

Catarina Sofia Mateus Reis e Silva

**Uso de cromatografia de bioafinidade na
prospecção de substâncias anticâncer em
actinomicetos marinhos: XIAP e STMN1 como
alvos farmacológicos**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em
Farmacologia do Instituto de Ciências Biomédicas da Universidade de
São Paulo, para obtenção do Título de Mestre em Ciências.

São Paulo – 2021

Catarina Sofia Mateus Reis e Silva

**Uso de cromatografia de bioafinidade na prospecção de
substâncias anticâncer em actinomicetos marinhos: XIAP e
STMN1 como alvos farmacológicos**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós
Graduação em Farmacologia do Instituto de Ciências
Biomédicas da Universidade de São Paulo, para
obtenção do Título de Mestre em Ciências.

Área de concentração: Farmacologia

Orientador: Prof. Dr. Leticia Veras Costa Lotufo
Co- Orientador: Prof. Dr. João Agostinho Machado Neto

Versão corrigida.

São Paulo – SP

2021

CATALOGAÇÃO NA PUBLICAÇÃO (CIP)
Serviço de Biblioteca e informação Biomédica
do Instituto de Ciências Biomédicas da Universidade de São Paulo

Ficha Catalográfica elaborada pelo(a) autor(a)

Mateus Reis e Silva, Catarina Sofia
Uso de cromatografia de bioafinidade na
prospecção de substâncias anticâncer em actinomicetos
marinhos: XIAP e STMN1 como alvos farmacológicos /
Catarina Sofia Mateus Reis e Silva; orientador
Leticia Veras Costa Lotufo; coorientador João
Agostinho Machado Neto. -- São Paulo, 2021.
83 p.

Dissertação (Mestrado)) -- Universidade de São
Paulo, Instituto de Ciências Biomédicas.

1. câncer. 2. bioprospecção. 3. xiap. 4. stmnl. 5.
embelina. I. Veras Costa Lotufo, Leticia ,
orientador. II. Machado Neto, João Agostinho ,
coorientador. III. Título.

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOMÉDICAS

Candidato(a): **Catarina Sofia Mateus Reis e Silva**

Título da Dissertação: **Uso de cromatografia de bioafinidade na prospecção de substâncias anticâncer em actinomicetos marinhos: XIAP e STMN1 como alvos farmacológicos**

Orientador: Profa. Dra. Leticia Veras Costa Lotufo

A Comissão Julgadora dos trabalhos de Defesa da Dissertação de Mestrado/Tese de Doutorado, em sessão pública realizada a/...../....., considerou o(a) candidato(a):

() **Aprovado(a)** () **Reprovado(a)**

Examinador(a): Assinatura:
Nome:
Instituição:

Examinador(a): Assinatura:
Nome:
Instituição:

Examinador(a): Assinatura:
Nome:
Instituição:

Presidente: Assinatura:.....
Nome:
Instituição:



Cidade Universitária "Armando de Sales Oliveira", Butantã, São Paulo, SP - Av. Professor Lineu Prestes, 2475 - ICB III - 05508-900
Comissão de Ética em Pesquisa - Telefone: (11) 3081-7721 - e-mail: cep@icb.usp.br

CERTIFICADO DE ISENÇÃO

Certificamos que o Protocolo CEP-ICB nº **968/2018** referente ao projeto intitulado: *"Uso de Cromatografia de Bioafinidade na Prospecção de Substâncias Anticâncer em Actinomicetos Marinhos: XIAP e STMN1 como alvos farmacológicos"* sob a responsabilidade de *Catarina Sofia Mateus Reis e Silva* e orientação do(a) Prof.(a) Dr.(a) *Letícia Veras Costa Lotufo*, do Departamento de Farmacologia, foi analisado pela **CEUA** - Comissão de Ética no Uso de Animais e pelo **CEPSH** - Comitê de Ética em Pesquisa com Seres Humanos, tendo sido deliberado que o referido projeto não utilizará animais que estejam sob a égide da Lei nº 11.794, de 8 de outubro de 2008, nem envolverá procedimentos regulados pela Resolução CONEP nº 466/2012.

São Paulo, 17 de agosto de 2018.


Prof. Dra. **Luciane Valéria Sita**
Coordenadora CEUA ICB/USP



Prof. Dra. **Camila Squarzoní Dale**
Coordenadora CEPSH ICB/USP

Dedico aos meus pais, Antonio Carlos e Silvia, o meu trabalho de dissertação. A relação que temos foi construída e é isso o que a torna tão única e especial. Vocês são o meu mundo hoje e sempre.

AGRADECIMENTOS ÀS AGÊNCIAS DE FOMENTO

O presente trabalho foi financiado pela Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP) através do processo número 2018/06522-2 (bolsa de mestrado) e foi vinculado aos projetos regulares FAPESP através dos processos 2015/17177-6 e 2017/24993-0.

O presente trabalho foi realizado com apoio da Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior - Brasil (CAPES) - Código de Financiamento 001 dentro Programa de Apoio à Pós-Graduação (PROAP).

AGRADECIMENTOS

Agradeço, em especial, à minha orientadora Profa. Dra. Leticia Veras Costa Lotufo por ter sido tão cordial ao responder o e-mail de uma aluna desconhecida e vinda de outra Universidade. Obrigada por ter acreditado em mim ao abrir as portas do seu laboratório para o meu estágio de conclusão de curso e para o mestrado. A felicidade que eu vivenciei em poder estar presente no laboratório que você criou e cultivou com tanto carinho é indescritível.

Ao meu co-orientador Prof. Dr. João Agostinho Machado Neto eu agradeço por ter abraçado o meu projeto e sempre estar tão presente comigo na bancada e por compartilhar o seu conhecimento. Obrigada por me acompanhar de perto e abrir o seu laboratório para que eu também fizesse parte.

Ao Dr. Norberto Peporine Lopes, famoso Betão, e aos membros do Laboratório de Química Orgânica da USP/RP, em especial à Dra. Anelize Bauermeister e a Mestre Eduarda Antunes Moreira muito obrigada por me abrirem o seu laboratório e terem me acompanhado em tantas conversas para aprofundar o entendimento sobre espectrometria de massas.

Ao Prof. Dr. Marcelo José Pena Ferreira e ao Dr. Marcelo Tangerina muito obrigada por confiarem em mim para trabalhar com as amostras de BRB e por me ajudarem com o GNPS ao longo de muitas conversas e alguns dias conturbados.

Aos meus amigos da família Lafarmar eu agradeço por me acompanharem desde o primeiro dia em que cheguei em 2017. Agradeço pelas companhias durante os meus longos períodos sentada purificando proteínas, apenas quem fica pingando gotinha por gotinha na mão sabe o quão cansativo é, por me ajudarem com a centrífuga, me escutarem chorando e quando eu estava feliz. Obrigada por todas as vezes que fomos comer sushi, pedimos pizza salgada com borda doce e os bolos “surpresa” de aniversário. Obrigada especial à Paola Branco que esteve comigo desde o primeiro dia em que me perdi indo até a USP e me acompanhou em toda a saga das IAPs, agradeço pelos conselhos, os choros e todas as caixinhas decoradas que fizemos.

Ao Laboratório de Biologia do Câncer e Antineoplásicos eu agradeço por terem aberto as suas portas para que eu pudesse trabalhar, principalmente no momento incerto em que vivemos, em especial eu gostaria de agradecer à Keli Lima por ter me ajudado e acompanhado nos meus experimentos se mostrando sempre muito prestativa.

Aos meus amigos da graduação eu gostaria de agradecer ao Lag por ter tornado toda essa história possível ao me apresentar a Professora Leticia e o Lafarmar. À Tolima por todas as quintas-feiras, todas as mudanças, todos os sonhos e os ensinamentos. Obrigada por ser o meu porto seguro quando eu estive longe de casa. Ao Halflife por entender as minhas dores e me ajudar nos meus momentos mais difíceis da minha vida pessoal (estou ansiosa para a nossa vila). E ao Viktor por ser o meu melhor amigo e a minha pessoa.

Aos amigos que eu cultivei e me acompanham a mais de 10 anos eu agradeço por me deixarem participar de suas vidas e por estarem presentes na minha. Obrigada por serem a minha família Aninha, Laís, Hitomi, Felipe, Kamilinha e, em especial, a Juliana que é o meu trevo da sorte.

À minha família en la calle La Rioja 633. Obrigada por me ajudarem a enxergar o mundo de uma forma nova e por me salvarem do momento em que eu estava vivendo. Vocês, suas histórias e lutas são a minha inspiração e eu vivo todos os dias lembrando do que vivemos naquela casa lotada. Duda, Zamzi, Laura, Violeta, Itzel, Annel, Emilia, Camilo, Alex, David e Luciano vocês me mudaram para melhor e nossas memórias no norte argentino são *inolvidables*.

Agradeço a todos os meus amigos que se fizeram presentes nestes últimos meses de insegurança seja por chamadas no discord, whatsapp, telegram ou ligações; em especial eu agradeço a Lis, Manda, Gui e Yuri.

E finalmente eu agradeço a mim mesma por ter sido corajosa de trilhar este caminho.

Obrigada.

Espero que a fumaça de bruxaria não saia logo de nossas vistas

Frase modificada de uma carta escrita em 1953 por Maurice Wilkins a James
Watson e Francis Crick

Índice

<i>Lista de figuras</i>	13
<i>Lista de tabelas</i>	14
<i>Lista de abreviaturas</i>	15
<i>Resumo</i>	16
<i>Abstract</i>	18
<i>1. Introdução geral</i>	20
1.1. Considerações gerais sobre os produtos naturais	20
1.2. Produtos naturais e o tratamento do câncer.....	22
1.3. Estratégias de bioprospecção de novos fármacos	25
<i>2. Capítulo 1. Prospecção alvo-direcionada de produtos naturais com afinidade pelas proteínas XIAP e STMN1</i>	30
2.1. Resumo.....	30
2.2. Introdução	31
2.2.1. X- chromosome- linked inhibitor of apoptosis protein (XIAP)	32
2.2.2. Statimina 1	33
2.3. Objetivos	35
2.3.1. Objetivo geral.....	35
2.3.2. Objetivos específicos	35
2.4. Material e métodos.....	35
2.4.1. Extratos de actinomicetos	35
2.4.2. Obtenção das proteínas de interesse.....	38
2.4.3. Ensaio de bioafinidade (HPLC- MS)	41
2.4.4. Análise dos dados obtidos por HPLC-MS/MS em bancos de dados	41
2.5. Resultados e discussão	41
2.5.1. Expressão heteróloga	41
2.5.2. Cromatografia de bioafinidade.....	47
2.5.3. Análise dos dados obtidos por HPLC-MS/MS em bancos de dados	51
2.6. Conclusão	55
<i>3. Capítulo 2. Embelina potencializa a apoptose induzida por venetoclax em células de leucemia aguda</i>	56
3.1. Resumo.....	56
3.2. Introdução	57
3.2.1. Apoptose	57
3.3. Objetivos	61
3.3.1. Objetivo geral.....	61
3.3.2. Objetivos específicos	61
3.4. Material e métodos.....	61
3.4.1. Cultura de células e reagentes químicos	61
3.4.2. Ensaio de MTT para avaliar a viabilidade celular	62
3.4.3. Avaliação do nível de expressão de XIAP	63
3.4.4. Ensaio de apoptose.....	63
3.4.5. Western blot	63
3.4.6. Modelagem computacional	64
3.5. Resultados e discussão	64
3.5.1. Venetoclax e embelina promovem diferentes efeitos citotóxicos nas células leucêmicas.....	64
3.5.2. A combinação de venetoclax e embelina potencializa os efeitos citotóxicos nas células Kasumi 1 e OCI-AML3 por meio da indução de apoptose	67
3.5.3. A embelina potencializa os efeitos da venetoclax por meio da regulação negativa de XIAP e da promoção de dano ao DNA e apoptose em células OCI-AML3.....	71
3.5.4. Ligação da embelina aos domínios BIR2 e BIR3 da XIAP	72
3.6. Conclusão	74
<i>4. Considerações finais</i>	75
<i>5. Atividades realizadas no período</i>	76
5.1. Disciplinas.....	76

5.2. Formação complementar	76
5.3. Participações em congressos	77
5.4. Apresentações de trabalhos	77
5.5. Organização de eventos.....	78
5.6. Trabalhos publicados	78
5.7. Capítulos de livros publicados	78
5.8. Aulas ministradas	78
6. <i>Referências</i>	79

Lista de figuras

1. Introdução Geral

Figura 1.1. Características fundamentais do câncer	23
Figura 1.2. Linha do tempo da aprovação para uso clínico pela agência regulatória americana <i>Food and Drug Administration</i> (FDA) de medicamentos cujo princípio ativo foi obtido ou inspirado em uma substância de um organismo marinho.	24
Figura 1.3. Fluxograma de prospecção de fármacos utilizando em uma abordagem fenotípica (A) ou alvo-dirigida (B). Adaptado de Heilket et al., 2019)	30

2. Capítulo 1

Figura 2.1: Esquema simplificado da técnica de cromatografia bioafinidade.	
Figura 2.2: XIAP na morte celular mediada por FAS / CD95	
Figura 2.3: Via de sinalização Statimina 1	
Figura 2.4: Fotos das placas de LB com canamicina contendo o plasmídeo da BIRC4 referente a XIAP	44
Figura 2.5: Gel de poliacrilamida para avaliar a superexpressão da XIAP	46
Figura 2.6: Géis de poliacrilamida corados com Coomassie Blue mostrando a indução e purificação da proteína STMN1 sob diferentes concentrações de IPTG	48
Figura 2.7: Western Blot para a visualização da purificação da proteína STMN1	49
Figura 2.8: Cromatogramas e espectros de massa para o extrato de 408 ScBm e amostra obtida por cromatografia de bioafinidade deste extrato com a proteína XIAP	50
Figura 2.9: Cromatogramas e espectros de massa para 432 extrato de BDm e amostra obtida por cromatografia de bioafinidade deste extrato com proteína STMN1	51
Figura 2.10: Molecular Network de todos os extratos analisados	55
Figura 2.11: <i>Hit</i> presente em 10.9 min e com m/z de 292.1 para a bactéria 455ISP2m para a XIAP	56
Figura 2.12: <i>Hit</i> presente em 21.7 min e com m/z de 313.1 para a bactéria 432R5Mm para a STMN1	56

3. Capítulo 2

Figura 3.1: Estrutura química das substâncias utilizadas neste estudo: embelina e venetoclax.	61
Figura 3.2: Viabilidade celular do painel de leucemia no tratamento com venetoclax e embelina	65
Figura 3.3: Nível de expressão de XIAP em diferentes linhagens leucêmicas	66
Figura 3.4: Efeitos do tratamento com venetoclax e embelina sob a viabilidade celular de linhagens celulares de leucemia Kasumi 1 e OCI- AML 3	67
Figura 3.5: O tratamento com a combinação de venetoclax e embelina induz apoptose em celulares	69
Figura 3.6: Análise de Western blot para o tratamento em monoterapia e combinação de embelina e venetoclax na linha celular OCI-AML3	71
Figura 3.7: Gráfico plotado demonstrando a pesquisa global em azul escuro e o refinamento local em ciano	72
Figura 3.8: Poses de docking entre os domínios XIAP BIR2 e BIR3 e embelina usando diferentes energias mínimas	73
Figura 3.9: Análise de docking entre os domínios XIAP BIR2 e BIR3 e embelina usando XIAP em sua conformação de tetrâmero	73

Lista de tabelas

Tabela 2.1: Tabela contendo todas as cepas utilizadas, os seus respectivos meios, IC ₅₀ e identificação	39
Tabela 2.2. Resultados da comparação da primeira sequência obtida da proteína expressa com o plasmídeo para a XIAP no banco de dados de proteínas do www.ncbi.nlm.nih.gov/protein .	46
Tabela 2.3. Resultados da comparação da segunda sequência obtida da proteína expressa com o plasmídeo para a XIAP no banco de dados de proteínas do www.ncbi.nlm.nih.gov/protein .	47
Tabela 2.4: Informações referentes às cepas que apresentaram <i>hit</i> específico com a XIAP	52
Tabela 2.5: Informações referentes às cepas que apresentaram <i>hit</i> específico com a STMN1	52

Lista de abreviaturas

7AAD	7- Amino- actinomycina D
ABT- 199	Venetoclax
APS	Persulfato de amônia
ATCC	American Type Cultura Collection
BCL2	Linfoma de células B2
BME	β -mercaptoethanol
BSA	Albumina sérica bovina
DSMZ	Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen
EDTA	Ácido etilenodiamino tetra-acético
GDC-0199	Venetoclax
GNPS	Global Natural Product Social Molecular Networking
H2AX	H2A histone family member γ
HCl	Ácido clorídrico
HPLC-MS	Cromatografia líquida acoplada à espectrometria de massas
IAP	Proteínas inibidoras de apoptose
IGF-1	Fator de crescimento semelhante à insulina tipo 1
IPTG	Isopropyl β -d-1-thiogalactopyranoside
JAK2	Janus kinase 2
LB	Luria bertani
LLA	Leucemia linfoblástica aguda
LMA	Leucemia mielóide aguda
LMC	Leucemia mielóide crônica
MTT	Metiltiazoletetrasolio
NF κ B	Fator nuclear κ B
OD	Densidade ótica
OP18	Oncoproteína 18
PBS	Phosphate-buffered saline
PELE	Protein energy landscape exploration
PMSF	Phenylmethylsulfonyl fluoride
SDS- PAGE	Eletroforese em gel de poliacrilamida com dodecil- sulfato de sódio
STMN1	Stathmin1
TNF- α	Fator de necrose tumoral alfa
TRAIL	TNF-related apoptosis-inducing ligand
UBA	Ubiquitin associated domain
XIAP	X-linked inhibitor of apoptosis

Uso de cromatografia de bioafinidade na prospecção de substâncias anticâncer em actinomicetos marinhos: XIAP e STMN1 como alvos farmacológicos. Autora: Catarina Sofia Mateus Reis e Silva. Orientadora: Leticia Veras Costa Lotufo. Programa de pós-graduação em Farmacologia, ICB-USP.

Resumo

A riqueza dos produtos naturais é proveniente de uma otimização evolutiva de suas funções biológicas distintas que incluem a regulação de mecanismos endógenos de defesa e interação com outros organismos, o que explica a sua relevância para o tratamento de doenças infecciosas e o câncer. O câncer é um conjunto de doenças que pode se iniciar em qualquer tecido ou órgão, caracterizando-se pelo crescimento descontrolado de células que podem invadir outros tecidos e órgãos. Existem proteínas superexpressas em linhagens tumorais que auxiliam na viabilidade e sobrevivência do tumor, como são os casos da XIAP e da Statimina (STMN1), usadas como alvos no presente trabalho. A XIAP é uma proteína da família das proteínas inibidoras de apoptose que, inicialmente, foi identificada como uma proteína que se liga às caspases atuando na apoptose pela via intrínseca e extrínseca, sendo importante na regulação de diversas vias de morte celular e inflamação. A proteína STMN1 primeiramente foi caracterizada como um peptídeo de 18kDa superexpresso em leucemia aguda e linfócitos proliferativos, sendo uma proteína importante na progressão do ciclo celular, segregação cromossomal, mobilidade celular e sobrevivência por conta da sua atuação na desestabilização dos microtúbulos. Este estudo se desenvolveu em duas frentes, uma relacionada ao isolamento novas substâncias moduladoras das proteínas XIAP e STMN1 a partir do extrato de bactérias marinhas coletadas em diferentes pontos da costa brasileira (Descrita no capítulo 1); e uma segunda frente que envolveu o estudo de uma substância natural, embelina, isolada da planta *Embelia ribes*, e descrita na literatura como moduladora da XIAP (Descrita no capítulo 2). Referente ao capítulo 1, ambas as proteínas foram produzidas por expressão heteróloga, tendo o seu protocolo padronizado. A técnica de cromatografia de bioafinidade também se mostrou válida para a prospecção de substâncias que modulem ambas as proteínas sendo obtido ao final *hits* específicos e inespecíficos para ambas as proteínas. O isolamento das substâncias ativas e o seu teste em linhagens leucêmicas não foi possível, no entanto os extratos foram comparados ao banco de dados GNPS, AntiBase e Scifinder. A partir desta análise, foram anotadas duas substâncias correspondendo a dois *hits* identificados na cromatografia de bioafinidade, a

burkholona, que foi identificada quando utilizada a XIAP, e a phthoxazolina A, anotada quando utilizada a STMN1. Contudo não existe na literatura nenhum material relacionado à interação destas substâncias com as proteínas estudadas neste trabalho, que reforça a importância desta estratégia no estabelecimento de alvos para as substâncias citotóxicas. Referente ao capítulo 2, a embelina foi estudada em uma terapia combinada com o venetoclax. O venetoclax (ABT-199) é um fármaco de biodisponibilidade oral que inibe BCL2 seletivamente e foi aprovado para uso em 2016 para tratamento de leucemia linfocítica crônica. O presente estudo verificou que a combinação de venetoclax e embelina reduz a viabilidade das células derivadas de leucemia mieloide aguda (LMA) ao desencadear a apoptose, a regulação negativa de XIAP e o dano ao DNA induzido. Devido à baixa toxicidade da embelina, essa substância pode ser usada em combinação para reduzir as doses de venetoclax, o que poderia minimizar os efeitos colaterais com manutenção da resposta terapêutica ou até mesmo reverter mecanismos de resistência em pacientes com LMA. Nossas descobertas reforçam que ainda mais os medicamentos direcionados às IAPs são uma opção anticâncer putativa para a LMA.

