

UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL
INSTITUTO DE CIÊNCIAS BÁSICAS DA SAÚDE
DEPARTAMENTO DE BIOQUÍMICA PROF. TUISKON DICK
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS BIOLÓGICAS: BIOQUÍMICA

ATIVIDADE ANTI-TUMORAL DO COMPOSTO LaSOM 65, DERIVADO DO
MONASTROL, EM LINHAGENS DE GLIOMAS

CRISTIANE DOS SANTOS STUEPP

Porto Alegre, Outubro de 2011

UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL
INSTITUTO DE CIÊNCIAS BÁSICAS DA SAÚDE
DEPARTAMENTO DE BIOQUÍMICA PROF. TUISKON DICK
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS BIOLÓGICAS: BIOQUÍMICA

ATIVIDADE ANTI-TUMORAL DO COMPOSTO LaSOM 65 EM GLIOMAS

CRISTIANE DOS SANTOS STUEPP

Orientadora: Dra. Ana Maria de Oliveira Battastini

Dissertação de Mestrado apresentada como
requisito parcial para a obtenção do título de
Mestre.

Porto Alegre, Outubro de 2011

*Aos meus pais,
Cláudio e Fátima*

"Não desista, vá em frente. Sempre há uma chance de você tropeçar em algo maravilhoso. Nunca ouvi falar de ninguém que tivesse tropeçado em algo enquanto estava sentado."

Caio F. Abreu

AGRADECIMENTOS

A Deus, meu criador e mantenedor, por proporcionar a conclusão de mais um dos nossos sonhos.

Ao PPGCB – Bioquímica, pela oportunidade de usufruir dos recursos materiais e humanos para o desenvolvimento deste trabalho.

Ao CNPq, FAPERGS, PROPESQ/UFRGS, pelo apoio financeiro fundamental.

A professora Ana, minha orientadora, por ter aceitado me orientar mesmo sem me conhecer. Pelo crescimento científico proporcionado, pela compreensão oferecida quando precisei, pela amizade e pelo exemplo.

A professora Vera e o grupo do LaSOM, por confiarem a mim o estudo deste novo composto e por estarem sempre dispostos a contribuir com o projeto.

A Andressa e a Elizandra, por se fazerem presentes e compartilharem o conhecimento de todas as técnicas que não me eram conhecidas. Pela amizade e dedicação.

A Fran e ao Fabrício, meus dois bolsistas queridos: absolutamente NADA disso seria possível sem a ajuda de vocês! Muito obrigada por todos os “galhos quebrados”, pela companhia, pela disposição e pela amizade! Eu já sinto muita saudade de vocês!

Aos queridos amigos do Laboratório 22: Lila, Fabrícia, Angel, Leti, Beli, Rafa, Fer, Elisa, Leila, por trazerem alegria aos meus dias, pelo companheirismo, pela amizade e pela ajuda. Eu quero muitas feijoadas a mais com vocês!

Aos colegas e amigos distribuídos pelo departamento de Bioquímica, especialmente os laboratórios 21, 23 e 24, aos quais sou muito grata pela amizade e ajuda!

Aos queridos amigos da Parasito/PUC, Prof. Deca, Prof. Tiana, Bárbara, Fernanda, Carol, Anne, Julia, Jéssica e Patrícia, por terem me iniciado na caminhada científica, pelo incentivo, apoio e amizade!

Aos meus pais, Cláudio e Fátima, por sonharem comigo, por terem se empenhando na minha formação, pela dedicação e pelo amor incondicional.

As minhas irmãs, Lú e Ana, pela amizade e amor.

Ao meu filho, Davi, o amor da minha vida, por fazer a mamãe tão feliz. Por ser a minha inspiração para encarar qualquer dificuldade.

RESUMO

Os gliomas são os tumores primários mais comuns no sistema nervoso central. Apesar dos progressos recentes no tratamento do glioblastoma, a sobrevida média dos pacientes ainda permanece em 15 meses. A cinesina KSP tem sido relatada como um alvo interessante para terapia do câncer. Seguidos pelo primeiro inibidor específico da KSP, monastrol, vários outros análogos estruturais também têm sido estudados. Aqui nós descrevemos o efeito do LaSOM 65, um composto derivado do monastrol, em gliomas. LaSOM 65 foi capaz de diminuir o crescimento celular e a viabilidade das células gliomas, mas, em contraste com monastrol, a molécula não causou bloqueio no ciclo celular em G2/M. Análises por citometria de fluxo mostraram que o LaSOM 65 leva as células à necrose e "apoptose tardia", após 24h e 48h de tratamento. Nós também investigamos o efeito do LaSOM 65 sobre a atividade da ecto-5'NT, uma enzima cuja expressão está associada com nível de invasão neovascularização e metástase dos tumores. O tratamento não alterou a atividade da enzima em comparação com as células controle. Experimentos *in vivo* mostraram que LaSOM 65 não foi capaz de diminuir o tamanho do tumor em modelo de gliomas de rato. Mais estudos são necessários para compreender os mecanismos pelos quais LaSOM 65 exerce seus efeitos citotóxicos.

ABSTRACT

Gliomas are the most common primary cancer in the central nervous system. Despite recent progress in the treatment of glioblastoma, the median survival of the patients still remains at 15 months. Kinesin Spindle Protein (KSP) has been reported as an interesting target for cancer therapy. Followed by the first specific KSP inhibitor, Monastrol, several other structural analogues have also been studied. Here we describe the effect of LaSOM 65, a monastrol derived compound, against glioma. LaSOM 65 was able to decrease cell growth and cell viability of gliomas cells, but, in contrast with monastrol, the molecule did not cause blockage in the cell cycle on G2/M phase. Analysis by flow cytometry showed that LaSOM 65 leads cells to necrosis and “late apoptosis” after 24h and 48h of treatment. We also investigate the effect of LaSOM 65 on ecto-5'NT activity, an enzyme whose expression level is associated with neovascularization, invasiveness and metastasis of tumors. The treatment did not alter the enzyme activity compared to control cells. Experiments *in vivo* shown that LaSOM 65 was not able to decrease the tumor size in rat gliomas model. More studies are necessary to understand the mechanisms by which LaSOM 65 is exerting its cytotoxic effects.

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO.....	1
1.1 Gliomas.....	1
1.1.1 Origem e classificação.....	1
1.1.2 Glioblastoma Multiforme.....	2
1.1.3 Tratamento.....	2
1.2. Mitose e Terapia para o câncer.....	3
1.2.1 Cinesinas Mitóticas.....	4
1.2.2 Cinesina Eg5 / KSP.....	5
1.2.3 Inibidores da cinesina Eg5.....	6
1.2.4 LaSOM 65.....	8
1.2.4.1 Estrutura química do LaSOM 65.....	8
1.2.4.2 Atividade antifúngica do LaSOM 65.....	8
1.2.4.3 Estudos farmacocinéticos do LaSOM 65.....	9
1.2.4.4 Atividade antitumoral do LaSOM 65.....	11
1.3. Sistema Purinérgico.....	11
1.3.1 Purinoreceptores.....	12
1.3.2 Ectonucleotidases.....	12
1.3.3 Ecto-5'-nucleotidase (ecto-5'NT).....	13
2. OBJETIVOS.....	15
3. RESULTADOS	
3.1 ANTITUMOR ACTIVITY OF LASOM 65, A MONASTROL DERIVATED COMPOUND, AGAINST GLIOMAS CELL LINES IN CULTURE.....	16
3.2 AVALIAÇÃO DO EFEITO ANTI-TUMORAL DO COMPOSTO LASOM 65 EM MODELO <i>IN VIVO</i> DE GLIOMA.....	51
4. DISCUSSÃO GERAL.....	63
5. REFERÊNCIAS.....	70
6. ANEXO.....	79

LISTA DE FIGURAS

Fig. 1 Formação do <i>spindle</i> monopolar.....	5
Fig. 2 Estrutura química do monastrol e LaSOM 65.....	8

LISTA DE TABELAS

TABELA 1. **Parâmetros farmacocinéticos do LaSOM 65 na dose de 1mg/Kg via intravenosa.....9**

TABELA 2. **Parâmetros farmacocinéticos do LaSOM 65 nas doses de 30 e 90mg/Kg via intraperitoneal.....10**

LISTA DE ABREVIATURAS

A₁ – Adenosina 1

A_{2a} – Adenosina 2a

A_{2b} – Adenosina 2b

A₃ – Adenosina 3

ADP – Adenina difosfato

AMP - Adenosina monofosfato

ATP – Adenosina trifosfato

DNA – Ácido desoxiribonucleico

Ecto-5'-NT – Ecto-5'-nucleotidase

Eg5 – cinesina mitótica

E-NPP – Ectonucleotídeo pirofosfatase/fosfodiesterase

E-NTPDase – Ecto-nucleosídeo trifosfato difosfohidrolase

FAL – Fosfatase alcalina

G2/M – Growth 2/Mitose

GBM – Glioblastoma multiforme

KSP – Kinesin spindle protein

LaSOM – Laboratório de síntese orgânica e medicinal

MGMT – Gene metilguanina-DNA-metiltransferase

P1 – Receptor purinérgico para adenosina

P2 – Receptor purinérgico para nucleotídeos

P2X – Receptor purinérgico ionotrópico

P2Y – Receptor purinérgico metabotrópico

PI – Iodeto de propídeo

SNC – Sistema nervoso central

1. INTRODUÇÃO

1.1 Gliomas

1.1.1 Origem e Classificação

Os gliomas são os tumores primários mais comuns no sistema nervoso central (SNC). Eles são um grupo heterogêneo de tumores que apresentam características semelhantes à glia, e incluem tumores constituídos de células com características de astrócitos (astrocitomas), oligodendrócitos (oligodendrogliomas), células ependimais (ependimomas) e mistura de vários tipos de células gliais (oligoastrocitomas) (Kleihues and Cavenee, 2001).

Ainda existe controvérsia sobre a origem dos gliomas. A identificação de células tronco-neurais capazes de diferenciar-se em neurônios e astrócitos maduros sustém a hipótese de que estas células, juntamente com os progenitores gliais, estariam envolvidas na gênese dos gliomas. Uma mutação poderia ativar a sua capacidade de proliferação e migração e formar células pré-malignas em várias áreas do cérebro. Por outro lado, outra possível origem das células tumorais seria a dediferenciação de células maduras em resposta a mutações genéticas (Maher *et al.*, 2001). Os gliomas são classificados pela Organização Mundial da Saúde em quatro níveis de acordo com o grau de malignidade. Os gliomas de grau I e grau II (astrocitoma de baixo grau) são tumores de baixo grau de malignidade, porém, este último tende a infiltrar-se difusa e rapidamente no parênquima cerebral ao redor do tumor, tornando

difícil a sua remoção completa por ressecção cirúrgica. Os gliomas de grau III (astrocitoma anaplástico) e IV (glioblastoma multiforme) são altamente malignos, caracterizados por intensa proliferação (grau III) e presença de tecido necrótico e/ou atividade angiogênica (grau IV) (Maher *et al.*, 2001).

1.1.2 Glioblastoma Multiforme

O glioblastoma multiforme (GBM) é a forma mais maligna de glioma (grau IV) sendo a sobrevida média dos pacientes de menos de um ano. Os GBM podem ser classificados em dois subtipos: i) primário ou “de novo”, atingem pacientes de 62 anos em média, sem quaisquer evidências clínicas e histológicas anteriores; ii) secundário ou “progressivo”, são originados de um glioma de baixo grau e se desenvolvem em pacientes mais jovens, com 45 anos em média (Lim *et al.*, 2011).

Apesar desses dois subtipos de GBMs apresentarem perfis genéticos distintos, com diferentes frequências de mutações genéticas, há muitas semelhanças quanto às características biológicas e clínicas de ambos. Tanto glioblastomas primários quanto glioblastomas secundários apresentam a mesma média de sobrevida, taxas de proliferação e invasão equivalentes e ambos apresentam proliferação microvascular e necrose (Maher *et al.*, 2001).

1.1.3 Tratamento

A cirurgia representa o tratamento de primeira escolha para os pacientes com gliomas, entretanto, a ressecção completa do tumor é limitada pela alta

invasividade das células tumorais nos tecidos adjacentes, o que leva a uma expressiva taxa de recorrência devido à permanência de células remanescentes no local do tumor (Behim *et al.*, 2003). Após a cirurgia, a maioria dos pacientes é tratada com radio/quimioterapia, sendo a temozolamida (um agente alquilante de DNA) o principal quimioterápico utilizado. Foi relatado, no entanto, que pacientes que expressam o promotor metilado do gene MGMT, que codifica uma enzima de reparo do DNA, apresentam uma grande redução da eficácia da temozolamida (Weller *et al.*, 2010). Esta limitação associada aos efeitos tóxicos da temozolamida indica a necessidade do desenvolvimento de novos quimioterápicos com diferentes alvos de ação e que apresentem menor toxicidade.

1.2 Mitose e Terapia para o câncer

Dentre os princípios dos quimioterápicos utilizados no tratamento do câncer está o de perturbar o processo de mitose e impedir que as cromátides irmãs sejam separadas e distribuídas para as então emergentes células filhas. Para isso, a grande maioria dos fármacos têm os microtúbulos como alvo de ação.

Os microtúbulos são constituídos de dímeros alfa/beta tubulina polimerizados que formam fibras que emergem dos pólos da célula em divisão e se ligam ao centrossomo dos cromossomos condensados, formando o “*spindle*” mitótico. Alcalóides da vinca promovem despolimerização dos microtúbulos e os taxanos estabilizam-nos e inibem a função do “*spindle*” mitótico (Wilson and Jordan, 2004). Dessa forma, a célula permanece “presa”

na mitose, o que acarreta a morte celular. No entanto, os microtúbulos exercem outros papéis importantes em células que não estão em processo de divisão, tais como regulação da mobilidade e do transporte de organelas. Assim, por exercerem ações sistêmicas, esses fármacos interferem concomitantemente nestes processos, causando muitos efeitos colaterais. Além disso, os microtúbulos são requeridos para o transporte de proteínas e vesículas ao longo dos axônios, o que é a causa da neurotoxicidade observada em fármacos que os têm como alvo de ação (Huszar *et al.*, 2009). Frente a essa situação, faz-se necessário que novos fármacos com potencial antimitótico, e com diferentes alvos de ação, sejam desenvolvidos para o tratamento do câncer.

1.2.1 Cinesinas Mitóticas

Nos últimos anos, cinesinas mitóticas destacaram-se como interessantes alvos para drogas antimitóticas. As cinesinas são um grupo de proteínas motoras que transformam a energia química liberada da hidrólise da adenosina trifosfato (ATP) em energia mecânica para movimentar-se em direção a extremidade positiva dos microtúbulos. Elas exercem diversas funções na célula, tais como o transporte de vesículas, organelas, cromossomos e complexos protéicos, bem como o controle do movimento dos microtúbulos (Miki *et al.*, 2005). Cerca de 623 cinesinas foram identificadas e classificadas em diferentes famílias de acordo com a função que exercem. Dentre as 45 cinesinas humanas, pelo menos 12 mostraram-se importantes em várias

etapas da mitose, tais como formação do *spindle* bipolar, alinhamento e segregação dos cromossomos e citocinese (Zhu *et al.*, 2005).

1.2.2 Cinesina Eg5 / KSP

A Eg5 é uma proteína homotetramérica e apresenta dois domínios motores em cada extremidade. Uma vez ligados aos microtúbulos antiparalelos, os domínios motores hidrolisam ATP e a energia liberada é utilizada para o seu movimento, resultando no deslizamento dessas fibras em direções opostas (Kapitein *et al.*, 2005). Esse processo é essencial durante a mitose e garante que os cromossomos sejam adequadamente separados, formando o *spindle* bipolar. Quando a Eg5 é inibida, as células apresentam bloqueio da separação dos centrosomos, resultando em um *spindle* monoastral, cercado por cromossomos condensados (Fig. 1). A ausência da tensão produzida pela inibição da cinesina Eg5 impede que o processo mitótico ocorra e leva a célula à morte.

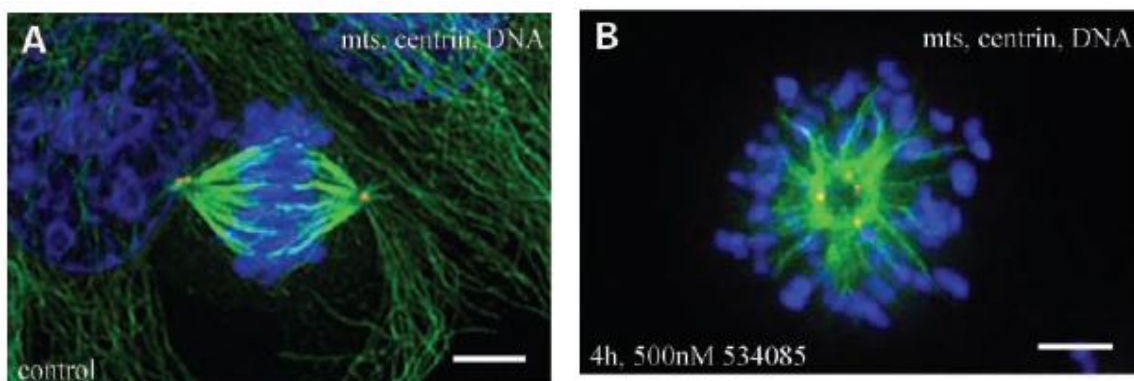


Figura 1. A) *spindle* bipolar. B) *spindle* monopolar (Orth *et al.*, 2008).

A Eg5 tem atraído muita atenção quanto ao seu potencial para o desenvolvimento de inibidores farmacológicos visando o tratamento do câncer. Além de ser extremamente importante para a divisão celular, ela está presente em uma variedade de tumores sólidos e leucemias, e é associada com alta taxa mitótica, indicando intensa proliferação celular (Carter *et al.*, 2006). Pouca ou nenhuma expressão dessa cinesina é detectada em tecidos adultos não proliferativos (LeGuellec *et al.*, 1991). Este fato a torna um alvo terapêutico ainda mais interessante, uma vez que seria possível inibi-la nas células tumorais (que apresentam elevado índice mitótico) sem que células não proliferativas sofram interferência.

