a ação de outra substância, apresentando efeito maior que a soma dos efeitos de cada uma individualmente (CHOU, 2010; HU, 2016).

As metodologias para avaliar o sinergismo são diversas, sendo a mais usada, a descrita por Chou e Talaly, com mais de 4.600 citações de 1984 até o ano de 2013 (ZHANG; FU; CHOU, 2016). Segundo Chou e Talalay (1984), o efeito das interações das substâncias é estimado pelo índice de combinação, baseado em princípios físicos, químicos e matemáticos, tendo como pré-requisito para avaliação dos efeitos, o conhecimento da potência e da forma da curva dose-resposta para cada substância.

## 2.8 PRODUTOS NATURAIS

Os produtos naturais são utilizados há milhares de anos para diferentes fins medicinais, sendo, muitas vezes, a única opção terapêutica disponível, em especial para grande parte da população mundial que não possui acesso ao atendimento primário de saúde (OMS, 2017).

De acordo com as estimativas da Convenção da Diversidade Biológica (CDB), o Brasil responde por cerca de 20% do patrimônio genético mundial, destacando-se entre os 17 países megadiversos do mundo (PIMENTEL et al., 2015). Dada a diversidade da flora medicinal e suas numerosas derivações químicas, os produtos naturais são amplamente utilizados como ferramenta farmacológica por serem capazes de agir com a maioria dos alvos terapêuticos (CRAGG; PEZZUTO, 2016).

Segundo NEWMANN e CRAGG (2016), entre 1930 e 2014, de todos os fármacos com atividade antitumoral disponíveis, 48% eram produtos naturais ou seus derivados. Esta proporção aumentou para 66% quando foram incluídos produtos semi-sintéticos.

Sabendo que o câncer é responsável por um grande número de mortes no mundo, muitas pesquisas têm sido direcionadas ao combate desta patologia. Nas últimas décadas, vários estudos baseados em compostos naturais têm sido realizados para descoberta de novas drogas, seja na prevenção ou tratamento do câncer



(FERNANDES et al., 2012; SAFARZADEH; SHOTORBANI; BARADARAN, 2014; HOSSEINI; GHORBANI, 2015; BISHAYEE; SETHI, 2016).

## 2.9 SUBSTÂNCIAS TESTE

Sabendo que os fitoquímicos são importantes fontes de compostos bioativos, destacamos a classe dos terpenos (monoterpenos, diterpenos, triterpenos, dentre outros), uma relevante classe de origem vegetal e altamente promissora por suas atividades biológicas e farmacológicas, com promissora atividade antitumoral (PETRONELLI; PANNITTERI; TESTA, 2009).

Estima-se que existem mais de 20 mil triterpenóides na natureza, podendo ser facilmente encontrados em diversos alimentos, como azeítonas, maçãs, laranjas e ervas aromáticas. Os triterpenóides são alvos de estudos por apresentarem citotoxicidade contra uma variedade de células cancerosas sem manifestar toxicidade em células normais (SETZER; SETZER, 2003; LIBY; YORE; SPORN, 2007; BISHAYEE; SETHI, 2016).

Dentre o grupo de terpenos mais comuns estão os ácidos triterpênicos ursólico, oleanólico e betulínico, que são metabólitos secundários (metabólitos especiais) presentes em várias famílias de vegetais. Esses três ácidos possuem várias atividades biológicas descritas, dentre elas podemos citar a capacidade de induzir as células tumorais à apoptose, bem como efeitos antioxidante, antiinflamatório e quimiopreventivo. (LIU, 1995; YOGESHWARI; SRIRAM, 2005; LASZCZYK, 2009).

A substância FAR2016018 também faz parte da classe dos triterpenos e pertence à família *Clusiaceae*. Esta família possui aproximadamente 50 gêneros e mil espécies, distribuídas em regiões tropicais e temperadas. Seu perfil fitoquímico inclui muitos produtos químicos com atividades farmacológicas relevantes, incluindo atividades antitumorais (KIJJOA; VIEIRA, 2009).

Assim como os triterpenos, os diterpenos também estão presentes em várias plantas medicinais e tem especial relevância no estudo do câncer com destaque para o paclitaxel, um importante diterpeno utilizado no tratamento do câncer de mama e de ovário (ALTMANN; GERTSCH, 2007).

A substância FAR2015056 pertence à família Alismaceae e classe diterpeno. Esta família é composta por plantas aquáticas e semi-aquáticas (JUDD et al., 1999),

de água doce ou salobra (PANSARIN; AMARAL, 2005) e possui aproximadamente 15 gêneros e cerca de 80 espécies (CANALLI; BOVE, 2017). Os dois gêneros dessa família que possuem a maior diversidade são o *Echinodorus* com 27 espécies e *Sagittaria* com 32 espécies (MOREIRA; BOVE, 2010). Algumas atividades farmacológicas da família Alimastaceae foram relatadas como, propriedades anti-hipertensiva, antiinflamatória, antioxidante e diurética (MARQUES et al., 2017).

As substâncias FAR2015056 e FAR2016018 fazem parte de um projeto com uma indústria europeia para identificação de compostos com potencial atividade antitumoral e hipertensiva e encontram-se sob sigilo.

A eficácia de cada composto isolado pode diferir em relação às várias atividades. Desta forma, a combinação dessas substâncias pode apresentar benefícios ao tratar o câncer de diferentes ângulos. Então, visando o desenvolvimento de novos agentes fitoterápicos para diversas doenças, somado à necessidade de validar as informações terapêuticas acumuladas durante séculos, é de extrema relevância estudos para identificar compostos presentes em plantas medicinais, capazes de atuar de forma sinérgica com o mesilato de imatinibe.

Neste sentido, células leucêmicas K562 foram tratadas com os ácidos triterpênicos betulínico, ursólico e oleanólico, e mais dois compostos isolados da biodiversidade brasileira, FAR2015056 e FAR2016018, para avaliar a interação com o MESIMA. Uma linhagem de células multi-droga resistentes (K562/Lucena) também foi utilizada para identificar se esses compostos reproduziriam os efeitos apresentados na linhagem sensível. Adiante, investigou-se ainda o possível mecanismo de morte celular após tratamento com as combinações sinérgicas.

### 3 OBJETIVOS

#### 3.1 OBJETIVO GERAL

Analisar o sinergismo *in vitro* entre produtos naturais e o mesilato de imatinibe, como alternativa na quimioterapia da Leucemia Mielóide Crônica.

#### 3.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Avaliar a atividade antiproliferativa das substâncias isoladamente e em combinação nas linhagens K562 e K562-Lucena;
- Determinar o índice de combinação do tratamento conjunto dos produtos naturais com o mesilato de imatinibe;
- Avaliar as combinações que apresentam sinergismo na linhagem resistente K562-Lucena;
  - Avaliar a atividade da glicoproteína-P na linhagem celular K562-Lucena;
  - Avaliar o índice de seletividade da combinação do mesilato de imatinibe com o ácido betulínico em células não tumorais NIH/3T3;
- Avaliar o mecanismo de indução de morte celular das combinações por meio da dupla coloração de anexina V / PI e da atividade das caspases 3/7.

## 4 MATERIAIS E MÉTODOS

### 4.1 SUBSTÂNCIAS TESTE E QUIMIOTERÁPICO

A rodamina 123 e os ácidos triterpênicos utilizados neste estudo fazem parte da biblioteca de compostos do Laboratório de Farmacologia Molecular – Farmanguinhos/Fiocruz-RJ e foram adquiridos comercialmente da Sigma Aldrich (Brasil).

O mesilato de imatinibe (SIGMA) foi fornecido pela Dr<sup>a</sup> Ana Tereza Gomes Guerrero do Escritório Técnico da Fiocruz Mato Grosso do Sul e o verapamil pela Dr<sup>a</sup> Patrícia Rodrigues Silva do Laboratório de Inflamação/DFP do Instituto Oswaldo Cruz/Fiocruz-RJ.

Os compostos isolados da biodiversidade brasileira, FAR2015018 e FAR2015056, foram fornecidos pelo Laboratório de Produtos Naturais – Farmanguinhos/Fiocruz-RJ. Essas substâncias fazem parte de um projeto para identificação de compostos com potencial atividade antitumoral e hipertensiva e suas estruturas encontram-se sob sigilo.

Uma solução estoque de todas as substâncias foi preparada adicionando DMSO para uma concentração de 40 mM.

As soluções foram mantidas em freezer até o momento do uso, sendo então, diluídas em meio RPMI-1640 (Gibco-Invitrogen, Brasil) suplementado com 10% de soro fetal bovino inativado (Gibco-Invitrogen, Brasil) e 1% de penicilina e estreptomicina (Sigma Aldrich®).

### 4.2 LINHAGENS CELULARES

As linhagens de células humanas leucêmicas utilizadas foram a K562 (leucemia mielóide crônica em crise blástica – ATCC® CCL-243) e a linhagem resistente K562-Lucena (desenvolvida por RUMJANEK et al., 2001, a partir da exposição contínua da K562 à níveis crescentes de vincristina) procedentes do Laboratório de Farmacologia Molecular – Farmanguinhos – Fiocruz/RJ.

As células leucêmicas foram mantidas em meio de cultura RPMI-1640 (*Roswell Park Memorial Institute Medium*) (GIBCO), contendo 10% de soro fetal bovino (GIBCO) e 1% de antibiótico (estreptomicina (10 U/mL) e penicilina (10 mg/mL) (Sigma Aldrich®) e cultivadas em incubadora a 37°C com umidade controlada e atmosfera de 5% de CO<sub>2</sub>, segundo protocolo recomendado pela American Type Culture Collection (ATCC, EUA, <http://www.atcc.org>).

As células na fase de crescimento logarítmico foram utilizadas para obtenção da densidade celular adequada para cada ensaio, considerando a característica de crescimento de cada linhagem e a contagem das células foi realizada em Câmara de Neubauer, utilizando o teste de exclusão com o corante azul de Tripán.

#### 4.3 AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE ANTIPROLIFERATIVA *in vitro*

Para determinação da atividade proliferativa das substâncias teste e do mesilato de imatinibe, foram obtidos os valores percentuais de proliferação celular (MTT), seguindo-se os cálculos de IC<sub>50</sub> das linhagens leucêmicas K562 e K562-Lucena e da linhagem não tumoral NIH/3T3, para obtenção do índice de seletividade (IS).

As células foram aspiradas da garrafa de manutenção, centrifugadas por 10 minutos a 800 rpm, o sobrenadante desprezado e o *pellet* celular ressuspenso em meio suplementado com soro e antibiótico para contagem de células viáveis em azul de tripan.

No primeiro dia de experimento, as células foram semeadas em placas de 96 poços (100 µL/poço) em uma densidade de 3 x 10<sup>5</sup> células/mL e acondicionadas em incubadora a 37°C, 5% de CO<sub>2</sub> e 100% de umidade relativa por 24 h.

A seguir, as células foram expostas por 48 h aos compostos em múltiplas concentrações (variando entre 0,01 a 100 µM), individualmente ou em combinação com o mesilato de imatinibe, em triplicata e em um volume de 100 µL/poço. Como controle positivo de inibição foi utilizado o mesilato de imatinibe nas concentrações de 0,3, 1, 3, 10 e 30 µM e como controle positivo de proliferação foi adicionado 100 µL/poço de RPMI suplementado.

Ao final das 48h, a proliferação celular foi monitorada pela técnica de MTT, adaptada de MOSMANN (1983) que consiste na redução do sal MTT pelas células

viáveis, convertendo-o em cristais formazan de cor azul arroxeadada e insolúveis em água. Para tal, acrescentou-se 20 µL/poço de uma solução de MTT na concentração de 2,5 mg/mL e as placas foram incubadas por 4h a 37°C, 5% de CO<sub>2</sub> e 100% de umidade relativa. Posteriormente, as placas foram centrifugadas a 1500 rpm por 12 minutos e o sobrenadante descartado por rápida vertida manual. A quantidade de células metabolicamente ativas foi mensurada, indiretamente, pela quantificação dos cristais formazan, solubilizados pela adição de 100 µL/poço de DMSO e, após homogeneização em baixa rotação por 15 minutos, foi lida a absorbância no leitor de microplacas VICTOR X5, em comprimento de ondas de 570 nm.

Para o cálculo de proliferação celular, seguimos a fórmula: proliferação (%) = (OD amostra / OD controle) x 100%. O IC<sub>50</sub> foi calculado utilizando o software Graph Pad Prism (Versão 5.01).

#### 4.4 ENSAIO DE SINERGISMO

Os efeitos da interação entre o mesilato de imatinibe e as substâncias teste foram avaliados pela análise de combinação de múltiplas drogas, conforme descrito por Chou e Talalay (1984), no qual o efeito da combinação de diferentes substâncias é estimado pelo Índice de Combinação (CI), calculado pelo software CompuSyn (Biosoft, Cambridge, U.K.). Esse método é baseado na equação do efeito mediano da droga que correlaciona, para cada substância, a dose e seu efeito correspondente (Frações Afetadas (Fa = percentual de inibição celular).

A avaliação do CI foi classificada da seguinte forma: CI<1 = sinergismo; CI=1 = aditivo; CI>1 = antagonismo, sendo considerados efeitos sinérgicos relevantes, os valores de CI<0.8.

Os resultados foram mensurados através das médias dos CIs atingidos com as Fa 0,5 (= inibição de 50% das células). Também foi avaliado o DRI (índice de redução de dose), que indica a proporção em que a dose de uma determinada droga em combinação sinérgica pode ser reduzida para alcançar efeito comparável àqueles alcançados com a dose da droga usada individualmente (CHOU; MARTIN, 2005).

#### 4.5 AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE DA GLICOPROTEÍNA P

A glicoproteína P (P-gp) é o produto do gene MDR-1, expresso em muitas células tumorais (LEVEILLE-WEBSTER; ARIAS, 1995). Níveis elevados de P-gp poderiam aumentar o efluxo do fármaco e assim tornar as células resistentes ao imatinibe (GOLDMAN, 2007).