Palavras-chave: produtos naturais, leucemia apoptose, prospecção alvo-direcionada

Use of bioaffinity chromatography to prospect for anticancer substances in marine actinomycetes: XIAP and STMN1 as pharmacological targets. Author: Catarina Sofia Mateus Reis e Silva. Supervisor: Leticia Veras Costa Lotufo. Graduation program in Pharmacology, ICB-USP.

Abstract

The richness of natural products comes from an evolutionary optimization of their distinct biological functions, which include the regulation of endogenous defense mechanisms and interaction with other organisms, which explains their relevance for the treatment of infectious diseases and cancer. Cancer is a set of diseases that can start in any tissue or organ, characterized by the uncontrolled growth of cells that can invade other tissues and organs. There are overexpressed proteins in cancer cell lines that assist in tumor viability and survival, as are the cases of XIAP and STathmina (STMN1), used as targets in the present study. XIAP is a protein from the apoptosis inhibiting protein family and was initially identified as a protein that binds to caspases acting inhibiting apoptosis by the intrinsic and extrinsic pathway, being important in the regulation of several pathways of cell death and inflammation. STMN1 was first characterized as an 18kDa peptide overexpressed in acute leukemia and proliferative lymphocytes, being an important protein in the progression of the cell cycle, chromosomal segregation, cell mobility and survival because of its role in destabilizing microtubules. This study was developed in two fronts, one related to the isolation of new substances modulating the proteins XIAP and STMN1 from the extract of marine bacteria collected in different points of the Brazilian coast (Described in chapter 1); and a second that involved the study of a natural substance, embelin, isolated from the *Embelia ribes* plant, described in the literature as a modulator of XIAP (described in chapter 2). Regarding chapter 1, both proteins were produced by heterologous expression, and their protocol was standardized. The functional chromatography technique also proved to be valid for the prospecting of substances that modulate both proteins, with specific and unspecific *hits* for both being obtained at the end. The isolation of the active substances and their testing in leukemia cell lines was not possible, however the extracts were compared to the GNPS, AntiBase and Scifinder database. Based on this analysis, two substances were annotated, corresponding to two hits identified in the functional chromatography, burkholone, which was identified when using XIAP, and phthoxazolin A, annotated when using STMN1. However, there is no

information in the literature relating to the potential interaction of these substances with the proteins studied in this work, which reinforces the importance of this strategy in the establishment of targets for cytotoxic substances. Referring to Chapter 2, embelin was studied in a combination therapy with venetoclax. Venetoclax (ABT-199) is an oral bioavailability drug that selectively inhibits BCL2 and was approved for the treatment of chronic lymphocytic leukemia. We found that the combination of venetoclax and embelin reduces the viability of acute myeloid leukemia (AML) cells by triggering apoptosis, XIAP down-regulation and DNA damage induced. Due to the low toxicity of embelin, this drug can be used in combination to reduce doses of venetoclax, which could minimize side effects with maintaining therapeutic response or even reverse resistance mechanisms in AML patients. Our findings further highlight drugs targeting IAP as a putative anticancer option for AML.

Keywords: natural products, leukemia, apoptosis, target-oriented bioprospection

1. Introdução geral

1.1. Considerações gerais sobre os produtos naturais

As plantas medicinais têm sido utilizadas como fonte de agentes terapêuticos por séculos e atualmente seguem sendo fonte de novos fármacos. Os primeiros registros existentes do uso de plantas na medicina datam de 2600 a.C. na Mesopotâmia. Outras civilizações também deixaram material escrito como documentos de 1550 a.C. da medicina egípcia e documentos de um milênio a.C. da medicina Indiana e Chinesa¹. Os produtos naturais são caracterizados por uma abundante diversidade e complexidade estrutural apresentando, normalmente, uma maior massa molecular, um maior número de átomos de carbono sp³ e átomos de oxigênio, contudo um menor número de átomos de nitrogênio e halogênio, um maior número de ligação de hidrogênio e uma maior rigidez molecular se comparados a uma biblioteca de produtos sintéticos. A riqueza dos produtos naturais é proveniente de uma otimização evolutiva de suas funções biológicas distintas que incluem a regulação de mecanismos endógenos de defesa e interação com outros organismos, o que explica a sua relevância para o tratamento de doenças infecciosas e câncer^{2,3}.

A descoberta racional de novos fármacos de origem natural se iniciou no começo do século 19 quando o alemão Friedrich Sertürner foi capaz de isolar uma substância analgésica e indutora do sono do ópio ao qual ele chamou de *morphium* (morfina), do Deus grego dos sonhos Morpheus, levando à publicação de um extenso artigo detalhando o isolamento, cristalização, estrutura e as propriedades farmacológicas do novo fármaco. A síntese química de produtos naturais foi o próximo passo com a produção do ácido salicílico em 1853. E a descoberta da penicilina em 1928 deu início a uma nova era na descoberta de novos fármacos provenientes de microrganismos¹.

Neste contexto, os organismos marinhos passaram a ser estudados de forma sistemática a partir da segunda metade do século 19, sendo o isolamento de nucleosídeos bioativos da esponja caribenha *Tethya crypta*, a primeira importante descoberta de uma substância de origem marinha para a farmacologia⁴. De fato, o isolamento das espongouridina e espongotimidina permitiu a entrada dos produtos naturais dentro da farmacologia por meio dos seus análogos que originaram os fármacos Ara-C (Citarabina®) e Ara-A (Vidarabina®) que são utilizados em clínica desde do final da década de 60, inaugurando o conceitos dos fármacos anti-metabólicos na terapêutica^{2,5}.

Os oceanos ocupam mais de 70% da superfície terrestre e 32 dos 33 filos de animais estão presentes na esfera aquática⁴. O Brasil, por sua vez, detém a segunda maior costa contínua no mundo, totalizando quase 8.500km; além da costa também apresenta 5 conjuntos de ilhas oceânicas que compreendem a 950 km², abrigando uma rica diversidade a ser estudada⁶.

O ambiente marinho é um complexo sistema que apresenta variações em luminosidade, níveis de oxigênio, temperatura, pH, pressão e salinidade, o que levou a seleção de organismos com características evolutivas peculiares. Dentre outras características, esses organismos possuem vias de biossíntese diversas que produzem metabólitos secundários com níveis de complexidade estrutural fascinantes⁷. Neste contexto, esponjas, tunicados, moluscos não calcários e microrganismos como bactérias, cianobactérias e fungos tem se mostrado extremamente profícuos na produção de metabólitos secundários com potencial farmacológico relevante².

Os produtos naturais marinhos apresentam uma diversidade de alvos moleculares impressionante. Animais sésseis, com capacidade de locomoção reduzida, sem estruturas físicas de defesa e de corpo macio como esponjas não calcárias, ascídias, algas, entre outros, são aqueles que apresentam grande partes das moléculas que, atualmente, encontram-se em testes clínicos e pré-clínicos. A função fisiológica destas moléculas deve assegurar a sobrevivência da espécie que não pode mover-se de seu predador e não dispõe de barreira física para detê-lo, desta forma o sucesso de sua sobrevivência deve-se a estas moléculas. A diversidade química dessas moléculas associada a abundância de alvos terapêuticos oferece uma grande gama ainda não explorada de possíveis novos fármacos^{2,5}.

Os oceanos contêm ainda uma diversidade inimaginável de microrganismos, e dentre estes podemos evidenciar as bactérias marinhas, que têm se mostrado valiosas na sua capacidade de sintetizar novas substâncias que são interessantes para o desenvolvimento de fármacos inéditos. Entre os anos de 1997 e 2008 foram identificados por volta de 660 novas substâncias de origem bacteriana, sendo destes 40% do filo das *Actinobacteria* e 33% de *Cyanobacterias*. Os membros do filo das actinobactérias exibem uma capacidade singular na produção de novos fármacos, no tratamento do câncer estes compostos pertencem a diversas classes estruturais como os peptídeos não ribossomais, macrolídeos, antraciclinas e os terpenóides. Esses metabólitos secundários apresentam funções específicas provenientes da relação entre microrganismos, sendo produzidos em condições específicas⁸.

1.2. Produtos naturais e o tratamento do câncer

O câncer é um conjunto de doenças que pode se iniciar em qualquer tecido ou órgão, caracterizando-se pelo crescimento descontrolado de células que podem invadir outros tecidos e órgãos. O câncer é a segunda maior causa de morte, atingindo globalmente, em 2020, um total de 10 milhões de mortes associadas a esta doença⁹.

As células tumorais são defeituosas nos circuitos regulatórios que administram a proliferação e homeostase em células normais. Existem alterações necessárias nas células normais para que elas se classifiquem como uma célula tumoral como o seu crescimento independente de sinais de crescimento, a insensibilidade da célula aos fatores que impedem o crescimento, evasão da morte celular programada, capacidade replicativa ilimitada, angiogênese, invasão tecidual e metástase (Figura 1.1). Ao longo do processo de transformação de uma célula tumoral, ela vai acumulando mutações que permitem a sua sobrevivência. O aumento do número de células é determinado não apenas pela proliferação celular, mas também pela capacidade de evadir a morte celular programada. A morte celular programada pode ser ativada como resposta ao estresse fisiológico que as células tumorais encontram ao longo da tumorigênese ou ao estresse ocasionado pelo tratamento¹⁰. Desta maneira, a cascata de sinais de morte celular programada, ou apoptose, irá culminar na morte da célula, sendo que esta maquinaria pode ser dividida em duas classes de componentes: sensores e efetores. Os sensores são responsáveis pela monitoração do ambiente extracelular e intracelular. A célula tumoral é capaz de replicar-se ilimitadamente graças a três fatores adquiridos: autonomia de crescimento sem os sinais de crescimento, insensibilidade a sinais que impedem o crescimento e evasão da morte celular programada¹¹.

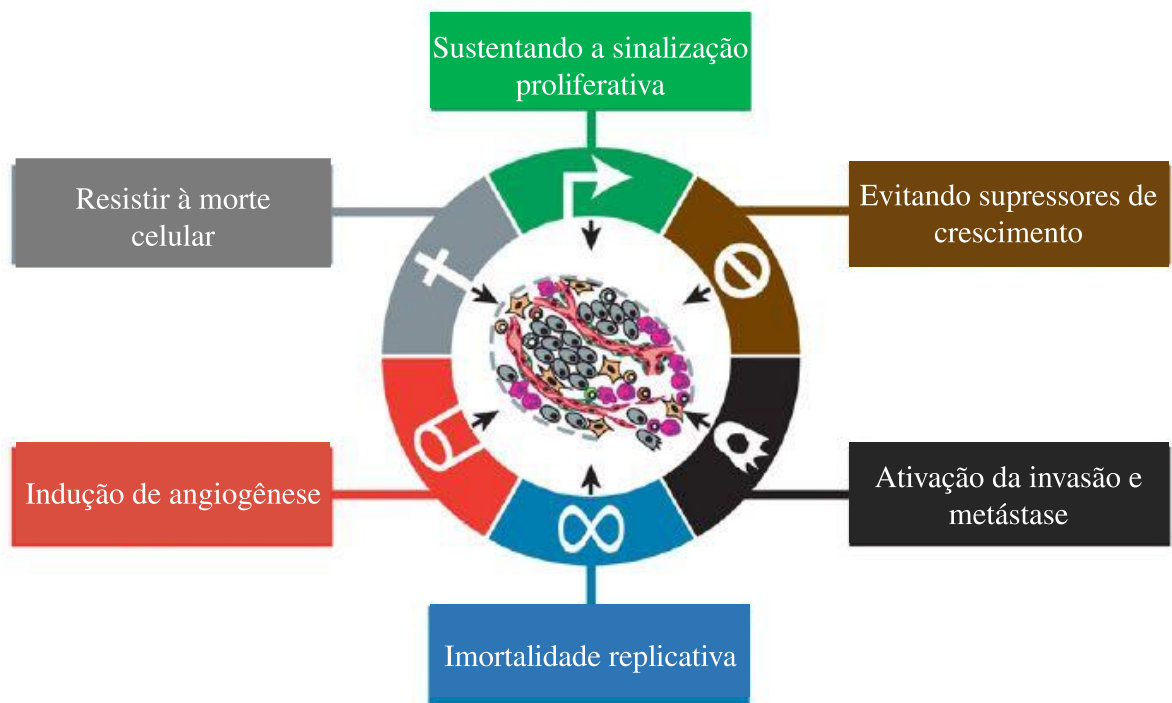


Figura 1.1: Características fundamentais do câncer.
 Figura editada.
 Fonte: Hanahan & Weinberg, 2011

A capacidade que células tumorais apresentam de evadir a apoptose contribui para o crescimento e progressão do tumor. Células tumorais são capazes de realizar isso por meio da desregulação da cascata de sinais que leva à apoptose. A apoptose apresenta uma via de ativação intrínseca ou via extrínseca do receptor de morte que é iniciada por receptores de morte extracelulares como TRAIL, FAS e TNF- α e a via de estímulos intracelulares como a hipóxia, estresse oxidativo, dano genético irreparável e privação de nutrientes¹².

O conhecimento da biologia tumoral é fundamental para possibilitar a descoberta de substâncias que possam interromper o desenvolvimento do tumor primário, e principalmente, de metástases. A chamada quimioterapia clássica trouxe inicialmente como alvos terapêuticos o próprio DNA, enzimas associadas à sua duplicação, como a timidilato sintase e as topoisomerasas I e II, e a tubulina. E foram substâncias de origem natural que tiveram um papel decisivo no desenvolvimento desses quimioterápicos ditos clássicos, como por exemplo as antraciclinas, os alcalóides da vinca e os taxanos, dentre outros¹³.

Já os produtos naturais marinhos ganharam um interesse especial ao longo dos anos, não apenas pela diversidade estrutural, mas principalmente por interagirem com alvos biológicos únicos, ou ainda, por deflagrar mecanismos de respostas diferentes daqueles observados com os fármacos de outras origens². Existem, até o presente momento, quinze fármacos de origem marinha aprovados para uso clínico, sendo dez deles utilizados no tratamento do câncer. São eles: citarabina (Cytosar-U®, 1969), mesilato de eribulina (Halaven®, 2010), brentuximabe vedotina (Adcetris®, 2011); trabectedina (Yondelis®, 2015), Panobinostat (Farydak®, 2015); plitidepsina (Aplidin®, 2018 apenas na Austrália); Enfortumab Vedotin-ejfv (PADCEV™, 2019); Polatuzumab vedotin (DCDS-4501A) (Polivy™, 2019); Belantamab Mafodotin-blmf (Blenrep™, 2020) e Lurbinectedin (Zepzelca™, 2020)^{14,15}. É interessante observar que enquanto entre a aprovação do Cytosar-U® e a do Halaven® passaram-se 41 anos, nos últimos cinco anos, cinco novos fármacos foram aprovados para uso no tratamento do câncer (Figura 1.2).

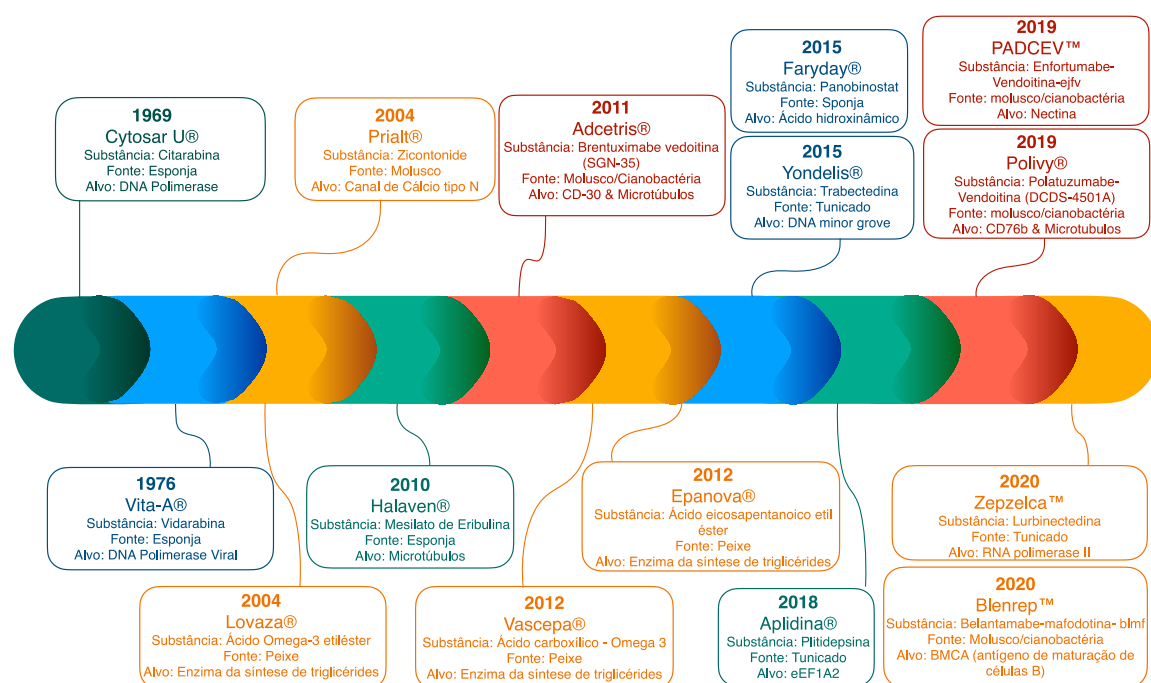


Figura 1.2: Linha do tempo da aprovação para uso clínico pela agência regulatória americana *Food and Drug Administration* (FDA) de medicamentos cujo princípio ativo foi obtido ou inspirado em uma substância de um organismo marinho. *Aplidina foi aprovada apenas pela agência regulatória da Austrália.

Fonte: Dados obtidos de <https://www.marinepharmacology.org/approved>

O desenvolvimento de novos fármacos a partir de produtos naturais apresentam dificuldades relacionadas à disponibilidade limitada e complexidade estrutural dessas moléculas. Os produtos naturais, muitas vezes, são produzidos em quantidades-traço e a biomassa é limitada para obtenção de quantidades suficientes de substâncias para garantir o suprimento adequado para o desenvolvimento pré-clínico e clínico¹⁶. Além disso, a elevada toxicidade dessas substâncias também dificultou muito o avanço do seu desenvolvimento e a sua eventual aprovação pelas Agências de Vigilância Sanitária dos diferentes países.

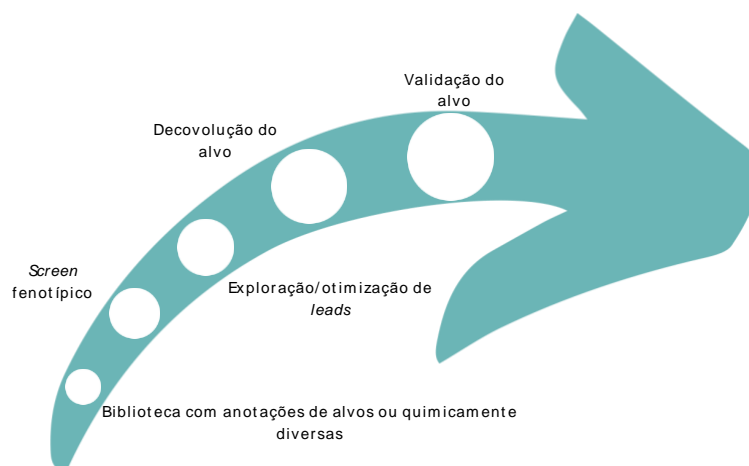
Há que se ressaltar, que a história do desenvolvimento das substâncias marinhas em uso clínico nos apresenta diferentes estratégias de superação dessas limitações. Com relação ao suprimento, destaca-se a obtenção da trabectedina por semi-síntese a partir da cianosafracina produzida por uma bactéria, e o elegante processo de simplificação molecular da obtenção da eribulina a partir da halicondrina, viabilizando um processo de síntese economicamente viável para o desenvolvimento do Yondelis® e do Halaven®, respectivamente. Com relação à toxicidade, o acoplamento da auristatina E, derivada da dolastatina produzida pelo molusco *Dolabella auricularia*, num anticorpo de reconhecimento de proteínas superexpressas nas células tumorais, como CD30 em células de linfoma no Adcetris®, direcionou as substâncias para as células-alvo, reduzindo significativamente a toxicidade sistêmica do medicamento. Uma descrição detalhada destes processos encontra-se na revisão de Jimenez e colaboradores². E esse conhecimento acumulado ao longo dos anos é o principal responsável pela aceleração no desenvolvimento de medicamentos de origem marinha.