1.2.3 Inibidores da cinesina Eg5

O Monastrol foi o primeiro inibidor específico da cinesina Eg5 a ser relatado (Mayer *et al.*, 1999). Foi demonstrado que ele é um inibidor alostérico que se liga em uma região próxima ao sítio catalítico da cinesina, induzindo uma mudança conformacional que impede a liberação do ADP do complexo ADP-Eg5. Dessa forma, o sítio catalítico da enzima mantém-se ocupado e impedido de hidrolisar uma nova molécula de ATP (Cochran *et al.*, 2005). Sem a hidrólise de ATP, a célula não tem energia para o movimento dos centrossomos em direção aos pólos e, dessa forma, o *spindle* bipolar não é formado. Estudos mostram que o monastrol bloqueia a formação do *spindle* bipolar causando uma parada no ciclo celular na fase G2/M e levando as células à apoptose (Chin and Herbst, 2006). É importante ressaltar que o

monastrol não afeta os microtúbulos na interfase nem a sua polimerização *in vitro* (Kapoor *et al.*, 2000). Foi demonstrado através de estudos *in silico*, utilizando “cross-validação” de dois *softwares*, que o monastrol, apesar de ter baixa lipofilia, é permeável à barreira hematoencefálica por ter baixo peso molecular e não apresentar cargas no pH fisiológico (Valensin *et al.*, 2009). Além disso, nenhum efeito neurotóxico foi relatado devido ao tratamento com o monastrol (Haque *et al.*, 2004).

A molécula do monastrol tem servido como base química para o desenho de novas drogas com potencial antimitótico. Por exemplo, a ciclização das suas cadeias laterais gerou derivados como o enastron, enastrol, dimetilenastron; a aromatização dessas cadeias formou o vasastrol (Sarli V *et al.*, 2005).

O ispinesib é a primeira molécula inibidora da Eg5 a ser utilizada em estudos clínicos de fase II. Resultados desses estudos indicam que o tratamento de tumores com ispinesib não acarreta neuro e gastrotoxicidade, sendo a neutropenia reversível a toxicidade mais comumente relatada. Em mulheres com câncer avançado de mama metastático, o tratamento com ispinesib foi capaz de reduzir o tamanho do tumor em 46% a 69% (Purcell *et al.*, 2010).

Desde então, muitos compostos inibidores da cinesina Eg5/KSP tem sido estudados. Sabe-se que mudanças conformacionais na estrutura química dessas moléculas podem torná-las mais potentes para o tratamento do câncer, bem como alterar padrões importantes de permeabilidade a barreira hematoencefálica, lipofilia e farmacocinética.

1.2.4 LaSOM 65

Uma diversidade de compostos derivados do monastrol foi sintetizada pelo Laboratório de Síntese Orgânica e Medicinal da Faculdade de Farmácia da UFRGS. Dentre essa coleção, o LaSOM 65 (5-etoxicarbonil-6-metil-4-(3-nitrofenil)-3,4-dihidropirimidina-2-(1H)-tione) mostrou-se promissor quanto a sua capacidade de inibir a proliferação e a viabilidade de células tumorais (Canto *et al.*, 2011). Por este motivo, decidiu-se estudar mais profundamente os efeitos desse composto sobre as linhagens de gliomas.

1.2.4.1 Estrutura química do LaSOM 65

O LaSOM 65 é um composto derivado do monastrol, sendo que a hidroxila original foi substituída pelo grupamento NO₂ (Fig. 2).

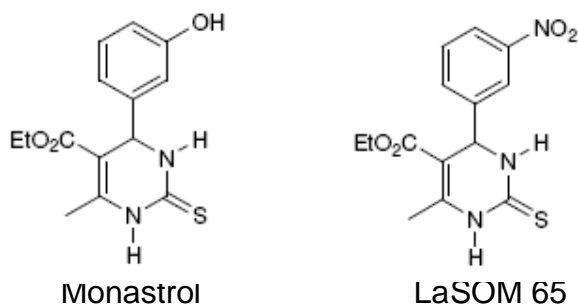


Figura 2. Estrutura química do monastrol e do LaSOM 65

1.2.4.2 Atividade antifúngica do LaSOM 65

A atividade antifúngica do LaSOM 65 foi verificada em culturas de *Botrytis cinérea* e *Colletotrichum glososporioides*, sendo que 1 mM desse composto

inibiu 19% e 30%, respectivamente, o crescimento das colônias em 72 h. Foi verificada também a atividade larvicida e ovicida em carrapatos da espécie *Rhipicephalus micropulus*. O LaSOM 65 não preveniu a eclosão dos ovos nem alterou a sobrevivência das larvas, possivelmente devido a sua incapacidade de atravessar a camada de actina polar que compõe o exoesqueleto deste ectoparasita (Canto, 2010).

1.2.4.3 Estudos Farmacocinéticos do LaSOM 65

O intuito de avaliar a atividade antitumoral *in vivo* do LaSOM 65 gerou a necessidade de estudar o seu perfil farmacocinético. Para isso, foram administradas as seguintes doses: 1 mg/Kg via intravenosa (Tabela 1) e 30 e 90 mg/Kg via intraperitoneal (Tabela 2).

Tabela 1 – Parâmetros farmacocinéticos do LaSOM 65 (1mg/kg - iv)

Parâmetros farmacocinéticos	Média ± DP
ke (h ⁻¹)	0,427 ± 0,103
t _{1/2} (h)	1,7 ± 0,4
ASCo-∞ (ng*h/mL)	1240 ± 187
CL (L/h/kg)	0,82 ± 0,12
Vd (L/kg)	1,76 ± 0,33
MRT (h)	2,2 0,4

TABELA 1. Parâmetros farmacocinéticos do LaSOM 65 na dose de 1mg/Kg via intravenosa (Torres e Dalla Costa). Ke: constante de eliminação, t_{1/2}: tempo de meia vida, ASCo-∞: área sob a curva do tempo zero ao tempo infinito, CL: clearance, Vd: volume de distribuição, MRT: tempo de residência médio.

Tabela 2 - Parâmetros farmacocinéticos do LaSOM 65 (30 e 90mg/kg - ip)

Parâmetros Farmacocinéticos	30 mg/kg (Média ± DP)	90 mg/kg (Média ± DP)
	(n = 7)	(n = 4)
Ke (h ⁻¹)	0,372 ± 0,090	0,281 ± 0,090
t _{1/2} (h)	2,0 ± 0,5	2,7 ± 1,0
ASCo-∞ (ng*h/mL)	26200 ± 7687	79020 ± 34,7*
CL (L/h/kg)	0,87 ± 0,27	0,90 ± 0,34
Vd (L/Kg)	2,64 ± 1,47	3,30 ± 1,00
Tmax (h)	1,7 ± 0,6	3,4 ± 0,8*
Cmax (ng/mL)	6177,0 ± 1477,9	13358,0 ± 4213,5*
Biodisponibilidade (%)	70,4	70,8

*diferença estatística ($\alpha = 0,05$)

TABELA 2. Parâmetros farmacocinéticos do LaSOM 65 nas doses de 30 e 90mg/Kg via intraperitonal (Torres e Dalla Costa). Ke: constante de eliminação, t_{1/2}: tempo de meia vida, ASCo-∞: área sob a curva do tempo zero ao tempo infinito, CL: clearance, Vd: volume de distribuição, Tmax: Tempo em que ocorre a concentração plasmática máxima, Cmax: concentração plasmática máxima.

Na dose de 1 mg/kg i.v., pode-se observar um curto tempo de meia-vida, seguido de alto *clearance* e uma boa distribuição tecidual. Nas duas doses administradas intraperitonalmente, não houve alterações na constante de velocidade de eliminação, tempo de meia-vida, volume de distribuição e *clearance* total. Houve aumento proporcional entre as doses e as áreas sob a curva, indicando farmacocinética linear na faixa de 30 a 90 mg/kg. A biodisponibilidade também foi constante para essa faixa de doses, indicando ausência de saturação.

1.2.4.4 Atividade antitumoral do LaSOM 65

Estudos *in vivo* mostraram que o LaSOM 65, na dose de 90 mg/kg i.p., foi capaz de reduzir 76% do crescimento do tumor sarcoma 180 em camundongos. Sabe-se que os animais com sarcoma 180 apresentam uma queda dos níveis de hemoglobina e um aumento dos leucócitos totais quando comparados aos animais saudáveis. O hemograma dos animais tratados com o LaSOM 65 revelou que esse composto não reverte os baixos níveis de hemoglobina, porém os leucócitos totais retornam aos níveis do controle saudável (Canto, 2010).

1.3 Sistema Purinérgico

O sistema purinérgico pode estar envolvido com o desenvolvimento tumoral de vários tipos de cânceres, incluindo os gliomas (White and Burnstock, 2006). Nucleotídeos e nucleosídeos extracelulares têm sido apontados como agentes tróficos de células gliais, participando de cascatas de regulação do crescimento e proliferação celular (Morrone *et al.*, 2003). Além de seu reconhecido papel no metabolismo intracelular, as purinas e pirimidinas no meio extracelular são moléculas sinalizadoras que interagem com diferentes receptores de superfície celular denominados purinoreceptores (Ralevic and Burnstock, 1998) e finalmente são degradados por várias ecto-enzimas

1.3.1 Purinoreceptores

Os purinoreceptores são divididos em P1 e P2. Os receptores de adenosina P1, ligados à proteína G, são subdivididos em A1, A2a, A2b e A3 (Fredholm et al., 2001). Os receptores P2 ligam nucleotídeos e são divididos em dois grupos: sete receptores P2X₁₋₇, ligados a canais iônicos; e oito receptores P2Y_{1, 2, 4, 6, 11-14}, acoplados à proteína-G (Dubyak, 1991; Abbracchio and Burnstock, 1994).

3.2 Ectonucleotidases

Os nucleosídeos-5'-trifosfatos são sequencialmente degradados aos seus respectivos nucleosídeos e fosfato inorgânico ou pirofosfato inorgânico através das ectonucleotidases.

As ectonucleotidases são enzimas localizadas na membrana plasmática das células, com o sítio catalítico voltado para o meio extracelular (Zimmermann, 1996). Os nucleosídeos 5'-tri e -difosfatados podem ser hidrolisados pelas E-NTPDase (ectonucleosídeo trifosfato difosfohidrolase), FAL (fosfatase alcalina) e E-NPP (ectonucleotídeo pirofosfatase/fosfodiesterase) (Zimmermann, 2001), formando seus respectivos nucleosídeos monofosfatados. Estes podem ser hidrolisados pela Ecto-5'-NT (ecto -5'-nucleotidase), pela FAL e por alguns membros das E-NPP (Battastini *et al.*, 1991, 1995, Zimmermann, 2001, Simon *et al.*, 2006, Knowles, 2011).

1.3.3 Ecto-5'-nucleotidase (ecto-5'NT)

A ecto-5'-NT/CD73, responsável pela hidrólise de nucleosídeos monofosfatados, especialmente o AMP, é altamente expressa na maioria dos tumores sólidos e seu nível de expressão está associado com a neovascularização, invasividade e metástases de tumores (Spychala, 2000). A ecto-5'-NT/CD73 apresenta várias funções não relacionadas com sua atividade enzimática, estando envolvida em interações célula-célula e célula-matriz extracelular, em eventos de migração e adesão celular (Vogel *et al.*, 1991), bem como nos mecanismos que induzem a resistência a drogas (Ujházy *et al.*, 1996).

Adicionalmente, ela tem sido relatada como proteína envolvida na motilidade celular (Ludwig *et al.*, 1999), molécula de adesão (Airas *et al.*, 1995), na proliferação e ativação de linfócitos e na adesão dos mesmos ao endotélio (Airas *et al.*, 1997). Recentemente foi mostrado que a ecto-5'-NT/CD73 é uma proteína reconhecidamente envolvida no processo proliferativo em células tumorais tornando-se uma forte candidata a marcador de agressividade (Spychala *et al.*, 2004) e progressão tumoral, além de ser um potencial alvo terapêutico (Zhou *et al.*, 2007).

Dados publicados pelo nosso laboratório apontam que alterações na via de sinalização purinérgica podem estar envolvidas na malignidade dos gliomas (Morrone *et al.*, 2003, 2005, 2006; Wink *et al.*, 2003). Em um outro estudo mostramos que modificações na atividade enzimática da ecto-5' nucleotidase/CD73 em diferentes estágios de confluência de linhagens de

glioblastoma em cultura podem estar correlacionadas com a proliferação celular desses tumores (Bavaresco *et al.*, 2008).

2. OBJETIVOS

Os Objetivos dessa dissertação foram:

2.1 Objetivos gerais:

1. Avaliar o efeito do composto LaSOM 65 sobre linhagens de glioma e células normais do sistema nervoso central, considerando seu potencial antiproliferativo e citotóxico.
2. Verificar o efeito do LaSOM 65 em modelo *in vivo* de gliomas.

2.2 Objetivos específicos:

1. Estudar o efeito do composto LaSOM 65 no ciclo celular bem como os possíveis tipos de morte celular que ele acarreta (necrose/apoptose) em linhagem de gliomas.
2. Estudar o mecanismo de ação dessa molécula, tal como a possível relação do seu efeito citotóxico com a atividade da enzima ecto-5'NT em linhagens de gliomas.

3. RESULTADOS

Os resultados desta dissertação foram organizados em dois artigos científicos. O primeiro, pronto para ser submetido a um periódico da área. O segundo artigo reúne na forma de manuscrito em preparação os demais dados obtidos neste trabalho de mestrado.

3.1 ANTITUMOR ACTIVITY OF LASOM 65, A MONASTROL DERIVATED COMPOUND, AGAINST GLIOMAS CELL LINES IN CULTURE.

Manuscrito a ser submetido ao periódico *Anti-Cancer Drugs*

ANTITUMOR ACTIVITY OF LASOM 65, A MONASTROL DERIVATED COMPOUND, AGAINST GLIOMAS CELL LINES IN CULTURE.

Cristiane S. Stuepp¹, Fabrício Figueiró¹, Franciane B. Mendes¹, Elizandra Braganhol¹, Andressa Bernardi¹, Rudimar Frozza¹, Christiane Salbego¹, Rômulo F. S. Canto², Dennis Russowsky³, Vera Lucia Eifler-Lima², Ana Maria O. Battastini^{1*}

¹Departamento de Bioquímica, ICBS, Universidade Federal do Rio Grande do Sul;

²Laboratório de Síntese Orgânica Medicinal/LaSOM, Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas, Universidade Federal do Rio Grande do Sul; ³Instituto de Química, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, RS, Brasil.

* Corresponding author: Dr. Ana M. O. Battastini

Departamento de Bioquímica – ICBS - UFRGS

Rua Ramiro Barcelos, 2600 – prédio anexo

CEP: 90035-003, Porto Alegre, RS, Brasil

FONE: +55 51 3308-5554

e-mail: abattastini@gmail.com

ABSTRACT

Gliomas are the most common primary cancer in the central nervous system. Despite recent progress in the treatment of glioblastoma, the median survival of the patients still remains at 15 months. Kinesin Spindle Protein (KSP) has been reported as an interesting target for cancer therapy. Followed by the first specific KSP inhibitor, Monastrol, several other structural analogues have also been studied. Here we describe the effect of LaSOM 65, a Monastrol derivated compound, against glioma cell lines. LaSOM 65 was able to decrease cell growth and cell viability of gliomas cells, but, in contrast with Monastrol, the molecule did not cause blockage in the cell cycle on G2/M phase. Analysis by flow cytometry shown that LaSOM 65 leads cells to necrosis and “late apoptosis” after 24h and 48h of treatment. We also investigated the effect of LaSOM 65 on ecto-5'NT activity, an enzyme highly expressed in most solid tumors whose expression level is associated with neovascularization, invasiveness and metastasis of tumors. The treatment did not alter the enzyme activity compared to control cells. More studies are necessary to understand the mechanisms by which LaSOM 65 is exerting its cytotoxic effects.

Key words: glioma, KSP inhibitors, ecto-5'-nucleotidase

1. Introduction

Gliomas are the most common primary cancer in the central nervous system (CNS), also being a heterogeneous group of tumors that demonstrates features similar to glia cells, with a high capacity of proliferation and invasion [1]. In this regard, gliomas are classified by the World Health Organization into four levels (I – IV) according to their degree of malignancy. In the fourth level, the glioblastoma multiform is considered the most aggressive and lethal form of glioma, which is sub-classified into primary (*de novo*) or secondary, originated from low grade glioma [2]. Despite recent progress in the treatment of glioblastoma, the median survival of the patients still remains at 15 months, and the majority of patients die within 2 years. The treatment consists of surgery followed by chemo/radiotherapy [3]; however, it is difficult to completely remove the tumor because of the invasive nature of the malignant gliomas throughout the brain.

Among the most effective cancer therapeutics currently in use are drugs that target tubulin and microtubules; while being essential for mitosis, these components of the cytoskeleton play a variety of physiological functions, such as mobility regulation and the transport of organelles. Thus, by acting systemically, the drugs interfere in these processes simultaneously, even in non-malignant cells, causing many side effects. Consequently, because microtubules play a main role in the transport of proteins and vesicles along axons, neurotoxicity has been observed in microtubule targeting drugs [4]. A significant effort is necessary to generate new antimitotics agents, with different targets, preventing tumor progression without causing toxicities in normal cells. After considering the above treatments, Kinesin Spindle Protein (KSP) has been reported as an interesting

target for cancer therapy. This motor protein transfers energy released by ATP hydrolysis into motile force to slide apart antiparallel microtubules. KSP is required early in mitosis to separate the centrosomes of the emerging spindle poles, thus driving establishment of a bipolar mitotic spindle [5]. Besides being extremely important for cell division, KSP is present in a variety of solid tumors and leukemias and is associated with a high mitotic rate, indicating intense proliferation [6]. Little or no expression of this kinesin is detected in non-proliferating cells [7]. Followed by the first specific KSP inhibitor discovered, monastrol [8], several other structural analogues have also been studied. The objective of the present study was to investigate the effect of LaSOM 65 (5-ethoxycarbonyl-6-methyl-4-(3-nitrophenyl)-3,4-dihydropyrimidin-2-(1H)-thione) a monastrol-derived compound against gliomas cell lines in culture.