Neste contexto, foi utilizada uma metodologia para monitoramento da atividade da P-gp, adaptada do procedimento descrito por MAIA et al. (1996). Células K562-Lucena foram semeadas em placas de 96 poços, fundo em U, em uma densidade de  $2 \times 10^5$ /poço. Em seguida, foram realizados os tratamentos com 10  $\mu$ M das substâncias teste, feita a marcação com rodamina 123 (800 ng/mL) e a placa incubada por 45 minutos em estufa a 37°C. O verapamil foi utilizado como controle positivo de inibição da atividade da proteína P-gp. Após esse tempo, as células foram centrifugadas a 1500 rpm por 12 minutos, o sobrenadante desprezado e as células lavadas pela adição de 200  $\mu$ L de PBS gelado, sendo mantidas em gelo até o momento da aquisição de dados em um citômetro de fluxo FACS Calibur. O verapamil, um inibidor da atividade da P-gp, foi utilizado como controle positivo de inibição da bomba de efluxo. Foram adquiridos  $10^4$  eventos e a fluorescência da Rh123 monitorada no canal FL-1. A análise foi realizada no programa CellQuest determinando a média da intensidade de fluorescência (MFI).

#### 4.6 ÍNDICE DE SELETIVIDADE

O índice de seletividade (IS) foi calculado por meio da razão entre a  $IC_{50}$  de cada substância, isoladamente ou em combinação, na linhagem não tumoral NIH/3T3 e a  $IC_{50}$  da amostra na linhagem leucêmica resistente K562-Lucena, conforme fórmula abaixo:

$$IS = \frac{IC_{50} \text{ linhagem NIH/3T3}}{IC_{50} \text{ linhagem K562-Lucena}}$$

O IS maior que 1 indica que a citotoxicidade das substâncias teste é mais seletiva para as células tumorais do que para as células não tumorais. Consideramos significativo um valor de IS maior ou igual a 2,0 (SUFFNESS; PEZZUTO, 1990).

## 4.7 DETECÇÃO DE MORTE CELULAR

Para avaliar se as substâncias que apresentaram sinergismo seriam capazes de interferir na morte das células leucêmicas resistentes K562-Lucena, utilizamos os testes de coloração de anexina V (ANXAV) e iodeto de propídio (PI) e, o ensaio de caspases-3/-7 ativas. Para estes ensaios,  $10^5$  células foram semeadas em placa de 24 poços e incubadas por 6 e 24h. As células foram tratadas com mesilato de imatinibe ( $6,5 \mu\text{M}$ ), ácido betulínico ( $6,5 \mu\text{M}$ ) e com a combinação de ambas ( $6,5 \mu\text{M}$  mesilato de imatinibe +  $6,5 \mu\text{M}$  ácido betulínico). Como controle positivo de morte celular utilizamos estaurosporina (STAURO)  $0,5 \mu\text{M}$ .

A concentração de  $6,5 \mu\text{M}$  do mesilato de imatinibe e  $6,5 \mu\text{M}$  do ácido betulínico foi selecionada por ter apresentado significativa melhora da atividade citotóxica ao serem combinados no ensaio de avaliação de proliferação celular, na linhagem K562-Lucena, conforme observado na figura 8B.

### 4.7.1 Anexina V / PI

Foi utilizada a técnica de citometria de fluxo empregando ANXAV-Isotiocianato de fluoresceína (FITC) e PI (Invitrogen®), para determinar uma possível atividade pró-apoptótica da combinação do mesilato de imatinibe e do ácido betulínico.

Um dos eventos que ocorre durante o processo apoptótico é a inversão da fosfatidilserina (FS) da face interna para a face externa da membrana plasmática da célula. A ANXAV é capaz de se ligar a FS, sugerindo morte por apoptose. O marcador nuclear fluorescente PI é utilizado para distinguir células apoptóticas de células necróticas. O PI é uma molécula que se intercala ao DNA, cuja permeabilidade só é possível em condições de alterações da membrana plasmática, como ocorre na necrose e na etapa final da apoptose. Sendo assim, podemos distinguir: células intactas, viáveis (PI- ANXAV-), células no início da apoptose (PI- ANXAV+) em apoptose avançada (PI+ ANXAV+) ou necróticas (PI+ ANXAV-).

Após os tratamentos, as células foram recolhidas, centrifugadas a 800 rpm por 10 min a  $4^\circ\text{C}$  e lavadas com PBS gelado. O sobrenadante foi descartado e as células



ressuspensas em 400 µL de tampão de ligação 1x (BD Biosciences) e incubadas com 5 µL de ANXAV-FITC durante 15 min no escuro. Ao final deste tempo, foi adicionado 400 µL de meio e mais 20 µL de solução de coloração PI, incubando durante 5 min em temperatura ambiente e protegidas da luz. A taxa de morte celular foi detectada usando um citômetro de fluxo BD FACSCalibur™ (BD Biosciences), utilizando os canais FL-1 (530nm) para a ANXAV e FL-3 para o PI. Foram adquiridos 10.000 eventos por amostra e a análise dos dados foi realizada pelo programa Cell Quest.

Os experimentos foram realizados em triplicata e os resultados expressos em porcentagem de células.

#### 4.7.2 Caspases -3/-7

Este ensaio foi realizado usando-se o kit *Vybrant™ FAM Caspase-3 and -7 Assay* (#V35118-Invitrogen, USA), que utiliza uma metodologia baseada no inibidor fluorescente de caspases (FLICA), que interaje com as caspases ativas.

Após cada tempo determinado, as células foram coletadas e transferidas para tubos de 2,0 mL e centrifugadas a 1200 rpm por 10 minutos. O sobrenadante foi descartado e as células ressuspensas em 100 µL de RPMI com 3 µL de FLICA 30x, e incubadas por 1h a 37°C e 5% CO<sub>2</sub>, protegidas da luz. Durante essa incubação, os tubos foram homogeneizados 2 vezes. Sem descartar o sobrenadante, foi adicionado 400 µL de tampão de lavagem 1x, centrifugando a 1200 rpm por 10 minutos. Após a centrifugação o sobrenadante foi descartado e as células ressuspensas em 400 µL de tampão de lavagem 1x. A análise foi realizada em citômetro de fluxo BD FACSCalibur™ (BD Biosciences, San Jose, CA, USA). Foram adquiridos 10.000 eventos.

#### 4.8 ANÁLISE ESTATÍSTICA

Para as análises estatísticas, as diferenças entre os testes, controle negativo e controle positivo foram avaliadas usando a análise de variância ANOVA de uma via, seguida do pós teste Student Newman Keuls, utilizando o programa GraphPad Prism 5.0, considerando a diferença estatisticamente significativa quando  $p < 0,05$ .

## 5 RESULTADOS

### 5.1 AVALIAÇÃO DA CITOTOXICIDADE DAS SUBSTÂNCIAS ISOLADAS OU EM COMBINAÇÃO

O efeito antiproliferativo dos ácidos betulínico, ursólico e oleanólico e das substâncias FAR2015056 e FAR2016018 sobre as linhagens leucêmicas K562 e K562-Lucena foi avaliado pelo método de MTT. Neste ensaio as células foram tratadas com as substâncias individualmente ou em combinação com o mesilato, em múltiplas concentrações, por um período de 48h.

A partir da leitura da densidade óptica, foram calculadas as porcentagens de proliferação e de inibição celular de cada um dos compostos testados em relação ao controle negativo (células não tratadas = 100% de proliferação). Esses percentuais foram usados na obtenção dos valores de IC<sub>50</sub> (concentração que inibe 50% da proliferação celular). O mesilato de imatinibe foi utilizado como controle positivo.

Inicialmente, as substâncias teste foram testadas individualmente em ambas as linhagens para obtenção da IC<sub>50</sub> - Tabela 1. Conforme observamos na tabela 1, tanto o fármaco padrão (mesilato de imatinibe) quanto as substâncias testadas, foram eficazes em inibir a proliferação celular em células leucêmicas (K562), assim como na linhagem resistente (K562-Lucena), observando-se a seguinte ordem crescente nos valores de IC<sub>50</sub>: mesilato de imatinibe < ácido betulínico < FAR2016018 < ácido ursólico < FAR2015056.

Valores semelhantes de IC<sub>50</sub> foram obtidos para a substância FAR2016018 e ácido ursólico (IC<sub>50</sub> 12,85 µM e 14 µM, respectivamente) frente à linhagem K562. Nesta mesma linhagem, o ácido betulínico foi o que apresentou melhor inibição (IC<sub>50</sub> 8,6 µM), dentre as substâncias testadas. Da mesma forma, essa substância apresentou valor de IC<sub>50</sub> próximo ao imatinibe na linhagem resistente (K562-Lucena) (IC<sub>50</sub> 12,52 µM e 13,12 µM respectivamente). Nesta linhagem resistente, todas as substâncias testadas foram eficazes, porém com diferenças de potência quando comparada com a linhagem não resistente K562 (IC<sub>50</sub> ácido betulínico < mesilato de imatinibe < ácido ursólico < FAR2016018 < FAR2015056). Pelo fato do ácido oleanólico ter apresentado valores elevados de IC<sub>50</sub> em relação ao mesilato de

imatinibe, mais de 60 na linhagem K562 ou 32 vezes na linhagem K562-Lucena, não o qualificaram para ser usado nos ensaios seguintes (Tabela 1).

**Tabela 1: IC<sub>50</sub> das substâncias teste frente as linhagens K562 e K562- Lucena.** Valores obtidos a partir dos ensaios de citotoxicidade com tratamento de 48h.

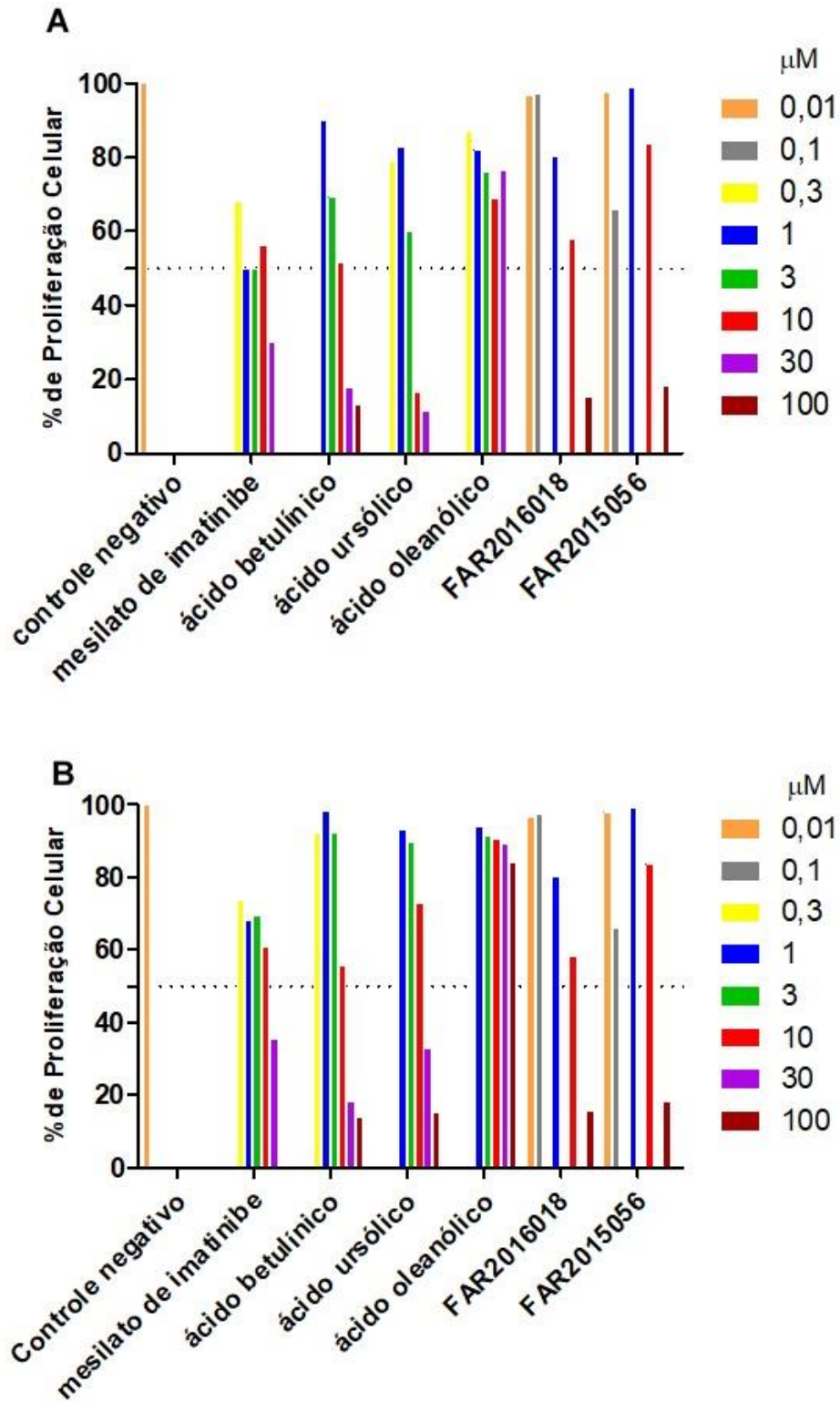
Substância	K562 IC <sub>50</sub> (µM)	K562-Lucena IC <sub>50</sub> (µM)
mesilato de imatinibe	3,5	13,12
ácido ursólico	14	19,6
ácido betulínico	8,6	12,52
ácido oleanólico	231,8	421,5
FAR2015056	32,8	86,4
FAR2016018	12,85	33,14

Observa-se então que, dentre as substâncias testadas, os ácidos betulínico e ursólico apresentaram uma menor IC<sub>50</sub> na linhagem resistente K562-Lucena, enquanto na linhagem K562 os melhores resultados foram vistos com ácido betulínico e FAR2015018.

Avaliando o perfil de proliferação das substâncias teste nas concentrações de tratamento (Figuras 6A e 6B), ficou evidente que a atividade antiproliferativa foi intensificando-se a partir de 10 µM, em ambas as linhagens, resistente e não resistente. As substâncias FAR2015056, FAR2016018 e o ácido betulínico apresentaram atividade anti-proliferativa em torno de 80% em sua maior concentração na linhagem K562 (Figura 6A). Na linhagem resistente K562-Lucena (Figura 6B) o mesmo fenômeno foi encontrado, embora com valores um pouco mais reduzidos (60-70% de inibição). O fármaco padrão imatinibe manteve-se na faixa de 65-70% de inibição em ambas as linhagens.