1.3. Estratégias de prospecção de novos fármacos

O processo de descoberta de um novo fármaco normalmente inicia-se em resposta a necessidade de estabelecer ou melhorar o tratamento de uma doença. Nesse sentido, os conhecimentos fisiológicos, genéticos e químicos da doença em questão levam a identificação de potenciais marcadores biológicos que podem ser interessantes do ponto de vista farmacológico. Esse acúmulo de conhecimento da fisiopatologia e vias de sinalização envolvidas nas doenças, levou ao desenvolvimento de uma série de abordagens alvo-dirigidas para a descoberta de novos fármacos, em contraponto aos chamados ensaios fenotípicos, isto é abordagens baseadas na observação da resposta biológica, que passaram a ser, primariamente, utilizados para confirmação e avaliação de segurança¹⁷. Na verdade,

existe uma ampla discussão na literatura sobre as vantagens e desvantagens do uso de técnicas alvo-direcionadas frente às chamadas técnicas fenotípicas (Figura 1.3).

A



B



Figura 1.3. Fluxograma de prospecção de fármacos utilizando em uma abordagem fenotípica (A) ou alvo-dirigida (B). Adaptado de Heilket et al., 2019)

A descoberta de novos fármacos por meio de uma abordagem fenotípica utiliza ensaios empíricos para identificar moléculas ativas que atuam por mecanismos não trabalhados antes e o seu sucesso na descoberta de novos fármacos é fundado em características como a entrega direta de substâncias ativas, a identificação de novos alvos ou mecanismos de ação e a opção por polifarmacologia; enquanto ensaios alvo-direcionados não são capazes de recriar o ambiente de um alvo, os ensaios fenotípicos

conseguem acessar este alvo no seu ambiente ^{18 19}. Os ensaios fenotípicos são importantes na descoberta de novos fármacos, tendo sido muito utilizados nos primórdios da descoberta e podendo contribuir para encontrar-se pistas que fornecem a eficácia desejada, para aumentar o conhecimento da doença e identificar os potenciais marcadores biológicos. Estes ensaios mensuram um fenótipo em um sistema fisiológico e são todos os ensaios pré-clínicos que utilizam sistemas fenotípicos como animais, células e vias bioquímicas; provendo um método empírico para explorar os efeitos em sistemas biológicos ¹⁷.

Previamente à revolução genética os medicamentos eram identificados, primariamente, por uma abordagem em que se encontravam a substância primeiramente, contudo com o avanço da tecnologia um novo paradigma para a descoberta de novos fármacos é que o alvo farmacológico é um marcador biológico para a doença. Neste paradigma, características centrais são a identificação da molécula que liga-se ao alvo e a otimização das propriedades farmacêuticas, exemplo: se a concentração do fármaco no corpo é suficiente para que o fármaco se ligue ao alvo ^{18 17}.

Em relação à identificação do alvo molecular, os ensaios fenotípicos podem auxiliar na exploração de novas proteínas que possam ser utilizadas, novos mecanismos de ação e abordam novos eventos de sinalização que outros cientistas não tenham estudado antes; já que estes ensaios apresentam o potencial de trabalhar diferentes alvos em paralelo, a probabilidade de uma polifarmacologia de sucesso aumenta conforme os alvos dividem sítios de ligação relacionados e/ou se os alvos engajados agem de forma sinérgica em uma rede relevante para a doença. Ao final para a validação de um alvo molecular existe uma estrutura a ser compreendida sendo a exposição ao sítio de ação, demonstração da ocupação do alvo, prova da mecânica farmacológica e o uso de ensaios fenotípicos são relevantes para a doença ^{19 20}.

Muitos dos medicamentos que foram descobertos por meio de ensaios visando o alvo molecular recorreram a ensaios fenotípicos adicionais para priorizar os ativos e identificar candidatos com eficiência funcional, sendo eles também utilizados para avaliar a segurança de uma nova substância. Por este motivo a utilização de ensaios fenotípicos e alvo-dirigidos são complementares e podem ajudar no avanço da ciência. No momento em que um alvo para a substância ativa, que foi encontrada durante os ensaios fenotípicos, é identificado os ensaios alvo-direcionados são capazes de complementar um ao outro. Ensaios focados no alvo, sejam bioquímicos ou biofísicos, são mais adequados para otimização de *leads*, ajudando a iluminar o mecanismo de ação da molécula nos compostos testados e habilitam a quantificação de constantes de ligação e cinéticas, enquanto os

ensaios fenotípicos são importantes para elucidar a ação do ativo em um contexto relevante fisiologicamente^{18 19}.

A escolha da proteína de interesse é crucial para o sucesso do processo de prospecção alvo direcionada. Inicialmente, deve-se definir a proteína-alvo com base no seu papel na doença que se pretende modular (Bunnage et al., 2015 – Nat Chemical Biology). Alterações moleculares das células neoplásicas podem definir a ativação/inativação de vias de sinalização, resultando na vantagem seletiva do crescimento tumoral. Dessa forma, grandes esforços têm sido feitos na tentativa de desenvolver terapias-alvos que atuem em vias de sinalização que participem da proliferação e sobrevivência celular. No presente estudo, duas proteínas foram selecionadas com alvo, a XIAP (X-chromosome-linked inhibitor of apoptosis protein) e a Statimina 1 (STMN1), que serão descritas em detalhe a seguir.

Essas proteínas foram selecionadas, entre outras coisas, pelo seu relevante papel nas leucemias. As leucemias são neoplasias dos glóbulos brancos caracterizadas pelo acúmulo de células tumorais na medula óssea. Existem mais de doze tipos de leucemia, sendo que as quatro principais são a leucemia mieloide aguda (LMA), leucemia linfoblástica aguda (LLA), leucemia mieloide crônica (LMC) e leucemia linfocítica crônica e a nomenclatura é referente ao tipo de célula sanguínea em que a neoplasia se originou e à sua taxa de crescimento e capacidade de diferenciação. São estimados 10.810 novos casos para cada ano do triênio no Brasil e o número de mortes conforme o Atlas de Mortalidade por Câncer de 2018 foi de 7.218²¹.

Desta maneira, este estudo se desenvolveu na busca de novas terapias para leucemia a partir de produtos naturais utilizando uma estratégia alvo-direcionada. No primeiro capítulo, utilizamos o modelo de cromatografia de bioafinidade para realização de prospecção de substâncias moduladoras das proteínas XIAP e STMN1 a partir do extrato de bactérias marinhas coletadas em diferentes pontos da costa brasileira. Esse estudo teve implicações inovadoras como a implementação desta técnica para as duas proteínas-alvos, além do acesso a uma fonte de produtos naturais ainda pouco explorada.

O segundo capítulo foi construído com base numa abordagem fenotípica para avaliar a eficácia do uso de uma substância natural moduladora da XIAP, a embelina, isolada da planta *Embelia ribes*, em modelos de células leucêmicas. No sentido de potencializar a sua eficácia, a substância moduladora de XIAP foi associada a uma segunda substância, o venotoclax, que é moduladora de BCL2 e já aprovada para uso clínico, e que

tem no aumento da expressão das proteínas anti-apoptóticas como a própria XIAP, seu principal mecanismo de resistência.

2. Capítulo 1. Prospecção alvo-direcionada de produtos naturais com afinidade pelas proteínas XIAP e STMN1

2.1 Resumo

Os organismos marinhos apresentam vias de biossíntese diversas relacionadas à produção de metabolitos secundários com diversidade e complexidade estruturais fascinantes, refletindo sua capacidade de ocupar com sucesso diferentes habitats. Estes metabolitos secundários são fontes interessantes de novos fármacos e para desvendá-los existem diferentes estratégias de prospecção, dentre elas a abordagem alvo-direcionada. No presente trabalho utilizamos uma técnica de prospecção alvo-direcionada chamada cromatografia de bioafinidade (ou cromatografia funcional). As proteínas *X-chromosome-linked inhibitor of apoptosis protein* (XIAP) e *statimina 1* (STMN1) foram selecionadas como alvos por sua relevância na manutenção da proliferação sustentada e sobrevivência em diversos tumores, inclusive os hematológicos como leucemias e linfomas. O objetivo deste projeto foi encontrar substâncias naturais que interajam com essas duas proteínas, XIAP e/ou STMN1. A expressão heteróloga de ambas as proteínas foi padronizada assim como a técnica de cromatografia de bioafinidade onde foram analisados 38 extratos sendo obtidos *hits* específicos e inespecíficos com ambas as proteínas. Os dados obtidos do HPLC-MS/MS contendo as informações dos extratos brutos e dos extratos com as proteínas foram analisados comparando com os bancos de dados do GNPS - com o uso da ferramenta dereplicator-, AntiBase e Scifinder. Essa estratégia permitiu atribuir anotações a dois dos *hits* identificados. O íon m/z 292,1 com tempo de retenção 10,9 min foi recuperado do extrato da bactéria BRB455 cultivada em meio ISP2m com a resina funcionalizada com XIAP. A comparação do perfil de fragmentação sugeriu que este íon seja compatível com a presença da substância burkholona. Já o íon m/z 313,1 com tempo de retenção 21,7 min foi recuperado do extrato da bactéria BRB432 cultivada em meio R5m com a resina funcionalizada com a STMN1. A comparação do perfil de fragmentação sugeriu que este íon seja compatível com a presença da substância phthoxazolina A. Ambas as substâncias foram previamente isoladas de bactérias. Contudo não existe na literatura nenhum dado sobre a potencial interação destas substâncias com as proteínas estudadas neste trabalho, mas a atividade citotóxica já foi descrita para phthoxazolina A. Esses dados abrem novas possibilidades de estudo dessas substâncias, e reforçam a importância desta estratégia no estabelecimento de alvos para as substâncias citotóxicas.

2.2. Introdução

A prospecção alvo-direcionada vem assumindo uma importância crescente na descoberta de novos fármacos, buscando atrelar a descoberta de novas substâncias bioativas com a modulação de alvos terapêuticos relevantes em várias doenças. De modo interessante, é no estudo de novas terapias para o tratamento do câncer que essa abordagem vem se mostrando mais promissora^{19,20}.

Recentemente, pesquisadores americanos desenvolveram uma técnica de cromatografia de bioafinidade baseada na funcionalização de uma resina com uma proteína de interesse, sendo capaz de recuperar substâncias com afinidade pelo alvo-selecionado a partir de misturas complexas²²⁻²⁴. De modo interessante, a interação com o alvo *per se* não define a atividade biológica. Num trabalho utilizando esta técnica tendo a proteína p97, uma ATPase implicada em vários processos biológicos, como alvo, foram recuperadas 3 substâncias, rheomodina, 1-hidroxidehidroherbarina e phomapirrolidona A, sendo que todas interagem com o mesmo alvo, mas com mecanismos de ação distintos²³. Na cromatografia de bioafinidade, a resina é ligada à proteína de interesse que é utilizada como alvo para o extrato, oferecendo especificidade para o alvo do produto natural (Figura 2.1). O uso em conjunto desta técnica com a cromatografia em sílica gel convencional propicia um avanço na descoberta de novos fármacos²².

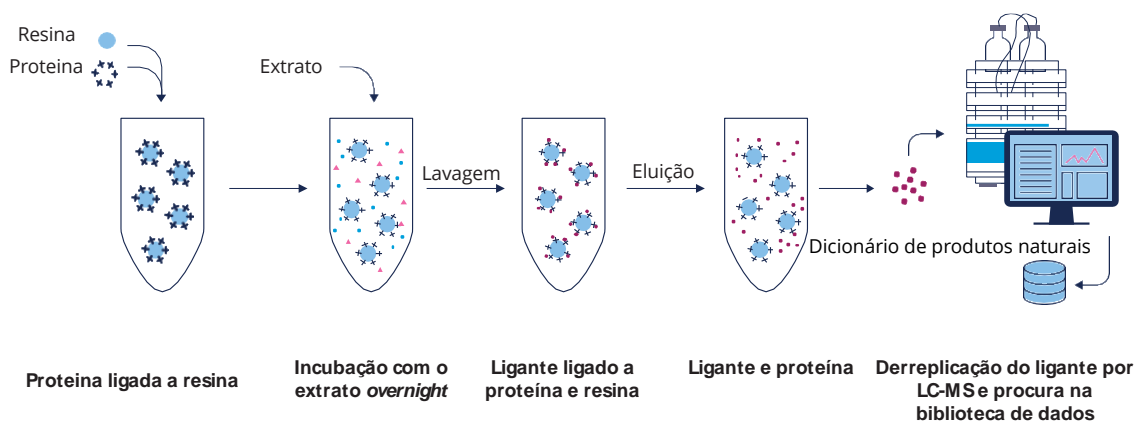


Figura 2.1: Esquema simplificado da técnica de cromatografia de bioafinidade.
Fonte: autor.

Visando a prospecção alvo-direcionada de substâncias para tratamento de tumores hematológicos, as proteínas *X-chromosome-linked inhibitor of apoptosis protein* (XIAP) e statimina (STMN1) foram selecionadas como alvos para a prospecção de substâncias

moduladoras utilizando a cromatografia de bioafinidade. Ambas as proteínas têm um papel estabelecido na manutenção da proliferação sustentada e sobrevivência em diversos tumores, inclusive os hematológicos como leucemias e linfomas^{25,26}.

2.2.1. X- chromosome- linked inhibitor of apoptosis protein (XIAP)

XIAP é uma proteína da família das proteínas inibidoras de apoptose(IAP) que, inicialmente, foi identificada como uma proteína que se liga às caspases atuando na apoptose pela via intrínseca e extrínseca, sendo importante na regulação de diversas vias de morte celular e inflamação²⁷.

A família das proteínas inibidoras de apoptose (IAPs) é importante no processo de morte celular e inflamação, contudo a XIAP é a única proteína da família capaz de suprimir a apoptose por meio de uma ligação direta às caspases (Figura 2.2). A apoptose é uma forma de morte celular programada importante para o desenvolvimento normal e homeostase do organismo, podendo ser iniciada por sinais que levam a sua via intrínseca ou extrínseca. A via extrínseca da apoptose é ativada por ligantes que induzem a apoptose como o Fas(FasL) e o fator de necrose tumoral(TNF- α) interagem com os seus respectivos receptores. A via intrínseca é induzida por sinais internos, como o dano em DNA, mas também pode ser ativada a partir de estímulos extrínsecos. Ambas as vias necessitam da atuação das caspases, sendo elas organizadas em caspases iniciadoras (caspase-2, -8, -9 e -10) e caspases efetoras (caspase-3, -6 e -7). As caspases 8 e 10 são clivadas seguindo sinais extrínsecos, enquanto a caspase 9 é ativada graças a via intrínseca mediada pela mitocôndria. Existem oito IAPs presentes em humanos e elas se caracterizam por conter de um a três domínios BIR (*baculoviral IAP repeats*) que funcionam como local de interação entre proteínas. A XIAP também apresenta um domínio UBA (*ubiquitin-associated*) e um domínio RING. O domínio BIR3 da XIAP liga-se diretamente à caspase 9 e a região de ligação entre os domínios BIR1 e BIR2 é responsável pela inibição das caspases 3 e 7. Uma diversidade de tumores superexpressam XIAP permitindo que a célula tumoral evite a apoptose, como é o caso da leucemia²⁵.

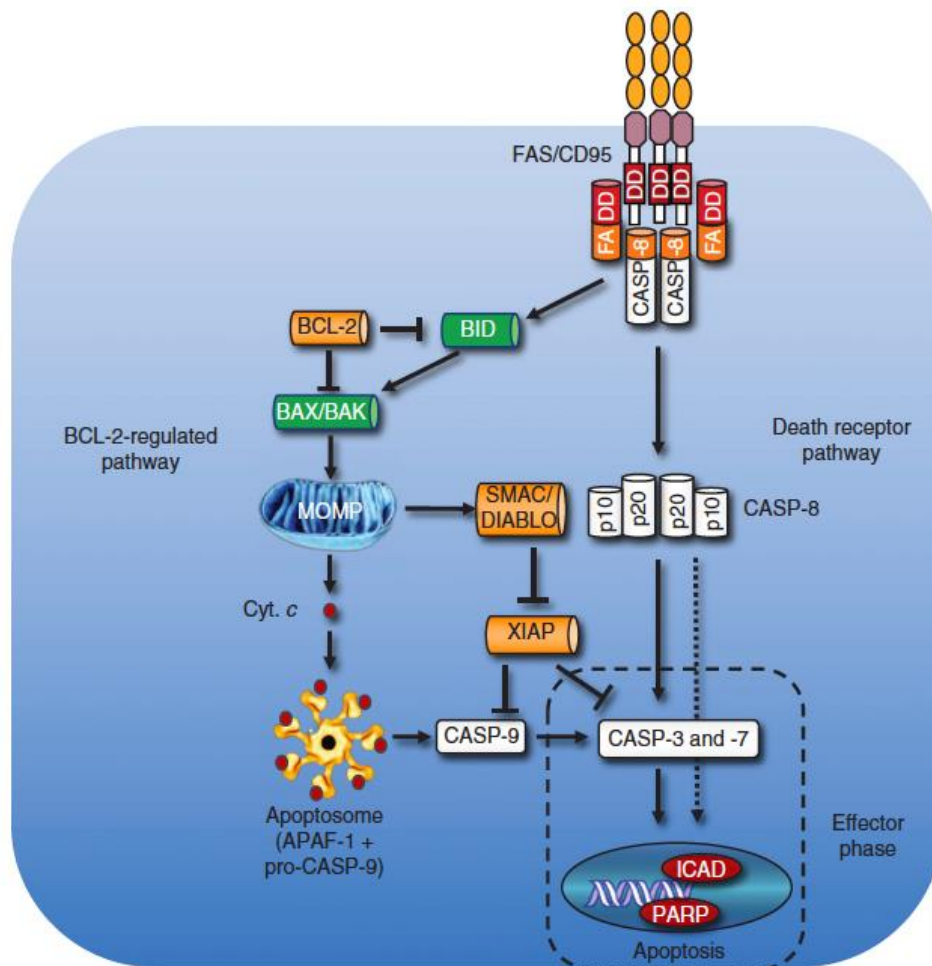


Figura 2.2: XIAP na morte celular mediada por FAS/CD95. O pool de XIAP define a propensão das células a sofrerem morte celular por apoptose em resposta ao estresse celular extrínseco como ativação FAS/CD95. XIAP impede a atividade de caspases processadas e, assim, aumenta o limiar para ativação de apoptose. O próprio XIAP é mantido sob controle por fatores pró-apoptóticos liberados de mitocôndrias como SMAC/DIABLO que se ligam e impedem sua atividade. Tipos de células com altos níveis de XIAP, como hepatócitos, requerem amplificação de um sinal de morte celular mediado por FAS/CD95 via dependente de BID potencial de membrana externa mitocondrial (MOMP) e subsequente liberação de SMAC/DIABLO para inibir XIAP função e, assim, permitir a ocorrência de apoptose. (Cyt. C) citocromo c.

Fonte: Jost & Vucic, 2020

2.2.2. Statimina 1

A Statimina 1 (STMN1) primeiramente foi caracterizada como um peptídeo de 18kDa superexpresso em leucemia aguda e linfócitos proliferativos²⁸. É uma proteína importante na progressão do ciclo celular, segregação cromossomal, mobilidade celular e sobrevivência por conta da sua atuação na desestabilização dos microtúbulos. A superexpressão da STMN1 foi reportada em células hematopoiéticas malignas e a sua inibição diminui o potencial proliferativo em células de leucemia. A STMN1 é uma

fosfoproteína citoplasmática também conhecida como oncoproteína 18(OP18), pertencente à família das Statiminas. A fosforilação da STMN1 em alguns sítios de serina específicos (16 e/ou 63) reduz a afinidade da STMN1 e os heterodímeros de alpha/beta-tubulina, sendo este um mecanismo importante de sua regulação. Ao longo do processo da mitose a dinâmica precisa dos microtúbulos é necessária para o sucesso da progressão do ciclo celular. Doenças hematológicas malignas caracterizam-se pela falta de regulação em vias de sinalização diversas o que dificulta a terapia. A STMN1 integra diversas vias de sinalização que se encontram alteradas em células malignas(Figura 2.3)²⁸.