Furthermore, the ecto-5'-NT/CD73, responsible for the hydrolysis of nucleotide monophosphates, especially AMP, is highly expressed in most solid tumors and its expression level is associated with neovascularization, invasiveness, and metastasis of tumors [9]. The ecto-5'-NT has several functions unrelated to its enzymatic activity, also being involved in cell-cell and cell-extracellular matrix interactions, in migration events and cell adhesion [10]. Recently, research has shown that ecto-5'-NT/CD73 is a protein known to be involved in tumor cell proliferation process in becoming a strong candidate marker for aggressiveness [11] and tumor progression, in addition to being a potential therapeutic target [12]. Alterations in the purinergic signaling pathway may be involved in malignancy of gliomas [13-17]. Considering these informations, our

second objective was to investigate the effect of LaSOM 65 in the enzymatic activity of the ecto-5'-NT by glioma cells.

2. Materials and Methods

2.1 Maintenance of cell lines

The glioma cells C6 (rat) and U138 (human) were obtained from American Type Culture Collection. The cells were maintained in Dulbecco's modified Eagle's medium (DMEM) containing 2,5 mg/mL Fungizone, 100 U/L garamicin and supplemented with 5% (C6) or 15% (U138) (v/v) fetal bovine serum (FBS). Cells were kept at 37°C, a minimum relative humidity of 95% and an atmosphere of 5% CO₂ in air.

2.2 Drug exposure

LaSOM 65 and Monastrol (Fig. 1) were easily synthesized employing the Biginelli reaction [18]. The compounds were dissolved in dimethylsulphoxide (DMSO). The gliomas cells were seeded according to each experiment and after reaching semi-confluence, the cultures were exposed for 24 or 48 h to 15, 30, 45, 75 and 100 µM LaSOM 65. Control cells were treated with 0.5% DMSO.

2.3 Cell counting

At the end of the treatment, the C6 and U138 cells were washed with phosphate buffered saline (PBS) and 200 µL of 0.25% trypsin/EDTA solution was

added to detach the cells, which were counted in a hemocytometer. The results were expressed as percentage of control.

2.4 Cell viability

The cell viability was measured by MTT method. At the end of the treatment, the medium was removed and cells were washed with phosphate buffered saline (PBS). After, 90 μ L DMEM and 10 μ L MTT were added to each of the wells. The cells were incubated for 3 h and the solution was then removed from the precipitate. A total of 100 μ L of DMSO were added to the wells and the absorbance was read in an ELISA plate reader at 490 nm.

2.5 Lactate dehydrogenase (LDH) activity

The degree of cellular death was evaluated by measuring the activity of lactate dehydrogenase (LDH, EC 1.1.1.27). Briefly, after 48 h treatment with LaSOM 65 the cell culture medium was collected and LDH activity was evaluated according to the procedure of Whitaker *et al* [19], by enzymatic colorimetric reaction. Absorption was measured at 490 nm.

2.6 Organotypic hippocampal slice cultures and quantification of cellular death

Organotypic hippocampal slice cultures were prepared according to Stoppini *et al* [20]. Briefly, 400- μ m-thick hippocampal slices were prepared from 6- to 8-day-old male Wistar rats using a McIlwain tissue chopper and separated in ice-cold Hank's balanced salt solution (HBSS) composed of 36 mM glucose, 1.26 mM

CaCl₂, 5.36 mM KCl, 136.89 mM NaCl, 0.44 mM KH₂PO₄, 0.34 mM Na₂HPO₄, 0.49 mM MgCl₂, 0.44 mM MgSO₄, 25 mM HEPES, 1% Fungizone and gentamicine 36 µl/100 ml; pH 7.2. The slices were placed on Millicell culture insert and the inserts were transferred to a 6-well culture plate. Each well contained 1 mL of tissue culture medium consisting of 50% minimum essential medium (MEM), 25% HBSS, 25% heat inactivated horse serum supplemented with 36 mM glucose, 25 mM HEPES, 4 mM NaHCO₃, 1% fungizone and gentamicine 36 µl/100 ml; pH 7.3. Organotypic cultures were maintained in a humidified incubator gasified with 5% CO₂ atmosphere at 37°C. The medium was changed every 3 days and experiments were carried out after 14 days in vitro when the cells received 30, 45, 75 and 100 µM LaSOM 65 and 100 µM Monastrol for 48h. Control cultures were performed with DMSO. After the treatment, 5 µM PI was added to the cultures and incubated for 2 h. Cultures were observed with an inverted microscope (Nikon Eclipse TE300) using a standard rhodamine filter set. Images were captured and then analyzed using Scion Image software. Cell death was assessed by fluorescent image analysis of propidium iodide (PI) uptake.

2.7 Immunofluorescence

C6 Glioma cells were left to adhere for at least 24 hours on coverslips in 24-well plates before addition of the treatment. Following incubation for 6 hours with 100 µM LaSOM 65 or 100 µM Monastrol, cells were washed with PBS, pH 7.4, fixed with 95% acetone and 5% formalin (10% paraformaldehyde- PBS) at 4°C, for 5 minutes. After two additional 5 minutes washes, fixed cells were incubated with blocking solution (7% goat serum, 0.2% Tween 20, PBS) for 1 h. After, cells were

incubated with anti-alpha-tubulin (ab52866) for 90 minutes, and with a FITC-conjugated goat anti-rabbit secondary antibody (Alexa 555) for 1 h. Cells were washed with PBS and incubated with DAPI, a nuclei marker. Images were collected using an olympus scanning confocal microscope.

2.8 Cell cycle analysis

The gliomas cells (C6) were seeded in 6-well plates and allowed to grown for 48 h. After reaching semi-confluence, glioma cells were treated with 45, 75 or 100 μM of LaSOM 65 for 24 and 48 h. At the end of the treatment, the medium was removed. Cells were washed with phosphate buffered saline (PBS) and 200 μl of 0.25% trypsin/EDTA solution was added to detach the cells. The trypsin was inactivated with the culture medium that was firstly removed. The mixture was centrifuged 1200 rpm for 10 minutes. Cells were resuspended in PBS and were counted. A quantity of $1 \cdot 10^6$ cells were fixed with 500 μL PBS and 4,5 mL ethanol 70%-PBS and maintained on freezer. At the day of analysis, cells were centrifuged, washed with PBS and incubated with propidium iodide and RNase for 30 minutes. The cells were analyzed using a FACScan cytometry system (Beckman Coulter, USA). The data obtained were analyzed on FCS express 4 Plus Research Edition.

2.9 Annexin V/PI flow cytometric staining

Apoptotic or necrotic cells were quantified by annexinV - FITC-propidium iodide (PI) double staining, using a kit purchased from Chemicon International. The C6 cells were seeded at 4×10^4 cells/well in 6-well plates. After reaching semi-confluence, glioma cells were treated with 45, 75 or 100 μM of LaSOM 65 for 48 h.

At the end of the treatment the medium was removed and reserved, the cells were washed with phosphate buffered saline (PBS) and 200 μ l of 0.25% trypsin/EDTA solution was added to detach the cells. The trypsin was inactivated with the culture medium firstly removed. The mixture was centrifuged at 1200 rpm for 10 minutes. Cells were resuspended in binding buffer containing FITC-conjugated annexin V and Propidium Iodide (PI), according to manufacturer's instruction. The samples were incubated for 15 min in dark at 4-8°C before analysis by flow cytometer. The quantification of apoptotic or necrotic cells was screened by dual-color flow cytometry technique using a FACScan cytometry system (Beckman Coulter, USA). The data obtained were analyzed on FCS express 4 Plus Research Edition.

2.10 Ecto-5'-nucleotidase activity

The ecto-5'-NT/CD73 activity was assayed as described by Wink *et al* [16]. The 24 multiwell plates containing gliomas cells were washed three times with phosphate-free incubation medium (2 mM MgCl₂, 120 mM NaCl, 5 mM KCl, 10 mM glucose, 20 mM HEPES, pH 7.4). The enzymatic reaction started by the addition of 200 μ L incubation medium containing 2 mM AMP, at 37°C. After 10 minutes of incubation, the reaction was stopped by transferring an aliquot of the incubation medium to pre-chilled tube containing trichloroacetic acid (5% w/v). The inorganic phosphate released was measured by the malachite green method [21]. Controls to determine the non-enzymatic Pi release were performed by incubating the cells in the absence of the substrate and incubating the substrate in the absence of cells. The protein concentration was measured using the Comassie

blue method [22] using bovine serum albumin as the standard. All samples were run in triplicate. Specific activity was expressed as nmol Pi released/min/mg of protein.

2.11 Statistical Analysis

All experiments were carried out at least three times in at least triplicate. Data were analysed by unpaired analysis of variance (ANOVA) followed by post-hoc comparisons (Tukey test).

3. Results

3.1 The antiproliferative effect of LaSOM 65 against glioma cells

Glioma cells (C6 and U138) were treated with 15, 30, 45, 75 and 100 μM LaSOM 65 for 48 h. After the treatment, cells were detached and counted. As shown in Fig. 2, 30, 45, 75 and 100 μM LaSOM 65 caused growth inhibition in C6 (19%, 38%, 53% and 72% respectively), but none of these concentrations were able to inhibit U138 cell proliferation.

3.2 LaSOM 65 decreases cell viability in gliomas cells

To investigate if LaSOM 65 alters cell viability, we performed MTT assay which measures the mitochondrial activity. As shown in Fig.3, after 48 h treatment LaSOM 65 significantly decreases C6 cell viability at a concentration of 75 and 100 μM (28% and 46%, respectively) and U138 at 100 μM (13%). Cell viability was also evaluated by measuring the activity of lactato dehydrogenase (LDH) in the cell

culture medium. The treatment with 75 and 100 μM LaSOM 65 for 48 h increased 34% LDH levels in the culture supernatants of C6 glioma cells. There was no difference in the LDH levels between the control and the treated groups of human glioma U138 (Fig. 4).

3.3 LaSOM 65 does not cause cytotoxic effect on organotypic hippocampal slice cultures

We used organotypic hippocampal slice cultures as a model to evaluate the effect of LaSOM 65 on normal neural cells. After 14 days in culture, the organotypic cultures were treated for 48h with 30, 45, 75 and 100 μM LaSOM 65 and the cell death was analyzed by PI uptake. Although the treatment with 45 μM LaSOM 65 caused a significant numerical difference from DMSO group, the increased PI uptake does not mean a significant damage to hippocampal slice cultures, since this treatment caused less than 10% of PI incorporation, and therefore a negligible biological effect. None of the concentrations caused damage to the organotypic hippocampal slice cultures (Fig. 5).

3.4 Morphological observation of nuclei

To test whether LaSOM 65 causes monopolar arrest in glioma cells, the C6 glioma cells treated with 100 μM LaSOM 65 for 6 hours were immunostained for nuclei and α -tubulin. Cells treated with monastrol were used as positive control. As shown in Figure 6, monastrol caused cellular arrest and monopolar spindle in C6 cells. The treatment with LaSOM 65 did not cause the same effect in the same proportions.

3.5 LaSOM 65 does not induce cell cycle arrest in G2/M phase

Eg5 inhibitors are known to cause a block of the cell cycle in G2/M phase due to the formation of a monopolar spindle and failure of cytokinesis. We investigated whether LaSOM 65 affects the cell cycle of gliomas cells. The rat glioma cells were treated with 100 μ M LaSOM 65 for 24 and 48 h. Monastrol (100 μ M) was used as a positive control. After the treatment, cells were fixed and stained with propidium iodide. Flow cytometry analyses showed that LaSOM 65 did not cause effect on the cell cycle neither in 24 h (Fig. 7) nor in 48 h (data not shown). Of all the LaSOM 65 treated cells, only 6,75% were on G2/M phase, while 82,1% were in G1 phase (data similar to those observed with control and DMSO group). However, the monastrol treated cells showed a significant increase in G2/M phase (67,35%) and a subsequent decrease in G1 phase (5,27%).

3.6 Identification of apoptotic or necrotic cell death

Monastrol induces apoptosis through mitochondrial membrane depolymerisation and caspase-3 activation. We investigated if the gliomas cells treated with LaSOM 65 also undergo to apoptosis. The C6 glioma cells exposed to 100 μ M monastrol or 100 μ M LaSOM 65 for 24 and 48 h were stained with annexina and propidium iodide. In 48h, of all monastrol treated cells, 82,5% were viable, 9,6% were in apoptosis, 5,4% in "late apoptosis" and only 2,4% in necrosis. About the LaSOM 65 treated cells, 82,1% were viable, 4,4% were in apoptosis, 7,2% in "late apoptosis" and 6,6% were in necrosis (Fig. 8). The same profile was verified in 24 hours of treatment (data not shown).

3.7 LaSOM 65 does not alter ecto-5'-nucleotidase activity in gliomas

To investigate the LaSOM 65 effect on ecto-5'-nucleotidase activity, cells (C6 and U138) were treated with 15, 30, 45, 75 and 100 μM LaSOM 65 for 10 minutes, 24 and 48 h. After the treatment, the inorganic phosphate released from AMP hydrolysis was measured according material and methods. The treatment with LaSOM 65 in all conditions tested did not alter the ecto-5'-NT enzymatic activity (Fig. 9).

4. Discussion

Monastrol is the first antimitotic compound that blocks mitosis by inhibiting the kinesin motor protein Eg5. There is great interest in developing Eg5 inhibitors due to their potential for improved side effect profiles caused by taxans and others antimitotic drugs. In the current study, we investigated the effect of LaSOM 65 (Fig. 1), a monastrol analog, against glioma cell lines. The rat glioma cells (C6) exposed to LaSOM 65 for 48 h showed a significant decrease of cell growth. 100 μM of this compound was able to decrease 72% cell proliferation and 46% cell viability. The human glioma (U138) was more resistant to the treatment and had the cell viability decreased only in 13%. In the neurotoxicity experiments carried against organotypic hippocampal slice cultures, LaSOM 65 revealed to be nontoxic. This result could be attributed to the lower expression level on normal brain compared to cancer cells. Eg5 is extremely important for cell division and it is present in a variety of solid tumors while little or no expression of this kinesin is detected in non-proliferating cells and normal tissues as brain.

Once that LaSOM 65 was able to decrease cell proliferation and cell viability, we decided to investigate if this molecule acts by the same mechanisms as monastrol. Many researches had shown that monastrol inhibit the human kinesin Eg5, which is required for the formation of a bipolar spindle, causing mitotic arrest and leading cells to monopolar spindle. To investigate if LaSOM 65 causes this phenotype, we stained the DNA and the α -tubulin of C6 glioma cells treated with 100 μ M LaSOM 65 for 6 h. The images obtained shown some cells with monopolar spindle, but the effect was not as striking as that observed in cells treated with monastrol.

The monopolar spindle caused by monastrol induces a blockage of the cell cycle in the G2/M phase. In most cases, mitotic arrest induces apoptosis through mitochondrial membrane depolymerisation and caspase-3 activation. Therefore, we performed experiments to check if LaSOM 65 causes that arrest on G2/M phase and, surprisingly, after 24 and 48 hours of treatment the cells were usually passing through the cell cycle. This result is in agreement with the images obtained from immunocytochemistry of cells treated with LaSOM 65, that show few cells with the monoastral phenotype, indicating that maybe this compound is acting by another mechanism than Eg5 inhibition.

In order to investigate if cells were going to apoptosis or necrosis due the treatment with LaSOM 65, we performed the annexin/PI technique. After 48h treatment cells were incubated with both markers and analyzed by flow cytometry. The results show that cells were dying mainly by necrosis and "late apoptosis", once that we observed double tagging. This last result was confirmed by measurement of the enzyme LDH in cell culture medium. There was an increase of

34% LDH in supernatants of cells treated with 100 μ M of LaSOM 65 for 48 hours, indicating cell disruption and leakage of this intracellular enzyme into the culture medium. These data together led us to investigate other mechanisms by which LaSOM 65 may be acting.

Ecto-5'-nucleotidase is highly expressed in most solid tumors and its expression level is associated with neovascularization, invasiveness and metastasis of tumors [9]. Data published by our laboratory indicate that alterations in the purinergic signaling pathway may be involved in malignancy of gliomas [13-17]. So, we decided to investigate the effect of LaSOM 65 on ecto-5'NT activity and whether it could be related to the antiproliferative effect of this drug. The rat glioma cells (C6) and human glioma (U138) were treated with 15, 30, 45, 75 and 100 μ M LaSOM 65 for only 10 minutes, or after 24 and 48h in culture. After the treatment, the enzyme activity was measured. None of the concentrations tested, at any time or conditions of treatment, alter the enzyme activity compared to control cells. This result, however, does not rule out the involvement of other elements of the purinergic system in the antiproliferative effect of the compound LaSOM 65, which should be further evaluated.

Much remains to be understood to improve antimitotic cancer chemotherapy. LaSOM 65 appears to be promising once it promotes a decrease of cell growth and cell viability of gliomas cells and not cause the neurotoxicity characteristic of antimitotic drugs currently used. However, more studies are necessary to understand the mechanisms by which LaSOM 65 is exerting its cytotoxic effects. In addition, these results presented here encouraged us to

investigate the effect of other new monastrol analogues against the proliferation of glioma cell lines.

Acknowledgements

This work was supported by Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq), Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (Capes) C. S. Stuepp was a recipient of CNPq fellowship and F. Figueiró and F. B. Mendes were recipient of Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado do Rio Grande do Sul (FAPERGS) fellowship. We also thank L.R. Blazina for her technical assistance and H.B. Biehl for his assistance in the confocal microscope.

REFERENCES

[1] Kleihues P and Cavenee WK. Pathology and genetics of tumors of the nervous system. IARC Press, Lyon, 2000.

[2] Maher EA, Furnari, FB, Bachoo RM, et al. Malignant gliomas: genetics and biology of a grave matter. *Genes Dev* 2001; **15**:1311-1333.

[3] Behin A, Hoang-Xuan K, Carpentier AF, Delattre J. Primary brain tumors in adults. *Lancet* 2003; **361**:323-331.

[4] Huszar D, Theoclitou ME, Skolnik J, Herbst R. Kinesin motor proteins as targets for cancer therapy. *Cancer Metastasis* 2009; **28**(1-2):197-208.

[5] Purcell JW, Davis J, Reddy M, Martin S, et al. Activity of the kinesin spindle protein inhibitor ispinesib (SB-715992) in models of breast cancer. *Clin Cancer Res.* 2010; **16**(2):566-576.