Diante dos resultados, identificou-se a concentração de 10 µM como a ideal para o tratamento das células no teste de resistência a fármacos, usando o fluoróforo Rh 123.

**Figura 6: Gráfico representativo da proliferação celular nas linhagens leucêmicas K-562 e K562-Lucena.** As células foram tratadas por 48h com diferentes concentrações (0,01 a 100  $\mu\text{M}$ ) do mesilato de imatinibe, ácido betulínico, ácido ursólico, ácido oleanólico, FAR2015056 ou FAR2016018 e a citotoxicidade avaliada pelo método de MTT. A porcentagem de proliferação celular foi calculada em relação ao controle negativo (não tratado = RPMI), considerado como 100%. O gráfico A corresponde ao tratamento na linhagem K562 e o gráfico B na linhagem resistente K562-Lucena.

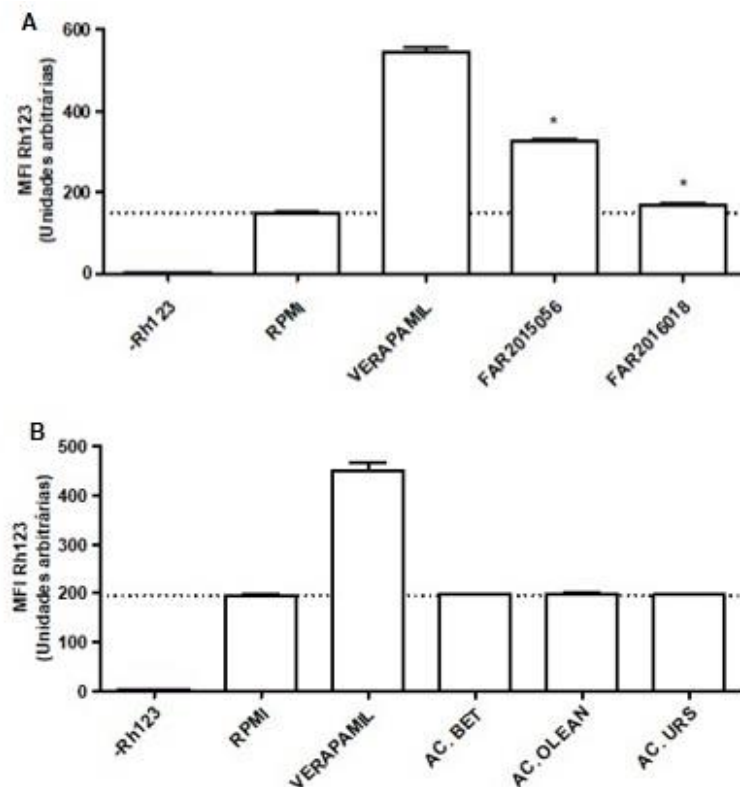


## 5.2 AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE DA GLICOPROTEÍNA-P (P-gp)

Essa abordagem avaliou a atividade das substâncias teste sobre a capacidade de inibir a atividade da P-gp, proteína responsável pela extrusão de fármacos do meio extracelular, impedindo o acúmulo no interior da célula em concentrações farmacologicamente ativas.

Neste ensaio as substâncias teste foram usadas apenas na linhagem MDR K562-Lucena, na concentração de 10  $\mu$ M, na presença de Rh 123.

**Figura 7: Atividade das substâncias teste sobre a atividade da glicoproteína P em células K562-Lucena.** A inibição da atividade da P-gp foi avaliada por citometria de fluxo, utilizando o substrato fluorescente Rh 123 e quantificada pela média de intensidade de fluorescência (MFI). O verapamil foi utilizado como controle de inibição da bomba de efluxo. A figura A mostra que as substâncias FAR2015056 e FAR2016018 foram capazes de impedir a extrusão da Rh 123 nas células leucêmicas, demonstrando efeito das substâncias teste em inibir a atividade da P-gp, enquanto na figura 7B, nota-se que os ácidos betulínico, ursólico e oleanólico não apresentaram atividade.



Na figura 7A é possível visualizar um aumento da intensidade de fluorescência em células tratadas com as amostras FAR2015056 e FAR2016018, demonstrando acúmulo de Rh 123 no interior das células. Este resultado sugere uma inibição na atividade da P-gp por parte dessas substâncias. Tal fenômeno não foi observado com

os ácidos betulínico, ursólico e oleanólico (Figura 7B), demonstrando que o efluxo não foi impedido, sugerindo que estas substâncias atuam por mecanismos diferentes.

### 5.3 COMBINAÇÃO DO MESILATO DE IMATINIBE COM AS SUBSTÂNCIAS FAR2015056, FAR2016018 E OS ÁCIDOS BETULÍNICO E URSÓLICO

A fim de avaliar se a interação do mesilato de imatinibe com as substâncias teste potencializa os efeitos obtidos isoladamente, foram realizados novos tratamentos. As concentrações utilizadas na combinação de cada substância com o mesilato de imatinibe foram estabelecidas utilizando dois critérios: considerando os valores das  $IC_{50}$  de cada substância teste individualmente e partindo da concentração de 10  $\mu$ M, definido pelo perfil de viabilidade, conforme observados na tabela 1 e figura 6, respectivamente.

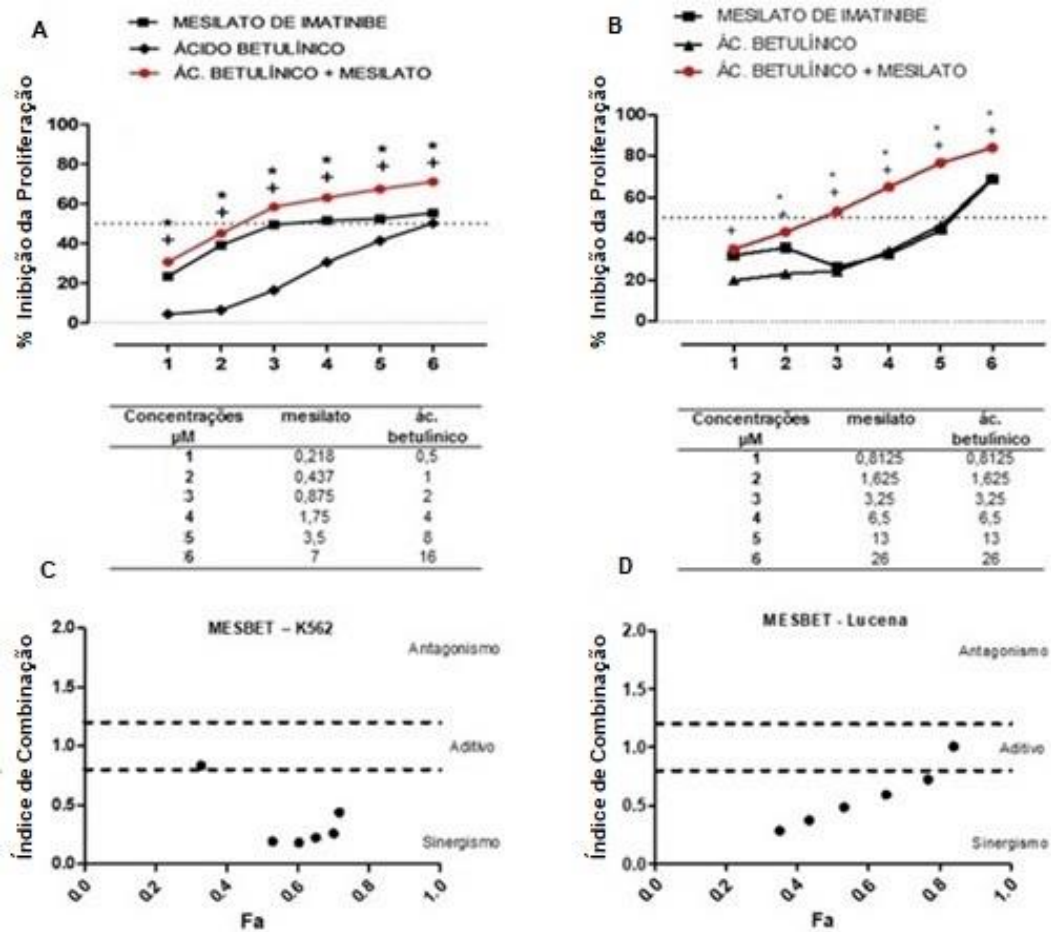
Dessa forma, para os testes de combinação do mesilato de imatinibe com os ácidos ursólico e betulínico, utilizamos os valores das  $IC_{50}$  e, para as substâncias FAR2015056 e FAR2016018, utilizamos a concentração de 10  $\mu$ M, extrapolando um ponto acima dessas concentrações escolhidas.

Após o tratamento das células K562 e K562-Lucena com as substâncias combinadas, por um período de 48 horas, foram calculados os índices de combinação (CI) e de redução de dose (DRI).

#### 5.3.1 Proliferação das células leucêmicas K562 e K562-Lucena tratadas com as combinações com o mesilato de imatinibe

As combinações entre o mesilato de imatinibe e o ácido betulínico evidenciaram uma importante melhora na atividade citotóxica nas duas linhagens celulares testadas, K562 e K562-Lucena (Figura 8A e 8B, respectivamente). Foi observado pela diminuição da proliferação celular, de forma dose dependente, potencializando o efeito de todas as concentrações quando comparado às substâncias utilizadas individualmente.

Figura 8: Avaliação da proliferação celular nas linhagens K562 e K562-Lucena após tratamento de 48h com diferentes concentrações do mesilato de imatinibe, ácido betulínico e combinações.



\*  $p < 0,05$  comparado ao mesilato de imatinibe e +  $p < 0,05$  comparado ao ácido betulínico.

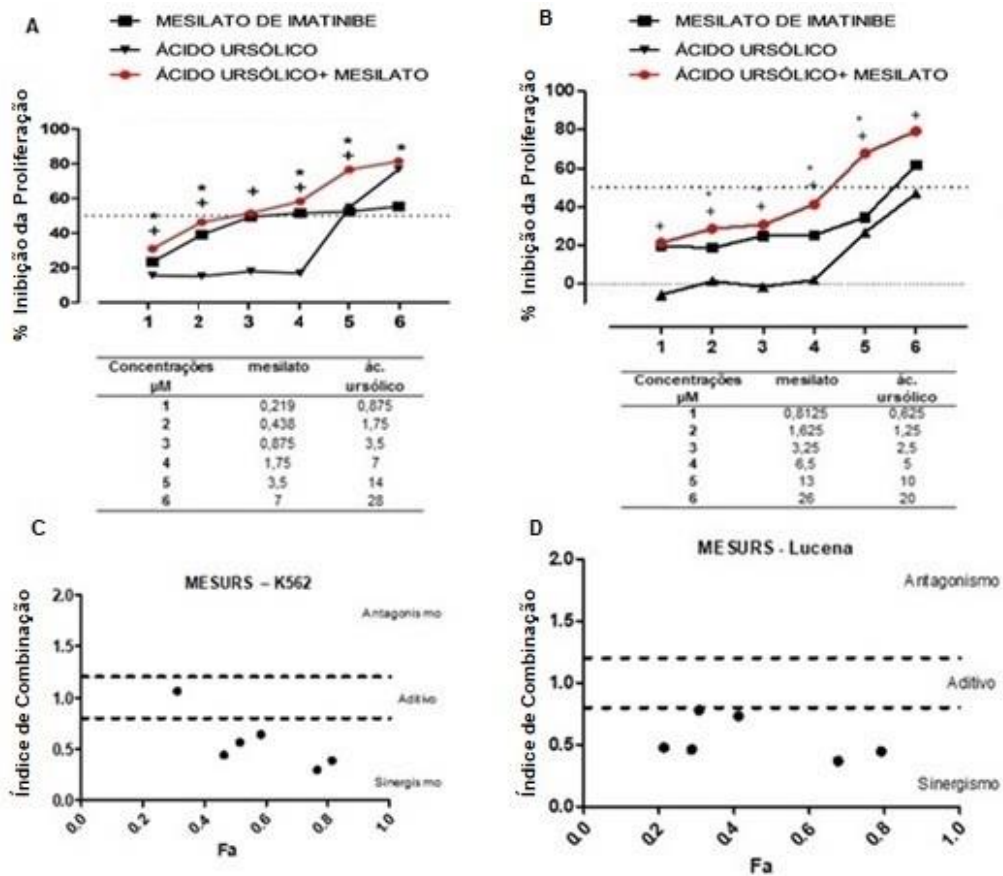
É possível notar na figura 8C e 8D forte efeito sinérgico em quatro das cinco concentrações das combinações do mesilato de imatinibe com o ácido betulínico em ambas as linhagens celulares, com exceção apenas da menor concentração na K562 que apresentou sinergismo fraco com  $CI = 0,83$  e na maior concentração na K562-Lucena, com efeito aditivo ( $CI = 1,01$ ). Podemos observar também que na linhagem resistente a concentração é inversamente proporcional à atividade, ou seja, quanto menor a concentração, maior o efeito sinérgico da interação com o mesilato de imatinibe. Evidenciando, desta forma, uma potenciação farmacológica, que é o principal objetivo do uso de combinações.

A potência farmacológica é a relação entre a dose de um fármaco e seu efeito, ou seja, quantidade de fármaco necessária para produzir um efeito biológico.

O efeito antiproliferativo do ácido ursólico também foi significativamente potencializado quando combinado com o mesilato de imatinibe (Figura 9A e 9B), mostrando inibição da proliferação celular de forma dose-dependente nas duas linhagens celulares.

Na análise do efeito da interação das combinações, é possível observar efeito aditivo na menor concentração nas células K562 (Figura 9C) e efeito sinérgico em todas as concentrações nas células K562-Lucena (Figura 9D).