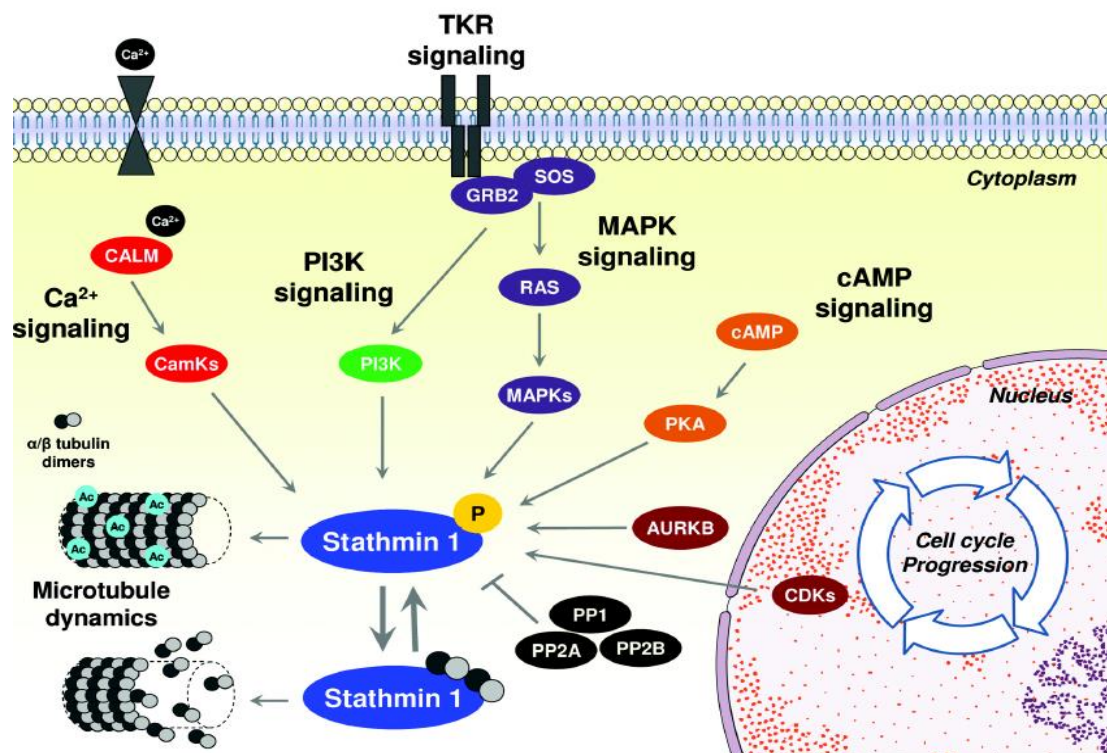


Figura 2.3.: Via de sinalização Stathmin 1. Quinases dependentes de ciclina(CDKs), Mitogen-proteína quinases ativadas(MAPKs), fosfoinositídeo 3-quinase(PI3K), Aurora quinase B(AURKB), proteína quinase A(PKA), e dependente de Ca²⁺/calmodulina fosforilato de proteína quinases(CamKs) Stathmin 1 em locais de serina e modular sua associação com alfa/beta-tubulina heterodímeros. Fosfatase de proteína 2A(PP2A), proteína fosfatase 2B(PP2B) e Fosfoproteína Fosfatase 1(PP1) desfosforilar Stathmin 1. A alternância na fosforilação e status de desfosforilação de Stathmin 1 contribui para o regulamento da dinâmica dos microtúbulos. Abreviações: TKR, receptor de tirosina quinase; P, fosforilação; Ac, acetilação.

Fonte: Machado-Neto, et al., 2014

Desta maneira, o presente estudo teve como objetivo encontrar substâncias em extratos de bactérias marinhas recuperadas das ilhas brasileiras que interagem com essas duas proteínas, XIAP e/ou STMN1. Há que se ressaltar, que além da escolha do alvo a ser estudado, vários outros fatores podem interferir na probabilidade de se encontrar substâncias ativas. Dentre eles, a origem dos extratos estudados é um importante ponto de partida. Neste contexto, os organismos marinhos, em especial, os microrganismos têm se mostrado altamente profícuos na produção de metabólitos secundários com potentes atividades biológicas, dedicando uma parcela significativa do seu genoma a essa finalidade²⁹.

2.3. Objetivos

2.3.1. Objetivo geral

Prospectar substâncias anticâncer em extratos actinomicetos marinhos com potencial para modular proteínas.

2.3.2. Objetivos específicos

- (i) Padronizar a expressão heteróloga da XIAP e da STMN1;
- (ii) Padronizar a técnica de cromatografia de bioafinidade tendo como alvos a XIAP e a STMN1;
- (iii) Desreplicação e análise por redes moleculares dos ligantes putativos de XIAP e STMN1

2.4. Material e métodos

2.4.1. Extratos de actinomicetos

Os extratos utilizados neste ensaio foram obtidos a partir do crescimento de cepas do banco de cepas de bactérias marinhas do LAFARMAR em colaboração com o projeto de pós-doutorado FAPESP (2017/16606-6) do Dr. Marcelo Tangerina sob supervisão do Professor Marcelo Pena do Instituto de Biociências-USP ligado ao mesmo projeto temático que este projeto de mestrado. Uma vez isoladas, as cepas foram crescidas em meio líquido, e separadas em duas alíquotas. Uma parte é utilizada para preparação de um pequeno extrato em acetato de etila 1:1 para avaliação da atividade citotóxica em células de adenocarcinoma humano HCT-116 através do teste do MTT na concentração de 50 µg/mL. E a segunda parte, é utilizada para a criopreservação a -80°C das cepas em glicerol 20%.

Esse processo encontra-se detalhado no trabalho de Velasco-Alzate et al. (2019)³⁰. Cada cepa recebe um código composto pelas letras BRB seguidas de 3 números obedecendo a sequência do banco (BRBXXX). Todas as informações referentes às cepas utilizadas estão contidas na Tabela 3.1.

Para esse trabalho, as cepas descongeladas e cultivadas em 50 mL de meio líquido à temperatura ambiente ($\cong 28^{\circ}\text{C}$) e sob uma agitação orbital de 180 rpm. Para cada cepa foram utilizados 5 meios de cultura diferentes:

1. Caldo amido-caseína (Starch Casein Broth–**SCBm**), composição/ L: amido, 10,0 g; NaCl, 2,0 g; caseína, 0,3 g; KNO₃, 2,0 g; K₂HPO₄, 2,0 g; MgSO₄.7H₂O, 0,05 g; CaCO₃, 0,02 g; FeSO₄.7H₂O, 0,01 g; sal marinho (Red Sea), 36,0 g; H₂O deionizada q.s.p. 1L;
2. **R5Mm**, composição/ L: glicose, 10,0 g; extrato de levedura, 5,0 g; Solução de casaminoácidos, 0,1 g; MgCl₂.6H₂O, 10,12 g; solução de minerais-traço (ZnCl₂, 40,0 mg L⁻¹; FeCl₃.6H₂O, 200,0 mg L⁻¹; CuCl₂.2H₂O, 10,0 mg L⁻¹; MnCl₂, 10,0 mg L⁻¹; Na₂B₄O₇.10H₂O, 10,0 mg L⁻¹; (NH₄)₆Mo₇O₂₄.4H₂O, 10,0 mg L⁻¹), 2,0 mL; sal marinho (Red Sea), 36,0 g; H₂O deionizada q.s.p. 1L;
3. **ISP2m** composição/ L: extrato de levedura, 4,0 g; malte, 10,0 g; dextrose, 4,0 g; sal marinho (Red Sea), 36,0 g; H₂O deionizada q.s.p. 1L;
4. **DBm**, composição/L: (meio pronto): Infusão de batata 200g; Glicose 20g; sal marinho (Red Sea), 36,0 g; H₂O deionizada q.s.p. 1L;
5. **A1**, composição/L: amido, 10,0 g; extrato de levedura, 4,0 g; peptona, 2,0 g; sal marinho (Red Sea), 36,0 g; H₂O deionizada q.s.p. 1L.

Os caldos foram extraídos duas vezes com 25 mL de acetato de etila(EtOAc).

Tabela 2.1: Tabela contendo todas as cepas utilizadas, os seus respectivos meios de cultivo e os percentuais de inibição de crescimento (GI%) de células HCT-116 obtidos através do teste do MTT na concentração de 50µg/mL dos extratos após 72 horas de incubação. Algumas cepas foram identificadas através do sequenciamento do gene do 16S rRNA e comparação da sequência obtida com dados do genebank. Esses dados foram obtidos do banco de cepas de bactérias marinhas do Lafarmar, ICB-USP

EXTRATO	MEIO	LOCAL DE COLETA	IDENTIFICAÇÃO DA BACTÉRIA	GI (%) (50µg/mL)
BRB340	A1m	Antártica		
BRB346	BDm	Sedimento (Atol das Rocas)		89,66
BRB346	R5Mm	Sedimento (Atol das Rocas)		90,133
BRB346	ScBm	Sedimento (Atol das Rocas)		95,623
BRB348	ScBm	Sedimento (Atol das Rocas)		98,661
BRB384	A1m	Sedimento (Trindade)		91,224
BRB389	ScBm	Sedimento (Trindade)		98,96
BRB390	BDm	Sedimento (Trindade)		95,528
BRB393	R5Mm	Sedimento (Atol das Rocas)		78,517
BRB398	BDm	Sedimento (Atol das Rocas)		96,343
BRB 401	BDm	Sedimento (Trindade)		98,314
BRB 408	A1m	Sedimento (Atol das Rocas)	<i>Bacillus sp.</i>	78,912
BRB 408	BDm	Sedimento (Atol das Rocas)	<i>Bacillus sp.</i>	79,065
BRB 408	ISP2m	Sedimento (Atol das Rocas)	<i>Bacillus sp.</i>	88,71
BRB 408	R5Mm	Sedimento (Atol das Rocas)	<i>Bacillus sp.</i>	82,117
BRB 408	ScBm	Sedimento (Atol das Rocas)	<i>Bacillus sp.</i>	95,695
BRB 417	BDm	Sedimento (Atol das Rocas)		90,465
BRB 417	ScBm	Sedimento (Atol das Rocas)		47,041
BRB 418	A1m	Sedimento (Atol das Rocas)		93,606
BRB 418	BDm	Sedimento (Atol das Rocas)		88,223
BRB 418	ISP2m	Sedimento (Atol das Rocas)		78,172
BRB 418	R5Mm	Sedimento (Atol das Rocas)		79,706
BRB 419	BDm	Sedimento (Alcatrazes)	<i>Pseudomonas sp.</i>	91,387
BRB 432	BDm	Sedimento (Alcatrazes)	<i>Psychrobacter sp.</i>	93,327
BRB 432	R5Mm	Sedimento (Alcatrazes)	<i>Psychrobacter sp.</i>	82,475
BRB 434	R5Mm	Sedimento (Alcatrazes)	<i>Bacillus sp.</i>	93,135
BRB 435	BDm	Sedimento (Alcatrazes)		90,5
BRB 442	A1m	Sedimento (Alcatrazes)	<i>Bacillus sp.</i>	93,092
BRB 442	BDm	Sedimento (Alcatrazes)	<i>Bacillus sp.</i>	99,221
BRB 442	ISP2m	Sedimento (Alcatrazes)	<i>Bacillus sp.</i>	97,707
BRB 442	R5Mm	Sedimento (Alcatrazes)	<i>Bacillus sp.</i>	93,078
BRB 443	A1m	Sedimento (Alcatrazes)	<i>Bacillus sp.</i>	9,091
BRB 444	ISP2m	Sedimento (Alcatrazes)		88,183
BRB 448	A1m	Sedimento (Alcatrazes)	<i>Bacillus sp.</i>	90,222
BRB 448	BDm	Sedimento (Alcatrazes)	<i>Bacillus sp.</i>	80,562
BRB 448	ISP2m	Sedimento (Alcatrazes)	<i>Bacillus sp.</i>	99,516
BRB 448	R5Mm	Sedimento (Alcatrazes)	<i>Bacillus sp.</i>	82,3
BRB 455	ISP2m	Sedimento (Atol das Rocas)		76,543

2.4.2 Obtenção das proteínas de interesse

2.4.2.1. Obtenção dos plasmídeos

O plasmídeo para a expressão de XIAP foi cedido pelo Prof. Dr. Eli Chapman (Department of Pharmacology and Toxicology, University of Arizona, EUA), contendo a sequência de expressão desejada com uma cauda extra de histina (His-tag), resistente à canamicina, em vetor pSpeedET.

No caso da expressão de STMN1, a bactéria competente já foi adquirida comercialmente na Addgene (<https://www.addgene.org/31326/>).

2.4.2.2. Transformação das bactérias competentes para a produção de XIAP

A proteína XIAP foi obtida por expressão em sistema heterólogo utilizando a bactéria *Escherichia coli* BL21(DE3). Para tornar as bactérias competentes, um pré-inóculo de *E. coli* foi adicionado em 10mL de meio LB, em tubo cônico de 50 mL, incubado a 37°C e 160 RPM overnight. No dia seguinte, 5 mL do cultivo foram transferidos para um erlenmeyer de 1 L contendo 500 mL de meio LB e novamente incubado sob as mesmas condições até atingir densidade ótica (OD) em $\lambda_{600\text{nm}}$ de 0,3. O cultivo foi então incubado em banho de gelo por 5 minutos e centrifugado a 3500 RPM e 4°C por 10 minutos. Após descarte do sobrenadante, o pellet foi ressuscitado cuidadosamente em 100 mL de tampão Ca^{2+} /glicerol gelado (60mM CaCl_2 , 10mM PIPES, 15% [v/v] glicerol, pH 7,0). O sobrenadante foi novamente descartado e a suspensão centrifugada e ressuscitada nas mesmas condições. Após a segunda ressuspensão, novamente o conteúdo foi centrifugado, o sobrenadante descartado, o pellet ressuscitado em 12 mL de tampão Ca^{2+} /glicerol e, por fim, alíquotas de 500 μL foram armazenadas a -80 °C.

A transformação foi feita com uma alíquota de 50 μL de uma suspensão com *E. coli* competente, adicionada a 3 μL do plasmídeo de interesse numa concentração aproximada de 3ng/mL, que havia sido previamente cultivado pela técnica de minipreparação de DNA plasmidial (Miniprep) e enviado para sequenciamento. Após 45 segundos de incubação em banho-maria a 42°C e mais 2 minutos em gelo, foram adicionados mais 850 μL de meio LB (Lysogeny Broth, 10 g.L⁻¹ triptona, 5 g.L⁻¹ extrato de levedura, 5 g.L⁻¹ cloreto de sódio) e incubados em câmara incubadora com agitação orbital à 37 °C e 160 RPM por 1h. O cultivo foi, então, centrifugado a 1500 RPM por 5 minutos, o sobrenadante descartado e o pellet ressuscitado em 400 μL de meio para ser inoculado em placa de Petri com meio LB sólido (+18 g.L⁻¹ agar) acrescido de 50 $\mu\text{g/mL}$

de canamicina. A placa foi incubada a 37 °C *overnight*, ou até que se formassem as colônias transformadas.

2.4.2.3. *Cultivos das bactérias transformadas*

Para a produção em larga escala de ambas as proteínas, inicialmente é necessário um pré-inóculo de pequena escala em tubos cônicos de 50 mL contendo 20 mL de meio LB com 50 µg/mL de canamicina para a XIAP e ampicilina para a STMN1, no qual a colônia transformada é inoculada. Estes tubos cônicos são mantidos a 37 °C e 160 RPM *overnight*. No dia seguinte o pré-inóculo é transferido para um frasco de cultivo em larga escala (erlenmeyers de 2 L de volume total, contendo 1 L de meio LB com canamicina para a XIAP e ampicilina para a STMN1 na proporção de 50 µg/mL).

Os cultivos em larga escala inicialmente também se encontram a 37 °C e 160 RPM, contudo ao atingir OD em $\lambda_{600\text{nm}}$ de 0,3 a 0,4, a temperatura é diminuída para 16 °C até atingirem OD em $\lambda_{600\text{nm}}$ de 0,8 para a indução de expressão utilizando IPTG (isopropil beta-D-1- tiogalactopiranosídeo), sendo necessário 1 mM para a STMN1 e 0,3 mM para a XIAP. Os cultivos em larga escala ficam *overnight* a 16 °C. No dia seguinte o meio contendo as bactérias é transferido para tubos cônicos de 50 mL e centrifugado a 7000 RPM por 15 minutos. Após o descarte do sobrenadante o pellet segue para o processo de extração e purificação, ou é armazenado a -20 °C até o início desta etapa.

2.4.2.4. *Purificação das proteínas*

O precipitado obtido durante a produção em larga escala é lisado por ressuspensão em tampão de lise completo (50 mM Hepes pH 7.4, 150 mM KCL, 5 mM MgCl₂, 10% [v/v] glicerol 50% em ddH₂O + 100mM SIGMAFAST Protease Inhibitor Cocktail Tablets EDTAfree + 2mM BME), seguido por sonicação no sonicador vertical Sonics Vibra- Cell VCX 500 (Sonics & Materials) durante 5 minutos, amplitude de 40% com pulso 30 segundos e intervalos de 15 segundos. Em seguida, a solução é novamente centrifugada (14000 RPM por 45 minutos) e o sobrenadante é adicionado à coluna de níquel (HisTrap excel 5 mL, GE LifeSciences), previamente empacotada com tampão de lise para a purificação por cromatografia de afinidade por metal imobilizado. Após eliminar os ligantes inespecíficos com os tampões de lavagem (tampão de lise + 2 mM BME) e de lavagem adstringente completo (50 mM Hepes pH 7.4, 1M KCL, 5 mM MgCl₂, 5% [v/v] glicerol 50% em ddH₂O + 2mM BME) é adicionado o tampão de eluição, contendo imidazol em uma concentração final de 250 mM (50 mM Hepes pH 7.4, 150 mM KCl,

5mM MgCl₂, 10% [v/v] glicerol 50%, 250 mM Imidazol em ddH₂O). O Imidazol compete com a proteína pelo sítio de ligação com o íon metálico, deslocando-a do sistema. Para 1L de meio utilizado são necessários 30 mL de tampão de eluição, sendo que o eluído é coletado em frações separadas em microtubos de 1,5mL ordenadamente para a análise em SDS-PAGE. As frações contendo as proteínas de interesse são dialisadas.

A etapa final de purificação é a diálise, necessária para a separação das proteínas de interesse do Imidazol. As frações purificadas são condicionadas em membrana de diálise Spectra/Por de 3.5kD (Spectrum Labs), imersa em tampão de diálise (20 mM Hepes pH 7.4, 150 mM KCl, 1mM MgCl₂ em ddH₂O) em agitador magnético a 4 °C *overnight*. A solução livre de Imidazol é então concentrada em filtros de centrífuga Amicon Ultra- 15 10K (Merck), a 4000 RPM a 4 °C. As proteínas são aliquoteadas em microtubos contendo 200 µL de solução.

2.4.2.5. *Confirmação da purificação e expressão*

A confirmação da expressão das bactérias transformadas foi realizada em gel de poliacrilamida 12% (Resolving Gel- 1,07 ml água deionizada; 1,8 ml glicerol; 9,0 ml tampão resolving; 5, 05 mL Acrilamida 40%; 25 µL Temed; 270 µL APS 10%. Stacking gel- 4,2 mL água desionizada, 5,6 mL tampão stacking; 1,25 mL acrilamida 40%; 25 µL temed; 270 µL APS 10%). A corrida foi realizada em equipamento da Bio-Rad de Wet/Tank Blotting Systems durante duas horas e meia a 90V. O gel foi corado com Commassie e descorado com uma solução contendo Metanol e Ácido acético.

Para a confirmação de expressão, precipitados de dois cultivos em pequena escala, um controle e um induzido com IPTG, foram lisados, sonificados e centrifugados da mesma forma que foi descrita no parágrafo anterior. Uma alíquota de 5 µL do sobrenadante foi preparada com 15 µL de Sample Buffer Laemmli 2x (Sigma-Aldrich). Para a confirmar a purificação, 5 µL do eluído da coluna a cada passagem durante o processo de purificação da proteína eluída também foram preparados da mesma forma.

2.4.2.6. *Quantificação de proteínas*

A dosagem das proteínas foi realizada com o kit da Bio-Rad e conforme o protocolo. Em uma placa de 96 poços foi pipetado um volume de 5µL, em triplicata das amostras a serem testadas, no caso a STMN1 e a XIAP, além da curva de BSA (nas concentrações de 2,0; 1,5; 1,0; 0,8; 0,5; 0,2). Em seguida, foi pipetada a solução A' (30 µL

de reagente S e 1,5 mL de reagente A) em um volume de 25 μ L. Ao final foi pipetado o reagente B. Posteriormente, a placa foi lida e analisada.

2.4.3. Ensaio de bioafinidade (HPLC- MS)

O ensaio de Bioafinidade (HPLC- MS) foi realizado em colaboração com a Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto com a Mestre Eduarda Antunes Moreira, Dra. Anelize Bauermeister e o Professor Norberto Peporine Lopes. Todas as amostras obtidas da cromatografia de bioafinidade foram solubilizadas em 0.5 mL de metanol e em seguida filtradas em colunas de Sephadex DH-20 (montada em uma pipeta de Pasteur) para remoção dos sais do tampão. As análises foram desenvolvidas em sistema HPLC (*high performance liquid chromatography*) (Shimadzu) acoplado à um espectrômetro de massas da AmaZon SL (Bruker Daltonics) equipado com uma fonte de ionização electrospray e um analisador iontrap. Os dados foram adquiridos no modo positivo de ionização. Os parâmetros empregados no espectrômetro de massas foram: voltagem: 3500V, end plate: 500V, temperatura do capilar: 320°C, faixa de m/z: 100-1000, gás de secagem: 10 L.min⁻¹, nebulizador: 60 psi. 15 μ L de cada amostra foram injetados em uma coluna cromatográfica Luna C18 (5 μ m, 4.6 x 25 cm) mantida à 40°C. A fase móvel consistiu de água deionizada (fase A) e metanol (fase B), ambas contendo 0.1 % de ácido fórmico. A condição cromatográfica aplicada foi: 5% fase B em 0 min, 100% fase B em 30 min, 100% fase B em 35 min e 5% fase B em 37 min. O quociente de vazão utilizado foi de 1.0 ml.min⁻¹.