[6] Carter BZ, Mak DH, Shi Y, Schoeber WD, Wang RY, Konopleva M, et al. Regulation and targeting of Eg5, a mitotic motor protein in blast crisis CML: Overcoming imatinib resistance. *Cell Cycle* 2006; **5**:2223–2229.

[7] Leguellec R, Paris J, Couturier A, Roghi C, Philippe M. Cloning by differential screening of a *Xenopus* cDNA that encodes a kinesin-related protein. *Molecular and Cellular Biology* 1991; **11**:3395–3398.

[8] Mayer TU, Kapoor TM, Haggarty SJ, King RW, Schreiber SL, Mitchison TJ. Small molecule inhibitor of mitotic spindle bipolarity identified in a phenotypebased screen. *Science* 1999; **286**:971–974.

[9] Spychala J. Tumor-promoting functions of adenosine. *Pharmacol. Ther.* 2000; **87**(2-3):161-173.

[10] Vogel M, Kowalewski HJ, Zimmermann H, Janetzko A, Margolis RU, Wollny HE. Association of the HNK-1 epitope with 5'-nucleotidase from *Torpedo marmorata* (electric ray) electric organ. *Biochem J* 1991; **278**:199-202.

[11] Spychala J, Lazarowski E, Ostapkowicz A, Ayscue LH, Jin A, Mitchell BS. Role of estrogen receptor in the regulation of ecto-5'- nucleotidase and adenosine in breast cancer. *Clin Cancer Res* 2004; **10**:708-717.

[12] Zhou P, Zhi X, Zhou T, Chen S, Li X, Wang L, Yin L, Shao Z, Ou Z. Overexpression of ecto-5'-nucleotidase (CD73) promotes T-47D human breast cancer cells invasion and adhesion to extracellular matrix. *Cancer Biol & Ther* 2007; **6**:426-431.

[13] Morrone FB, Jacques-Silva MC, Horn AP, Bernardi A, Schwartzmann G, Rodnight R, Lenz G. Extracellular nucleotides and nucleosides induce proliferation and increase nucleoside transport in human glioma cell lines. *J Neurooncol* 2003; **64**(3):211-218.

[14] Morrone FB, Horn AP, Stella J, Spiller F, Sarkis JJF, Salbego C., Lenz G, Battastini AMO; Increased resistance of glioma cell lines to extracellular ATP cytotoxicity. *J Neuro-oncology* 2005; **71**:135-140.

[15] Morrone FB, Oliveira DL, Gamermann PW, Stella J, Wofchuk S, Wink MR, Meurer L, Edelweiss MIA, Lenz G, Battastini AMO. Involvement of extracellular ATP on the glioblastoma growth in a rat gliomas model; paper in submitting; 2006.

[16] Wink MR, Braganhol E, Tamajusuku ASK, Casali EA, Karl J, Barreto-Chaves ML, Schwartzmann G, Sarkis JJF, Battastini AMO. Extracellular adenine nucleotides metabolism in astrocyte cultures from different brain regions. *Neurochem Int* 2003; **43**:621-28.

[17] Bavaresco L., Cappellari AR, Bernardi A. Braganhol E, Rockenbach L, Farias PF, Wink MR, Delgado-Cañedo A, Battastini AMO. The role of ecto-5'-nucleotidase/cd73 in glioma cell line proliferation. *Mol Cel Biochem* 2008; **319**(1-2):61-68.

[18] Canto RFS, Bernardi A, Battastini AMO, Russowsky D, Eifler-Lima VL. Synthesis of Dihydropyrimidin-2-one/thione Library and Cytotoxic Activity against the Human U138-MG and Rat C6 Glioma Cell Lines. *J. Braz. Chem. Soc.* 2011; **22**:1379-1388.

[19] Whitaker JF. A general colorimetric procedure for the estimation of enzymes which are linked to the NADH-NAD⁺ system. *Clin Chim Acta* 1969; **24**(1):23-37.

[20] Stoppini L, Buchs PA, Muller D. A simple method for organotypic cultures of nervous tissue. *J Neurosci Methods* 1991; **37**(2):173-182.

[21] Chan KM, Delfert D, Junger KD. A direct colorimetric assay for Ca²⁺ + stimulated ATPase activity. *Anal Biochem* 1986; **157**:375–380.

[22] Bradford MM. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein–dye binding. *Anal Biochem* 1976; **72**:248-254.

LEGENDS TO FIGURES

Fig 1 **Chemical structure of LaSOM 65 and Monastrol.** The original hydroxyl group of Monastrol was replaced by a NO₂ group on the LaSOM 65 molecule (ethyl 6-methyl-4-(3-nitrophenyl)-2-1-,2,3,4-tioxotetrahydropyrimidin-5-carboxylate).

Fig. 2 **Effect of LaSOM 65 on C6 and U138 cell proliferation.** C6 and U138 glioma cells were treated with different concentrations of LaSOM 65. After, the cells were detached and counted. Values are represented as mean \pm SD of three independent experiments with triplicate determinations. Data were analyzed by one way ANOVA followed by Tukey post test. * significantly different from the DMSO group ($p < 0.05$).

Fig. 3 **LaSOM 65 decreases C6 and U138 cell viability.** C6 and U138 glioma cells were treated with different concentrations of LaSOM 65. After, the cell viability were measured by MTT assay. Values are represented as mean \pm SD of three independent experiments with triplicate determinations. Data were analyzed by one way ANOVA followed by Tukey post test. * significantly different from the DMSO group ($p < 0.05$).

Fig. 4 **LDH activity on cellular media of LaSOM 65 treated cells.** C6 and U138 glioma cells were treated with different concentrations of LaSOM 65. After, the cell culture medium was removed and the LDH activity was measured. Values are represented as mean \pm SD of three independent experiments with triplicate

determinations. Data were analyzed by one way ANOVA followed by Tukey post test. * significantly different from the DMSO group ($p < 0.05$).

Fig. 5 Effect of LaSOM 65 on organotypic hippocampal slice cultures.

Quantitative analysis of hippocampus damage after LaSOM 65 and Monastrol 100 μM treatment. Cellular death was analyzed by propidium iodide (PI) incorporation, which was visualized using a Nikon inverted microscope (at 40x magnification). Data represent the means \pm SEM. of three independent experiments made in duplicate. Data were analyzed by ANOVA followed by Tukey post-test. ** significantly different from the DMSO group ($p < 0.01$).

Fig. 6 Immunofluorescence microscopy. C6 fixed cells were stained to nuclei (1) and α -tubulin (2). (A) Cell control, (B) Cells treated with 100 μM monastrol for 6h, (C) Cells treated with 100 μM LaSOM 65 for 6 h.

Fig. 7 Cell cycle analysis. Effect of LaSOM 65 on the cell cycle of C6 glioma cells. (A) DMSO group, (B) Cells treated 100 μM Monastrol for 24 h (positive control), (C) Cells treated 100 μM LaSOM 65 for 24 h. After the treatment, cells were stained with propidium iodide and its content was analyzed by flow cytometry. The compound LaSOM 65 did not induce a block of the cell cycle in G2/M phase.

Fig. 8 Evaluation of cell death caused by LaSOM 65 on C6 glioma cells. The C6 glioma cells were exposed to (A) DMSO, (B) 100 μM Monastrol, (C) 100 μM LaSOM 65 for 48 h. After, the cells were stained with annexina and propidium

iodide and analyzed by flow cytometry. (Q1) Apoptosis, (Q2) Late apoptosis, (Q3) Necrosis, (Q4) Viable cells.

Fig. 9 Effect of LaSOM 65 on Ecto-5'-nucleotidase activity. C6 and U138 glioma cells were treated with different concentrations of LaSOM 65 for 10 minutes (A and B), 24 h (C and D) and 48 h (E and F). After, the Ecto-5'-nucleotidase activity was measured. Values are represented as mean \pm SD of three independent experiments with triplicate determinations. Data were analyzed by one way ANOVA followed by Tukey post test.