**Figura 9: Avaliação da proliferação celular nas linhagens K562 e K562-Lucena após tratamento de 48h com diferentes concentrações do mesilato de imatinibe, ácido ursólico e combinações.**



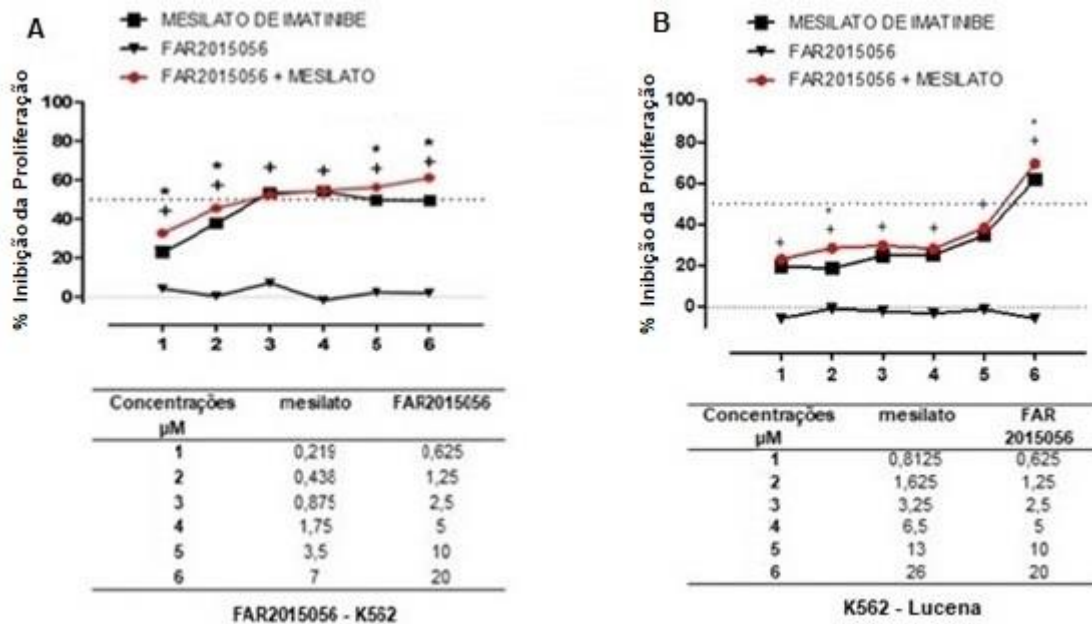
\*  $p < 0,05$  comparado ao mesilato de imatinibe e +  $p < 0,05$  comparado ao ácido ursólico.

A figura 10A e 10B mostra que a combinação com a substância FAR2015056 apresentou significativa melhora na atividade citotóxica em todas as concentrações quando comparada à substância FAR2015056 individualmente e, praticamente repetiu os mesmos resultados do mesilato de imatinibe só. Esta combinação não foi



capaz de gerar índice de combinação e nem índice de redução de dose apesar da diferença significativa ( $p < 0,05$ ) entre alguns pontos da combinação e a curva do mesilato de imatinibe individualmente.

**Figura 10: Avaliação da proliferação celular nas linhagens K562 e K562-Lucena após tratamento de 48h com diferentes concentrações do mesilato de imatinibe, FAR2015056 e combinações.**

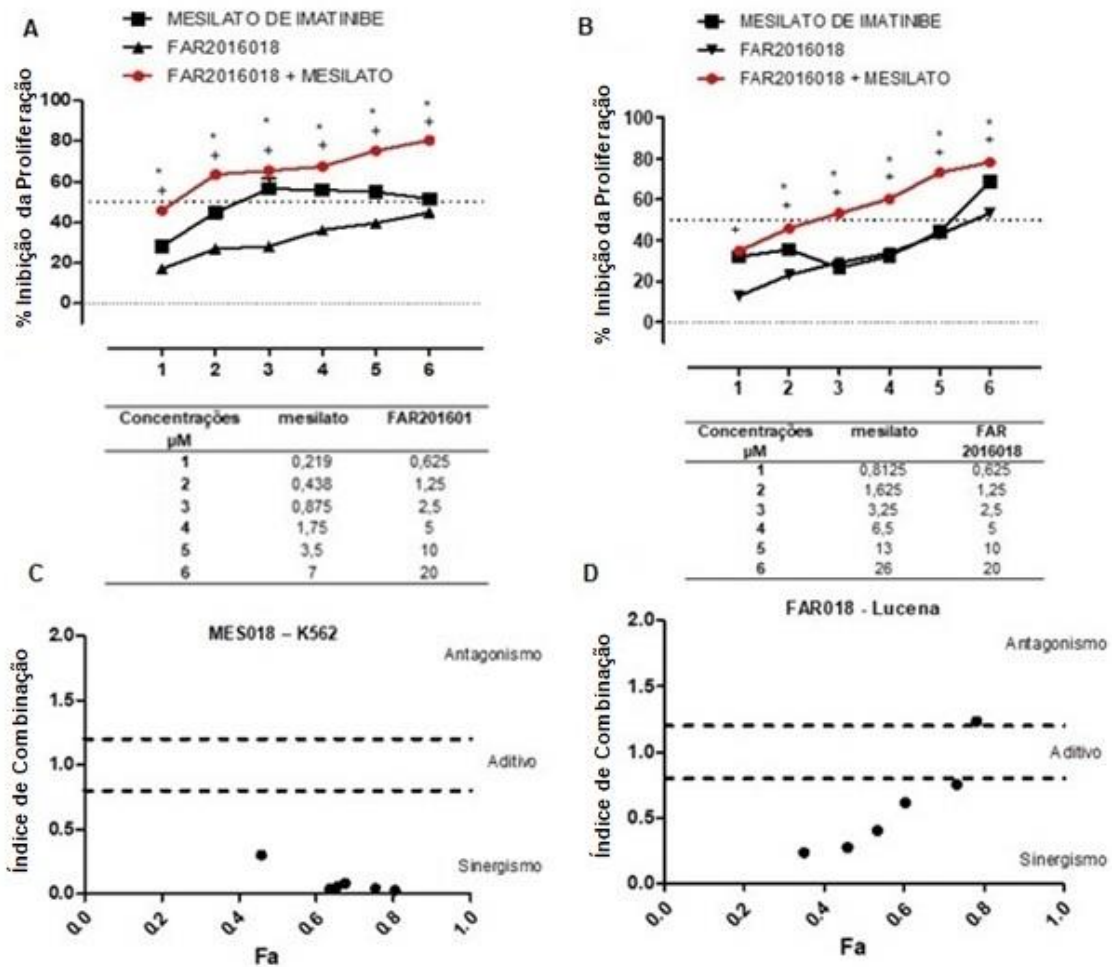


\*  $p < 0,05$  comparado ao mesilato de imatinibe e +  $p < 0,05$  comparado a FAR2015056.

De todas as substâncias testadas, a FAR2016018 foi a que apresentou melhor resultado, mostrando aumento significativo do efeito antiproliferativo quando em combinação (Figura 11A e 11B). Os valores de inibição da proliferação celular após 48h de tratamento com a combinação foram de 46 a 80% para as concentrações em ordem crescente na linhagem K562 (Figura 11A), variando de 34,9 a 78,1% na linhagem K562-Lucena (Figura 11B).

Podemos notar ainda, na figura 11C e 11D, a fortíssima atividade sinérgica evidenciada por meio dos valores de CI das combinações. Assim como visto na combinação do mesilato de imatinibe e ácido betulínico, a interação do mesilato de imatinibe e FAR2016018 apresentou melhor resposta sinérgica na menor concentração da linhagem resistente (CI = 0,23).

Figura 11: Avaliação da proliferação celular nas linhagens K562 e K562-Lucena após tratamento de 48h com diferentes concentrações do mesilato de imatinibe, FAR2016018 e combinações.



\*  $p < 0,05$  comparado ao mesilato de imatinibe e +  $p < 0,05$  comparado a FAR2016018.

Analisando os resultados de combinações entre mesilato de imatinibe e as substâncias testadas nas linhagens K562, verifica-se que em todos os ensaios as combinações foram mais eficazes em diminuir a proliferação celular em comparação às substâncias testadas individualmente. Isso foi observado para o ácido betulínico (Figura 8A e 8B), ácido ursólico (Figura 9A e 9B), FAR2015056 (Figura 10A e 10B) e FAR2016018 (Figura 11A e 11B). Esses efeitos se apresentaram de forma dose dependente, e potencializado para todas as concentrações quando comparado às substâncias utilizadas isoladamente, na linhagem K562.

Outra análise importante refere-se ao índice de combinação (CI), o qual reflete um potencial sinergismo de substâncias que apresentam valores de CI inferior a 1 (CI <1).

Assim como ocorreu na linhagem sensível K562, a amostra FAR2015056 não apresentou atividade citotóxica quando utilizada individualmente, assim como também não apresentou melhora na resposta farmacológica no tratamento com o mesilato de imatinibe.

Quando associamos o mesilato de imatinibe com a substância FAR2016018 nota-se uma significativa melhora do efeito citotóxico observado em todas as concentrações testadas (Figura 11A e 11B). Na análise do efeito sinérgico (Figura 11C e 11D), é possível perceber que apenas a maior concentração da combinação apresentou efeito antagônico na linhagem K562-Lucena (Figura 11D) e todas as demais mostraram efeito sinérgico. É importante ressaltar que quanto menor a concentração utilizada, maior é o efeito sinérgico, evidenciando assim, que a combinação avaliada potencializou o efeito farmacológico do mesilato de imatinibe nas linhagens celulares analisadas.

Na linhagem resistente K562-Lucena as análises de combinações entre mesilato de imatinibe e ácido betulínico (Figura 8A e 8B), bem como a combinação entre o mesilato de imatinibe e ácido ursólico (Figura 9A e 9B) e a combinação de mesilato de imatinibe e FAR2016018 (Figura 11A e 11B), mostram uma curva de inibição da proliferação extremamente satisfatória se comparadas com as células incubadas com as substâncias de forma individual.

### 5.3.2 Comparação do desempenho sinérgico das combinações nas duas linhagens

O efeito das combinações nas duas linhagens foi avaliado pelo cálculo do CI e do DRI. As combinações do ácido betulínico, ácido ursólico e FAR2016018 com o mesilato de imatinibe apresentaram CI significativo, com valores abaixo de 1 na Fa 0,5 (fração que inibe 50% da viabilidade celular), indicando efeito sinérgico em ambas as linhagens leucêmicas.

Na tabela 2 nota-se que a substância FAR2016018 apresentou a melhor interação em ambas as linhagens, comprovada pelo valor do CI de 0,15 na K562 e 0,35 na K562-Lucena. Observamos também uma boa redução de dose com resultado de DRI de 7,66 para o mesilato e 50,13 para a FAR2016018 na linhagem sensível e 4,37 e 8,18, respectivamente, para o mesilato de imatinibe e FAR2016018 na linhagem resistente.

A interação do ácido betulínico com o mesilato de imatinibe reduziu a concentração do mesilato de imatinibe em 7 vezes e do ácido betulínico em mais de 12 vezes na linhagem K562 e em 4,61 e 5,46 vezes, respectivamente, para o mesilato de imatinibe e ácido betulínico, na linhagem resistente.

A combinação mesilato de imatinibe e ácido ursólico também apresentou efeito sinérgico significativo nas duas linhagens, embora com menor intensidade quando comparado às outras substâncias. Entretanto, a combinação de imatinibe e FAR2015056 não se apresentou favorável, não sendo possível analisar a atividade sinérgica nas duas linhagens.

**Tabela 2: Índice de combinação (CI) e índice de redução de dose (DRI) de cada combinação nas linhagens K562 e K562-Lucena.** Os valores de CI referem-se à fração que inibe 50% da viabilidade celular (Fa 0,5) e o DRI indica a quantidade que cada substância foi reduzida na combinação para produzir o efeito.  $CI < 1$ ,  $= 1$  e  $> 1$  indicam sinergismo, efeito aditivo e antagonismo, respectivamente.

Substância	K562			K562 - Lucena		
	CI (Fa 0,5)	DRI mesilato	DRI Substância	CI (Fa 0,5)	DRI mesilato	DRI Substância
ácido betulínico	0,22	7,16	12,71	0,40	4,61	5,46
ácido ursólico	0,56	3,11	4,86	0,41	4,40	5,53
FAR2016018	0,15	7,66	50,13	0,35	4,37	8,18

Apesar dos efeitos sinérgicos apresentados em três das quatro substâncias testadas, apenas o ácido betulínico foi selecionado para continuar os demais testes para elucidação do mecanismo de ação. As demais substâncias serão estudadas posteriormente, em novos trabalhos.

### 5.3.3 Proliferação das células NIH/3T3 - Índice de Seletividade

A fim de garantir a seletividade dos efeitos citotóxicos pelas células tumorais, foi utilizada a linhagem de células não tumorais NIH/3T3. Neste ensaio o valor de  $IC_{50}$  das células não tumorais foi dividido pelo valor da  $IC_{50}$  das células resistentes K562-Lucena.

Os resultados observados demonstraram que a combinação do mesilato de imatinibe com o ácido betulínico apresentou IS de 10,92. Este valor significa que a combinação foi 10,92 vezes mais ativa na linhagem de células leucêmicas do que em células não tumorais.

O mesilato de imatinibe e o ácido betulínico testados isoladamente apresentaram IS de 9,59 e 1,22, respectivamente.

#### 5.4 MORTE CELULAR

Sabendo que a combinação do mesilato de imatinibe com o ácido betulínico apresentou efeito citotóxico e atividade sinérgica significativos, foi avaliado se o efeito citotóxico observado era via mecanismo de indução de apoptose. Para tal, foi utilizada a metodologia de citometria de fluxo para detecção desta atividade e foi possível observar que a combinação do mesilato de imatinibe com o ácido betulínico (6,5  $\mu$ M + 6,5  $\mu$ M) foi capaz de induzir a morte de células leucêmicas MDR por apoptose.