2.4.4. Análise dos dados obtidos por HPLC-MS/MS em bancos de dados

Os dados obtidos do HPLC-MS/MS contendo as informações dos extratos brutos e dos extratos com as proteínas foram analisados comparando com os bancos de dados do GNPS – com o uso da ferramenta dereplicator-, AntiBase e Scifinder em colaboração com o projeto de pós-doutorado FAPESP (2017/16606-6) do Dr. Marcelo Tangerina sob supervisão do Professor Marcelo Pena do Instituto de Biociências - USP ligado ao mesmo projeto temático que este projeto de mestrado.

2.5. Resultados e discussão

2.5.1. Expressão heteróloga

A padronização deste protocolo iniciou com os estudos de expressão em busca da cepa para a transformação da proteína, tendo como opções as cepas BL21(DE3) e Rosetta

de *E. coli*, sendo que a transformação com o aparecimento de colônias ocorreu apenas com a cepa de BL21, padronizando-se assim os futuros testes apenas com esta cepa (Figura 2.4). A cepa BL21 (DE3) é uma cepa de *Escherichia coli*, uma bactéria Gram negativa que foi descoberta e descrita em 1885 como habitante do cólon de mamíferos. As cepas mais estudadas de *E. coli* são a K-12 e B e ambas são provenientes do intestino humano e os estudos com estas cepas datam das primeiras décadas do século 20. A BL21(DE3) é uma cepa altamente utilizada na produção de proteínas recombinantes que estejam sob o controle da T7 RNA polimerase, como é o caso da XIAP utilizada neste estudo. A maior deleção da BL21(DE3) ocorreu de forma espontânea e levou a remoção do *ompT*, sendo esta deleção desejável já que o OmpT é protease de membrana que pode elevar a degradação de proteínas no processo de purificação³¹.

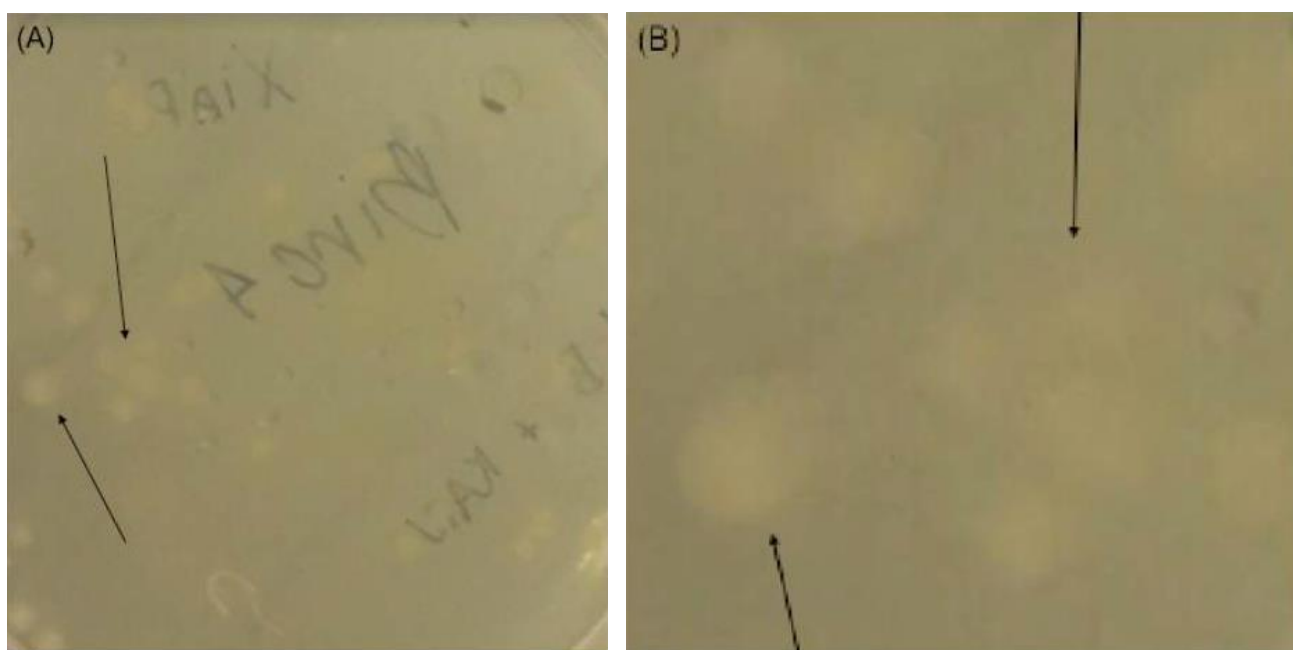


Figura 2.4: Fotos das placas de LB com canamicina contendo o plasmídeo da BIRC4 referente a XIAP. (A) Foto da placa com sua identificação e algumas colônias que são mostradas por setas. (B) Zoom nas colônias para melhor visualização.

Para a indução da XIAP utilizou-se IPTG nas concentrações de 1mM e 0,3mM, sendo que foi na menor concentração de IPTG (0,3mM) que a bactéria cresceu melhor. Para os crescimentos em pequena e larga escala as temperaturas utilizadas foram de 37°C e, posteriormente, 16°C. A produção em larga escala da XIAP foi extensamente laboriosa tendo em vista que não foi encontrada na literatura uma estimativa de proteína final

purificada para os litros de produção de bactéria, o que levou a uma grande produção de bactérias crescidas em meio de cultura.

Para a confirmação da purificação realizou-se um gel de poliacrilamida (figura 2.5) e a amostra final foi sequenciada e foram obtidas as seguintes sequências:

XIAP

GACCAAAGACGAGATATACATACCCATGGGATCTGATAAAAATTCATCATC
TCATCATCACGAAAACCTGGGGAGACAGGGCATGACTTTTAACAGTTTTGAA
GGATCTAAAATGAGGGACCTGGGAGACATCAATAAGGAAGAAGAATTTGTA
GAAGAGTTTAATAGATTA AAAACTTTTGCTAATTTTCCAAGTGGTAGTCCTGT
TTCAGCATCAACACTGGCACGAGCAGGGTTTCTTTATACTGGTGAAGGAGAT
ACCGTGCGGTGCTTTAGTTGTCATGCAGCTGTAGATAGATGGCAATATGGAG
ACTCAGCAGTTGGAAGACACAGGAAAGTATCCCCAAATTGCAGATTTATCAA
CGGCTTTTATCTTGAAAATAGTGCCACGCAGTCTACAAATTCTGGTATCCAGA
ATGGTCAGTACAAAGTTGAAATCTATCTGGGAAGCAGAGATCATTTTGCCTT
AGACAGGCGGGGGTGGAGACACATGCAGACTATCTTTTGAGAACTGGGCAGGT
TG TAGATATATCAGACACCATATAGGCGAGGAACCCTGCCATGTATAGTGAA
GAAGCTAGATTAAAGTCCTTTCAGAACTGGCCAGACTATGCTCACCTAACCC
CAAGAGAGTTAGCAAGTGCTGGACTCTACTACACAGG

XIAP

GACGAGAATACATACCCATGGGATCTGATAAAAATTCATCATCATCATCA
CGAAAACCTGTCACGAGGGCATGACTTTTAACAGTTTTGAAGGATCTAAAC
TAGTGTACCTGCAGACATCAATAAGGAAGAAGAATTTGTAGAAGAGTTTAAT
AGATTA AAAACTTTTGCTAATTTTCCAAGTGGTAGTCCTGTTTCAGCATCAAC
ACTGGCACGAGCAGGGTTTCTTTATACTGGTGAAGGAGATACCGTGCGGTGC
TTTAGTTGTCATGCAGCTGTAGATAGATGGCAATATGGAGACTCAGCAGTTG
GAAGACACAGGAAAGTATCCCCAAATTGCAGATTTATCAACGGCTTTTATCTT
GAAAATAGTGCCACGCAGTCTACAAATTCTGGTATCCAGAATGGTCAGTACA
AAGTTGATAACTATCTGGGAAGCAGAGATCATTTTGCCTTAGACAGGCGGGT
CGGGAGACACATGCAGACTATCTTTTGAGAACTGGGCAGGTTGTAGATATAT
CAGACACCAGATAGGCGAGGAACCCTGCCATGTATAGTGAAGAAGCTAGATT
AAAGTCCTTTCAGAACTGGCCAGACTATGCTCACCTAACCCCAAGAGAGTTA
GCAAGTGCTGGACTCTACT

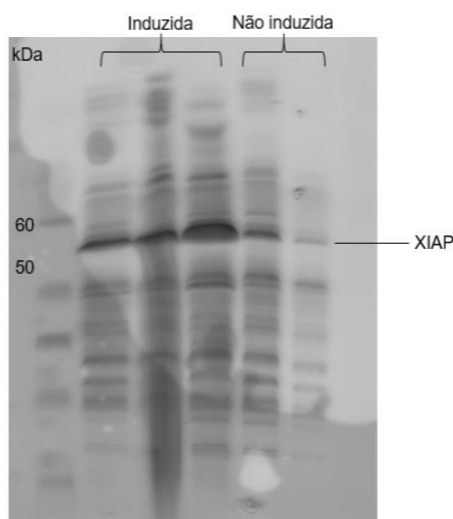


Figura 2.5: Gel de poliacrilamida para avaliar a superexpressão da XIAP. A superexpressão da proteína é evidenciada. Foi coletada uma amostra antes da indução com IPTG como controle negativo e após deixar *overnight* foi coletada outra amostra como controle positivo. As bandas são condizentes com o peso molecular da XIAP de 53kDa.

Na comparação da sequência de nucleotídeo para obtenção de uma proteína com o banco de dados de proteínas do www.ncbi.nlm.nih.gov/protein (blastX), a primeira sequência demonstrou alta identidade (95.42%) com um construto sintético de XIAP (Tabela 2.2) e todas as 100 sequências encontradas são referentes a proteína XIAP obtida em diferentes espécies animais. Comprovando que a proteína purificada é de fato a XIAP. A segunda sequência também teve alta homologia com proteínas anotadas no banco de dados como sendo a XIAP, contudo o maior e- value foi com uma proteína anotada como sendo da espécie de primata *Pongo abelli*, orangotango- de- Sumatra. Todas as 100 sequências anotadas também são de diferentes espécies que expressam XIAP ou o construído sintético da proteína (Tabela 2.3). Comprovando assim que em ambas as sequências a proteína purificada é a XIAP desejada para o estudo.

Tabela 2.2. Resultados da comparação da primeira sequência obtida da proteína expressa com o plasmídeo para a XIAP no banco de dados de proteínas do www.ncbi.nlm.nih.gov/protein.

Descrição	Nome científico	Score Máximo	Score Total	Homologia	Número de acesso
XIAP [synthetic construct]	Construto Sintético	259	494	95.42%	AIC54018.1
baculoviral IAP repeat-containing 4 [synthetic construct]	Construto Sintético	259	494	95.42%	AAX29953.1
IAP-like protein ILP [Homo sapiens]	<i>Homo sapiens</i>	259	494	95.42%	AAC50518.1
E3 ubiquitin-protein ligase XIAP [Homo sapiens]	<i>Homo sapiens</i>	259	494	95.42%	NP_001158.2

<u>E3 ubiquitin-protein ligase XIAP isoform X1 [Pongo abelii]</u>	<u>Pongo abelii</u>	258	492	92.54%	<u>XP_003779771.1</u>
---	---------------------	-----	-----	--------	-----------------------

Tabela 2.3. Resultados da comparação da primeira sequência obtida da proteína expressa com o plasmídeo para a XIAP no banco de dados de proteínas do www.ncbi.nlm.nih.gov/protein.

Descrição	Nome científico	Score Máximo	Score Total	Homologia	Número de acesso
<u>E3 ubiquitin-protein ligase XIAP isoform X1 [Pongo abelii]</u>	<u>Pongo abelii</u>	270	496	90.28%	<u>XP_003779771.1</u>
<u>baculoviral IAP repeat-containing 4 [synthetic construct]</u>	Construto Sintético	270	496	95.59%	<u>AAX29953.1</u>
<u>XIAP [synthetic construct]</u>	Construto Sintético	270	496	92.20%	<u>AIC54018.1</u>
<u>E3 ubiquitin-protein ligase XIAP [Homo sapiens]</u>	<u>Homo sapiens</u>	270	496	92.20%	<u>NP_001158.2</u>
<u>IAP-like protein ILP [Homo sapiens]</u>	<u>Homo sapiens</u>	270	496	92.20%	<u>AAC50518.1</u>

A expressão da proteína STMN1 foi realizada seguindo o protocolo que se encontra detalhado na metodologia e para padronização deste protocolo foram necessários ensaios iniciais. Diferente da XIAP não foram necessários ensaios para a transformação da bactéria e o protocolo de padronização consistiu nos valores utilizados para a indução com IPTG, tempo e temperatura. As concentrações usadas de IPTG foram de 0,25, 0,5, 1,0 e 1,5 mM. Para a confirmação de expressão, foi realizado um gel de poliacrilamida e o padrão obtido (Figura 2.6) é similar com o apresentado por Büssow et al. (2005)³², mostrando que a expressão heteróloga da STMN1 foi possível assim como no artigo em que o seu plasmídeo foi trabalhado. Para mais uma verificação foi realizada o ensaio de *Western Blotting* (Figura 2.7) em que o anticorpo para STMN1 identificou e marcou a proteína em 18kDa. A melhor concentração de IPTG foi 1,0 mM, sendo esta a escolhida para a padronização do protocolo. As frações apresentadas em todas as figuras são a proteína purificada que é

recolhida ao sair da coluna de purificação IMAC. A primeira fração é o primeiro produto provindo da coluna ao iniciar a eluição que é recolhido em microtubo de 1,5mL e assim por diante, normalmente a proteína se desliga da resina durante o meio da eluição, por volta das frações 14 a 18.

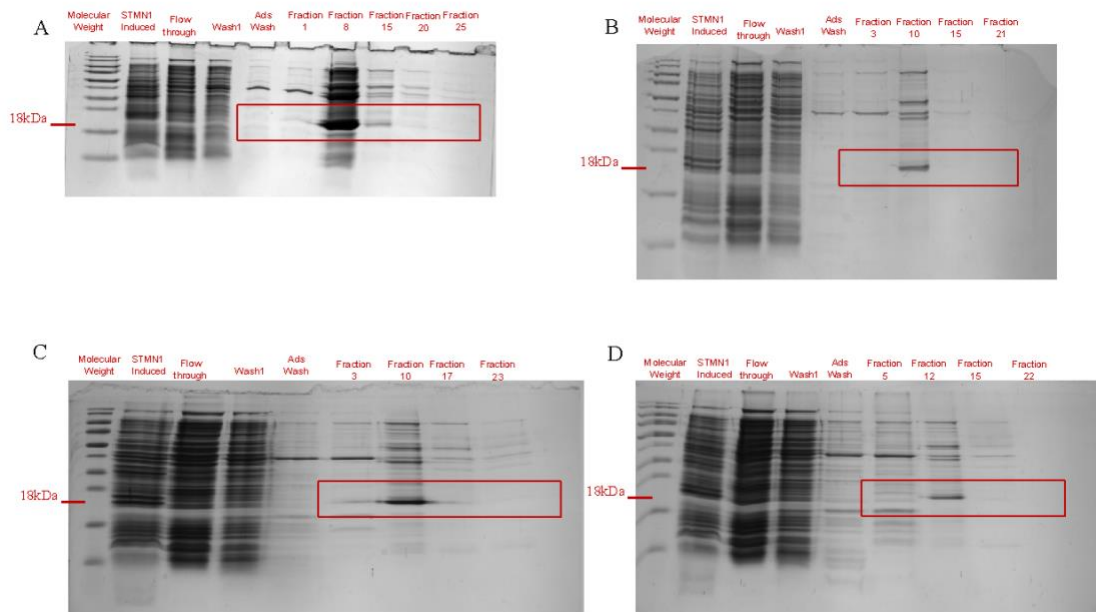


Figura 2.6: Géis de poliacrilamida corados com *Coomassie Blue* mostrando a indução e purificação da proteína STMN1 sob diferentes concentrações de IPTG. (A) Indução da proteína STMN1 com 0,25mM de IPTG (concentração de estoque de 1M) e purificação em coluna IMAC. (B) Indução da proteína STMN1 com 0,5nM de IPTG (concentração de estoque de 1M) e purificação em coluna IMAC. (C) Indução da proteína STMN1 com 1,0mM de IPTG (concentração de estoque de 1M) e purificação em coluna IMAC. (D) Indução da proteína STMN1 com 1,5mM de IPTG (concentração de estoque de 1M) e purificação em coluna IMAC.

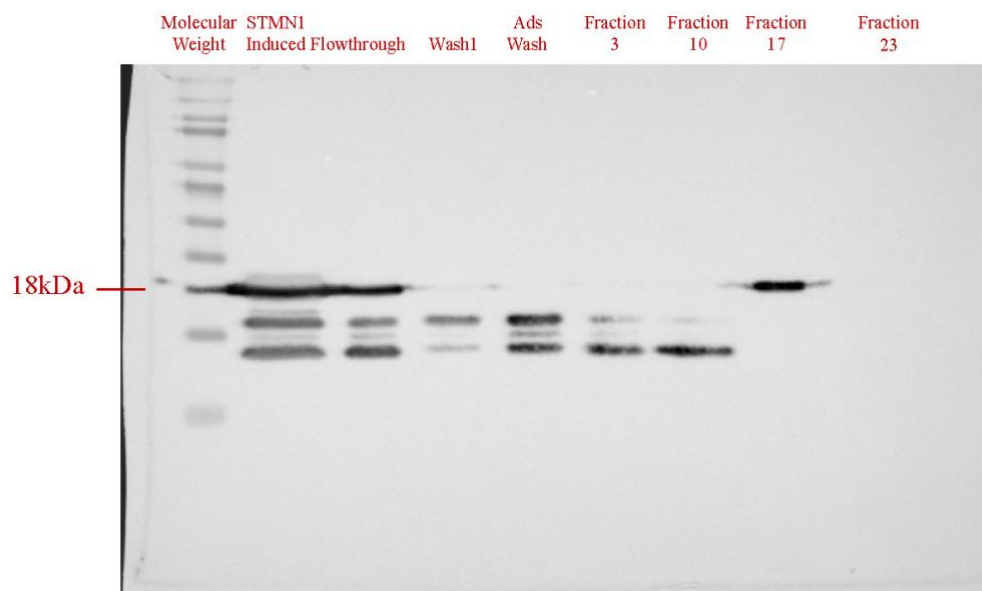


Figura 2.7: Western Blotting para a visualização da proteína STMN1.

2.5.2. Cromatografia de bioafinidade

Foram analisados 38 extratos (Tabela 3.1) utilizando a técnica de cromatografia de bioafinidade com as proteínas XIAP e STMN1, sendo obtidos *hits* específicos e inespecíficos para ambas as proteínas. Os *hits* são substâncias encontradas nos extratos que apresentaram interação com as proteínas na técnica de cromatografia de bioafinidade e podem ser classificados como específicos e inespecíficos. Como critério selecionamos *hits* específicos como aqueles que apresentaram interação com apenas uma das proteínas, graças as diferenças estruturais que elas apresentam, servindo assim como controle. Os resultados para os chamados *hits* específicos estão detalhados nas Tabelas 2.4. e 2.5. A critério de exemplificação estão apresentadas duas figuras de dois hits com as proteínas XIAP e STMN1 (figura 2.8 e figura 2.9).