FIGURES

Figure 1

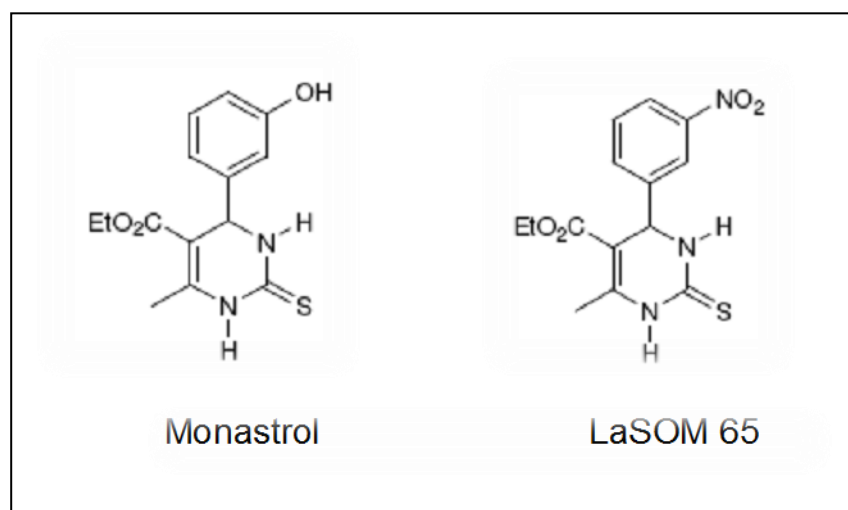


Figure 2

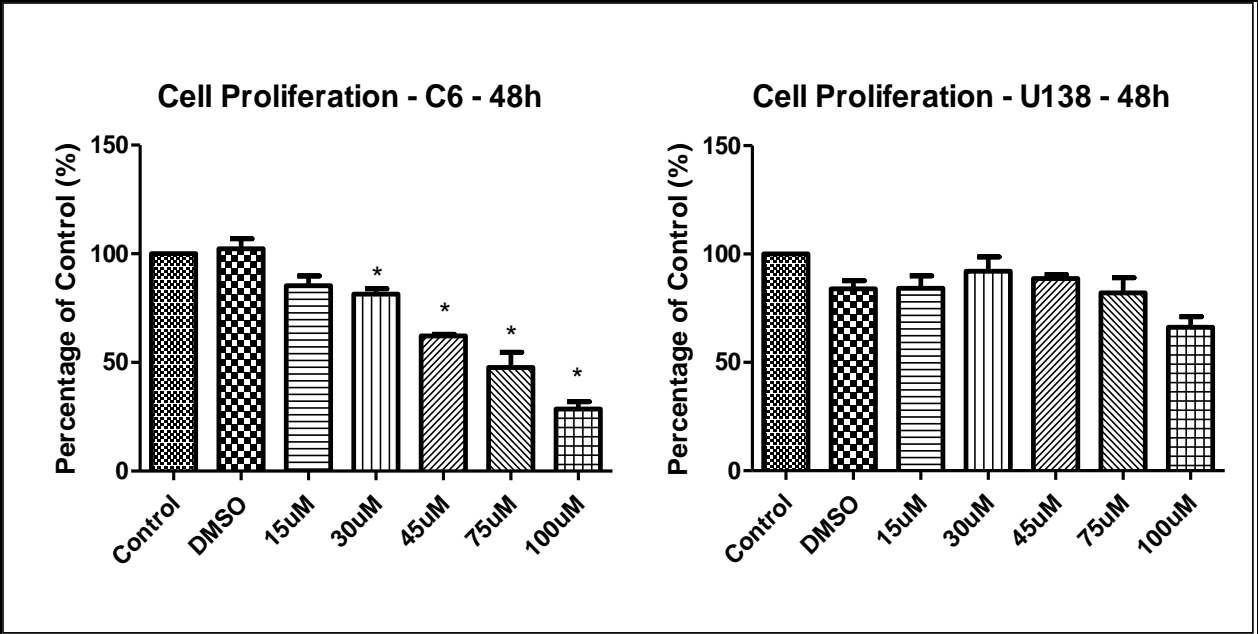


Figure 3

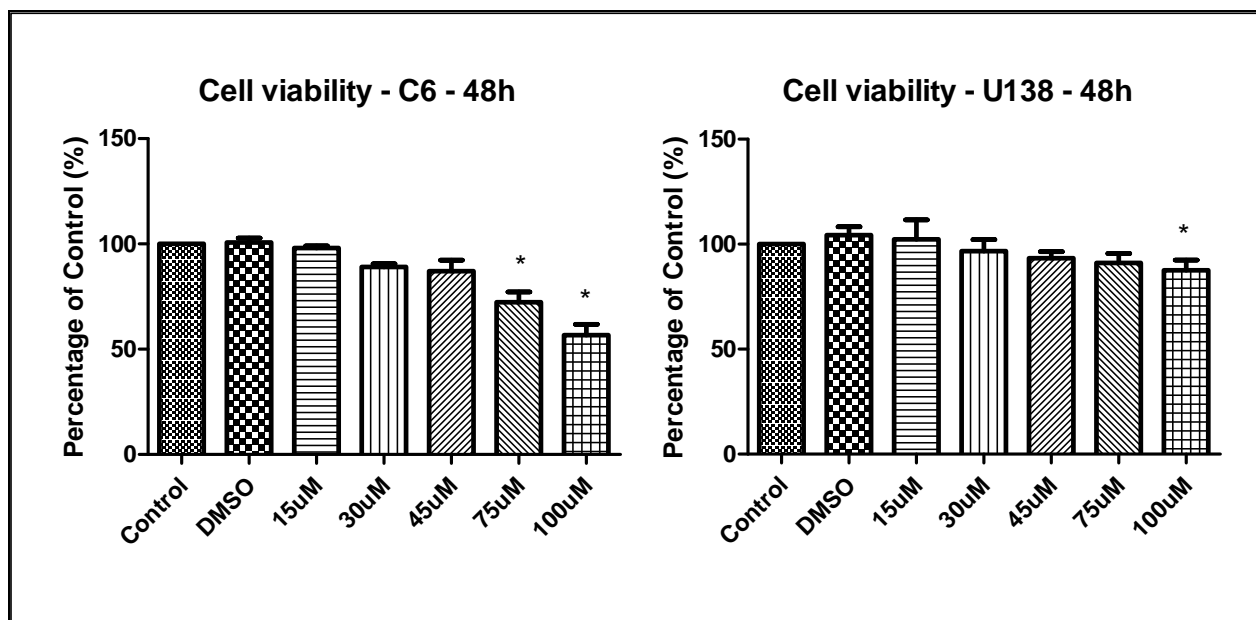


Figure 4

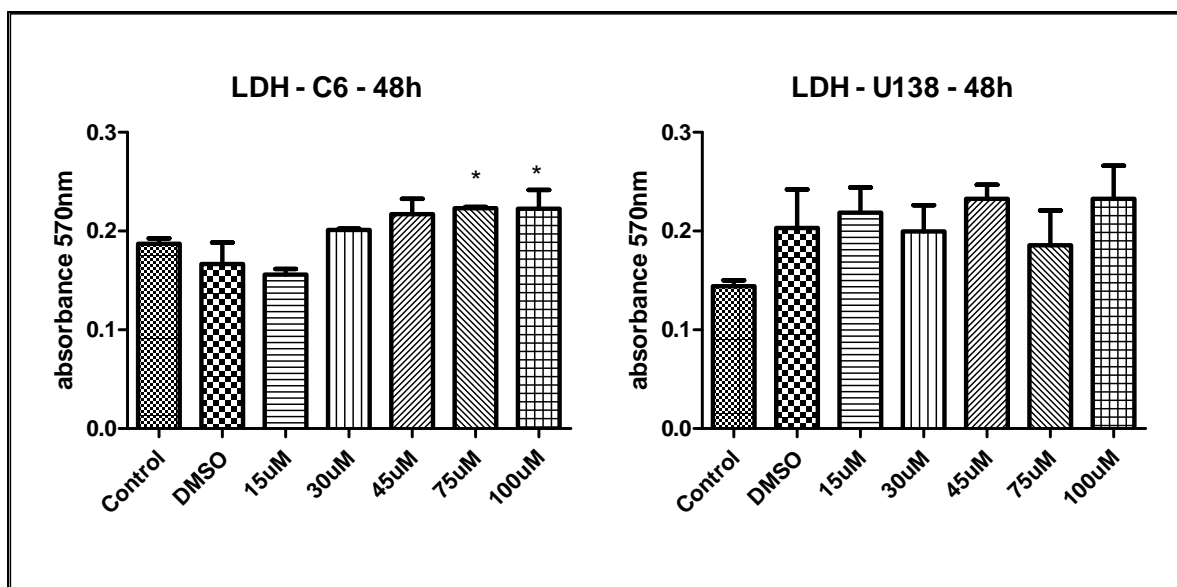


Figure 5

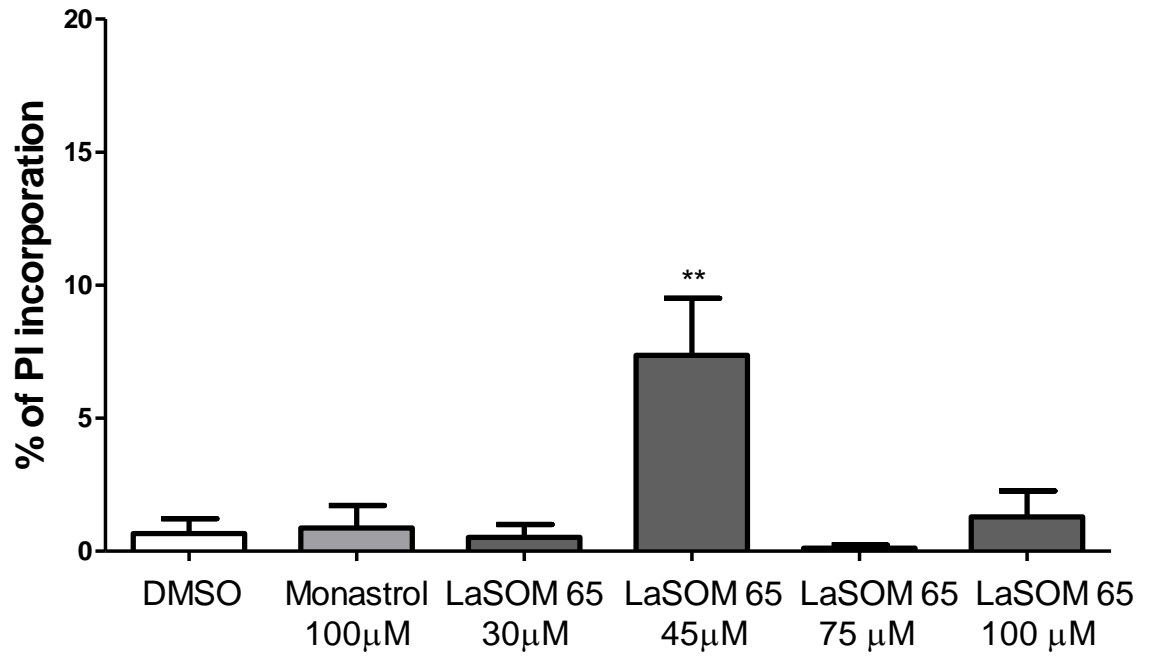


Figure 6

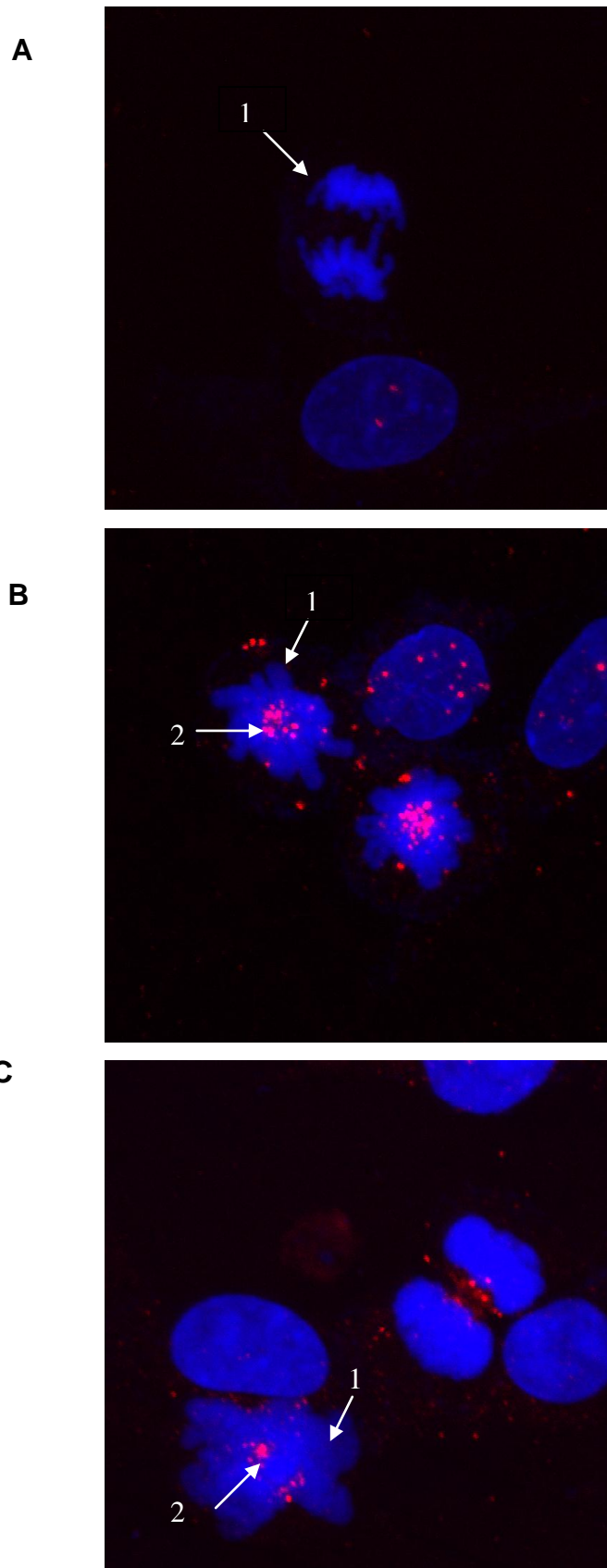
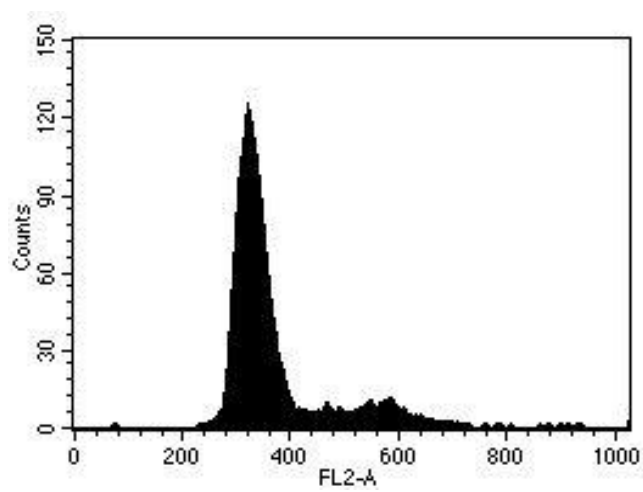
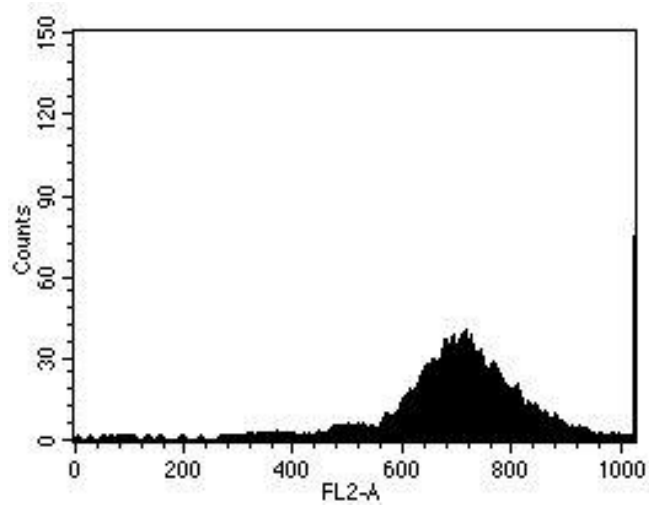


Figure 7

A



B



C

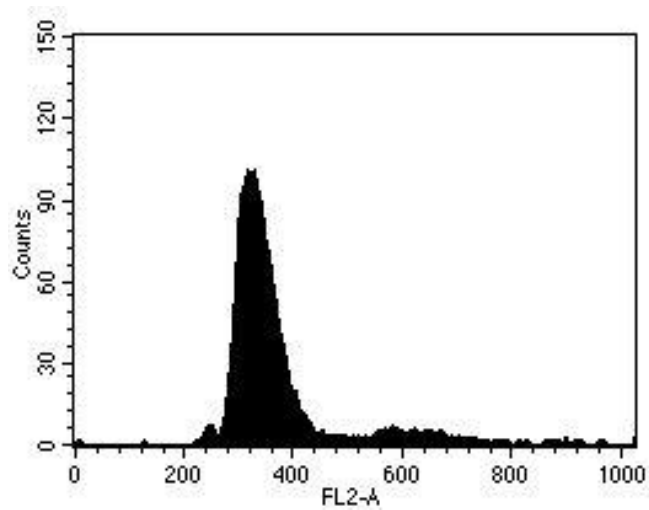
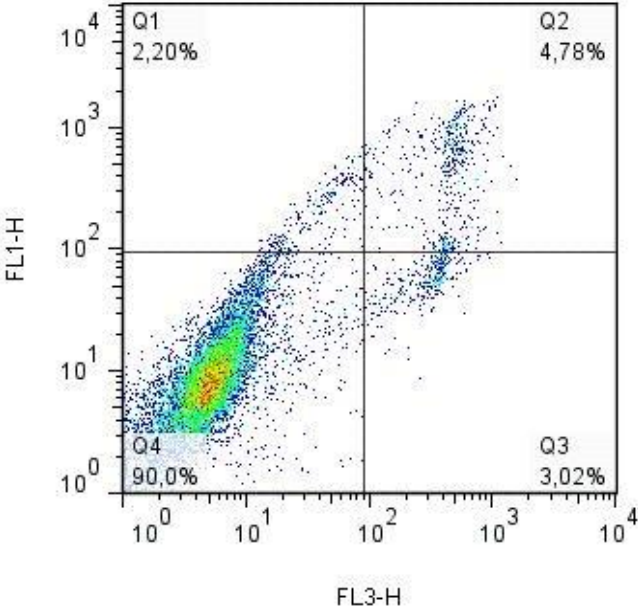
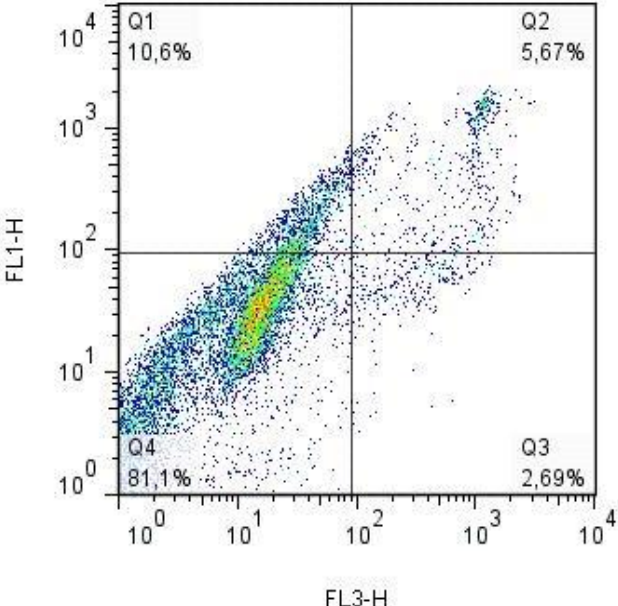


Figure 8

A



B



C

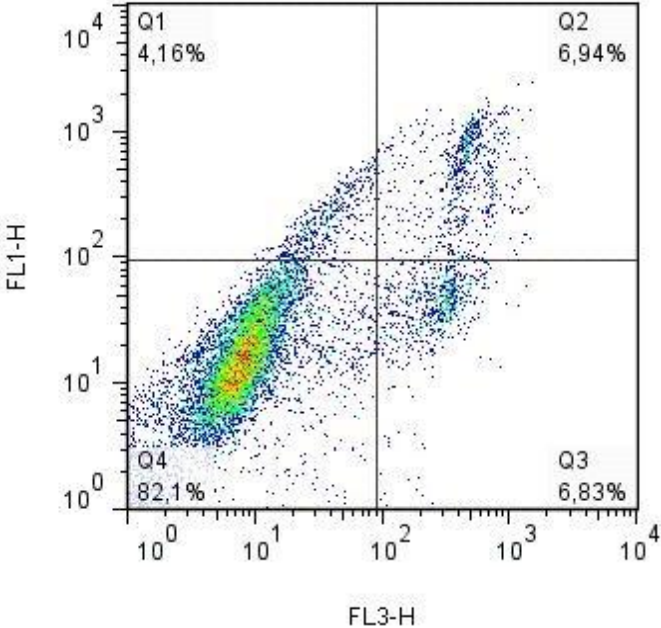
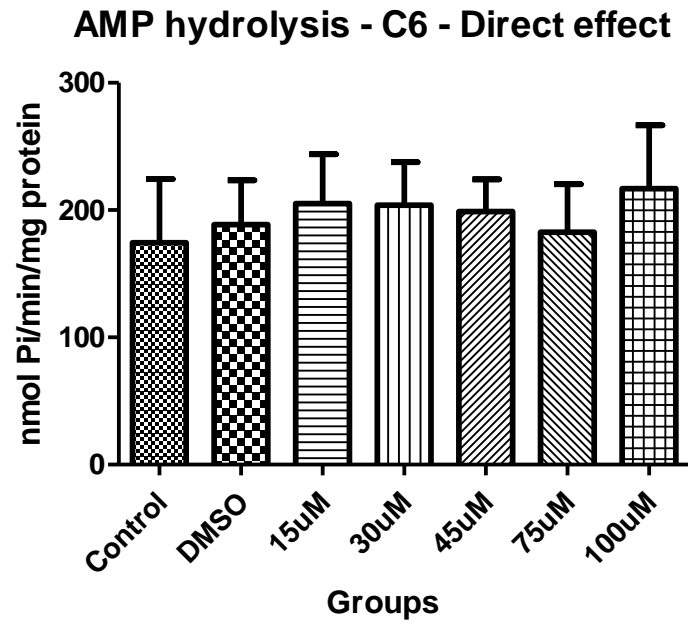
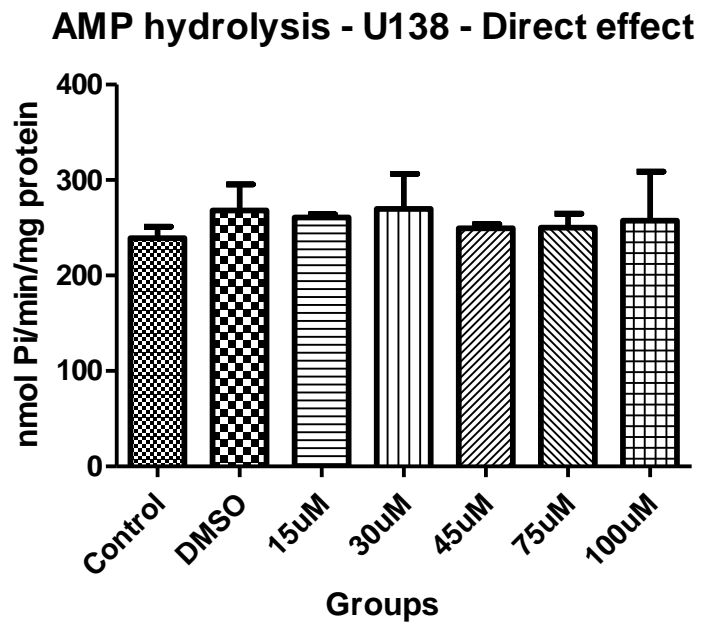


Figure 9

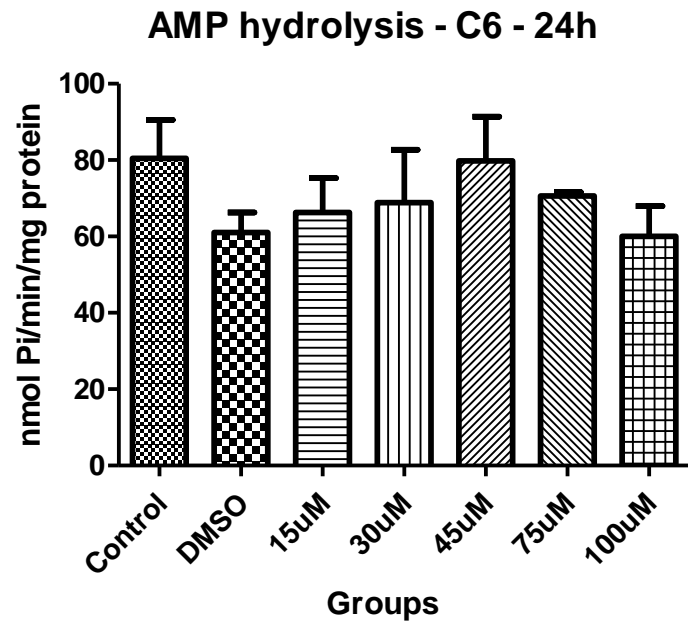
A



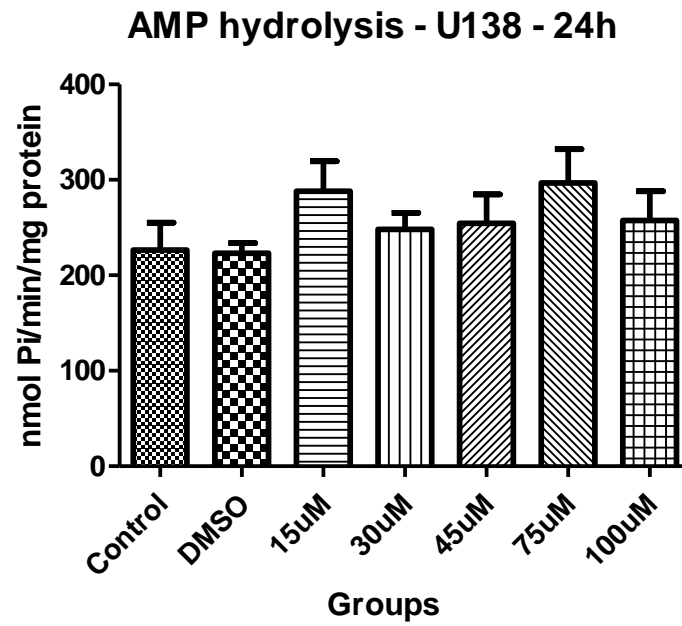
B



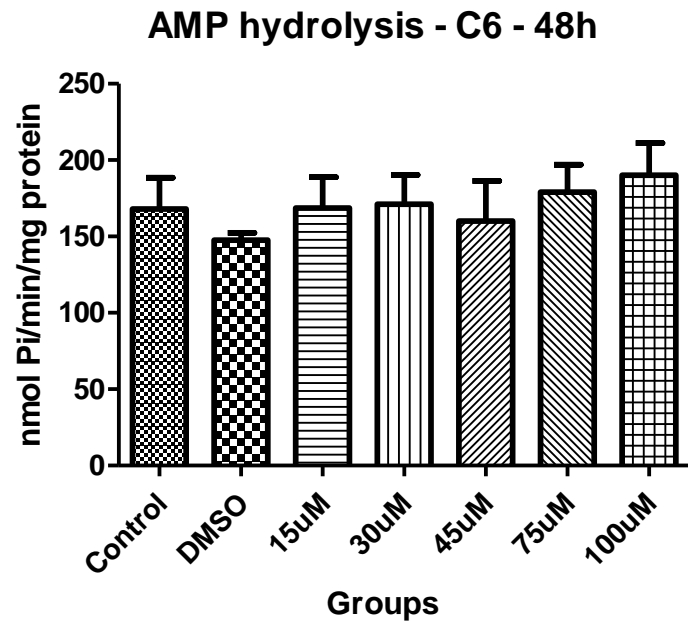
C



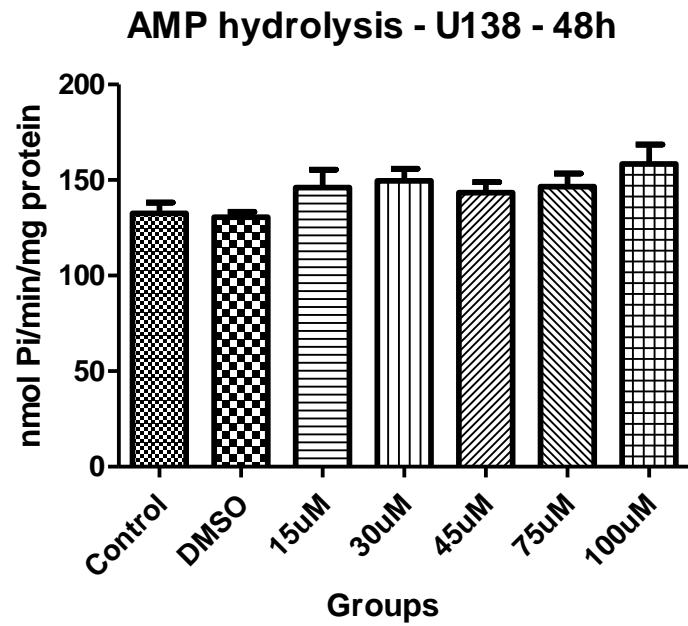
D



E



F



3.2 AVALIAÇÃO DO EFEITO ANTI-TUMORAL DO COMPOSTO LASOM 65 EM MODELO *IN VIVO* DE GLIOMA

(Artigo em preparação)

3.2.1 Introdução

Os gliomas constituem o grupo de tumores cerebrais mais comum no sistema nervoso central (Kleihues and Cavenee, 2000). Estes tumores são caracterizados por alta taxa de proliferação celular e intensa invasividade, comprometendo o tecido neural periférico ao redor da massa tumoral. Os gliomas são classificados pela Organização Mundial da Saúde em quatro níveis (I – IV), de acordo com o grau de malignidade. O Glioblastoma multiforme (grau IV) é a forma mais maligna e devastadora de glioma. O tratamento desse tipo de tumor é baseado em ressecção cirúrgica associada a quimio/radioterapia. Os resultados obtidos, no entanto, não são promissores, sendo a sobrevida média dos pacientes de apenas 15 meses (Mazeron and Kantor, 1998, Baylei *et al.*, 1995).