##### 5.4.1 Anexina V / PI

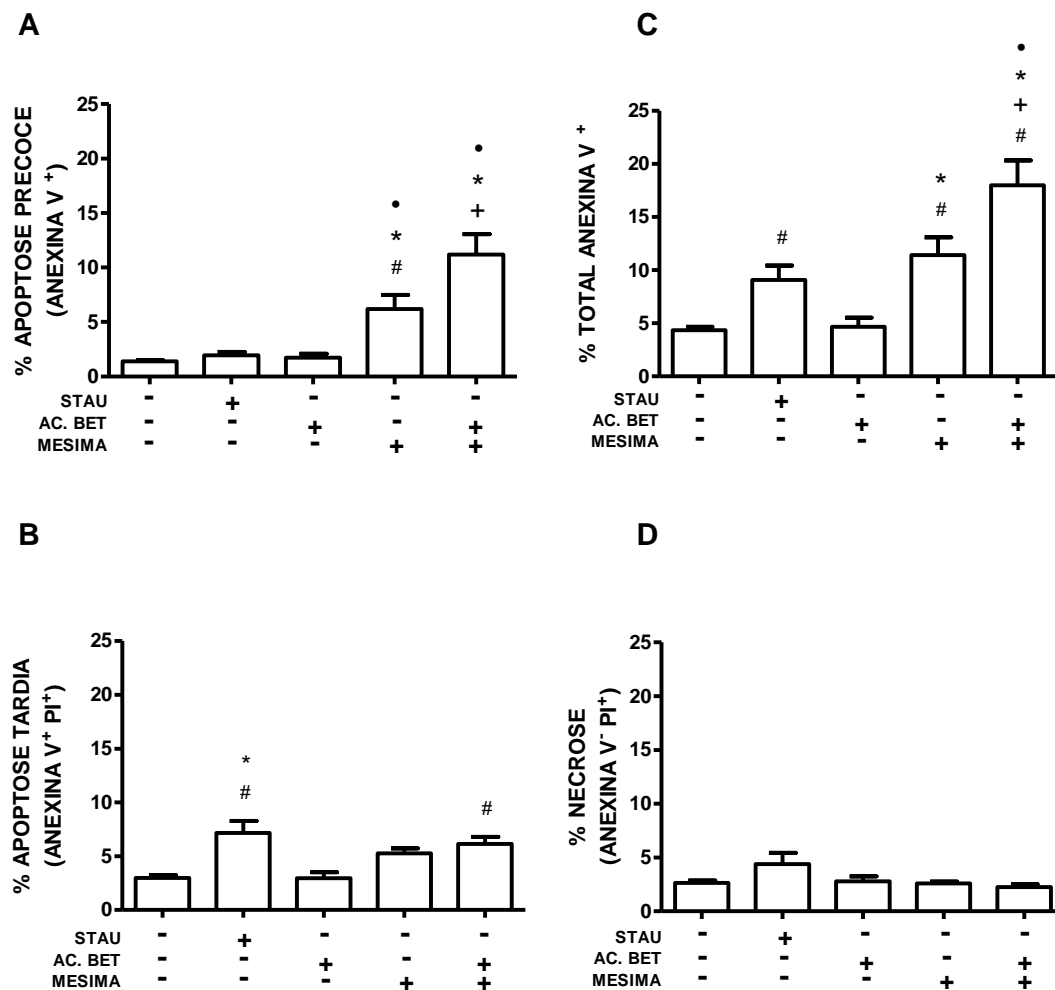
A indução da apoptose foi investigada após tratamento de 24h das células K562-Lucena com o mesilato de imatinibe e o ácido betulínico, isoladamente, ou com a combinação mesilato de imatinibe e o ácido betulínico por meio da técnica de dupla marcação ANXAV/PI. Este método permite a detecção, tanto de células em apoptose, marcadas com anexina por meio da externalização da fosfatilserina, quanto células necróticas que se coram com o PI, por apresentarem perda da integridade da membrana. Com esta marcação é possível dividir a população celular em quatro categorias: apoptose precoce (ANXAV+/PI-), apoptose tardia (ANXAV+/PI+), necrose (ANXAV-/PI+) e células viáveis (ANXAV-/PI-). A concentração da combinação (6,5  $\mu$ M + 6,5  $\mu$ M de cada substância) foi definida por ser a que apresentou maior potência da atividade antiproliferativa no ensaio de MTT, em relação à atividade das substâncias isoladamente.

O tratamento com o mesilato de imatinibe aumentou significativamente a quantidade de células em apoptose precoce, marcadas com anexina V (Figura 12A), em relação às demais substâncias testadas isoladamente, assim como ao grupo não tratado. Na figura 12A, pôde ser observado um aumento ainda maior após tratamento com a combinação mesilato de imatinibe + ácido betulínico, em relação a todos os grupos avaliados. A combinação também apresentou aumento de células marcadas

duplamente com ANXAV/PI, demonstrando fase de apoptose tardia, quando comparadas ao grupo não tratado (Figura 12B). Nesta mesma figura, constata-se que o número de células da combinação no final da apoptose, dobrou em relação ao tratamento com ácido betulínico e ao grupo não tratado. Ao somar a porcentagem de células ANXAV positivas (Figura 12C), é possível notar que a combinação aumentou em 2 vezes o número de células apoptóticas em relação ao tratamento com STAURO e mais de 4 vezes em relação ao grupo MEIO.

A figura 12D mostra que nenhuma das substâncias testadas causou alteração significativa no número de células necróticas.

**Figura 12: Avaliação da indução de apoptose das células K562-Lucena pelo ensaio de dupla coloração anexina V / PI.** Gráfico representativo de dois experimentos independentes. Dados apresentados como média  $\pm$  desvio padrão, considerando significativo quando  $p < 0,05$ , sendo, \*  $p < 0,05$  quando comparado ao ácido betulínico (AC. BET), +  $p < 0,05$  quando comparado ao mesilato de imatinibe (MESIMA), •  $p < 0,05$  quando comparado à estaurosporina (STAU) e #  $p < 0,05$  quando comparado ao grupo não tratado.

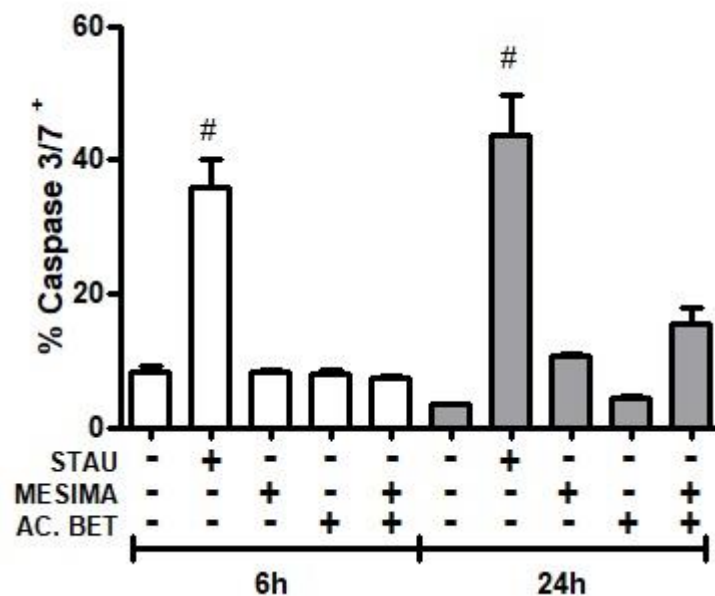


### 5.4.2 Caspase -3/-7

Visto que os resultados anteriores evidenciaram aumento na quantidade de células apoptóticas após o tratamento combinado com mesilato de imatinibe e ácido betulínico, avaliou-se o envolvimento das caspases neste efeito, uma vez que as caspases desempenham importante papel no processo de apoptose.

Nos ensaios da atividade de caspase 3 e 7 (Figura 13), a staurosporina foi utilizada como controle positivo de ativação de caspase e apresentou aumento de 35,7% para 43,7% de acordo com o tempo de tratamento, 6h e 24h, respectivamente. Não foi observada alteração significativa após o tratamento de 6h em nenhuma substância testada. Entretanto, é possível notar aumento significativo de células K562-Lucena caspase 3 e 7 positivas, após o tratamento por 24h com a combinação mesilato de imatinibe e ácido betulínico, em comparação aos grupos do ácido betulínico isoladamente e ao grupo não tratado (MEIO).

**Figura 13: Dosagem dos níveis de caspase -3/-7 para detecção do efeito apoptótico do tratamento isolado ou combinado do mesilato de imatinibe (MESIMA) e ácido betulínico (AC. BET) (6,5  $\mu$ M + 6,5  $\mu$ M) por 6h e 24h, em células K562-Lucena. A estaurosporina (STAU) foi utilizada como controle positivo de caspase. Os dados apresentados representam a média  $\pm$  desvio padrão. # p < 0,05 quando comparado ao grupo não tratado e \* p<0.05 quando comparado ao AC. BET.**



## 6 DISCUSSÃO

A resistência terapêutica das células tumorais é o maior obstáculo para um tratamento efetivo. Atualmente, o desenvolvimento de novas estratégias para superar a resistência a quimioterápicos, tem sido alvo de vários estudos (OZBEN, 2006; VAIDYA, GHOSH e VUNDINTI, 2011; KIM et al., 2012; KIM e KIM, 2015; KIM et al., 2016).

O uso do mesilato de imatinibe em alguns tipos de câncer é classicamente descrito na literatura, entretanto relatos de resistência a esta droga padrão no tratamento de leucemia mielóide crônica, também vêm sendo demonstrado (SHAH et al., 2004; QUINTÁS-CARDAMA; KANTARJIAN; CORTES, 2009; ABDEL-AZIZ et al., 2015; CAVNAR et al., 2017; SAITO et al., 2017). Neste sentido, a combinação de múltiplas drogas é crucial nesta busca, com o objetivo de obter efeito sinérgico para reduzir possíveis efeitos tóxicos e potencializar a ação farmacológica e terapêutica do quimioterápico (DANCEY e CHEN, 2006).

Diversos estudos têm demonstrado que o uso combinado de agentes antitumorais com produtos naturais, potencializa o efeito de inibição de crescimento das células tumorais (MOROTTI et al., 2006; YI; WETZSTEIN, 2011; ZHANG et al., 2016). Combinações entre o mesilato de imatinibe e outros fármacos têm sido uma ferramenta muito utilizada na tentativa de reduzir ou mesmo abolir a resistência de algumas células ao imatinibe (SHEN et al., 2009). Bandyopadhyay e colaboradores (2017) demonstraram que co-tratamento com avasimibe e imatinibe, na linhagem K562 e na linhagem resistente K562R, reduziu a proliferação celular diminuindo a dose dos quimioterápicos sem perder seu efeito, e, além disso, obtiveram efeito sinérgico.

Diante de evidências que mostram a capacidade de substâncias derivadas de produtos naturais atuarem de forma sinérgica a alguns fármacos (HEMAISWARYA e DOBLE, 2006; LIN; JIANG; LIU, 2016), com possibilidade de reduzir as suas concentrações e, conseqüentemente, reduzir os efeitos adversos indesejados, foram testados alguns princípios ativos derivados de plantas, pertencentes à classe dos terpenos.

As plantas medicinais são utilizadas há anos por apresentam importante valor como fonte de substâncias com potencial terapêutico para diversas doenças e, ainda



hoje, representam um importante reservatório para a identificação de novas drogas. Dados da literatura demonstram a atividade de diferentes constituintes derivados de plantas medicinais, na prevenção ou tratamento do câncer, tais como os flavonóides, polifenóis, alcalóides, terpenos, dentre outros (SAFARZADEH; SHOTORBANI; BARADARAN, 2014; ATANASOV et al., 2015; NEWMAN; CRAGG, 2016).

Entre os inúmeros compostos produzidos pelas plantas, destacam-se os terpenos, que representam a maior e mais diversificada classe de produtos naturais, com diferentes ações terapêuticas já demonstradas (PETRONELLI, PANNITTERI e TESTA, 2009). Apesar das suas atividades preventivas ou terapêuticas, é possível melhorar seu potencial citotóxico ao combiná-los com outros fármacos.

Neste estudo, primeiramente foi realizada uma triagem com diferentes substâncias da classe dos terpenos, com o objetivo de encontrar uma substância promissora para atuar de forma sinérgica com o mesilato de imatinibe. As linhagens leucêmicas K562 e K562-Lucena foram utilizadas nestes ensaios.

A linhagem K562 é bem descrita em estudos com o mesilato de imatinibe, sobre a qual este fármaco apresenta efeitos inibitórios de crescimento já bem descritos (WEI, TO e AU-YEUNG, 2015). Neste estudo observou-se que o imatinibe foi capaz de inibir a proliferação das células K-562, o que está em consonância com os dados também vistos por LIN, JIANG e LIU (2016). A linhagem resistente K562-Lucena é derivada da K562 e também foi utilizada para avaliar se as substâncias apresentariam ação farmacológica sobre uma linhagem resistente.

Os resultados encontrados mostram que as amostras FAR2016018 e os ácidos ursólico e betulínico apresentaram significativa inibição na proliferação de ambas as linhagens leucêmicas, tanto administradas isoladamente quanto em combinação com o mesilato de imatinibe. Ao contrário do observado com as substâncias acima, o ácido oleanólico não foi efetivo em inibir a atividade proliferativa das células leucêmicas, em nenhuma das linhagens testadas.

O ácido betulínico foi descrito pela primeira vez em 1917 por Trautenberg e possui várias atividades biológicas conhecidas, sendo a de maior interesse a sua atividade citotóxica, descoberta em 1976, em uma linhagem de leucemia linfática, P-388, assim como em muitas linhagens de células tumorais humanas (TRUMBULL, 1976; FULDA, 2010; MOGHADDAM, AHMAD e SAMZADEH-KERMANI, 2012; CSUK, 2014).

Assim como o ácido betulínico, os ácidos ursólico e oleanólico pertencem à classe dos terpenos e possuem diversas atividades farmacológicas descritas, dentre elas, hepatoprotetora, anti-inflamatória e antitumoral (NOVOTNÝ; VACHALKOVA; BIGGS, 2001; LI; GUO; YANG, 2002; LIU, 2005).

O fato da substância causar inibição na proliferação das células tumorais é importante, porém, diversas substâncias são expulsas da célula, impedindo que o fármaco atinja concentrações terapêuticas eficazes.

Existem vários mecanismos envolvidos na resistência das células tumorais aos quimioterápicos, sendo um dos principais mecanismos, o transporte através da membrana plasmática, via glicoproteína P, cuja atividade promove o efluxo do fármaco para o meio extracelular (HUBER, MARUIAMA e ALMEIDA, 2010).