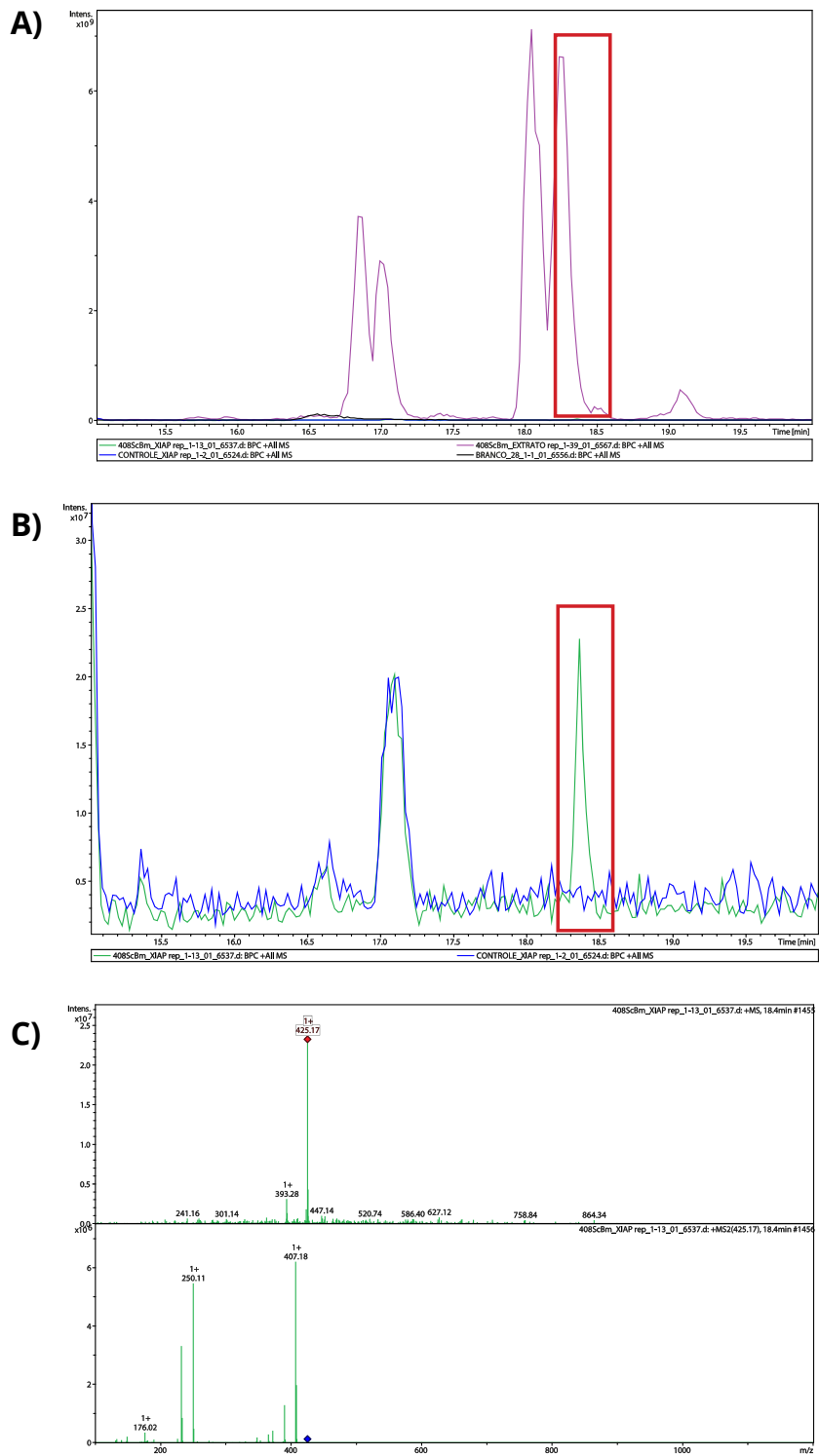


Figura 2.8: Cromatogramas e espectros de massa para o extrato de 408 ScBm e amostra obtida por cromatografia de bioafinidade deste extrato com a proteína XIAP. (A) Cromatograma mostrando cromatografia de pico de tempo de retenção de 18,4 minutos para o *hit* no extrato. (B) Cromatograma mostrando o pico relativo ao *hit*. (C) Espectro de massa da proteína XIAP mostrando o íon principal m/z 425.

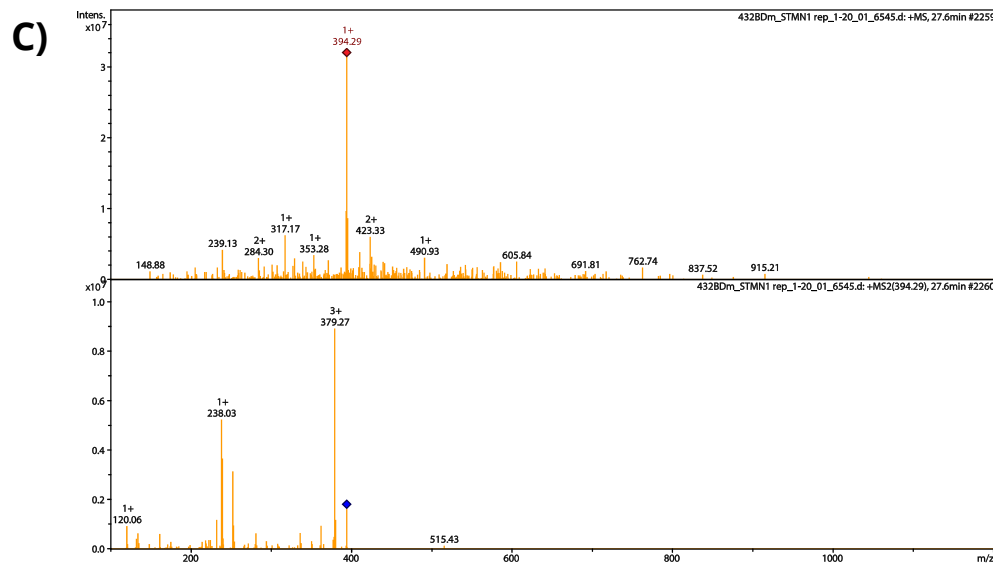
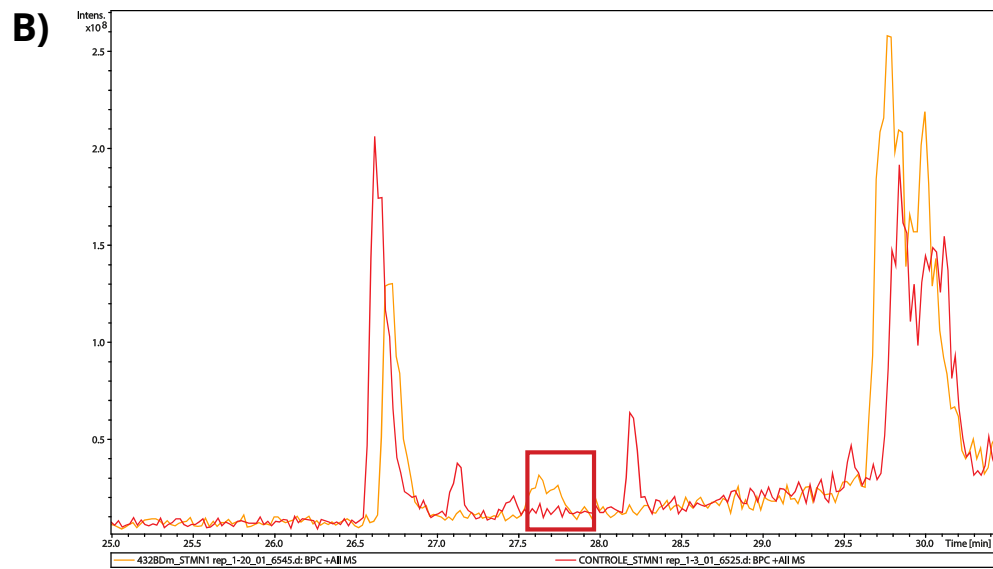
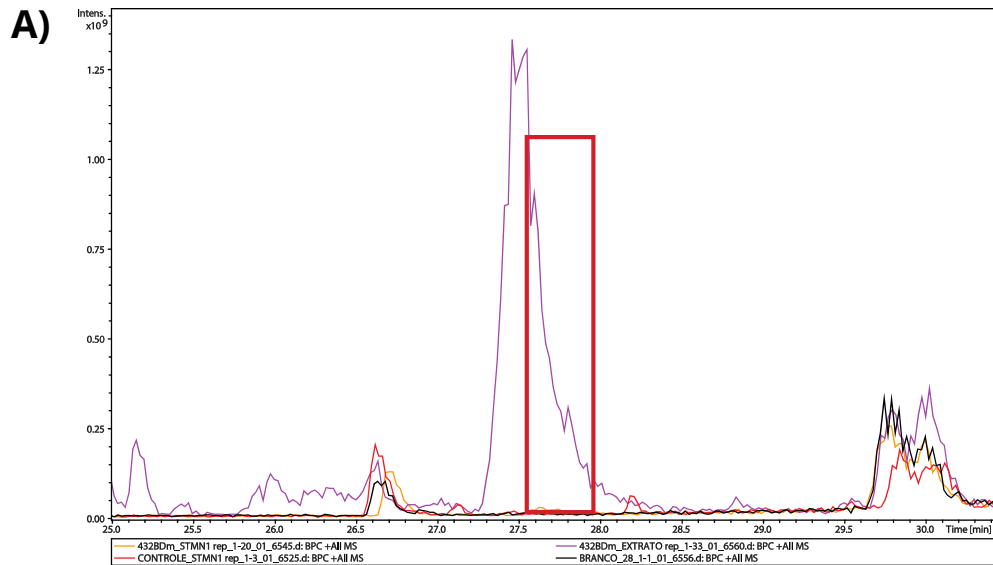


Figura 2.9: Cromatogramas e espectros de massa para o extrato de 432 BDm e amostra obtida por cromatografia de bioafinidade deste extrato com a proteína STMN1. (A) Cromatograma mostrando cromatografia de pico de tempo de retenção de 27,6 minutos para o *hit* no extrato. (B) Cromatograma mostrando o pico relativo ao *hit*. (C) Espectro de massa da proteína XIAP mostrando o íon principal m/z 394.29.

A técnica de cromatografia de bioafinidade foi realizada uma vez com todos os extratos apresentados na Tabela 3.1 e duas vezes nos extratos apresentados nas Tabelas 2.4 e 2.5, assegurando assim a confiabilidade no resultado e nos *hits* específicos. Ao todo 7 extratos apresentaram diferentes *hits* inespecíficos e eles foram: BRB393 R5Mm, BRB398 BDm BRB434 R5Mm, BRB442 R5Mm, BRB448 BDm, BRB448 R5Mm e BRB455 ISP2m.

Tabela 2.4: Tabela contendo as informações referentes as cepas que apresentaram *hit* específico com a XIAP. Na tabela temos a informação do extrato, o meio de cultura em que o mesmo foi cultivado, o tempo de retenção e a relação m/z do íon referente ao *hit*.

EXTRATO	MEIO	TEMPO DE RETENÇÃO	ÍON m/z
BRB340	A1m	28.1 / 29.5	369.42 / 368.44
BRB346	R5Mm	22.7	197.06
BRB346	ScBm	17.6	308.12
BRB408	ISP2m	13.4 / 18.5 / 23	327.2 / 425.1 / 269.1
BRB408	ScBm	18.4	425.17
BRB417	ScBm	28.2	369.4
BRB418	A1m	17.5	267.09
BRB418	ISP2m	15.9	211.0
BRB418	R5Mm	22.7	197
BRB432	BDm	7.3	289.18
BRB432	R5Mm	22.7	197
BRB448	ISP2m	28.2	369.4
BRB455	ISP2m	10.9	292.1

Tabela 2.5: Tabela contendo as informações referentes as cepas que apresentaram *hit* específico com a STMN1. Na tabela temos a informação do extrato, o meio de cultura em que o mesmo foi cultivado, o tempo de retenção e a relação m/z do íon referente ao *hit*.

EXTRATO	MEIO	TEMPO DE RETENÇÃO	ÍON m/z
BRB408	ISP2m	7.01/18.4	274.1/ 425.2
BRB432	BDm	27.6	394.29
BRB432	R5Mm	21.7	313.1
BRB448	BDm	8	371.2

Conforme apresentado na Tabela 2.1 não são todas as cepas de bactérias trabalhadas nesta pesquisa que foram identificadas, contudo podemos elencar a BRB408, BRB432 e BRB448 que já foram identificadas. As cepas BRB408 e BRB448 são bactérias

identificadas como *Bacillus sp.*, enquanto a BRB432 é identificada como *Psychrobacter sp.*

O gênero *Bacillus* é um gênero de bactérias Gram-positivas e formadoras de esporos podendo ser encontrada principalmente em solos o que leva a muitas espécies deste gênero a estarem associadas a plantas, bactérias endofíticas e a rizobactérias³³. Essas características do gênero *Bacillus* fazem com que estas bactérias sejam responsáveis pela produção de uma gama de compostos de diferentes estruturas e que desempenham uma série de atividades biológicas, conhecidos como metabólitos secundários que servem como mecanismo de defesa, agentes de simbiose, hormônios sexuais etc. Estas diferentes estruturas químicas são interessantes para o uso farmacêutico levando ao estudo do extrato bruto em busca de novos fármacos. Dentre os metabólitos secundários de *Bacillus sp.* podemos citar as classes estruturais de bacteriocinas, lipopeptídeos cíclicos, toxinas inseticidas, sideróforos, dicetopiperazinas, alcaloides indólicos, lantibióticos, macrolactonas, isocumarinas, pigmentos e várias substâncias de outras classes químicas³⁴.

O potencial de uso industrial dos metabólitos secundários do gênero *Bacillus sp.* pode ser observado na classe dos lipopeptídeos cíclicos, em que muitas substâncias com potencial antifúngico já identificadas, dentre vários outros. O gênero *Bacillus* representa uma rica fonte de metabólitos secundários com um potencial de uso farmacêutico gigantesco³⁴.

O gênero *Psychrobacter sp.* é menos estudado que o gênero *Bacillus sp.*, mas o seu potencial industrial também é relevante. O gênero *Psychrobacter sp.* foi proposto em 1986 por Juni e Heym³⁵ para acomodar bactérias psicrófilas, Gram-negativas e halotolerantes. As fontes destas bactérias compreendem peixes, frutos do mar, água marinha, sedimento marinho, comida processada, gelo antártico, dentre outros³⁶. Esse gênero de bactéria é amplamente encontrado em ambientes gelados, sendo capaz de crescer em temperaturas abaixo de 5°C³⁸. Algumas cepas de *Psychrobacter sp.* são capazes de produzir enzimas como a anidrase carbônica sugerindo um potencial biotecnológico de biorremediação por meio da precipitação de metais pesados³⁷⁻³⁹.

2.5.3. Análise dos dados obtidos por HPLC-MS/MS em bancos de dados

Os dados obtidos do HPLC-MS/MS contendo as informações dos extratos brutos e dos extratos com as proteínas foram analisados comparando com os bancos de dados do GNPS – com o uso da ferramenta dereplicator-, AntiBase e Scifinder (Figura 2.10). A maioria dos extratos não obteve nenhuma substância anotada nos bancos de dados, o que

ressalta a carência de dados de substâncias da biodiversidade brasileira nesses bancos de dados.

Durante as buscas, no entanto, foram encontradas duas substâncias já descritas na literatura. O *hit* para a XIAP com tempo de retenção de 10.9 min e com *m/z* de 292.1 para a bactéria BRB455 ISP2m foi anotado como correspondendo a substância burkholona presente no banco de dados do AntiBase 2012 (figura 2.11). A burkholona é um antibiótico citotóxico produzido pela *Burkholderia* sp. que atua contra IGF-1⁴⁰. A burkholone é uma substância pouco estudada na literatura e com aparente potencial citotóxico o que a torna interessante para estudos visando analisar se este potencial citotóxico pode estar ligado à sua ação na XIAP. O outro hit encontrado nos bancos de dados foi para a phthoxazolin A. O *hit* em 21.7 min e com *m/z* de 313.1 para a bactéria BRB432R5Mm obtido com a STMN1 está anotado no AntiBase e no GPNS-Dereplicator como sendo a phthoxazolin A (figura 2.12). A phthoxazolin A é uma substância produzida por *Streptomyces* sp. que já teve o seu potencial como antibiótico apontado em 1990⁴¹ e, em 2009, foi demonstrado que ela inibe o crescimento de células de câncer de próstata⁴².

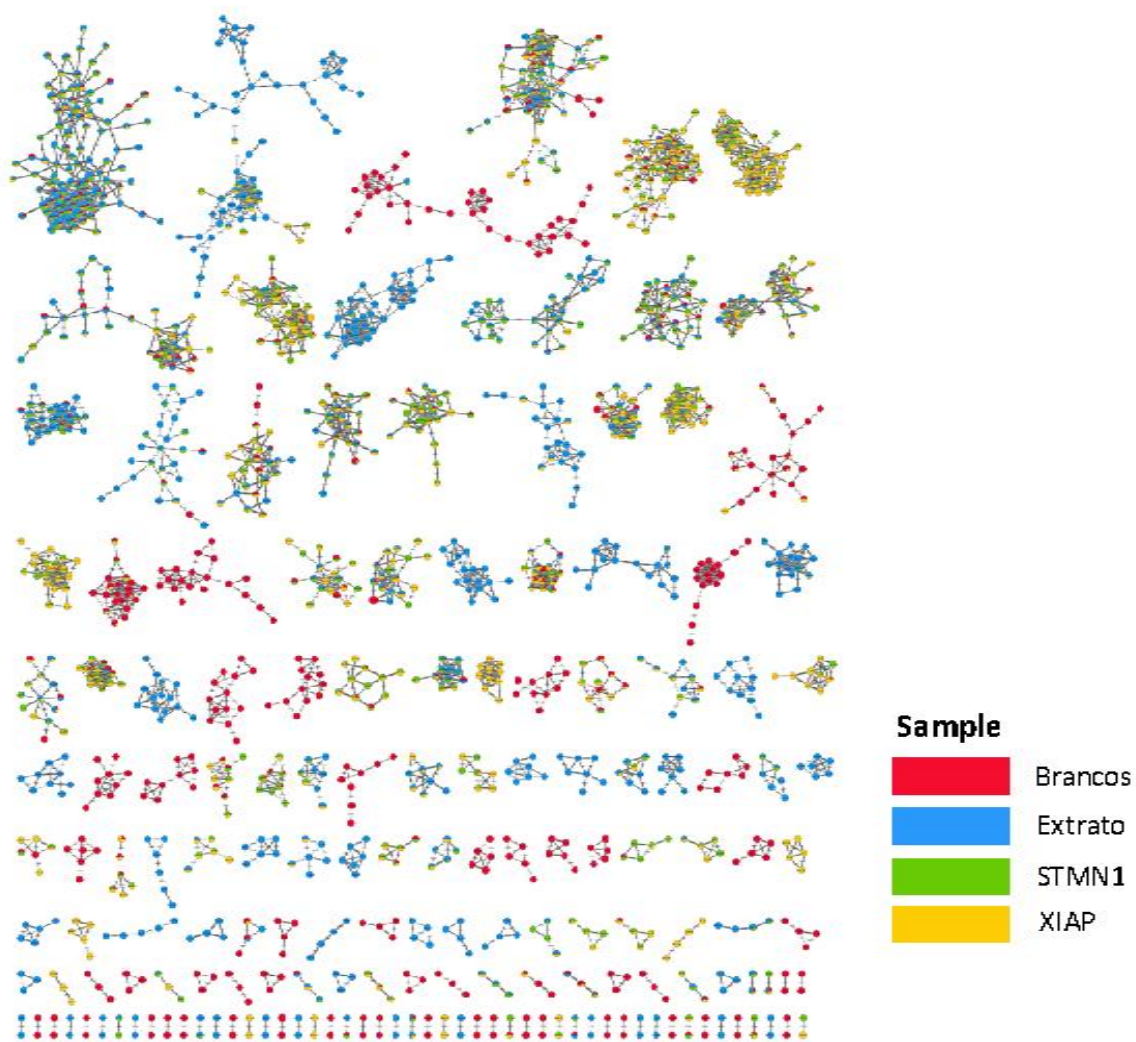


Figura 2.10: Molecular Network de todos os extratos analisados. Os nodos em vermelho representam o branco, em azul o extrato, em verde a STMN1 e em amarelo a XIAP. Na busca em bancos de dados foram encontradas apenas duas anotações que estão apresentadas nas figuras 3.5 e 3.6.

455ISP2m_XIAP

Hit em 10.9 min – m/z 292.1

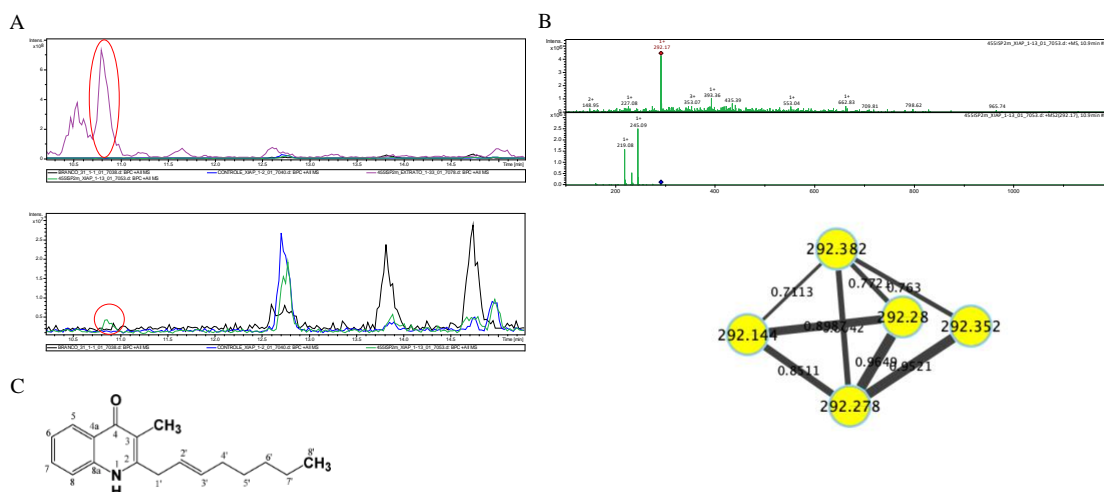


Figura 2.11: Hit presente em 10.9 min e com m/z de 292.1 para a bactéria BRB455 ISP2m para a XIAP. (A) Cromatograma da bactéria BRB455ISP2m para a XIAP com a presença de um hit específico no tempo de retenção de 10.9 min. (B) m/z 292.1 para a bactéria BRB455 ISP2m para a XIAP e o cluster do MS obtido pelo GNPS. (C) Estrutura química da substância anotada no banco de dados como sendo a burkholone.