Neste cenário, têm-se investido muitos recursos em estudos de novas terapias para o tratamento desta patologia. Buscam-se agentes capazes de matar as células tumorais remanescentes do processo cirúrgico e eficazes em reduzir a proliferação das células malignas, impedindo dessa forma o crescimento do tumor. Aliado a essas características, espera-se minimizar os efeitos colaterais tão comumente observados no tratamento quimioterápico. Recentemente, as cinesinas mitóticas tornaram-se alvos interessantes para o tratamento do câncer, especialmente a cinesina Eg5, por ser essencial no processo de divisão celular e estar altamente expressa em tumores sólidos (Carter, *et al.*, 2006). Muitos inibidores desta cinesina mostraram-se eficazes em bloquear a divisão celular de tumores e desencadear a morte celular (Burris *et al.*, 2004, Beekman *et al.*, 2007).

O Monastrol foi a primeira molécula descrita como inibidora da cinesina Eg5 (Mayer *et al.*,1999). Neste capítulo, o potencial efeito terapêutico do composto LaSOM 65 foi testado em modelo *in vivo* de glioblastoma, o qual reproduz tumores com crescimento e invasão semelhantes aos gliomas primários humanos, o que torna esse modelo útil para avaliar o potencial terapêutico de drogas (Takano *et al.*, 2001; Morrone *et al.* 2006; Bernardi *et al.*, 2009).

3.2.2 Materias e Métodos

3.2.2.1 Cultura de células: A linhagem de glioma de rato C6 obtida da American Type Culture Collection (Rockville, Maryland, USA) foi cultivada em Dulbecco's modified Eagle's medium (DMEM) contendo 0,032% gentamicina, 0,1% fungizona e 5% de soro fetal bovino. As células foram mantidas em incubadora a 37°C, com 95% de umidade relativa e 5% de CO₂.

3.2.2.2 LaSOM 65: O composto foi sintetizado pelo Laboratório de Síntese Orgânica e Medicinal da Faculdade de Farmácia, UFRGS e dissolvido em solução salina com 5% DMSO e 0,2% Tween 80.

3.2.2.3 Animais: Foram utilizados 22 ratos Wistar machos, com 70 dias de vida. Os animais foram divididos em quatro grupos: 1) Controle (solução salina), 2) Veículo (solução salina, 5% DMSO e 0,2% tween 80), 3) LaSOM 65 30 mg/Kg e 4) LaSOM 65 90 mg/Kg. Todos os animais utilizados eram procedentes do biotério

do Departamento de Bioquímica, UFRGS. O projeto foi aprovado no comitê de ética do Hospital de Clínicas de Porto Alegre sob o número 11-0135.

3.2.2.4 Implante dos gliomas: O implante do tumor foi realizado no cérebro de ratos por meio de cirurgia estereotáxica, utilizando-se quetamina/xilazina como anestésicos conforme descrito a seguir. Um total de 1×10^6 células de glioma C6 em 3 μ L DMEM com 5% soro fetal bovino foi injetado no estriado direito do cérebro de ratos Wistar machos.

3.2.2.5 Tratamento dos animais: Após 12 dias do implante dos tumores, os ratos foram tratados via intraperitoneal com o composto LaSOM 65 (30mg/Kg ou 90mg/Kg), veículo, salina (grupo controle), uma vez por dia durante 10 dias.

3.2.2.6 Quantificação do volume tumoral: Após o tempo de tratamento, os ratos foram decapitados e o cérebro inteiro foi removido, seccionado e fixado com 10% paraformaldeído (PFA) em PBS (pH 7.4). O tumor foi localizado através de análise histológica com hematoxilina-eosina (H&E). Para a quantificação do tamanho do tumor, foram adquiridas imagens através de uma câmera digital acoplada ao microscópio. As imagens foram analisadas em microscópio Stemi DV4 - Zeiss (aumento de 8x) usando o software AxioVision Release 4.7. O volume total do tumor foi calculado pela soma das áreas segmentares e pela multiplicação da resolução da fatia.

3.2.2.7 Descarte de resíduos: Os resíduos biológicos (carcaças, tecidos dos animais) foram acondicionados em sacos plásticos de coloração branca, congelados e retirados pela empresa terceirizada Aborgama do Brasil LTDA, a qual se responsabiliza pelo tratamento dos resíduos e pela destinação adequada. Os resíduos químicos foram separados, identificados e armazenados em galões e posteriormente enviados ao Centro de Gestão e Tratamento de Resíduos Químicos do Instituto de Química da UFRGS.

3.2.2.8 Análise Estatística: Os dados obtidos foram analisados por ANOVA de uma via (análise de variância) seguida do pós teste de Tukey.

3.2.3 Resultados

3.2.3.1 Controle de peso: Os animais foram pesados diariamente durante os 10 dias de tratamento. Os dados da Tabela 1 mostram que os 2 animais controle, que receberam apenas salina, perderam peso ao longo do tratamento. Dos 6 animais do grupo veículo, 4 perderam peso e 2 ganharam peso, Dentre os 7 animais que receberam LaSOM 65 na dose de 30 mg/Kg, 2 ganharam peso enquanto 5 perderam peso. Na dose de 90 mg/Kg, todos os animais perderam peso.

Tabela 1**Tempo de tratamento (dias)**

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
R1 Controle	274g	270g	270g	270g	260g	248g	235g	221g	207g	174g
R2 Controle	306g	325g	324g	320g	320g	323g	319g	326g	331g	335g
R3 Veículo	310g	310g	310g	305g	300g	283g	280g	278g	270g	255g
R4 Veículo	280g	287g	290g	290g	290g	285g	287g	270g	255g	247g
R5 Veículo	380g	380g	384g	384g	388g	384g	380g	367g	351g	330g
R6 Veículo	360g	360g	365g	365g	378g	378g	380g	386g	391g	306g
R7 Veículo	327g	327g	327g	327g	325g	325g	330g	332g	339g	343g
R8 Veículo	354g	354g	359g	359g	375g	375g	370g	380g	390g	400g
R9 30mg/Kg	290g	295g	280g	262g	256g	241g	†	-	-	-
R10 30mg/Kg	272g	273g	265g	260g	255g	255g	254g	250g	240g	235g
R11 30mg/Kg	329g	325g	320g	315g	310g	300g	291g	276g	265g	261g
R12 30mg/Kg	245g	245g	325g	325g	329g	325g	320g	320g	320g	385g
R13 30mg/Kg	360g	360g	355g	350g	340g	336g	330g	330g	330g	400g
R14 30mg/Kg	370g	370g	340g	345g	350g	349g	345g	345g	345g	330g
R15 30mg/Kg	395g	395g	390g	390g	385g	385g	390g	390g	390g	385g
R16 90mg/Kg	302g	287g	280g	275g	280g	220g	261g	260g	254g	253g
R17 90mg/Kg	335g	317g	310g	300g	293g	286g	282g	278g	268g	†
R18 90mg/Kg	320g	305g	290g	280g	280g	270g	274g	267g	267g	250g
R19 90mg/Kg	335g	†	-	-	-	-	-	-	-	-
R20 90mg/Kg	400g	†	-	-	-	-	-	-	-	-
R21 90mg/Kg	410g	†	-	-	-	-	-	-	-	-
R22 90mg/Kg	350g	†	-	-	-	-	-	-	-	-

Tabela 1 – Massa corporal dos animais durante os 10 dias de tratamento com LaSOM 65 (30 e 90 mg/Kg) após 12 dias da cirurgia de implante de glioma, O símbolo “†” representa o dia em que o animal morreu.

3.2.3.2 Lâminas de H&E

A Figura 1 mostra secções representativas dos cérebros dos quatro grupo de animais (controle, veículo, LaSOM 65 30 mg/Kg e LaSOM 65 90 mg/Kg) corados com H&E. Como observado, em todas as fotos há a presença do tumor, indicando o sucesso da implantação. Nenhuma das duas doses do composto LaSOM 65, no entanto, foi capaz de diminuir a área tumoral.

Fig.1 – Secções representativas do cérebro de animais com modelo de glioma

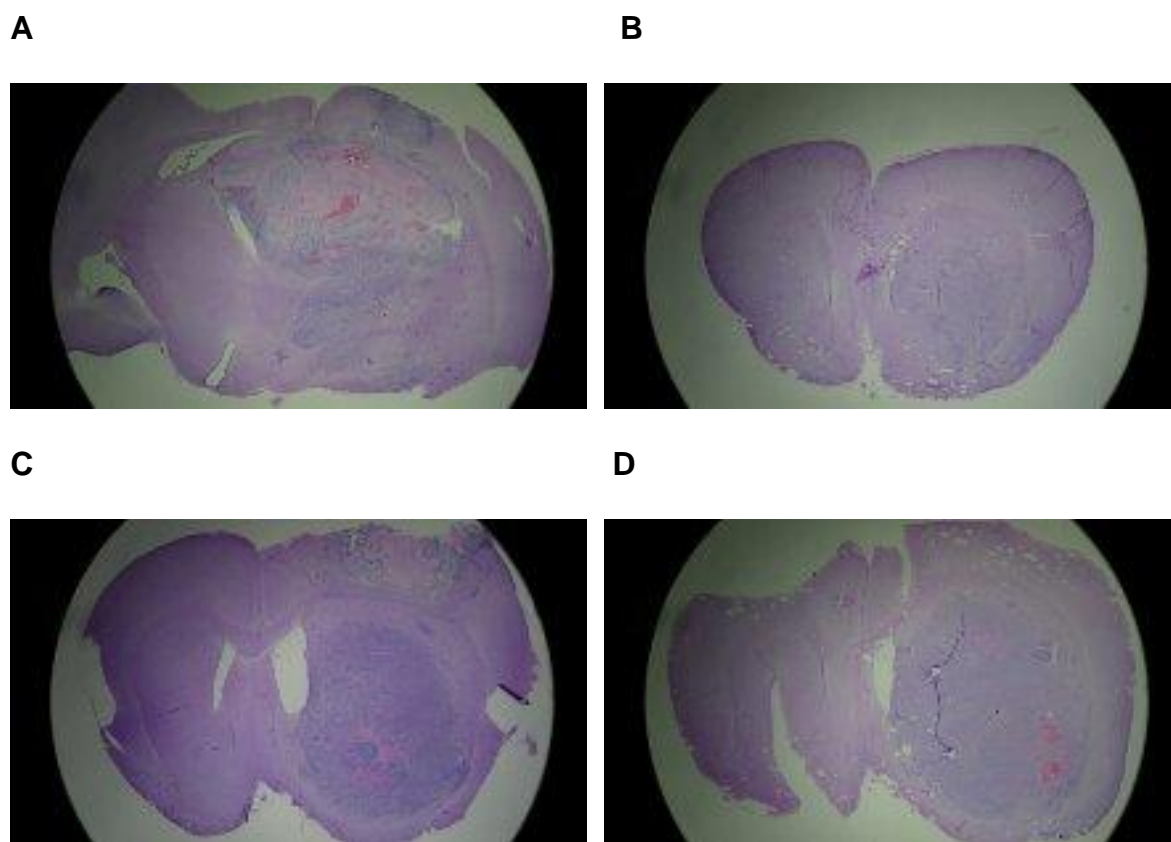


Fig.1 – Células de glioma C6 foram implantadas no cérebro de ratos Wistar através de cirurgia estereotóxica. Após 12 dias do implante, os animais foram tratados por 10 dias com (A) Solução salina, (B) Veículo, (C) LaSOM 65 30 mg/Kg e (D) LaSOM 65 90 mg/Kg. Após os animais foram decapitados e o cérebro foi removido, seccionado e corado com H&E.

3.2.3.3 Volume do Tumor: Após 10 dias de tratamento, os animais foram decapitados e o cérebro foi seccionado em três fatias que foram coradas com H&E. As áreas dos tumores foram delimitadas através do software AxioVision Relase 4.7. Obtivemos o volume total do tumor multiplicando as áreas do tumor nas três fatias pela largura das fatias. Como observado na figura 2, o tratamento com as duas doses do LaSOM 65 (30 e 90 mg/Kg) a princípio não apresentou diminuição significativa do volume do tumor em comparação ao grupo controle.

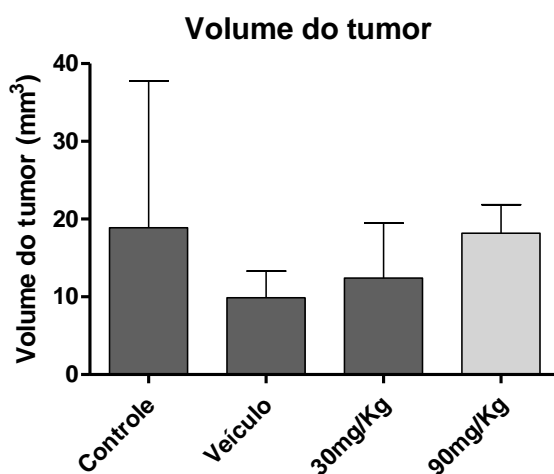


Fig. 2 – Quantificação do volume tumoral de ratos com modelo de glioma tratados com LaSOM 65 por 10 dias. Dados estão representados por média + erro.

3.2.4 Discussão

O modelo *in vivo* de glioma tem sido largamente utilizado em estudos de novas terapias para o tratamento dessa patologia e para entender os mecanismos pelos quais ela se desenvolve de forma tão agressiva e resistente. Neste estudo o modelo *in vivo* de glioma foi utilizado com intuito de avaliar o potencial terapêutico de uma nova molécula derivada do Monastrol, o LaSOM 65.

Após 12 dias do implante do tumor, os animais foram submetidos ao tratamento diário, via intraperitoneal, com LaSOM 65 nas doses de 30 e 90 mg/Kg. Os animais foram pesados diariamente e, como mostra a Tabela 1, a maioria deles perdeu peso ao longo do tratamento. Essa diminuição de peso, no entanto, foi também observada nos animais controle e no grupo veículo, indicando que provavelmente se deva à patologia em si e não ao tratamento com o composto.

No grupo que recebeu a dose de 30 mg/Kg (n = 7), um animal morreu no sétimo dia de tratamento. Dos 7 animais que receberam a dose maior (90mg/Kg), 4 animais morreram no primeiro dia de tratamento e 1 morreu no último dia, indicando que essa dose do composto LaSOM 65 estava sendo tóxica. Agregado a isso, foram observados sintomas de toxicidade gastrointestinal como urina turva, diarreia e inchaço peritoneal nos animais tratados com ambas as doses do composto.

As lâminas de H&E seguidas do cálculo do volume tumoral indicaram não haver diferença entre os grupos de animais controle, veículo e tratados, no que se refere a esses parâmetros. É importante ressaltar que apenas 2 animais foram utilizados como controle e o erro entre eles foi expressivo, gerando portanto, a

necessidade de aumentar a população desse grupo para uma melhor avaliação dos resultados obtidos.

Com base nos resultados preliminares, as doses administradas do composto LaSOM 65 demonstraram não ser eficientes na redução do volume tumoral e ainda desencadear sintomas de toxicidade nos animais, levando inclusive alguns a morte. Entretanto, os dados são muitos preliminares para determinar a capacidade antitumoral dessa molécula, sendo preciso aumentar o número dos experimentos e adequar as condições de tratamento, no que diz respeito principalmente à dose e via de administração. Faz-se, também, necessário um estudo aprofundado do composto LaSOM 65, no que se refere à parâmetros farmacocinéticos de dose letal, bem como de possíveis toxicidades decorrentes do tratamento continuado.

3.2.5 Referências

BAYLEI CC, SPOONER D. Brain tumors in children. In: Peckham M, Pinedo HM, Veronesi U (eds). Oxford Textbook of Oncology. New York: Oxford University Press, p.2055-2063, 1995.

BEEKMAN KW, BRADLEY D, HUSSAIN M. New molecular targets and novel agents in the treatment of advanced urothelial cancer. *Semin Oncol.* Apr;34(2):154-64, 2007.

BERNARDI A, BRAGANHOL E, JÄGER E, FIGUEIRÓ F, EDELWEISS MI, POHLMANN AR, GUTERRES SS, BATTASTINI AMO. Indomethacin-loaded nanocapsules treatment reduces in vivo glioblastoma growth in a rat glioma model. *Cancer Let.* 281, 53 – 63, 2009.