Diante do obstáculo causado pela resistência terapêutica promovida pela glicoproteína P, superexpressa em várias células tumorais humanas e detectada em cerca de 60% dos pacientes com LMC avançada, é indispensável descobrir substâncias capazes de reverter essa resistência, inibindo a extrusão do fármaco e, dessa forma, aumentando sua concentração intracelular e conseqüentemente a atividade citotóxica. Para tal, as linhagens celulares resistentes têm sido utilizadas a fim de identificar substâncias capazes de superar o fenótipo de resistência (ILLMER et al., 2004; HUBER; MARUIAMA; ALMEIDA, 2010; MAIA, 2011).

Sendo assim, foi investigada a atividade dos terpenos FAR2015056, FAR2016018 e os ácidos betulínico, ursólico e oleanólico na linhagem K562-Lucena, que superexpressa a P-gp, responsável pelo fenótipo multidroga resistente de células tumorais.

Dentre as substâncias testadas, FAR2015056 e FAR2016018 foram capazes de inibir a atividade da P-gp, sugerindo possível efeito modulador, enquanto os ácidos triterpênicos não foram capazes de evitar o efluxo.

É extremamente importante identificar substâncias que apresentem diferentes efeitos que levem ao dano da célula tumoral, pois fármacos com diferentes tipos de ação são usados em combinações na tentativa de melhorar o efeito citotóxico diminuindo a concentração do quimioterápico e ainda, atingir efeito sinérgico.

Diante disso, após a avaliação da atividade citotóxica e, determinação da potência ( $IC_{50}$ ) e da curva dose-efeito das substâncias isoladamente e em combinação, foi calculado o efeito farmacológico das interações com o mesilato de

imatinibe pelo método de Chou e Talalay e quantificado por meio do índice de combinação (CI) (CHOU, 2010).

Quando dois ou mais fármacos são administrados simultaneamente, a combinação dos efeitos farmacológicos pode gerar efeito combinatório maior (sinergismo), igual (aditividade) ou menor (antagonismo) do que os efeitos de cada fármaco isoladamente. (CHOU, 2010; HU et al., 2016).

O sucesso das combinações envolve vários fatores importantes para a terapêutica, tais como: a diminuição da dose, o aumento da eficácia terapêutica, a redução das reações adversas e efeitos colaterais, o aumento da duração do efeito e ainda a possibilidade de impedir ou retardar a resistência medicamentosa (CHOU, 2010).

Ao analisar o conjunto de dados, observa-se que as combinações do mesilato de imatinibe com os ácidos betulínico e ursólico ou a substância FAR2016018 evidenciaram significativa atividade sinérgica ao mesilato de imatinibe, tanto na linhagem K562 quanto na linhagem resistente K562-Lucena.

É importante salientar uma potenciação farmacológica ao combinar o mesilato de imatinibe com o ácido betulínico e a substância FAR2016018, notada ao apresentarem uma maior ação sinérgica quanto menor a concentração utilizada. Este fato, ajuda a impedir ou retardar a resistência medicamentosa, além de causar menos efeitos adversos na clínica.

Outro dado relevante é o índice de redução de dose (DRI), que indica o quanto cada substância foi reduzida em uma combinação sinérgica para proporcionar o mesmo efeito obtido isoladamente (CHOU; MARTIN, 2005). Neste ensaio, observou-se uma maior redução do mesilato de imatinibe e do ácido betulínico e FAR2016018, em ambas as linhagens testadas.

Dada a interação sinérgica observada entre as combinações com o mesilato de imatinibe, o ácido betulínico foi selecionado para elucidar os mecanismos que levam aos efeitos citotóxicos e sinérgicos encontrados e identificar o mecanismo de morte implicado na inibição da proliferação, uma vez que, um dos principais marcadores do câncer é a incapacidade da célula tumoral em sofrer apoptose (HANAHAN; WEINBERG, 2011).

A morte celular é geralmente classificada em duas grandes categorias, facilmente identificadas por suas diferenças morfológicas: a apoptose que representa

a morte celular programada e, em um processo patológico, visa a eliminação de células mutadas que levam ao crescimento descontrolado das células tumorais e a progressão da doença e, a necrose, que representa a morte celular acidental, que causa perda da integridade da membrana e inflamação tecidual (OUYANG, 2012; DASGUPTA, 2017).

Antes dos ensaios para avaliação de morte celular, a linhagem de células não tumorais NIH/3T3 foi usada para avaliar a seletividade da combinação do mesilato de imatinibe com o ácido betulínico pelas células tumorais resistentes, K562-Lucena. Este teste mostrou que a combinação não apresentou citototoxicidade para as células não tumorais, demonstrando dessa forma, seletividade para a linhagem leucêmica.

Para avaliação da morte celular, primeiramente foi investigado o potencial das substâncias teste em desencadear a apoptose ou necrose, por meio das alterações da membrana mitocondrial, pelo ensaio de dupla coloração de anexina V/PI.

Os dados mostram que as substâncias testadas não induziram necrose. Entretanto, houve um aumento significativo na porcentagem de células apoptóticas após tratamento de 24h com o mesilato de imatinibe isoladamente e em combinação com o ácido betulínico. Esses achados indicam que o mesilato de imatinibe isoladamente ou em combinação, conseguiu inibir a proliferação celular pela indução de apoptose em células resistentes K562-Lucena. Esses resultados ratificam os achados de CAO e colaboradores (2014), que também demonstraram aumento na indução de apoptose em tratamento combinado com o mesilato de imatinibe em uma linhagem leucêmica resistente.

Para entender o mecanismo pelo qual a combinação do ácido betulínico com o mesilato de imatinibe induziu a apoptose, foi investigada a concentração de caspases 3/7. As caspases são enzimas que desempenham um papel central na regulação da apoptose, sendo as caspases 3/7 efetoras desse processo (RICCI; ZONG, 2006).

O tratamento de 24h das células K562-Lucena com o mesilato de imatinibe e o ácido betulínico, isoladamente ou em combinação demonstram que os agentes combinados induziram aumento significativo na atividade de caspase-3/7 após 24 horas de tratamento, quando comparados ao grupo não tratado e ao ácido betulínico isoladamente.

Os resultados achados neste estudo comprovam a atividade antiproliferativa e sinérgica da combinação do mesilato de imatinibe com o ácido betulínico, nas

linhagens leucêmicas K562 e K562-Lucena, assim como o efeito apoptótico na linhagem resistente, corroborando com KUTKOWSKA, STRZADALA e RPAK (2017) que também descreveram esses mesmos efeitos ao combinarem o ácido betulínico com o sorafenibe em células de câncer de pulmão.

Nossos dados reforçam a importância da interação dos produtos naturais com agentes antitumorais, e chama a atenção para o potencial quimioterápico de terpenos ao apresentarem atividade também na linhagem resistente. Neste contexto, este estudo mostrou que a combinação do ácido betulínico com o mesilato de imatinibe foi eficaz, ao apresentar propriedades antiproliferativa e sinérgica potentes contra células de LMC. Isto pode fornecer uma melhor estratégia de tratamento combinado e reduzir o perfil de citotoxicidade, sugerindo a possibilidade de reduzir a dose e melhorar os protocolos já utilizados e, portanto, pode ser benéfico para os pacientes.

## 7 CONCLUSÕES

Os dados obtidos neste trabalho permitem concluir que:

**OBJETIVO 1:** Avaliar a atividade antiproliferativa das substâncias isoladamente e em combinação nas linhagens K562 e K562-Lucena.

- Os ácidos betulínico e ursólico e a substância FAR2016018 apresentaram potencial citotóxico no ensaio de proliferação celular (MTT) após tratamento isolado nas linhagens leucêmicas K562 e K562-Lucena;
- A substância FAR2015056 não apresentou efeito citotóxico quando usada isoladamente;
- Os efeitos citotóxicos dos tratamentos combinados do mesilato de imatinibe com os ácidos betulínico e ursólico e a substância FAR2016018 foram potencializados na linhagem K562, assim como na linhagem resistente K562-Lucena, em comparação com os tratamentos administrados isoladamente.

**OBJETIVO 2:** Determinar o índice de combinação do tratamento conjunto dos produtos naturais com o mesilato de imatinibe.

- Foram calculados os índices de combinação, assim como os índices de redução de dose das combinações do mesilato de imatinibe com o ácido betulínico, ácido ursólico e FAR2016018, em ambas as linhagens.
- A substância FAR2015056 não gerou índice de combinação e índice de redução de dose.

**OBJETIVO 3:** Avaliar as combinações que apresentam sinergismo na linhagem resistente K562-Lucena.

- As combinações do mesilato de imatinibe com o ácido betulínico, ácido ursólico e FAR2016018 apresentaram efeito sinérgico na maior parte das concentrações testadas, em ambas as linhagens.

**OBJETIVO 4:** Avaliar a atividade da glicoproteína-P na linhagem celular K562-Lucena.

- As amostras FAR2015056 e FAR2016018 foram capazes de inibir a atividade da P-gp.

**OBJETIVO 5:** Avaliar o índice de seletividade da combinação do mesilato de imatinibe com o ácido betulínico em células não tumorais NIH/3T3.

- A combinação mesilato de imatinibe com o ácido betulínico não reduziu a proliferação celular das células não tumorais NIH/3T3.

**OBJETIVO 6:** Avaliar o mecanismo de indução de morte celular das combinações por meio da dupla coloração de anexina V / PI e da atividade das caspases 3/7.

- O tratamento isolado de células leucêmicas MDR, K562-Lucena, com o mesilato de imatinibe aumentou significativamente a quantidade de células em apoptose precoce;
- O tratamento combinado do mesilato de imatinibe com o ácido betulínico por 24h foi capaz de induzir a morte de células leucêmicas K562-Lucena por apoptose, apresentando aumento de células em fase de apoptose precoce e tardia;
- As substâncias testadas isoladamente ou em combinação não apresentaram significância no número de células necróticas;
- A combinação mesilato de imatinibe com o ácido betulínico elevou a quantidade de células apoptóticas, evidenciada pelo aumento da concentração de caspase 3 e 7 em células K562-Lucenas, após tratamento de 24h.

Ao analisar o conjunto de dados, observa-se que o ácido betulínico, quando associado ao mesilato de imatinibe, apresentou uma potenciação farmacológica ao reduzir a dose e apresentar forte efeito sinérgico, maior objetivo do uso de combinações.

É importante salientar que os resultados comprovam a hipótese de que a combinação do mesilato de imatinibe com produtos naturais apresenta sinergismo e possui viabilidade terapêutica.



## 8 REFERÊNCIAS

- ABDELHAMED, S. et al. Identification of plant extracts sensitizing breast cancer cells to TRAIL, **Oncology Reports**, v. 29, n. 5, p. 1991-1998, 2013. doi: 10.3892/or.2013.2293. Epub 2013 Feb 19.
- ABDEL-AZIZ, A. K. et al. Modulation of imatinib cytotoxicity by selenite in HCT116 colorectal cancer cells. **Basic & Clinical Pharmacology & Toxicology**, v. 116, n. 1, p. 37-46, 2015.  
<https://onlinelibrary.wiley.com/doi/full/10.1111/bcpt.12281>
- ALTMANN, K.; GERTSCH, J. Anticancer drugs from nature—natural products as a unique source of new microtubule-stabilizing agents. **Natural Product Reports**, v. 24, n. 2, p. 327-357, 2007.
- APPERLEY, J. F. Part I: mechanisms of resistance to imatinib in chronic myeloid leukaemia. **The Lancet Oncology**, v. 8, n. 11, p. 1018-1029, 2007.
- ASHKENAZI, A. Directing cancer cells to self-destruct with proapoptotic receptor agonists. **Nature Reviews Drug Discovery**, v. 7, p. 1001-1012, 2008.
- ATANASOV, A. G. et al. Discovery and resupply of pharmacologically active plant-derived natural products: a review. **Biotechnology Advances**, v. 33, n. 8, p. 1582-1614, 2015.
- BACCARANI, M. et al. European LeukemiaNet recommendations for the management of chronic myeloid leukemia: 2013. **Blood**, v. 122, n. 6, p. 872-884, 2013.
- BANDYOPADHYAY, S. et al. Cholesterol esterification inhibition and imatinib treatment synergistically inhibit growth of BCR-ABL mutation-independent resistant chronic myelogenous leukemia. **PLoS One**, v. 12, n. 7, p. e0179558, 2017.
- BAO, F. et al. Comparison of FISH and quantitative RT-PCR for the diagnosis and follow-up of BCR-ABL-positive leukemias. **Molecular Diagnosis & Therapy**, v. 11, n. 4, p. 239-245, 2007.
- BENSON, J.R.; LIAU, S.S. Cancer genetics: a primer for surgeons. **The Surgical Clinics of North America**, v. 88, p. 681-704, 2008.
- BERGANTINI, A. P. F. et al. Leucemia mielóide crônica e o sistema Fas-FasL. **Revista Brasileira de Hematologia e Hemoterapia**, v. 27, n. 2, p. 120-5, 2005.
- BISHAYEE, A. e SETHI, G. Bioactive natural products in cancer prevention and therapy: Progress and promise. In: **Seminars in Cancer Biology**. Academic Press, p. 1-3, 2016.
- BIXBY, D.; TALPAZ, M. Mechanisms of resistance to tyrosine kinase inhibitors in chronic myeloid leukemia and recent therapeutic strategies to overcome resistance. **ASH Education Program Book**, v. 2009, n. 1, p. 461-476, 2009.

BORTOLHEIRO, T. C.; CHIATTONE, C. S. Leucemia Mielóide Crônica: história natural e classificação. **Revista Brasileira de Hematologia e Hemoterapia**, v. 30, n. 1, p. 3-7, 2008.

CANALLI, Y. M.; BOVE, C. P. Flora of Rio de Janeiro: Alismataceae. **Rodriguésia**, v. 68, n. 1, p. 17-28, 2017.

CAO, C. et al. A polymethoxyflavone from *Laggera pterodonta* induces apoptosis in imatinib-resistant K562R cells via activation of the intrinsic apoptosis pathway. **Cancer Cell International**, v. 14, n. 1, p. 137, 2014.