432R5Mm_STMN1

Hit em 21.7 min – m/z 313.1

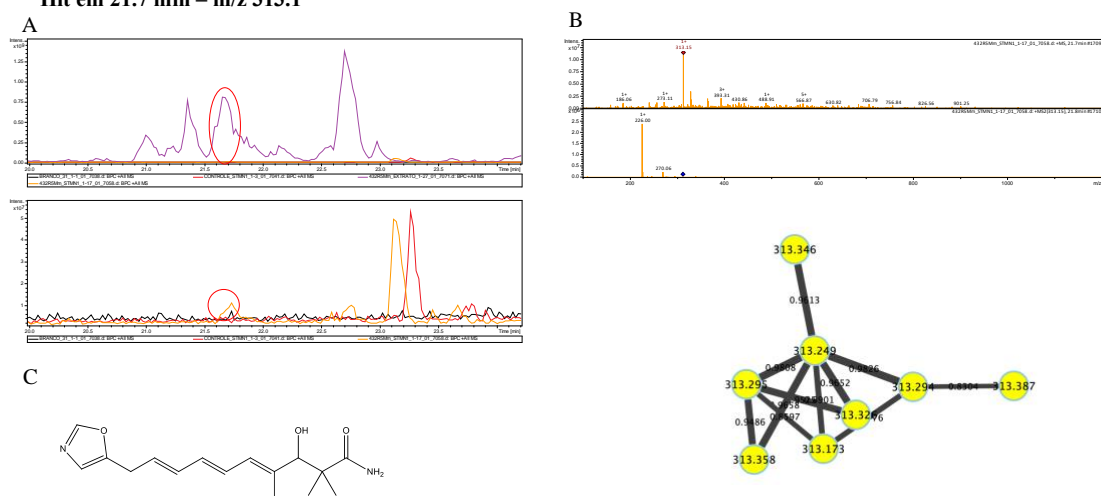


Figura 2.12: Hit presente em 21.7 min e com m/z de 313.1 para a bactéria BRB432R5Mm para a STMN1. (A) Cromatograma da bactéria BRB432R5Mm para a STMN1 com a presença de um hit específico no tempo de retenção de 21.7 min. (B) m/z 313.1 para a bactéria BRB432R5Mm para a STMN1 e o cluster do MS obtido pelo GNPS. (C) Estrutura química da substância anotada no banco de dados como sendo a phthoxazolin A.

2.6. Conclusão

O projeto inicial da cromatografia de bioafinidade apresentou contratempos em relação aos objetivos iniciais decorrente da pandemia mundial de Covid- 19, contudo a técnica ainda foi padronizada com duas proteínas estruturalmente diversas e em um grande número de extratos do nosso banco de cepas. Apesar de não ter sido possível realizar a purificação das substâncias ativas e posteriormente os ensaios biológicos, os extratos foram comparados ao banco de dados GNPS, AntiBase e Scifinder.

Nos bancos de dados também foram anotadas duas substâncias correspondendo a dois *hits* identificados na cromatografia de bioafinidade, a burkholone, que foi identificada quando utilizada a XIAP, e a phthoxazolin A, anotada quando utilizada a STMN1. Contudo não existe na literatura nenhum material relacionando o potencial de interação das substâncias com ambas as proteínas estudadas neste trabalho, o que reforça a importância desta estratégia no estabelecimento de alvos para as substâncias citotóxicas. Naturalmente, essas informações precisam ser confirmadas com a purificação das substâncias e validação da sua atividade biológica.

3. Capítulo 2. Embelina potencializa a apoptose induzida por venetoclax em células de leucemia aguda

Manuscrito aceito para publicação na revista Toxicology in vitro.

3.1 Resumo

A leucemia mieloide aguda (LMA) é caracterizada pela expansão clonal da linhagem mielóide na medula óssea e no sangue periférico. É uma doença heterogênea, cujas alterações genéticas estão frequentemente associadas a prejuízos nas estratégias terapêuticas além da recidiva da doença. Assim, é necessário buscar novas substâncias e alvos para superar a LMA. Buscando compreender o efeito biológico de um modulador da XIAP nas células leucêmicas, iniciamos o estudo da substância embelina. A embelina (2,5-dihydroxy-3-undecyl-1,4-benzoquinona) é uma benzoquinona de origem natural descrita na literatura como inibidora de XIAP. O venetoclax (ABT-199) é um fármaco de biodisponibilidade oral, que inibe BCL2 seletivamente, aprovado para uso em 2016 pela agência regulatória dos Estados Unidos para o tratamento de leucemia linfocítica crônica. Contudo a resistência ao venetoclax, pode ser adquirida pela regulação positiva ou graças a outras proteínas anti-apoptóticas. Desta maneira, podemos inferir que a combinação entre os fármacos levaria a um efeito potente de indução de apoptose, uma vez que a cascata apoptótica, antes suprimida pela ação da XIAP e da BCL2, seria ativada na presença dessas substâncias. O objetivo deste capítulo foi estudar o efeito da terapia combinada de venetoclax e embelina em linhagens de LMA. A combinação de venetoclax e embelina reduz a viabilidade das linhagens celulares de LMA, aumentando a morte celular por apoptose, a regulação negativa de XIAP e o dano ao DNA induzido. Devido à baixa toxicidade da embelina, essa substância pode ser usada em combinação para reduzir as doses de venetoclax, o que poderia minimizar os efeitos colaterais com manutenção da resposta terapêutica ou até mesmo reverter mecanismos de resistência em pacientes com LMA. Nossas descobertas destacam ainda mais os medicamentos direcionados às proteínas inibidoras de apoptose (IAPs) como uma opção para o tratamento da LMA.

3.2. Introdução

A leucemia mielóide aguda (LMA) é caracterizada pela expansão clonal da linhagem mielóide na medula óssea e no sangue periférico. É uma doença heterogênea, cujas alterações genéticas estão frequentemente associadas a prejuízos nas estratégias terapêuticas além da recidiva da doença. Assim, é necessário buscar novas substâncias e alvos para superar a LMA⁴³.

Buscando compreender o efeito biológico de um modulador da XIAP nas células leucêmicas, iniciamos o estudo da substância embelina. A embelina (2,5-dihidroxi-3-undecil-1,4-benzoquinona) (Figura 3.1) é uma benzoquinona de origem natural proveniente do fruto da *Embelia ribes*, popularmente conhecida como vidanga, que tem sido estudada como tratamento para uma variedade de cânceres⁴⁴. A embelina é descrita na literatura como inibidora de XIAP, sendo a inibição decorrente da ligação da substância ao domínio BIR3 da proteína impedindo a associação da proteína com a caspase 9 resultando na supressão do crescimento celular, proliferação e migração em diferentes modelos tumorais⁴⁵.

Além do estudo da embelina sozinha, incluímos no nosso estudo o venetoclax (Figura 3.1). O venetoclax (ABT-199) é um fármaco de biodisponibilidade oral que inibe BCL2 seletivamente e foi aprovado para uso em 2016 pela agência regulatória dos Estados Unidos no tratamento de leucemia linfocítica crônica. Estudos *in vivo* e *in vitro* em células de LMA demonstraram que o fármaco apresenta alta efetividade. Contudo a resistência ao venetoclax pode ser adquirida pela regulação positiva ou graças a outras proteínas antiapoptóticas⁴⁶.

A capacidade de evitar a apoptose é uma das características da resistência aos tratamentos anticâncer atuais⁴⁷. Desta forma, drogas capazes de neutralizar as funções pró-oncogênicas e antiapoptóticas das IAPs, incluindo a XIAP, podem ser mais efetivas por levar à morte celular diretamente ou por diminuir o limiar de indução de apoptose, tornando o tratamento mais efetivo e menos tóxico⁴⁷.

3.2.1. Apoptose

O termo apoptose foi utilizado pela primeira vez em um artigo escrito por Kerr, Wyllie e Currie em 1972 para descrever um processo de morte celular que resulta na remoção ordenada e eficiente de células defeituosas. A apoptose pode ser provocada por

sinais de dentro da célula ou por sinais externos e a desregulação do aparato de morte celular apoptótico é um *hallmark* do câncer, sendo a alteração na apoptose responsável pelo desenvolvimento tumoral e também da resistência do tumor a terapias ^{48,49}.

A apoptose é um componente vital em processos como o desenvolvimento correto e funcionamento do sistema imune, a atrofia dependente de hormônios, desenvolvimento embrionário, a morte celular induzida e outros processos; e uma apoptose incorreta, seja o excesso ou a falta, é um fator importante em muitas condições humanas como as doenças neurodegenerativas, doenças autoimunes e o câncer. No câncer os mecanismos para regulação do ciclo celular encontram-se disfuncionais, tendo um excesso de proliferação celular e/ou uma queda na remoção de células. A supressão da apoptose durante a carcinogênese apresenta um papel importante no desenvolvimento e progressão de algumas linhagens tumorais e células tumorais podem adquirir resistência a apoptose por meio da expressão de proteínas anti-apoptóticas, como a BCL2, ou a regulação negativa ou mutação de proteínas pro-apoptóticas como a BAX ⁴⁸.

A apoptose ocorre normalmente durante o desenvolvimento e envelhecimento como um mecanismo homeostático para manter as populações de células nos tecidos e pode acontecer como um mecanismo de defesa a uma reação imune ou quando as células são danificadas por uma doença ou um agente nocivo⁴⁸.

Existem duas principais vias de apoptose, sendo elas a via extrínseca ou dependente de receptor e a via intrínseca ou mitocondrial. Existe uma via adicional que envolve a citotoxicidade mediada por células T e a morte celular dependente de perforina- granzyma. Todas as vias convergem para a via de execução de apoptose que é iniciada pela clivagem de caspase 3 e resulta em fragmentação do DNA, degradação de proteínas do citoesqueleto e nucleares, formação de corpos apoptóticos, reticulação de proteínas, expressão de ligantes para os receptores das células fagocitárias e captação pelas células fagocitárias. Células em processo apoptótico apresentam uma série de modificações bioquímicas como a clivagem de proteínas, a quebra de DNA e o reconhecimento fagocitário ⁴⁸.

A via extrínseca de apoptose, também conhecida como a via do receptor de morte, é iniciada por células NK ou macrófagos que produzem ligantes que ao ligar-se aos receptores presentes na membrana celular levam a ativação da pro- caspase- 8 em caspase-8. Este processo envolve receptores de morte da família do fator de necrose tumoral (TNF). Os membros desta família de receptores TNF compartilham domínios extracelulares ricos em cisteína e apresentam um domínio de 80 aminoácidos conhecido como o “domínio da

morte”. O domínio da morte apresenta um papel fundamental na transmissão do sinal de morte celular da superfície da célula para as vias intracelulares ^{48,50}.

A via intrínseca de apoptose envolve uma série de estímulos não mediados por receptores que produzem sinais intracelulares que agem diretamente em alvos dentro da célula. Esses estímulos podem atuar de forma positiva ou negativa, sendo os sinais negativos aqueles que envolvem a ausência de alguns fatores do crescimento, hormônios e citocinas que levam ao fracasso da supressão da morte. Os estímulos que atuam de forma positiva incluem a radiação, toxinas, hipóxia, hipertermia, infecções virais e radicais livres ⁴⁸⁻⁵⁰.

Todos estes estímulos levam a mudanças na membrana mitocondrial interna que resultam na abertura do poro de transição de permeabilidade mitocondrial, perda da capacidade mitocondrial da transmembrana e liberação de dois grupos principais de proteínas pro- apoptóticas do espaço intramembrana para o citosol. O primeiro grupo consiste no citocromo c, Smac/DIABLO e a serina protease HtrA2/Omi. O segundo grupo consiste em proteínas pró- apoptóticas, AIF, endonuclease G e CAD que são liberadas da mitocôndria durante a apoptose. A Smac/DIABLO e a HtrA2/Omi são relatados por promover a apoptose por meio da inibição das proteínas inibidoras de apoptose (IAP) ⁴⁸⁻⁵⁰.

O controle e a regulação destes eventos apoptóticos mitocondriais ocorrem por meio de membros da família BCL2 que atuam na permeabilidade da membrana mitocondrial podendo ser pro- apoptótica ou anti- apoptótica. Na via intrínseca a ativação de proteínas pró-apoptóticas membros desta família BCL2, BAX e BAK, neutralizam as proteínas anti-apoptóticas da família, BCL2L1 a MCL1 levando a perturbação da membrana externa mitocondrial, fazendo com que proteínas que, normalmente, encontram-se confinadas sejam dispersas no citosol. Estas proteínas incluem o citocromo- c que é importante na ativação da morte dependente de mitocôndria que liga-se a Apaf-1 provocando a formação de um complexo chamado de apoptossomo que recruta a pro-caspase- 9 para o seu domínio de recrutamento de caspase (CARD), levando a sua ativação e proteólise⁴⁸⁻⁵⁰.

A família BCL2 pode ser classificada em três subgrupos, um com ação pro-apoptótica e dois com ação anti- apoptótica, dependendo da composição do domínio BH. Os domínios BH1 e BH2 são importantes para dimerização com proteínas pro-apoptóticas, enquanto o domínio BH3 é crucial em interações com ambas as proteínas, estando presente em todos os membros da família. O domínio BH4 é encontrado, principalmente, nos

membros da família com atividade supressora de morte. O balanço de interações entre proteínas da família BCL2 é importante para determinar a sobrevivência celular ou a apoptose⁴⁹.

As caspases são responsáveis por uma cascata de sinalização que amplia o sinal apoptótico e leva a uma rápida morte celular encontrando-se amplamente expressas em sua forma inativa, proenzima, na maioria das células e uma vez ativadas podem ativar outras pro-caspases, iniciando assim esta cascata de sinalização. A cascata é possível graças a atividade proteolítica que fornece as caspases a capacidade de clivar proteínas nos seus resíduos de ácido aspártico⁴⁸⁻⁵⁰.

A caspase- 3 é considerada a mais importante das caspases executoras e é ativada por qualquer uma das caspases iniciadoras (caspase- 8, caspase- 9 ou caspase- 10). Esta caspase especificamente ativa a endonuclease CAD. Em células proliferativas a CAD esta complexada com o seu inibidor, ICAD, e em células em apoptose a ativação da caspase-3 cliva a ICAD liberando a CAD. A CAD então degrada o DNA cromossomal do núcleo e leva a condensação de cromatina. A caspase-3 também induz a reorganização do citoesqueleto e a desintegração da célula em corpos apoptóticos⁴⁸⁻⁵⁰.

A regulação negativa das caspases é realizada pelas proteínas inibidoras de apoptose e é característico desta família a presença do domínio BIR que leva a interação com diversas proteínas incluindo as caspases e a sua inativação. As ações das IAPs podem ser suprimidas por proteína mitocondriais como a Omi/ HtrA2 e a Smac/ DIABLO que são liberadas no citosol durante a apoptose⁴⁹.

A via final de apoptose é a via de execução, enquanto que é a ativação das caspases que inicia a fase apoptótica. As caspases executoras ativam a endonuclease citoplasmática que degrada o material nuclear, e proteases que degradam proteínas nucleares e do citoesqueleto. As caspase- 3, caspase- 6 e caspase- 7 funcionam como efetoras clivando diversos substratos como citoqueratinas, PARP, proteína do citoesqueleto alpha fodrin, a proteína nuclear NuMa e outras; levando assim a sua cascata⁴⁸⁻⁵⁰.

Sumarizando, a apoptose inicia-se quando o dano celular é detectado, levando à cascata de caspases que começa com a ativação das caspases iniciadoras (caspase-8 e caspase-9), seguido pela ativação das caspases executoras (caspase- 3, caspase- 6 e caspase- 7). A ativação das caspases executoras leva a iniciação de uma cascata de eventos que resulta na fragmentação do DNA pela ativação de endonucleases, destruição de proteínas nucleares do citoesqueleto, reticulação de proteínas, expressão de ligantes para as células fagocíticas e a formação de corpos apoptóticos⁵⁰.

Desta maneira, considerando o papel relevante das proteínas XIAP e BCL2 no processo de apoptose, podemos inferir que a combinação entre o fármaco venetoclax e o produto natural embelina levaria a um efeito potente de indução de apoptose, uma vez que a cascata apoptótica, antes suprimida pela ação destas proteínas, seria ativada na presença de substâncias que atual inibindo especificamente estes alvos.

3.3. Objetivos

3.3.1. Objetivo geral

Estudar o efeito da inibição simultânea de BCL2 e XIAP em células de LMA a partir da terapia combinada de venetoclax e embelina em linhagens de leucemia mielóide aguda.

3.3.2. Objetivos específicos

- (i) Avaliar a citotoxicidade da embelina em linhagens celulares leucêmicas
- (ii) Avaliar a citotoxicidade da terapia combinada por embelina e venetoclax em linhagens leucêmicas
- (iii) Avaliar o efeito do tratamento combinado sobre a apoptose de células de LMA

3.4. Material e métodos

3.4.1. Cultura de células e reagentes químicos

As linhagens celulares de leucemia mielóide aguda, MOLM13, MV4-11, OCI-AML3 e Kasumi 1, foram gentilmente cedidas pelo Prof. Eduardo Magalhães Rego (Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto, Brasil). As condições de cultura de células foram realizadas de acordo com as recomendações da ATCC e DSMZ. A embelina foi isolada de frutos maduros frescos de *Myrsine umbellata* Mart. (Primulaceae) coletadas em São José dos Alpes, Campos do Jordão (7°48'63"S, 45°2'648"W), São Paulo, Brasil (dezembro de 2014). A espécie foi identificada pela Dra. Inês Cordeiro do Instituto de Botânica do Estado de São Paulo, São Paulo, Brasil, um voucher foi depositado no herbário da mesma instituição (SILVA-3). Resumidamente, 252g de frutos secos foram extraídos com etanol 70% em turboextrator. O extrato resultante foi filtrado e o solvente evaporado sob pressão reduzida a 40 °C, obtendo-se o extrato hidroetanólico bruto. Foi então sucessivamente dividido entre a mistura MeOH-água (1:9) e *n*-hexano. A solução foi completamente evaporada para dar a fração seca correspondente. Foi submetido à

cromatografia em coluna de sílica gel utilizando gradientes graduais de *n*-hexano-acetato de etila para obtenção de doze frações principais (Fh-1 a Fh-12). A fração Fh-3 foi purificada por TLC preparativa (*n*-hexano-acetato de etila. 1:1, v/v) resultando na embelina. O Venetoclax (ATB-199) foi adquirido na TargetMol (Target Molecule Corp., Boston, MA, EUA) e preparado como uma solução estoque 50 mM em dimetilsulfóxido (Me₂SO₄; DMSO).

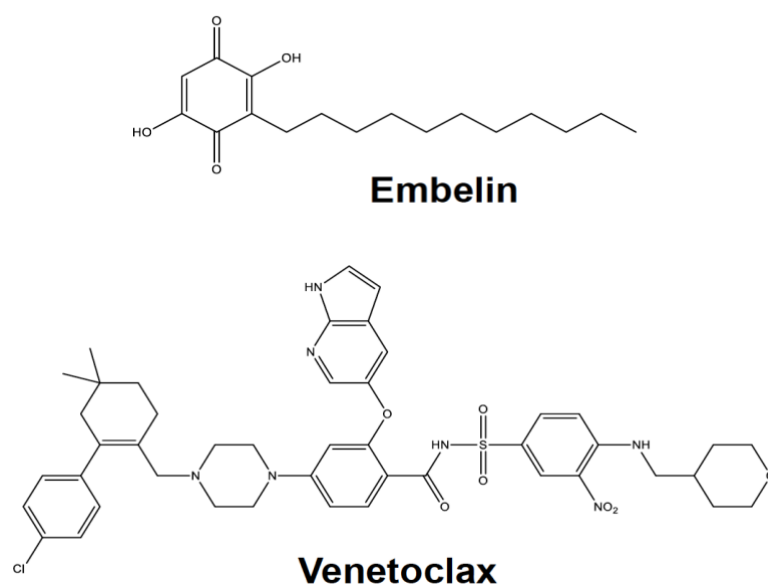


Figura 3.1: Estrutura química das substâncias utilizadas neste estudo: embelina e venetoclax.