BURRIS H 3RD, YARDLEY D, JONES S, HOUSTON G, BROOME C, THOMPSON D, GRECO FA, WHITE M, HAINSWORTH J. Phase II trial of trastuzumab followed by weekly paclitaxel/carboplatin as first-line treatment for patients with metastatic breast cancer. *J Clin Oncol*, May 1;22(9):1621-9, 2004.

CARTER BZ, MAK DH, SHI Y, SCHOEBER WD, WANG RY, KONOPLEVA M, *et al.* Regulation and targeting of Eg5, a mitotic motor protein in blast crisis CML: Overcoming imatinib resistance. *Cell Cycle*, 5, 2223–2229, 2006

KLEIHUES P and CAVENEE WK. Pathology and genetics of tumors of the nervous system. IARC Press, Lyon, 2000.

MAYER TU, KAPOOR TM, HAGGARTY SJ, KING RW, SCHREIBER SL, and MITCHISON TJ. Small molecule inhibitor of mitotic spindle bipolarity identified in a phenotypebased screen. *Science*, 286, 971–974, 1999.

MAZERON JJ, KANTOR G. Radiotherapy in stereotactic conditions (radiosurgery) in malignant brain tumors: clinical research. *Cancer Radiother.* 2: 215-217, 1998.

MORRONE FB, OLIVEIRA DL, GAMERMANN P, et al. *In vivo* glioblastoma growth is reduced by apyrase activity in a rat glioma model. *BMC Cancer* 23: 226, 2006.

TAKANO T, LIN JHC, ARCUINO G, GAO Q, YANG J, NEDERGAARD M: Glutamate release promotes growth of malignant gliomas. *Nature Med*, 7:1010-1015, 2001.

4. DISCUSSÃO GERAL

Os tumores primários do sistema nervoso central (SNC) estão entre neoplasias sólidas mais prevalentes, representando uma das mais importantes causas de mortalidade por câncer antes dos 15 anos de idade (Baylei et al., 1995) e correspondem à cerca de 50% de todas as neoplasias cerebrais (Hochberg and Pruitt, 1991). Dentre os vários tipos de tumores do SNC, os gliomas são os mais frequentes (Kleihues and Cavenee, 2000).

Os gliomas são um grupo heterogêneo de tumores divididos pela Organização Mundial da Saúde em 4 graus (I - IV), em escala crescente de malignidade. O Glioblastoma multiforme, grau IV, é a forma mais devastadora de glioma, sendo caracterizada por intensa proliferação e capacidade de invasão. O tratamento desta patologia é baseado em cirurgia para remoção da massa tumoral, seguida de quimio/radioterapia. Apesar dos avanços científicos, o prognóstico dos pacientes ainda é pobre, sendo a expectativa de vida de apenas 15 meses.

No cenário de constante busca de estratégias terapêuticas mais eficazes para o tratamento do câncer, as cinesinas mitóticas ganharam destaque como interessantes alvos para o desenvolvimento de drogas antimitóticas. O interesse nas cinesinas foi inspirado em 1999, quando Mayer e colaboradores identificaram o monastrol, uma pequena molécula inibidora seletiva da proteína motora cinesina-5, também chamada de Eg5 ou KSP. A Eg5 está presente em uma variedade de tumores sólidos e leucemias, e é associada com alta taxa mitótica,

indicando intensa proliferação (Carter *et al.*, 2006). Pouca ou nenhuma expressão dessa cinesina é detectada em tecidos adultos não proliferantes (LeGuellec *et al.*, 1991).

No presente estudo, o composto LaSOM 65, um derivado do monastrol, foi avaliado quanto ao seu potencial terapêutico para o tratamento de gliomas. No artigo científico do item 3.1, os objetivos foram: a) avaliar se o composto LaSOM 65 apresenta atividade antiproliferativa e citotóxica em linhagens de glioma, b) os mecanismos pelos quais essa ação é exercida. Para isso, foram utilizadas duas linhagens de glioma: C6 (rato) e U138 (humano), que foram expostas ao tratamento com diversas concentrações do composto LaSOM 65 (15, 30, 45, 75 e 100 μM) durante 48 horas.

Em um primeiro momento, através do método de contagem celular em hemocítômetro, todas as concentrações testadas do composto LaSOM 65 foram capazes de inibir a proliferação das células de glioma da linhagem C6, porém, as células de glioma humano da linhagem U138 mostraram-se mais resistentes, sendo que nenhuma das concentrações testadas apresentou efeito antiproliferativo. A viabilidade celular de ambas as linhagens foi verificada pelo método do MTT, onde observou-se que após 48 h de tratamento, as duas concentrações maiores do composto LaSOM 65 (75 e 100 μM) reduziram a viabilidade celular da linhagem C6. A linhagem U138 teve sua viabilidade celular reduzida apenas pela concentração de 100 μM .

A cultura organotípica de hipocampo foi utilizada a fim de averiguar se o composto LaSOM 65 exerce ação citotóxica em células neurais normais. Após 14 dias em cultura, as células foram expostas ao composto (30, 45, 75 e 100 μM) por

48 horas. Nenhuma das concentrações testadas causou dano celular. Este primeiro grupo de resultados foi importante para mostrar que o composto LaSOM 65 tem potencial citotóxico sobre as células cancerosas e não causa nenhum dano às células normais do sistema nervoso central. Este dado é muito interessante sob o ponto de vista que a maioria dos agentes quimioterápicos utilizados na clínica causa efeitos colaterais expressivos por agir não somente no sítio tumoral, mas também em células normais. Este é o caso dos taxanos, que agem sobre os microtúbulos de células normais causando neurotoxicidade (Huszar *et al.*, 2009). Dessa maneira, a inibição da cinesina mitótica Eg5 torna-se vantajosa em relação a outras estratégias terapêuticas, justamente pelo fato dessa proteína estar altamente expressa em tumores e pouco expressa em células normais e tecidos não proliferantes.

Considerando o efeito citotóxico do LaSOM 65 sobre as linhagens de glioma, foram utilizadas metodologias para avaliar os possíveis mecanismos envolvidos neste processo, bem como caracterizar o tipo de morte celular acarretada. Uma vez ligados aos microtúbulos antiparalelos, os domínios motores da cinesina Eg5 hidrolisam ATP e a energia liberada é utilizada para o seu movimento, resultando no deslizamento dessas fibras em direções opostas (Kapitein *et al.*, 2005). Quando a Eg5 é inibida pelo Monastrol, as células apresentam bloqueio da separação dos centrossomos, resultando em um *spindle* monoastral, cercado por cromossomos condensados. Para avaliar se o composto LaSOM 65 também causa o fenótipo monoastral, o DNA e a α -tubulina das células de glioma C6 tratadas com 100 μ M desta molécula por 6 h foram marcados e observados em microscópio confocal. Surpreendentemente, as células tratadas

com LaSOM 65 não apresentaram a mesma quantidade de células com *spindle* monopolar comparado às células tratadas com monastrol, indicando que talvez o LaSOM 65 não esteja inibindo a cinesina Eg5 tão eficazmente quanto o Monastrol.

Sabe-se que os inibidores da cinesina Eg5, por formarem o *spindle* monopolar e causar falha na citocinese, levam as células a um bloqueio no ciclo celular na fase G2/M. Foi investigado se o tratamento com o composto LaSOM 65 afeta o ciclo celular da linhagem de glioma C6. As células tratadas com 100µM da molécula por 24 e 48 horas foram analisadas por citometria de fluxo, que indicou o fluxo normal pelo ciclo celular, sem qualquer bloqueio característico. Novamente, o composto LaSOM 65 não se comportou como o Monastrol, que foi capaz de manter as células de glioma C6 em G2/M, ratificando os dados da literatura. A principal importância deste grupo de resultados é mostrar que o composto LaSOM 65 não age da mesma forma que o Monastrol, embora seja um derivado dessa molécula. A substituição do radical OH por um radical NO₂ alterou completamente o efeito do composto original, de forma que as células tratadas não apresentaram predominantemente a formação do *spindle* monopolar nem causaram a parada no ciclo celular característica de inibidores da Eg5.

É relatado que o Monastrol leva as células à apoptose através da despolimerização da membrana mitocondrial e da ativação da caspase-3. Foi investigado se as células de glioma tratadas com LaSOM 65 também podem morrer por esse mecanismo. As células de glioma foram tratadas com 100 µM de Monastrol ou composto LaSOM 65 por 48 horas, após, foram marcadas com PI e anexina e analisadas por citometria de fluxo. As células tratadas com Monastrol morreram predominantemente por apoptose, enquanto as células tratadas com

LaSOM 65 apresentaram principalmente dupla marcação, indicando apoptose tardia, e marcação apenas com PI, indicando necrose. Estes dados foram confirmados pela dosagem da enzima LDH no meio de cultura das células tratadas com o composto LaSOM 65. A LDH é uma enzima citosólica, cuja presença no meio de cultura das células indica ruptura da membrana celular e extravasamento do conteúdo intracelular para o meio extracelular, como acontece em processos necróticos. As células tratadas com LaSOM 65 apresentaram uma quantidade significativamente maior dessa enzima no meio de cultura em relação as células controles.

Uma vez que o composto LaSOM 65 não se comportou da mesma forma que a sua molécula de origem quanto aos mecanismos pelos quais age, nós decidimos investigar a possível relação entre o efeito antiproliferativo desta molécula e a enzima ecto-5'-nucleotidase (Ecto-5'NT).

A Ecto-5'NT é uma enzima do sistema purinérgico que catalisa a hidrólise de nucleosídeos 5'-monofosfatados até os respectivos nucleosídeos, sendo a principal fonte de adenosina no meio extracelular. Seu nível de expressão está associado com a neovascularização, invasividade e metástases de tumores (Spychala, 2000). Estudos realizados pelo nosso grupo de pesquisa mostraram fortes indícios de que a sinalização purinérgica está envolvida na progressão dos gliomas, isto porque esse grupo de tumores apresenta uma baixa taxa de hidrólise do ATP e uma alta taxa de hidrólise do AMP, comportamento inverso ao observado em astrócitos (Wink, *et al.*, 2003). Este perfil de acúmulo de ATP e rápida formação de adenosina é vantajoso para as células tumorais, pois o ATP e adenosina extracelulares promovem a proliferação de linhagens de glioma

(Morrone *et al.*, 2003). Nossa ideia foi verificar se o composto LaSOM 65 poderia estar diminuindo a atividade da Ecto-5'NT, justificando a inibição da proliferação celular das linhagens tratadas com esse composto. Para isto, as células de glioma foram tratadas por 10 minutos, 24 e 48 horas com as diferentes concentrações de LaSOM 65 (15, 30, 45, 75, 100 μ M). A atividade enzimática verificada após os tempos de tratamento indicou não haver diferença entre as células controle e as células tratadas, em nenhuma das condições testadas. Este resultado, no entanto, não exclui o envolvimento de outros elementos do sistema purinérgico no efeito antiproliferativo do composto LaSOM 65.

Este grupo de experimentos *in vitro* mostrou o potencial antiproliferativo e citotóxico de uma nova molécula derivada do Monastrol, o LaSOM 65. Alguns mecanismos de ação foram analisados, como a formação do *spindle* monopolar, parada no ciclo celular e inibição da enzima ecto-5'NT. Nenhum deles, no entanto, foi capaz de justificar o efeito desta molécula nas linhagens de glioma, gerando um leque ainda maior de outros mecanismos a serem estudados.

A terapia farmacológica dos gliomas é limitada pela barreira hematoencefálica. Considerando os resultados obtidos no item 3.1 que indicaram que o composto LaSOM 65 exerce efeito antiproliferativo em gliomas e não apresenta efeito citotóxico para o tecido neural, nós decidimos investigar se o tratamento com este composto é capaz de reduzir os tumores de ratos em modelo *in vivo* de glioma.

Os animais foram submetidos a uma cirurgia de implante de glioma e após 12 dias, foram tratados com duas doses do LaSOM 65: 30 e 90 mg/Kg, durante 10

dias. Foi verificado que os animais submetidos ao tratamento apresentaram perda de peso, distúrbios gastrointestinais e alguns, inclusive foram à óbito.

Após os 10 dias, os animais foram sacrificados e o volume tumoral foi medido. Os resultados preliminares mostrados no item 3.2 indicam que não houve diferença no volume do tumor entre os animais controles e os tratados. Muito cedo é, no entanto, para avaliar a capacidade antitumoral dessa molécula, baseada apenas neste primeiro experimento piloto, sendo preciso ampliar os resultados obtidos até aqui.

Nossos resultados abrem novas perspectivas para o entendimento do potencial antiproliferativo do composto LaSOM 65 bem como o estudo de outros derivados do monastrol que possam apresentar efeitos ainda mais expressivos e promissores.

5. REFERÊNCIAS

ABBRACCHIO MP, SAFFREY MJ, PÓQUER V, BURNSTOCK G. Modulation of astroglial cell proliferation by analogues of adenosine and ATP in primary cultures of rat striatum. *Neuroscience*, 59, 67-76, 1994.

AIRAS L, HELLMAN J, SALMI M, BONO P, PUURUNEN T, SMITH DJ, JALKANEN S. CD73 is involved in lymphocyte binding to the endothelium characterization of lymphocyte-vascular adhesion protein 2 identifies it as CD73. *J Exp Med*. 182(5):1603-1608, 1995.

AIRAS L, NIEMELA J, SALMI M, PUURUNEN T, SMITH DJ, JALKANEN S. Differential regulation and function of CD73, a glycosyl-phosphatidylinositol-linked 70-kD adhesion molecule, on lymphocytes and endothelial cells. *J Cell Biol*. 136: 421-431, 1997.

BATTASTINI AM, DA ROCHA JB, BARCELLOS CK, DIAS RD, SARKIS JJ. Characterization of an ATP diphosphohydrolase (EC 3.6.1.5) in synaptosomes from cerebral cortex of adult rats. *Neurochem Res*. Dec;16(12):1303-10, 1991.

BATTASTINI AM, OLIVEIRA EM, MOREIRA CM, BONAN CD, SARKIS JJ, DIAS RD. Solubilization and characterization of an ATP diphosphohydrolase (EC 3.6.1.5)

from rat brain synaptic plasma membranes. *Biochem Mol Biol Int.* Oct;37(2):209-19, 1995.

BAVARESCO L, CAPPELLARI AR, BERNARDI A, BRAGANHOL E, ROCKENBACH L, FARIAS PF, WINK MR, DELGADO-CAÑEDO A, BATTASTINI AMO. The role of ecto-5'-nucleotidase/cd73 in glioma cell line proliferation. *Mol Cell Biochem* 319(1-2):61-8, 2008.

BEHIN A, HOANG-XUAN K, CARPENTIER AF, DELATTRE J. Primary brain tumors in adults. *Lancet.* 361: 323-331, 2003.

CANTO R. Síntese de diidropirimidinonas análogas ao Monastrol e avaliação pré-clínica do LaSOM 65. 2010. Dissertação (Mestrado em Ciências Farmacêuticas) - Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico. Orientador: Vera Lucia Eifler-Lima. 2010

CANTO R, BERNARDI A, BATTASTINI AMO, RUSSOWSKY D, EIFLER-LIMA VL. Synthesis of Dihydropyrimidin-2-one/thione Library and Cytotoxic Activity against the Human U138-MG and Rat C6 Glioma Cell Lines. *J. Braz. Chem. Soc.*, Vol. 22, No. 7, 1379-1388, 2011.

CARTER BZ, MAK DH, SHI Y, SCHOEBER WD, WANG RY, KONOPLEVA M, et al. Regulation and targeting of Eg5, a mitotic motor protein in blast crisis CML: Overcoming imatinib resistance. *Cell Cycle*, 5, 2223–2229, 2006.

CHIN GM, HERBST R. Induction of apoptosis by monastrol, an inhibitor of the mitotic kinesin Eg5, is independent of the spindle checkpoint. *Mol Cancer Ther*. Oct;5(10):2580-91, 2006.

COCHRAN JC, GATIAL JE 3RD, KAPOOR TM, GILBERT SP. Monastrol inhibition of the mitotic kinesin Eg5. *J Biol Chem*. Apr 1;280(13):12658-67, 2005.

DUBYAK GR. Signal transduction by P2-purinergic receptors for extracellular ATP. *Am J Respir Cell Mol Biol*. Apr;4(4):295-300, 1991.

FREDHOLM BB, IJZERMAN AP, JACOBSON KA, KLOTZ KN, LINDEN J. International Union of Pharmacology. XXV. Nomenclature and classification of adenosine receptors. *Pharmacol Rev*. Dec;53(4):527-52, 2001.

HAQUE SA, HASAKA TP, BROOKS AD, LOBANOV PV, BAAS PW. Monastrol, a prototype anti-cancer drug that inhibits a mitotic kinesin, induces rapid bursts of axonal outgrowth from cultured postmitotic neurons. *Cell Motil Cytoskeleton*. May;58(1):10-6, 2004.

HOCHBERG FB, PRUITT A. Neoplasias do Sistema Nervoso Central. In: Harrison medicina interna. 12ed. Rio de Janeiro. Guanabara Koogan, p13-70, 1991.

HUSZAR D, THEOCLITOU ME, SKOLNIK J, HERBST R. Kinesin motor proteins as targets for cancer therapy. *Cancer Metastasis*, Jun;28(1-2):197-208, 2009.

KAPITEIN LC, PETERMAN EJG, KWOK BH, KIM JH, KAPOOR TM, SCHMIDT CF. The bipolar mitotic kinesin Eg5 moves on both microtubules that it crosslinks. *Nature*, 435, 114–118, 2005.

KAPOOR TM, MAYER TU, COUGHLIN ML, MITCHISON TJ. Probing spindle assembly mechanisms with monastrol, a small molecule inhibitor of the mitotic kinesin, Eg5. *J Cell Biol*. Sep 4;150(5):975-88, 2000.

KLEIHUES P and CAVENEE WK. Pathology and genetics of tumors of the nervous system. IARC Press, Lyon, 2000.

KNOWLES AF. The GDA1_CD39 superfamily: NTPDases with diverse functions. *Purinergic Signalling* 7:21–45, 2011.

LEGUELLEC R, PARIS J, COUTURIER A, ROGHI C, and PHILIPPE M. Cloning by differential screening of a *Xenopus* cDNA that encodes a kinesin-related protein. *Molecular and Cellular Biology*, 11, 3395–3398, 1991.