CAVNAR, Michael J. et al. Rectal Gastrointestinal Stromal Tumor (GIST) in the Era of Imatinib: Organ Preservation and Improved Oncologic Outcome. **Annals of Surgical Oncology**, v. 24, n. 13, p. 3972-3980, 2017.

CHEREDA B; MELO J. V. Natural course and biology of CML. **Annals of Hematology**, v. 94, Supl 2, p. S107–S121, 2015.

CHOU, T. C.; MARTIN, N. CompuSyn for drug combinations: PC software and user's guide: a computer program for quantitation of synergism and antagonism in drug combinations, and the determination of IC50 and ED50 and LD50 values. **ComboSyn, Paramus, NJ**, 2005.

CHOU, T. C.; TALALAY, P. Quantitative analysis of dose-effect relationships: the combined effects of multiple drugs or enzyme inhibitors. **Advances in Enzyme Regulation**, v. 22, p. 27-55, 1984.

CHOU, T. Drug combination studies and their synergy quantification using the Chou-Talalay method. **Cancer Research**, v. 70, n. 2, p. 440-446, 2010.

COHEN M. H. et al. Approval Summary for Imatinib Mesylate Capsules in the Treatment of Chronic Myelogenous Leukemia, **Clinical Cancer Research**, v. 8, n. 5, p. 935-942, 2002.

CORTES, J. Natural history and staging of chronic myelogenous leukemia. **Hematology/Oncology Clinics of North America**, v. 18, n. 3, p. 569-584, 2004.

CRAGG, G. M.; PEZZUTO, J. M. Natural products as a vital source for the discovery of cancer chemotherapeutic and chemopreventive agents. **Medical Principles and Practice**, v. 25, n. Suppl. 2, p. 41-59, 2016.

CSUK, R. Betulinic acid and its derivatives: a patent review (2008–2013). **Expert Opinion on Therapeutic Patents**, v. 24, n. 8, p. 913-923, 2014.

DANCEY, J. E.; CHEN, H. X. Strategies for optimizing combinations of molecularly targeted anticancer agents. **Nature Reviews Drug Discovery**, v. 5, n. 8, p. 649-659, 2006.

DASGUPTA, A. et al. Cancer's Achilles' Heel: Apoptosis and Necroptosis to the Rescue. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 18, n. 1, p. 23, 2016.

DEININGER, M. W. N.; GOLDMAN, J. M.; MELO, J. V. The molecular biology of chronic myeloid leukemia. **Blood**, v. 96, n. 10, p. 3343-3356, 2000.

DIAMOND, J.M; MELO, J.V. Mechanism of resistance to BCR-ABL kinase inhibitors. **Leukemia & Lymphoma**, v. 52, n. S1, p. 12-22, 2011.

DIAMOND, J.; SILVA; M.G. Mechanism of resistance to BCR-ABL kinase inhibitors. **Acta Medica Portuguesa**, v. 26, n. 4, p. 402-408, 2013.

DOS SANTOS, L. R.; MORRONE, F. . Resultados do mesilato de imatinibe no tratamento da leucemia mielóide crônica: uma revisão bibliográfica. **Revista da Graduação**, v. 1, n. 1, 2014.

ERNST T; HOCHAUS A. Chronic myeloid leukemia: Clinical impact of BCR-ABL1 mutations and other lesions associated with disease progression. **Seminars in Oncology**, v. 39, n. 1, p. 58-66, 2012.

FADERL, S. et al. The biology of chronic myeloid leukemia. **New England Journal of Medicine**, v. 341, n. 3, p. 164-172, 1999.

FERNANDES, D. C. et al. Atividade antinociceptiva do óleo essencial de *Echinodorus macrophyllus* (Kunth) Micheli (Alismataceae). **Revista Fitos**, p. 245-251, 2012.

FORCE, T.; KRAUSE, D. S.; VAN ETEN, R. A. Molecular mechanisms of cardiotoxicity of tyrosine kinase inhibition. **Nature Reviews Cancer**, v. 7, n. 5, p. 332-344, 2007.

FRAZER, R.; IRVINE, A. E.; MCMULLIN, M. Chronic myeloid leukaemia in the 21st century. **The Ulster Medical Journal**, v. 76, n. 1, p. 8, 2007.

FRIZZO, M. N.; DICK, A. P.; TRACHYNSKI, J. O mesilato de imatinibe como tratamento para inibir a proliferação das células neoplásicas em pacientes com leucemia mieloide crônica. **Revista Contexto & Saúde**, v. 16, n. 30, p. 64-76, 2016.

FUCHS, Y.; STELLER, H. Live to die another way: modes of programmed cell death and the signals emanating from dying cells. **Nature reviews Molecular cell biology**, v. 16, n. 6, p. 329, 2015.

FULDA, S. Modulation of apoptosis by natural products for cancer therapy. **Planta Medica**, v. 76, n. 11, p. 1075-1079, 2010.

FUNKE, V. M. et al. Leucemia mielóide crônica e outras doenças mieloproliferativas crônicas. **Revista Brasileira de Hematologia e Hemoterapia**. São Paulo, v. 32, p. 71-90, Suplemento 1, 2010.

FUZER, A. M. et al. [10] Gingerol Reverts Malignant Phenotype of Breast Cancer Cells in 3D Culture. **Journal of Cellular Biochemistry**, 2017.

GALLUZZI, L. et al. Molecular mechanisms of cell death: recommendations of the Nomenclature Committee on Cell Death 2018. **Cell Death & Differentiation**, p. 1, 2018.

- GAMBACORTI-PASSERINI, C. B. et al. Molecular mechanisms of resistance to imatinib in Philadelphia-chromosome-positive leukaemias. **The Lancet Oncology**, v. 4, n. 2, p. 75-85, 2003.
- GOLDMAN, J. M. How I treat chronic myeloid leukemia in the imatinib era. **Blood**, v. 110, n. 8, p. 2828-2837, 2007.
- GONÇALVES, J. G. et al. Evolução histórica das políticas para o controle do câncer de mama no Brasil. **Diversitates International Journal**, v. 8, n. 1, 2016.
- GUAMAN-ORTIZ, L.M.; ORELLANA, M.I.R.; RATOVIČSKI, E.A. Natural compounds as modulators of non-apoptotic cell death in cancer cells. **Current Genomics**, v. 18, n. 2, p. 132-155, 2017.
- HANAHAN, D.; WEINBERG, R. A. Hallmarks of cancer: the next generation. **Cell**, v. 144, n. 5, p. 646-674, 2011.
- HARJES, U. Therapeutic resistance: Ironing it out. **Nature Reviews Cancer**, v. 17, n. 9, p. 510-510, 2017.
- HELMANN R.; SCHIFFER, C. A. BCR-ABL tyrosine kinase inhibitors for chronic myelogenous leukemia. **New England Journal of Medicine**, Boston, v. 357, p. 258-265, 2007.
- HEMAISWARYA, S.; DOBLE, M. Potential synergism of natural products in the treatment of cancer. **Phytotherapy Research**, v. 20, n. 4, p. 239-249, 2006.
- HOCHHAUS, A. et al. Long-term outcomes of imatinib treatment for chronic myeloid leukemia. **New England Journal of Medicine**, v. 376, n. 10, p. 917-927, 2017.
- HOSSEINI, A.; GHORBANI, A. Cancer therapy with phytochemicals: evidence from clinical studies. **Avicenna Journal of Phytomedicine**, v. 5, n. 2, p. 84, 2015.
- HU, Q. et al. Recent advances of cocktail chemotherapy by combination drug delivery systems. **Advanced Drug Delivery Reviews**, v. 98, p. 19-34, 2016.
- HUBER, P. C., MARUIAMA, C.H. e ALMEIDA, W.P. Glicoproteína-P, resistência a múltiplas drogas (MDR) e relação estrutura-atividade de moduladores. **Química Nova**, 2010.
- HUSSAIN. A. et al. Aloe vera inhibits proliferation of human breast and cervical cancer cells and acts synergistically with cisplatin. **Asian Pacific Journal of Cancer Prevention: APJCP**, v. 16, n. 7, p. 2939, 2015.
- ICHIM, G.; TAIT, S.W.G. A fate worse than death: apoptosis as an oncogenic process. **Nature Reviews Cancer**, v. 16, p. 539-548, 2016.
- ILLMER, T. et al. P-glycoprotein-mediated drug efflux is a resistance mechanism of chronic myelogenous leukemia cells to treatment with imatinib mesylate. **Leukemia**, v. 18, n. 3, p. 401, 2004.
- INSTITUTO NACIONAL DO CÂNCER (INCA), 2018. Estimativa 2018/2019 - Incidência de câncer no Brasil.

INSTITUTO NACIONAL DO CÂNCER (INCA) -  
 Condutas do INCA/MS. **Revista Brasileira de  
 Cancerologia**, v. 49, n. 1, p. 5-8, 2003. Disponível em:  
[http://www.inca.gov.br/rbc/n\\_49/v01/pdf/condutas.pdf](http://www.inca.gov.br/rbc/n_49/v01/pdf/condutas.pdf) >. Acesso em: 04/11/2017.

JABBOUR, E. et al. Frequency and clinical significance of BCR-ABL mutations in patients with chronic myeloid leukemia treated with imatinib mesylate. **Leukemia**. V. 20, n. 10, p. 1767-1773, 2006.

JABBOUR E. et al. Chronic myeloid leukemia: mechanisms of resistance and treatment, **Hematology/Oncology Clinics of North America**, v. 25, n. 5, p. 981-995, 2011.

JUDD, W. S. et al. Plant systematics: a phylogenetic approach. **Ecologia Mediterranea**, v. 25, n. 2, p. 215, 1999.

JULIANO, R. L. e LING, V. A surface glycoprotein modulating drug permeability in Chinese hamster ovary cell mutants. **Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Biomembranes**, v. 455, n. 1, p. 152-162, 1976.

KALIKS, R. A. et al. Diferenças no tratamento sistêmico do câncer no Brasil: meu SUS é diferente do teu SUS. **Brazilian Journal of Oncology**, v. 13, n. 44, p. 1-12, 2017.

KANG, H. C.; DAWSON, T. M.; DAWSON, V. L. Excitotoxic programmed cell death involves caspase-independent mechanisms. In: FUJIKAWA, D. G. Acute neuronal injury: The role of excitotoxic programmed cell death mechanisms. **Springer Science: North Hills**, CA. 1.ed., cap. 5, p. 79-89, 2010.

KANG, Z. et al. The Philadelphia chromosome in leukemogenesis. **Chinese journal of cancer**, v. 35, n. 1, p. 48, 2016.

KANTARJIAN H. et al. Hematologic and cytogenetic responses to imatinib mesylate in chronic myelogenous leukemia, **New England Journal of Medicine**, v. 346, n. 9, p. 645-652, 2002. Erratum in: **New England Journal of Medicine**. v. 346, p. 1923, 2002.

KATHAWALA, R. J. et al. The modulation of ABC transporter-mediated multidrug resistance in cancer: a review of the past decade. **Drug Resistance Updates**, v. 18, p. 1-17, 2015.

KERR, J.F.R; WYLLIE, A.H.; CURRIE, A. R. Apoptosis: a basic biological phenomenon with wide-ranging implications in tissue kinetics. **British journal of cancer**, v. 26, n. 4, p. 239, 1972.

KHOURY, Hanna J.; BIXBY, Dale L. Outcomes of chronic-phase chronic myeloid leukemia beyond first-line therapy. **Leukemia & lymphoma**, v. 56, n. 3, p. 568-576, 2015.

KIJJOA, A. e VIEIRA, L. M. M. Triterpenes from the plants of the Family Clusiaceae (Guttiferae): Chemistry and biological activities. *Natural Products: Chemistry, Biochemistry and Pharmacology* (Ed. G. Brahmachari), Alpha Science International Ltd., Oxford, 2009.

KIM, J. H. et al. Combined treatment of 3-hydroxyflavone and imatinib mesylate increases apoptotic cell death of imatinib mesylate-resistant leukemia cells. *Leukemia Research*, v. 36, n. 9, p. 1157-1164, 2012.

KIM E. G.; KIM K. M. Strategies and Advancement in Antibody-Drug Conjugate Optimization for Targeted Cancer Therapeutics, *Biomolecules & Therapeutics*, Seoul, v. 23, n. 6, p. 493-509, 2015.

KIM, M. S. et al. Development of exosome-encapsulated paclitaxel to overcome MDR in cancer cells. *Nanomedicine: Nanotechnology, Biology and Medicine*, v. 12, n. 3, p. 655-664, 2016.

KURAMATO, A. C. K. et al. Desenvolvimento de abordagens moleculares para o estudo da transformação maligna por BCR-ABL: da genômica a novos quimioterápicos. In: **1º Prêmio Saúde Oncologia da América Latina**, São Paulo. abr./mai. 2006.

KUTKOWSKA, J.; STRZADALA, L.; RPAK, A. Synergistic activity of sorafenib and betulinic acid against clonogenic activity of non-small cell lung cancer cells. *Cancer Science*, v. 108, n. 11, p. 2265-2272, 2017.

LASZCZYK, M. N. Pentacyclic triterpenes of the lupane, oleanane and ursane group as tools in cancer therapy. *Planta Medica*, v. 75, n. 15, p. 1549-1560, 2009.

LESGARDS J.F. et al. Anticancer activities of essential oils constituents and synergy with conventional therapies: a review, *Phytotherapy Research*, v. 28, n. 10, p. 1423-1446, 2014.

LEVEILLE-WEBSTER, C. R.; ARIAS, I. M. The biology of the P-glycoproteins. *The Journal of Membrane Biology*, v. 143, n. 2, p. 89-102, 1995.

LEE, H. J. et al. Philadelphia chromosome-positive acute lymphoblastic leukemia. *Cancer*, v. 117, n. 8, p. 1583-1594, 2011.

LIBY, K. T.; YORE, M. M.; SPORN, M. B. Triterpenoides and rexinoids as multifunctional agents for the prevention and treatment of cancer. *Nature Reviews Cancer*, v. 7, p.357-369, 2007.