LIM SK, LLAGUNO SR, MCKAY RM, PARADA LF. Glioblastoma multiforme: a perspective on recent findings in human cancer and mouse models. *BMB Rep.* Mar;44(3):158-64, 2011.

LUDWIG HC, RAUSCH S, SCHALLOCK K, MARKAKIS E. Expression of CD 73 (ecto-5'-nucleotidase) in 165 glioblastomas by immunohistochemistry and electronmicroscopic histochemistry. *Anticancer Res.* May-Jun;19(3A):1747-52, 1999.

MAHER EA, FURNARI, FB, BACHOO RM, et al. Malignant gliomas: genetics and biology of a grave matter. *Genes Dev.* 15: 1311-1333, 2001

MAYER TU, KAPOOR TM, HAGGARTY SJ, KING RW, SCHREIBER SL, and MITCHISON TJ. Small molecule inhibitor of mitotic spindle bipolarity identified in a phenotypebased screen. *Science*, 286, 971–974, 1999.

MIKI H, OKADA Y, and HIROKAWA N. Analysis of the kinesin superfamily: Insights into structure and function. *Trends in Cell Biology*, 15, 467–476, 2005.

MORRONE FB, JACQUES-SILVA MC, HORN AP, BERNARDI A, SCHWARTSMANN G, RODNIGHT R, LENZ G. Extracellular nucleotides and nucleosides induce proliferation and increase nucleoside transport in human glioma cell lines. *J Neurooncol.* 64(3):211-8, 2003.

MORRONE FB, HORN AP, STELLA J, SPILLER F, SARKIS JJF, SALBEGO C., LENZ G, BATTASTINI AMO; Increased resistance of glioma cell lines to extracellular ATP cytotoxicity. *J Neuro-oncology* 71, 135-140, 2005.

MORRONE FB, OLIVEIRA DL, GAMERMANN PW, STELLA J, WOFCHUK S, WINK MR, MEURER L, EDELWEISS MIA, LENZ G, BATTASTINI AMO; Involvement of extracellular ATP on the glioblastoma growth in a rat gliomas model; paper in submitting; 2006.

ORTH JD, TANG Y, SHI J, LOY CT, AMENDT C, WILM C, ZENKE FT, MITCHISON TJ. Quantitative live imaging of cancer and normal cells treated with Kinesin-5 inhibitors indicates significant differences in phenotypic responses and cell fate. *Mol Cancer Ther.* Nov;7(11):3480-9, 2008.

PURCELL JW, DAVIS J, REDDY M, et al. Activity of the Kinesin Spindle Protein Inhibitor Ispinesib (SB-715992) in Models of Breast Cancer. *Clin Cancer Res*;16:566-576, 2010.

RALEVIC V, BURNSTOCK G. Receptors for purines and pyrimidines. *Pharmacol Rev.* Sep;50(3):413-92, 1998.

SARLI V, HUEMMER S, SUNDER-PLASSMANN N, MAYER TU, GIANNIS A. Synthesis and biological evaluation of novel Eg5 inhibitors. *Chem Bio Chem* 6(11):2005-2013, 2005.

SIMON C ROBSON, SÉVIGNY J, ZIMMERMANN H. The E-NTPDase family of ectonucleotidases: Structure function relationships and pathophysiological significance. *Purinergic Signalling* 2:409–430, 2006.

SPYCHALA J. Tumor-promoting functions of adenosine. *Pharmacol. Ther* Aug-87(2-3):161-73, 2000.

SPYCHALA J, LAZAROWSKI E, OSTAPKOWICZ A, AYSCUE LH, JIN A, MITCHELL BS. Role of estrogen receptor in the regulation of ecto-5'-nucleotidase and adenosine in breast cancer. *Clin Cancer Res.* 10:708-717, 2004.

TORRES B, DALLA COSTA T. Dados não publicados.

UJHÁZY P, BERLETH ES, PIETKIEWICZ JM, KITANO H, SKAAR JR, EHRKE MJ, MIHICH E. Evidence for the involvement of ecto-5'-nucleotidase (CD73) in drug resistance. *Int J Cancer.* 68: 493-500, 1996.

VALENSIN S, GHIRON C, LAMANNA C, KREMER A, ROSSI M, FERRUZZI P, NIEVO M, BAKKER A. KIF11 inhibition for glioblastoma treatment: reason to hope or a struggle with the brain? *BMC Cancer.* Jun 22;9:196, 2009.

VOGEL M, KOWALEWSKI HJ, ZIMMERMANN H, JANETZKO A, MARGOLIS RU, WOLLNY HE. Association of the HNK-1 epitope with 5'-nucleotidase from *Torpedo marmorata*. *Biochem J.* 278: 199-202, 1991.

WELLER M. MGMT promoter methylation in malignant gliomas: ready for personalized medicine? *Nature Reviews Neurology*, v. 6, p.39-51, jan. 2010.

WHITE N, BURNSTOCK G. P2 receptors and cancer. *Trends Pharmacol Science*; 27:211-217, 2006.

WILSON L, JORDAN MA. New microtubule/tubulin-targeted anticancer drugs and novel chemotherapeutic strategies. *J Chemother.* Nov;16 Suppl 4:83-5, 2004.

WINK MR, BRAGANHOL E, TAMAJUSUKU ASK, CASALI EA, KARL J, BARRETO-CHAVES ML, SCHWARTSMANN G, SARKIS JJF, BATTASTINI AMO. Extracellular adenine nucleotides metabolism in astrocyte cultures from different brain regions. *Neurochem Int* 43: 621-28; 2003.

ZHOU P, ZHI X, ZHOU T, CHEN S, LI X, WANG L, YIN L, SHAO Z, OU Z. Overexpression of ecto-5'-nucleotidase (CD73) promotes T-47D human breast cancer cells invasion and adhesion to extracellular matrix. *Cancer Biol & Ther.* 6: 426-431, 2007.

ZHU C, ZHAO J, BIBIKOVA M, LEVERSON JD, BOSSY-WETZEL E, FAN J-B, *et al.* Functional analysis of human microtubule-based motor proteins, the kinesins and dyneins, in mitosis/cytokinesis using RNA interference. *Molecular Biology of the Cell*, 16, 3187–3199, 2005.

ZIMMERMANN H. Biochemistry, localization and functional roles of ectonucleotidases in the nervous system. *Prog Neurobiol.* Aug;49(6):589-618, 1996.

ZIMMERMANN H. Ectonucleotidases: some developments and a note on nomenclature. *Drug Dev. Res.* 52, 44-56, 2001.

6. ANEXO

Instruções da revista *Anti-Cancer Drugs*

Anti-Cancer Drugs

 **Author Resources**

Online Submission and Review System

[Instructions for Authors \(this page\)](#)

[Copyright Transfer \(PDF\)](#)

[Reprint Ordering](#)

[Permissions Requests](#)

Note: These instructions comply with those formulated by the International Committee of Medical Journal Editors. For further details, authors should consult the “Uniform Requirements for Manuscripts Submitted to Biomedical Journals” at www.icmje.org.

The Journal is a member of the Committee on Publication Ethics (COPE) which aims to define best practice in the ethics of scientific publishing (www.publicationethics.org).

SCOPE

Anti-Cancer Drugs is devoted to the rapid publication of innovative investigations on therapeutic agents against cancer and methods to diminish adverse effects of drugs. The journal publishes peer reviewed articles on anti-cancer drug design, drug delivery, pharmacology and chemotherapy evaluation.

POINTS TO CONSIDER WHEN SUBMITTING YOUR PAPER TO ONE OF OUR JOURNALS

Please think carefully about the following points and make the appropriate declarations.

Redundant or duplicate publication

We ask you to confirm that your paper has not been published in its current form or a substantially similar form (in print or electronically, including on a web site, or in another language), that it has not been accepted for publication elsewhere, and that it is not under consideration by another publication. The International

Committee of Medical Journal Editors has provided details of what is and what is not duplicate or redundant publication (www.icmje.org). If you are in doubt (particularly in the case of material that you have posted on a web site), we ask you to proceed with your submission but to include a copy of the relevant previously published work or work under consideration by other journals. In your covering letter to the editors, draw attention to any published work that concerns the same patients or subjects as the present paper.

Conflicts of interest

Authors must state all possible conflicts of interest in the manuscript, including financial, consultant, institutional and other relationships that might lead to bias or a conflict of interest. If there is no conflict of interest, this should also be explicitly stated as none declared. All sources of funding should be acknowledged in the manuscript. All relevant conflicts of interest and sources of funding should be included on the title page of the manuscript with the heading “Conflicts of Interest and Source of Funding:”. For example:

Conflicts of Interest and Source of Funding: A has received honoraria from Company Z. B is currently receiving a grant (#12345) from Organization Y, and is on the speaker’s bureau for Organization X – the CME organizers for Company A. For the remaining authors none were declared.

In addition, each author must complete and submit the journal’s copyright transfer agreement, which includes a section on the disclosure of potential conflicts of interest based on the recommendations of the International Committee of Medical Journal Editors, “Uniform Requirements for Manuscripts Submitted to Biomedical Journals” (www.icmje.org/update.html). The form is readily available on the manuscript submission page www.editorialmanager.com/acd and can be completed and submitted electronically. Please note that authors may sign the copyright transfer agreement form electronically. For additional information about electronically signing this form, go to <http://links.lww.com/ZUAT/A106>.

Permissions to reproduce previously published material

We ask you to send us copies of permission to reproduce material (such as illustrations) from the copyright holder. We cannot send your paper to press without these permissions!

Patient consent forms

The protection of a patient's right to privacy is essential. We ask you to send copies of patient consent forms on which patients or other subjects of your experiments clearly grant permission for the publication of photographs or other material that might identify them. If the consent form for your research did not specifically include this, please obtain it or remove the identifying material. A sample patient consent form is available from the Journal's website if required.

Ethics committee approval

You must state clearly in your submission in the Methods section that you conducted studies on human participants must with the approval of an appropriate named ethics committee. Please also look at the latest version of the Declaration of Helsinki. Similarly, you must confirm that experiments involving animals adhered to ethical standards and must state the care of animal and licensing guidelines under which the study was performed.

Authorship

We ask all authors to confirm that they have read and approved the paper. Second, we ask all authors to confirm that they have met the criteria for authorship as established by the International Committee of Medical Journal Editors, believe that the paper represents honest work, and are able to verify the validity of the results reported. In addition to those from the ICJME the International Society for Medical Publication Professionals, ISMPP (www.ismpp.org) have produced some useful guidelines on authorship of studies sponsored by companies: Good Publication Practice (GPP2) (www.ismpp.org).

Compliance with NIH and Other Research Funding Agency Accessibility Requirements

A number of research funding agencies now require or request authors to submit the post-print (the article after peer review and acceptance but not the final published article) to a repository that is accessible online by all without charge. As a service to our authors, LWW will identify to the National Library of Medicine (NLM) articles that require deposit and will transmit the post-print of an article

based on research funded in whole or in part by the National Institutes of Health, Wellcome Trust, Howard Hughes Medical Institute, or other funding agencies to PubMed Central. The Copyright Transfer Agreement provides the mechanism.

Copyright assignment

Papers are accepted for publication on the understanding that exclusive copyright in the paper is assigned to the Publisher. Authors are asked to submit signed copyright assignment forms with their paper. They may use material from their paper in other words published by them after seeking formal permission.

Submissions

Authors are strongly encouraged to submit their manuscripts through the web-based tracking system at <http://www.editorialmanager.com/acd>. The site contains instructions and advice on how to use the system. Authors should NOT in addition then post a hard copy submission to the editorial office, unless you are supplying artwork, letters or files that cannot be submitted electronically, or have been instructed to do so by the editorial office. Should authors have difficulty in uploading files contact the Editor, Dr Mels Sluysen at e-mail: m.sluysen@planet.nl in the first instance, but do not send your files.

Double spacing should be used throughout the manuscript, which should include the following sections, each starting on a separate page: Title Page, abstract and keywords, text, acknowledgements, references, individual tables and captions. Margins should be not less than 3 cm. Pages should be numbered consecutively, beginning with the Title Page, and the page number should be placed in the top right hand corner of each page. Abbreviations should be defined on their first appearance in the text; those not accepted by international bodies should be avoided.

Authors are invited to list up to four potential reviewers, including their full addresses, telephone and fax numbers, and e-mail addresses.

PRESENTATION OF PAPERS

Title Page

The Title Page should carry the full title of the paper and a short title to be used as a 'running head' (and which should be so identified). The first name, middle initial

and last name of each author should appear. If the work is to be attributed to a department or institution, its full name should be included. Any disclaimers should appear on the Title Page, as should the name and address of the author responsible for correspondence concerning the manuscript and the name and address of the author to whom requests for reprints should be made. Finally, the Title Page should state conflicts of interest and source of funding, and when none state “none declared”.

Abstracts

The second page should carry a structured abstract of no more than 250 words. The abstract should state the Objective(s) of the study or investigation, basic Methods (selection of study subjects or laboratory animals; observational and analytical methods), main Results (giving specific data and their statistical significance, if possible), and the principal Conclusions. It should emphasise new and important aspects of the study or observations.

Key Words

The abstract should be followed by a list of 3–10 keywords or short phrases which will assist the cross-indexing of the article and which may be published. When possible, the terms used should be from the Medical Subject Headings list of the National Library of Medicine (<http://www.nlm.nih.gov/mesh/meshhome.html>).

Text

Full papers of an experimental or observational nature may be divided into sections headed Introduction, Methods (including ethical and statistical information), Results and Discussion (including a conclusion), although reviews may require a different format.

Acknowledgements

Acknowledgements should be made only to those who have made a substantial contribution to the study. Authors are responsible for obtaining written permission from people acknowledged by name in case readers infer their endorsement of data and conclusions.

References

References should be numbered consecutively in the order in which they first appear in the text. They should be assigned Arabic numerals, which should be given in brackets, e.g. [17], [17, 19-23]. References should include the names of all authors when six or fewer; when seven or more, list only the first six names and add et al. References should also include full title and source information. Journal names should be abbreviated as in MEDLINE (NLM Catalog, <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/nlmcatalog>).

Articles in journals

Standard journal article:

Ravaud A, Bello CL. Exposure–response relationships in patients with metastatic renal cell carcinoma receiving sunitinib: maintaining optimum efficacy in clinical practice. *Anticancer Drugs* 2011; **22**:377–383.

More than six authors:

Umemura S, Yamane H, Yano T, Hoshika T, Shiote Y, Takigawa N, et al. Synchronous double primary lung cancers with different response to pemetrexed. *Anticancer Drugs* 2011; **22**:473–476.

Supplements:

Gianni AM, Berinstein NL, Evans PAS, López-Guillermo A, Solano C. Stem-cell transplantation in non-Hodgkin's lymphoma: improving outcome. *Anticancer Drugs* 2002; **13** (suppl): S35–42.

Books

Book:

DeVita VT, Hellman S, Rosenberg SA. *Cancer: principles & practice of oncology*, 7th edn. Philadelphia: Lippincott Williams & Wilkins, 2005.

Chapter in a book:

Restifo NP, Wunderlich JR. Cancer Immunology. In: DeVita VT, Hellman S, Rosenberg SA, eds. *Cancer: principles & practice of oncology*, 7th edn. Philadelphia: Lippincott Williams & Wilkins, 2005: 139-161.

Personal communications and unpublished work should not feature in the reference list but should appear in parentheses in the text. Unpublished work accepted for publication but not yet released should be included in the reference list with the words 'in press' in parentheses beside the name of the journal concerned. References must be verified by the author(s) against the original documents.

Tables

Each table should be typed on a separate sheet in double spacing. Tables should not be submitted as photographs. Each table should be assigned an Arabic numeral, e.g. (Table 3) and a brief title. Vertical rules should not be used. Place explanatory matter in footnotes, not in the heading. Explain in footnotes all non-standard abbreviations that are used in each table. Identify statistical measures of variations, such as standard deviation and standard error of the mean. Be sure that each table is cited in the text. If you use data from another published or unpublished source, obtain permission and acknowledge the source fully.

Illustrations

References to figures and tables should be made in order of appearance in the text and should be in Arabic numerals in parentheses, e.g. (Fig. 2). Most file formats are accepted, but TIFF and EPS files, with fonts embedded, are preferred. If scanned, line art should be at a resolution of 800 dpi, and halftones and colour at 300 dpi. All colour values should be CMYK. If hard copies are submitted they should have a label pasted to the back bearing the figure number, the title of the paper, the author's name and a mark indicating the top of the figure. Illustrations should be presented to a width of 82 mm or, when the illustration demands it, to a width of 166 mm. Photomicrographs must have internal scale markers. If

photographs of people are used, their identities must be obscured or the picture must be accompanied by written consent to use the photograph. If a figure has been published before, the original source must be acknowledged and written permission from the copyright holder for both print and electronic formats should be submitted with the material. Permission is required regardless of authorship or publisher, except for documents in the public domain. Figures may be reduced, cropped or deleted at the discretion of the editor. Colour illustrations are acceptable but authors will be expected to cover the extra reproduction costs (for current charges, contact the publisher).

Legends for illustrations

Captions should be typed in double spacing, beginning on a separate sheet of paper. Each one should have an Arabic numeral corresponding to the illustration to which it refers. Internal scales should be explained and staining methods for photomicrographs should be identified.

Units of measurement

Measurements of length, height, weight, and volume should be reported in metric units (metre, kilogram, or litre) or their decimal multiples. Temperatures should be given in degrees Celsius. Blood pressures should be given in millimetres of mercury.

All haematologic and clinical chemistry measurements should be reported in the metric system in terms of the International System of Units (SI). Editors may request that alternative or non-SI units be added by the authors before publication.

Abbreviations and symbols

Use only standard abbreviations. Avoid abbreviations in the title and abstract. The full term for which an abbreviation stands should precede its first use in the text unless it is a standard unit of measurement.

Offprints

Offprints may be purchased using the appropriate form that will be made available

with proofs. Orders should be sent when the proofs are returned; orders received after this time cannot be fulfilled.



Copyright 2011, Lippincott Williams & Wilkins. All rights reserved

Published by Lippincott Williams & Wilkins

[Copyright/Disclaimer Notice](#) • [Privacy Policy](#)