LI, Jie; GUO, Wei-Jian; YANG, Qing-Yao. Effects of ursolic acid and oleanolic acid on human colon carcinoma cell line HCT15. *World Journal of Gastroenterology*, v. 8, n. 3, p. 493, 2002.

LIU, Jie. Oleanolic acid and ursolic acid: research perspectives. *Journal of ethnopharmacology*, v. 100, n. 1-2, p. 92-94, 2005.

LIN, Z.; JIANG, J.; LIU, X.S. Ursolic acid-mediated apoptosis of K562 cells involves Stat5/Akt pathway inhibition through the induction of Gfi-1. **Nature Scientific Reports**, 2016.

LIU, J. Pharmacology of oleanolic acid and ursolic acid. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 49, n. 2, p. 57-68, 1995.

LOPES, N. R.; ABREU, M. T. Inibidores de tirosino quinase na leucemia mielóide crônica. **Revista Brasileira de Hematologia e Hemoterapia**, v. 31, n. 6, p. 449-53, 2009.

LUO, J.; SOLIMINI, N. L.; ELLEDGE, S. J. Principles of cancer therapy: oncogene and non-oncogene addiction. **Cell**, v. 136, p. 823- 837, 2009.

MAIA, R. C. et al. Heparin reverses Rhodamine 123 extrusion by multidrug resistant cells. **Cancer Letters**, v. 106, n. 1, p. 101-108, 1996.

MAIA, R.C. et al. LQB-118, a pterocarpanquinone structurally related to lapachol [2-hydroxy-3-(3-methyl-2-butenyl)-1, 4-naphthoquinone]: a novel class of agent with high apoptotic effect in chronic myeloid leukemia cells. **Investigational New Drugs**, v. 29, n. 6, p. 1143-1155, 2011.

MARQUES, A. M. et al. *Echinodorus grandiflorus*: Ethnobotanical, phytochemical and pharmacological overview of a medicinal plant used in Brazil. **Food and Chemical Toxicology**, 2017.

MELO, J. V.; CHUAH, C. Resistance to imatinib mesylate in chronic myeloid leukaemia. **Cancer Letters**, v. 249, n. 2, p. 121-132, 2007.

MOGHADDAM, M. G.; AHMAD, F. B. H.; SAMZADEH-KERMANI, A. Biological activity of betulinic acid: a review. **Pharmacology & Pharmacy**, v. 3, n. 02, p. 119, 2012.

MOREIRA, A. D. R. e BOVE, C. P. Flóra do Parque Nacional da Restinga de Jurubatiba. **Arquivos do Museu Nacional**, v. 68, n. 3-4, p. 163-165, 2010.

MOREIRA, M. A. M. et al. Changes in gene expression profile in two multidrug resistant cell lines derived from a same drug sensitive cell line. **Leukemia Research**, v. 38, n. 8, p. 983-987, 2014.

MOROTTI, A. et al. Valproate enhances imatinib-induced growth arrest and apoptosis in chronic myeloid leukemia cells. **Cancer**, v. 106, n. 5, p. 1188-1196, 2006.

MOSMANN, T. Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: application to proliferation and cytotoxicity assays. **Journal of Immunological Methods**, v. 65, n. 1-2, p. 55-63, 1983.

MUNDHENKE, C. et al. Novel treatment of ovarian cancer cell lines with Imatinib mesylate combined with Paclitaxel and Carboplatin leads to receptor-mediated antiproliferative effects. **Journal of Cancer Research and Clinical Oncology**, v. 134, n. 12, p. 1397, 2008.

NESTAL DE MORAES G, et al. The Interface between BCR-ABL-Dependent and Independent Resistance Signaling Pathways in Chronic Myeloid Leukemia. **Leukemia Research and Treatment**, artigo ID 671702, 19 páginas, 2012.

NEVIANI, P. et al. FTY720, a new alternative for treating blast crisis chronic myelogenous leukemia and Philadelphia chromosome–positive acute lymphocytic leukemia. **The Journal of Clinical Investigation**, v. 117, n. 9, p. 2408, 2007.

NEWMAN, D. J.; CRAGG, G. M. Natural products as sources of new drugs from 1981 to 2014. **Journal of Natural Products**, v. 79, n. 3, p. 629-661, 2016.

NOWELL, P. C.; HUNGERFORD, D. A. Chromosome studies on normal and leukemic human leukocytes. **Journal of the National Cancer Institute**, v. 25, n. 1, p. 85-109, 1960.

NOVOTNÝ, L.; VACHALKOVA, A.; BIGGS, D. Ursolic acid: an anti-tumorigenic and chemopreventive activity. Minireview. **Neoplasma**, v. 48, n. 4, p. 241, 2001.

ODENIKE, O. et al. Gene mutations, epigenetic dysregulation, and personalized therapy in myeloid neoplasia: are we there yet? **Seminars in Oncology**, v. 38, n. 2, p. 196-214, 2011.

OHANIAN, M. et al. Tyrosine kinase inhibitors in acute and chronic leukemias, **Expert Opinion on Pharmacotherapy**, v. 13, n. 7, p. 927-938, 2012.

ORGANIZAÇÃO MUNDIAL DA SAÚDE (OMS), Câncer. Disponível em: Acesso em: outubro de 2017.

OUYANG, L. et al. Programmed cell death pathways in cancer: a review of apoptosis, autophagy and programmed necrosis. **Cell Proliferation**, v. 45, n. 6, p. 487-498, 2012.

OZBEN, T. Mechanisms and strategies to overcome multiple drug resistance in cancer. **FEBS Letters**, v. 580, n. 12, p. 2903-2909, 2006.

PANSARIN, E.R.; AMARAL, M.C.E. Alismataceae. Flora Fanerogâmica do Estado de São Paulo. **São Paulo: Rima**. v.4, p.1-10, 2005.

PARRISH, A. B.; FREEL, C. D.; KORNBLUTH, S. Cellular mechanisms controlling caspase activation and function. **Cold Spring Harbor Perspectives in Biology**, v. 5, n. 6, p. a008672, 2013.

PETRONELLI, A.; PANNITTERI, G.; TESTA, U. Triterpenoids as new promising anticancer drugs. **Anti-Cancer Drugs**, v. 20, n. 10, p. 880-892, 2009.



PIMENTEL, V. et al. Biodiversidade brasileira como fonte da inovação farmacêutica: uma nova esperança? **Revista do BNDES**, v.43, p. 41-89, 2015.

PORTARIA SAS/MS 431 ANVISA de 03/10/2001 – Protocolo Clínico e Diretrizes Terapêuticas para o tratamento da Leucemia Mielóide Crônica do Adulto

QUINTÁS-CARDAMA, A.; KANTARJIAN, H. M e CORTES, J. E.. Mechanisms of primary and secondary resistance to imatinib in chronic myeloid leukemia. **Cancer control: journal of the Moffitt Cancer Center**, v. 16, n. 2, p. 122, 2009.

RICCI, M. Stacey; ZONG, Wei-Xing. Chemotherapeutic approaches for targeting cell death pathways. **The oncologist**, v. 11, n. 4, p. 342-357, 2006.

ROSKOSKI R., JR. A historical overview of protein kinases and their targeted small molecule inhibitors, **Pharmacological Research**, v. 100, p. 1-23, 2015.

ROWLEY, J. D. A new consistent chromosomal abnormality in chronic myelogenous leukaemia identified by quinacrine fluorescence and Giemsa staining. **Nature**, v. 243, n. 5405, p. 290, 1973.

RUMJANEK, V.M.et al. Multidrug resistance in tumour cells: characterization of the multidrug resistant cell line K562-Lucena1. **Anais da Academia Brasileira de Ciências**, v. 73, n. 1, p. 57-69, 2001.

RUMJANEK, V. M.; VIDAL, R. S.; MAIA, R. C. Multidrug resistance in chronic myeloid leukaemia: how much can we learn from MDR–CML cell lines? **Bioscience Reports**, v. 33, n. 6, p. e00081, 2013.

SAFARZADEH, E.; SHOTORBANI, S. S.; BARADARAN, B. Herbal medicine as inducers of apoptosis in cancer treatment. **Advanced Pharmaceutical Bulletin**, v. 4, n. Suppl 1, p. 421, 2014.

SAITO, Y. et al. HSP90 inhibitor has a possibility to overcome imatinib resistance in gastrointestinal stromal tumors. **Cancer Research**, v. 77, n. 13 Supplement, 1330, 2017.

SAWYERS, C. L. Chronic myeloid leukemia. **New England Journal of Medicine**, v. 340, n. 17, p. 1330-1340, 1999.

SETZER, W. N.; SETZER, M. C. Plant-derived triterpenoids as potential antineoplastic agents. **Mini Reviews in Medicinal Chemistry**, v. 3, n. 6, p. 540-556, 2003.

SHAH, N. P. et al. Overriding imatinib resistance with a novel ABL kinase inhibitor. **Science**, v. 305, n. 5682, p. 399-401, 2004.

SHAROM, F. J. The P-glycoprotein multidrug transporter. **Assays in Biochemistry**, v. 50, p. 161-178, 2011.

- SHEN, T. et al. Imatinib and nilotinib reverse multidrug resistance in cancer cells by inhibiting the efflux activity of the MRP7 (ABCC10). **PLoS One**, v. 4, n. 10, p. e7520, 2009.
- SMITH, M. L.; HILLS, R.K.; GRIMWADE, D. Independent prognostic variables in acute myeloid leukaemia. **Blood reviews**, v. 25, n. 1, p. 39-51, 2011.
- STEWART, B. W. K. P., e WILD, C. P. **World Cancer Report 2014**. 2014
- SOSSELA, F. R.; ZOPPAS, B. C. A.; WEBER, L. P. Leucemia Mielóide Crônica: aspectos clínicos, diagnóstico e principais alterações observadas no hemograma. **Volume 49/Volume 49 Número 2/Number 2**, v. 49, n. 2, p. 127-30, 2017.
- SUFFNESS, M.; PEZZUTO, J. M. Methods in plant biochemistry: assays for bioactivity. **Methods in Plant Biochemistry: Assays for Bioactivity**, 1990.
- TALPAZ, M. et al. Imatinib induces durable hematologic and cytogenetic responses in patients with accelerated phase chronic myeloid leukemia: results of a phase 2 study. **Blood**, v. 99, n. 6, p. 1928-1937, 2002.
- TAUCHI T.; OHYASHIKI K. Molecular mechanisms of resistance of leukemia to imatinib mesylate, **Leukemia Research**, v. 28, Suppl 1, p. 39-45, Review, 2004.
- TEFFERI, A.; VARDIMAN, J. W. Classification and diagnosis of myeloproliferative neoplasms: the 2008 World Health Organization criteria and point-of-care diagnostic algorithms, **Leukemia**, v. 22, n. 1, p. 14-22, 2008.
- THOMAS, J. et al. Active transport of imatinib into and out of cells: implications for drug resistance. **Blood**, v. 104, n. 12, p. 3739-3745, 2004.
- TOWER, J. Programmed cell death in aging. **Ageing Research Reviews**, v. 23, p. 90-100, 2015.
- TRELA, E.; GLOWACKI, S.; BŁASIAK, J. Therapy of chronic myeloid leukemia: twilight of the imatinib era? **International Scholarly Research Notices Oncology**, v. 2014, 2014.
- TRUMBULL, E. R. et al. Tumor inhibitory agents from *Vauquelinia corymbosa* (Rosaceae). **Journal of pharmaceutical sciences**, v. 65, n. 9, p. 1407-1408, 1976.
- VAIDYA, S.; GHOSH, K.; VUNDINTI, B. R. Recent developments in drug resistance mechanism in chronic myeloid leukemia: a review. **European Journal of Haematology**, v. 87, n. 5, p. 381-393, 2011.
- WANG, T. et al. Combination of arsenic trioxide and Dasatinib: a new strategy to treat Philadelphia chromosome-positive acute lymphoblastic leukaemia. **Journal of Cellular and Molecular Medicine**, v. 22, n. 3, p. 1614-1626, 2018.
- WATERS W. F. Globalization, socioeconomic restructuring, and community health. **Journal of Community Health**, v. 2, n. 26, p. 79-92, 2001.

WEI, Y.; TO, K. K. W.; AU-YEUNG, S. C. F. Synergistic cytotoxicity from combination of imatinib and platinum-based anticancer drugs specifically in Bcr-Abl positive leukemia cells. **Journal of Pharmacological Sciences**, v. 129, n. 4, p. 210-215, 2015.

World Health Organization. **Cancer**. 2018. [Internet] Disponível em: <<http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs297/en/>>. Acesso em 15.abril. 2018.

WONG, R. S. Apoptosis in cancer: from pathogenesis to treatment. **Journal of Experimental & Clinical Cancer Research**, v. 30, n. 1, p. 87, 2011.

YI, W.; WETZSTEIN, H. Y. Anti-tumorigenic activity of five culinary and medicinal herbs grown under greenhouse conditions and their combination effects. **Journal of the Science of Food and Agriculture**, v. 91, n. 10, p. 1849-1854, 2011.

YOGEESWARI, P.; SRIRAM, D. Betulinic acid and its derivatives: a review on their biological properties. **Current Medicinal Chemistry**, v. 12, n. 6, p. 657-666, 2005.

ZAHARIEVA, M. M. et al. Modern Therapy of Chronic Myeloid Leukemia. In: **Leukemia**. InTech, 2013.

ZHANG, N.; FU, J.; CHOU, T. Synergistic combination of microtubule targeting anticancer fludelsonone with cytoprotective panaxytriol derived from panax ginseng against MX-1 cells in vitro: experimental design and data analysis using the combination index method. **American Journal of Cancer Research**, v. 6, n. 1, p. 97, 2016.

ZHANG, L.i et al. Synergistic anti-tumor activity and mechanisms of total glycosides from Cimicifuga dahurica in combination with cisplatin. **Chinese Journal of Integrative Medicine**, p. 1-9, 2016.

ZHOU J. et al. Research progress on synergistic anti-tumor mechanisms of compounds in traditional Chinese medicine, **Journal of Traditional Chinese Medicine**, v. 34, n. 1, p. 100-105, 2014.

ZUCCALA, E. Chemotherapy: Clocking up resistance. **Nature Reviews Cancer**, v. 16, n. 6, p. 343-343, 2016.