3.4.2. Ensaio de MTT para avaliar a viabilidade celular

Os efeitos do venetoclax e/ou embelina na viabilidade celular foram investigados pelo ensaio do MTT⁵¹. Resumidamente, um total de 2×10^4 células por poço foram semeadas em uma placa de 96 poços e expostas a concentrações crescentes de venetoclax (Ø; 0,1; 0,5; 1; 5; 10 e 50 µM) ou embelina (Ø; 8,5; 17; 34; 85; 170 µM) por 48 h. Para a análise de tratamento combinado, as células Kasumi 1 e OCI-AML3 foram tratadas com doses graduadas de venetoclax (0,1; 0,5; 1; 5; 10 e 50 µM) e embelina (8,5; 17; 34; 85; 170 µM) sozinhas ou em combinação por 48 horas e os dados foram ilustrados usando o software do *multiple experiment viewer* (MeV) 4.9.0 (<http://www.tm4.org/mev/>). Em seguida, após a incubação, foram adicionados 10 µL de solução de MTT (5 mg / mL) (Thermo Fisher Scientific, San Jose, CA, EUA) e incubados a 37°C, 5% de CO₂ por 4 h. A reação foi interrompida usando 100 µL de HCl 0,1 N em isopropanol anidro. A viabilidade celular foi avaliada por espectrofotometria medindo a absorbância em 570 nm (Thermo Fisher Scientific, EUA). A concentração inibitória dos valores de 50% (IC₅₀) foi

calculada usando análise de regressão não linear no GraphPad Prism 8 (GraphPad Software, Inc., San Diego, CA, EUA).

3.4.3. Avaliação do nível de expressão de XIAP

O RNA total foi obtido usando o reagente TRIzol (Thermo Fisher Scientific). O cDNA foi sintetizado a partir de 1 µg de RNA usando um kit de transcrição reversa de cDNA de alta capacidade (Thermo Fisher Scientific). PCR quantitativa (qPCR) foi realizada utilizando um Real-Time System QuantStudio 3 de PCR (Thermo Fisher Scientific) e um Sistema de SybrGreen para *XIAP* (FW: GACAGTATGCAAGATGAGTCAAGTCA; RV: GCAAAGCTTCTCCTCTTGCAG), *HPRT1* (FW: GAACGTCTTGCTCGAGATGTGA; RV: TCCAGCAGGTCAGCAAAGAAT), e *ACTB* (FW: AGGCCAACCGCGAGAAG; RV: ACAGCCTGGATAGCAACGTACA). *HPRT1* e *ACTB* foram usados como genes de referência. Os valores de quantificação relativa foram calculados usando a equação $2^{-\Delta\Delta CT}$. Um negativo 'No Template Control' foi incluído para cada par de iniciador.

3.4.4. Ensaio de apoptose

Um total de 1×10^5 células por poço foi semeado em uma placa de 24 poços na presença de veículo (Ø) ou venetoclax (Kasumi 1:1µM; OCI-AML3:10µM) e / ou embelina (Kasumi 1:85 e 170 µM; OCI-AML3:8,5 e 34 µM) por 48 horas. Em seguida, as células foram lavadas com PBS gelado e ressuspensas em um tampão de ligação contendo 1 µg/mL de 7AAD e 1 µg/ml de APC marcada com anexina V. Todas as amostras foram analisadas por citometria de fluxo (FACSCalibur; Becton Dickinson) após incubação por 15 min à temperatura ambiente em uma área protegida da luz. Dez mil eventos foram adquiridos para cada amostra.

3.4.5. Western blot

A extração de proteína total foi realizada usando um tampão contendo Tris 100 mM (pH 7,6), Triton X-100 a 1%, NaCl 150 mM, PMSF 35 mg / mL, Na₃VO₄ 10 mM, NaF 100 mM, Na₄P₂O₇ 10 mM e 4 mM. EDTA. Quantidades iguais de proteína (30 µg) foram usadas a partir de extratos totais, seguido por SDS-PAGE e análise de *Western blotting* com os anticorpos indicados e foi realizada usando um Sistema de Substrato de Duração Estendida SuperSignal™ West Dura (Thermo Fisher Scientific, San Jose, CA, EUA) e um sistema de gel doc G: BOX Chemi XX6 (Syngene, Cambridge, RU). Os anticorpos

dirigidos contra XIAP (# 2042), caspase 3 (# 9665), caspase clivada 3 (# 9661), PARP1 (# 9542) e α -tubulina (# 2144) eram da Cell Signaling Technology (Danvers, MA, EUA). O anticorpo dirigido contra γ H2AX (sc-51748) foi da Santa Cruz Biotechnology (Santa Cruz, CA, EUA).

3.4.6. Modelagem computacional

O docking computacional foi modelado com o algoritmo PELE (*Protein Energy Landscape Exploration*) usando uma amostragem global e uma amostragem local de refinamento. A amostragem global é para encontrar possíveis locais de ligação. Para isso, o PELE usa translações e rotações maiores do ligante e inicia várias simulações (128 neste caso) com o ligante cobrindo toda a superfície da proteína. O local pega os melhores sítios de ligação encontrados na busca global e realiza um refinamento local, onde o ligante é solicitado a realizar traduções e rotações menores, que são acopladas a previsões mais completas da cadeia lateral e minimização de todo o complexo.

Aqui, as ligações de embelina foram modeladas para dois domínios BIR diferentes da proteína XIAP. Portanto, uma conformação BIR2 (estrutura PDB-4WVS) com resolução de 1,4 Å e uma conformação BIR3 (estrutura PDB-3CLX) com resolução de 1,4 Å foram utilizadas. Além disso, para confirmar o sítio de ligação, o domínio BIR3 também foi modelado em sua conformação de tetrâmero (estrutura PDB-3CLX). Protocolos globais e locais padrão, conforme mostrado no servidor web PELE, <https://pele.bsc.es/pele.wt>, foram usados.

3.5. Resultados e discussão

3.5.1. Venetoclax e embelina promovem diferentes efeitos citotóxicos nas células leucêmicas

Para os ensaios de viabilidade celular, um painel de linhas celulares de LMA foi escolhido com base em estudos anteriores sobre sensibilidade contra venetoclax⁵². Neste estudo, foi confirmado em um novo conjunto de experimentos que o venetoclax foi ativo contra as linhagens celulares de leucemia MOLM13, MV4-11 e Kasumi 1, com valores de IC₅₀ variando de <0,1 a 5 μ M. Em contraste, a linhagem celular OCI-AML3 é resistente ao tratamento com venetoclax, com valor de IC₅₀ de 40 μ M (Figura 3.2), corroborando com Lima et al. (2021)⁵². Por esta razão, células Kasumi 1 e OCI-AML3 foram selecionadas para ensaios de combinação de fármacos.

O venetoclax foi o primeiro antagonista mimético de BH3 potente e altamente seletivo de BCL2. Também denominado ABT-199 ou GDC-0199, foi descrito em 2013⁵³. O primeiro estudo de fase 1 do venetoclax em pacientes com leucemia linfóide refratária ou recidiva (# NCT01328626) relatou, além da segurança, uma taxa de resposta geral de 79% em pacientes pré-tratados com leucemia linfocítica crônica de alto risco de recidiva ou refratária, tendo 20% dos pacientes uma remissão completa⁵⁴. Estudos pré-clínicos usando venetoclax em LMA como uma única opção terapêutica demonstraram um padrão de sensibilidade semelhante aos encontrados para outros miméticos de BH3, como obatoclax e navitoclax, no entanto estudos *ex vivo* usando mieloblastos de LMA e células-tronco/progenitoras derivadas do sangue de pacientes de LMA ou a medula óssea foi altamente sensível ao venetoclax, exceto para casos com cariótipo complexo e mutações JAK2⁵⁵. De fato, grupos de pacientes desfavoráveis ou idosos com LMA têm apresentado uma resposta interessante ao venetoclax em ensaios clínicos^{56,57}.

O tratamento com embelina promoveu baixa citotoxicidade nas linhagens celulares avaliada, com valores de IC₅₀ superiores a 170 µM. Os resultados do tratamento das células com embelina são consistentes com a literatura em que a substância é descrita como substância citotóxica apenas em doses elevadas⁴⁴. Embora seja possível apontar algumas linhagens que tiveram queda mínima na viabilidade celular, como MOLM13 e OCI-AML3, a viabilidade celular não foi comprometida em 50% (Figura 3.2).

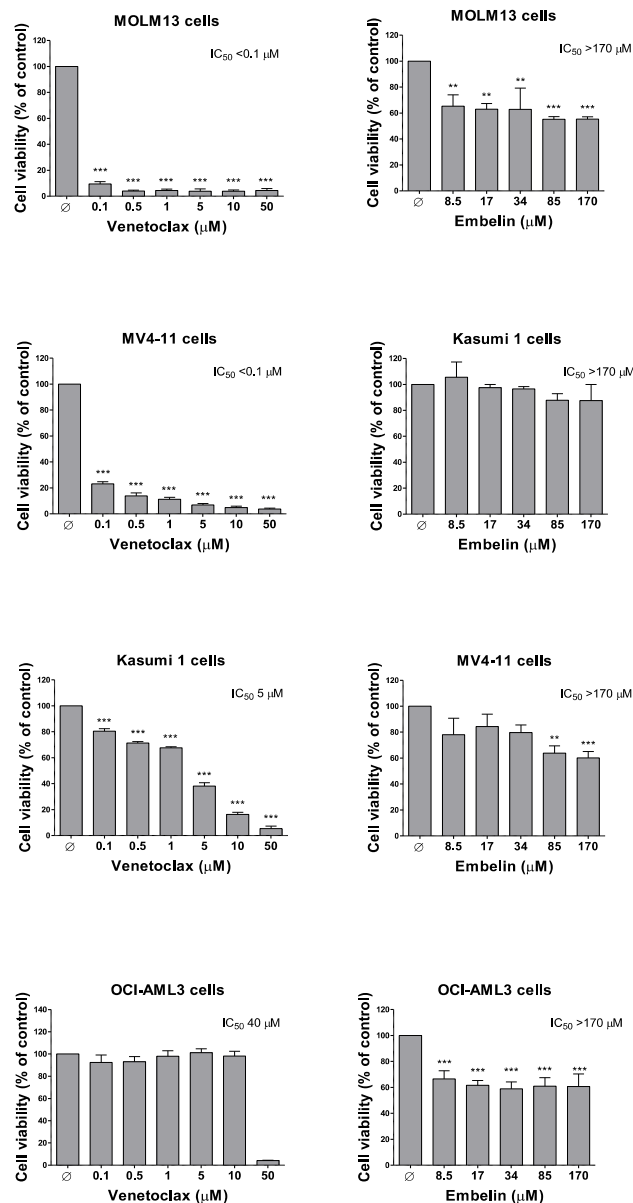


Figura 3.2: Viabilidade celular do painel de leucemia no tratamento com venetoclax e embelina. As células MOLM13, MV4-11, Kasumi 1 e OCI-AML 3 foram expostas ao tratamento com as concentrações apresentadas nas tabelas 4, 5 e 6 de venetoclax e embelina 48 horas. Os valores expressos representam a porcentagem de células viáveis para cada condição comparadas ao controle (células tratadas com veículo [Ø]). Os gráficos de barras representam a média ± DP de no mínimo quatro experimentos independentes. Os valores p e as linhas celulares são indicados nos gráficos; *p<0.05, **p<0.01, ***p<0.0001; Teste ANOVA e pós-teste de Bonferroni. (A) Painel de leucemias com o tratamento com venetoclax. O venetoclax apresentou IC₅₀ < 0,1 μM nas linhagens de MOLM13 e MV4-11 caracterizando ambas como sensíveis, IC₅₀ < 5,4 μM na linhagem Kasumi 1 caracterizando a como moderada e IC < 36 μM na linhagem OCI-AML 3 caracterizando a como resistente. (B) Painel de leucemias com o tratamento com a embelina. Conforme o que é relatado na literatura a embelina não comprometeu a viabilidade celular de nenhuma das células e não foi possível traçar os seus valores de IC₅₀.

A expressão de XIAP basal foi avaliada nas linhagens de células LMA usadas no presente estudo. No ensaio de RNAm, observou-se que todas as linhagens expressaram XIAP em níveis diferentes, porém, sem diferença significativa (Figura 3.3). O ensaio de *Western blotting* também revelou que todas as linhagens de células LMA expressaram altos níveis de XIAP (Figura 3.3).

Apesar dos resultados promissores para venetoclax, as taxas de sobrevivência para pacientes com LMA permanecem baixas, o que decorre devido à resistência à quimioterapia e às altas taxas de recidiva. A terapia combinada foi amplamente estudada e demonstrou melhores resultados⁵⁸⁻⁶⁰.

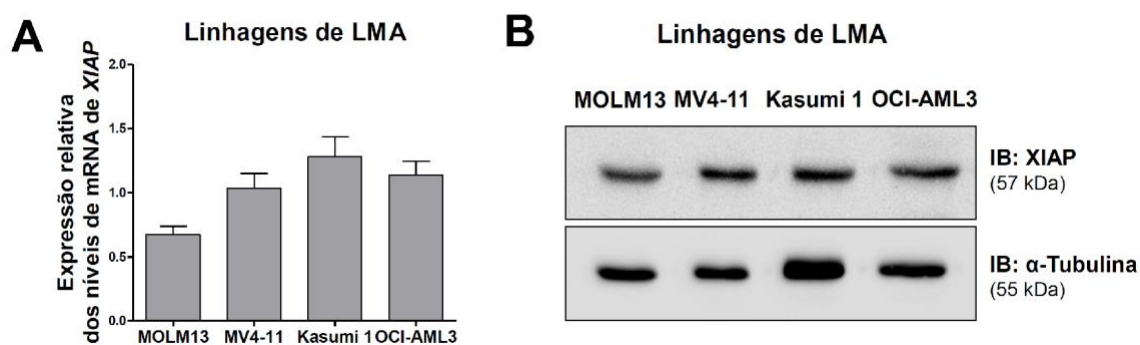


Figura 3.3: Nível de expressão de XIAP em diferentes linhagens leucêmicas. (A) Os níveis de XIAP foram avaliadas por PCR quantitativo. Todas as linhagens apresentaram níveis parecidos de expressão de XIAP. (B) Análise protéica realizada por Western Blot para as proteínas XIAP e α -tubulina nas linhagens celulares MOLM13, MV4-11, Kasumi 1 e OCI-AML 3. A revelação foi realizada pelo sistema SuperSignal™ West Dura Extended Duration Substrate system e o equipamento G:BOX Chemi XX6 gel doc.

3.5.2. A combinação de venetoclax e embelina potencializa os efeitos citotóxicos nas células Kasumi 1 e OCI-AML3 por meio da indução de apoptose

No tratamento combinado para células Kasumi 1, após 48h, os valores de IC_{50} diminuíram de 6,9 μ M de venetoclax sozinho para 4 μ M de venetoclax quando combinado com 85 μ M de embelina (Figura 3.4). Com uma concentração mais alta de embelina (170 μ M), o IC_{50} de venetoclax foi reduzido ainda mais para 1,8 μ M, demonstrando que embora a embelina não tenha propriedades citotóxicas, quando as células são tratadas em conjunto, há um aumento da citotoxicidade do antagonista de BCL2. Resultados semelhantes foram obtidos com células OCI-AML3, onde os valores de IC_{50} foram reduzidos de 31,2 μ M para 26,2 μ M e 21,7 μ M quando o venetoclax foi combinado com embelina a 8,5 μ M e 34 μ M,

respectivamente (Figura 3.4). Os resultados obtidos com OCI-AML3 são ainda mais estimulantes devido à natureza resistente da célula.

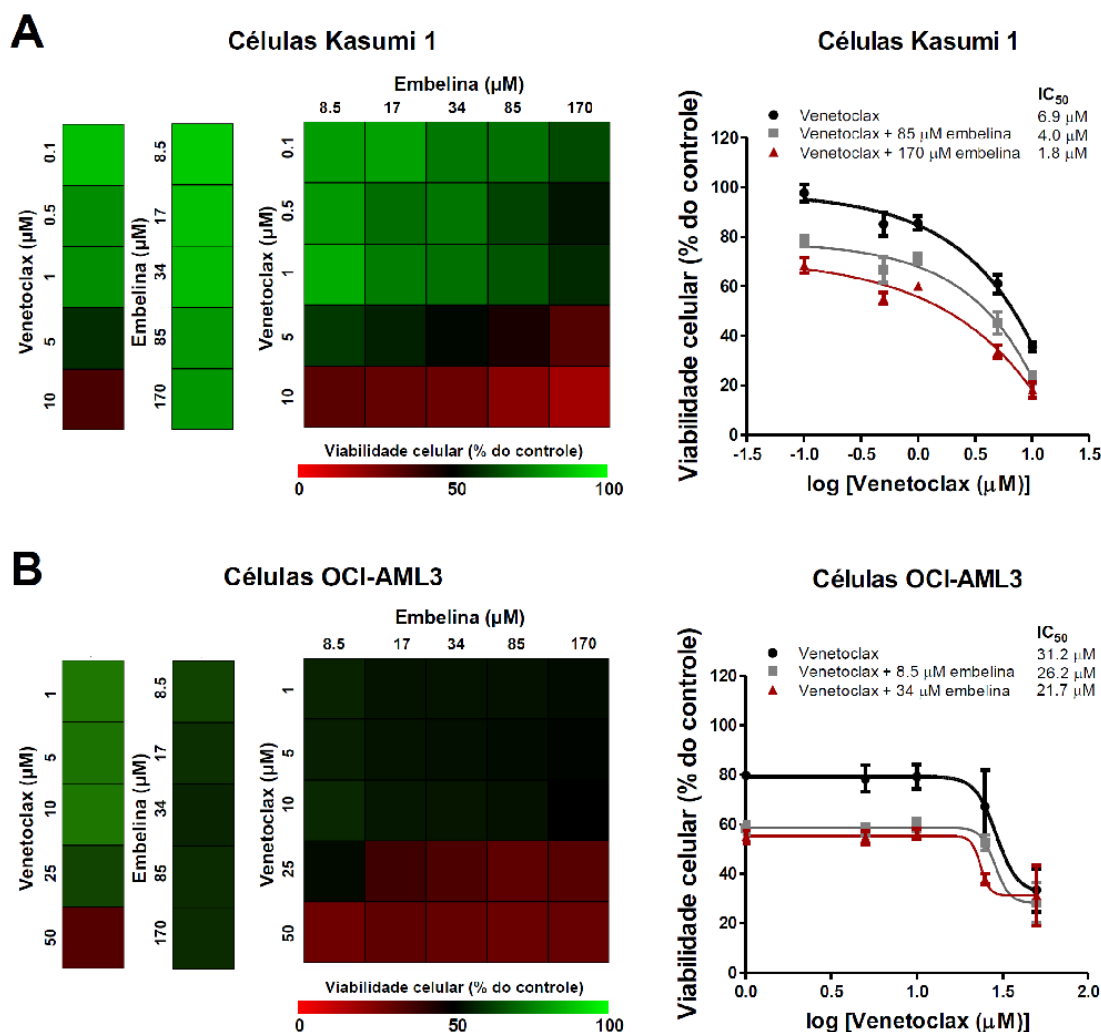


Figura 3.4: Efeitos do tratamento com venetoclax e embelina sob a viabilidade celular de linhagens celulares de leucemia Kasumi 1 e OCI- AML 3. Os valores de IC_{50} para cada composto estão descritos. (A) O IC_{50} em Kasumi 1 no tratamento apenas com o venetoclax foi de $6,9\mu\text{M}$ enquanto o tratamento combinado viu uma queda para $4,0\mu\text{M}$ e $1,8\mu\text{M}$. (B) O IC_{50} em OCI- AML 3 no tratamento apenas com venetoclax foi de $31,2\mu\text{M}$ enquanto o tratamento combinado viu uma queda para $26,2\mu\text{M}$ e $21,7\mu\text{M}$.

Para avaliar se o tratamento combinatório promove apoptose em linhagens celulares de OCI-AML3 e Kasumi1, as células foram tratadas com venetoclax a $10\mu\text{M}$ combinado com embelina a $8,5$ ou $24\mu\text{M}$ para células OCI-AML3 e venetoclax a $1,0\mu\text{M}$ combinado com embelina a 85 ou $170\mu\text{M}$ para células Kasumi 1 por 48h. A concentração foi escolhida com base no ensaio de viabilidade celular. Não houve aumento no número de células apoptóticas e/ou necróticas na presença de embelina com base na análise do ensaio de externalização de anexina-V para ambas as linhas celulares. O venetoclax, por outro lado, aumentou as células positivas para anexina V, o que indicou a presença de um número

crescente de células apoptóticas em comparação com o controle em ambas as linhagens testadas.

Enquanto a menor concentração de embelina (8,5 μM para células OCI-AML3 e 85 μM para Kasumi 1) não alterou os efeitos indutores de apoptose do venetoclax, o tratamento combinado com a maior concentração de embelina (34 μM para células OCI-AML3 e 170 μM para Kasumi 1), aumentou ainda mais a apoptose na presença de venetoclax, indicando efeitos potencializados para ambas as linhas celulares (Figura 4.5). Os resultados clínicos derivados de estudos usando inibidores de BCL2 em combinação com agentes LMA padrão, incluindo azacitidina, decitabina, citarabina em dose baixa, forneceram resultados promissores para o tratamento de pacientes com LMA⁶¹. O tratamento combinatório venetoclax com araC ou CAFdA em células de leucemia resistentes ao venetoclax como terapia de agente único, revelou que no tratamento combinatório, venetoclax aumentou a citotoxicidade dos análogos de nucleosídeos e reverteu parcialmente a resistência das células de leucemia também por indução de apoptose⁵⁹.

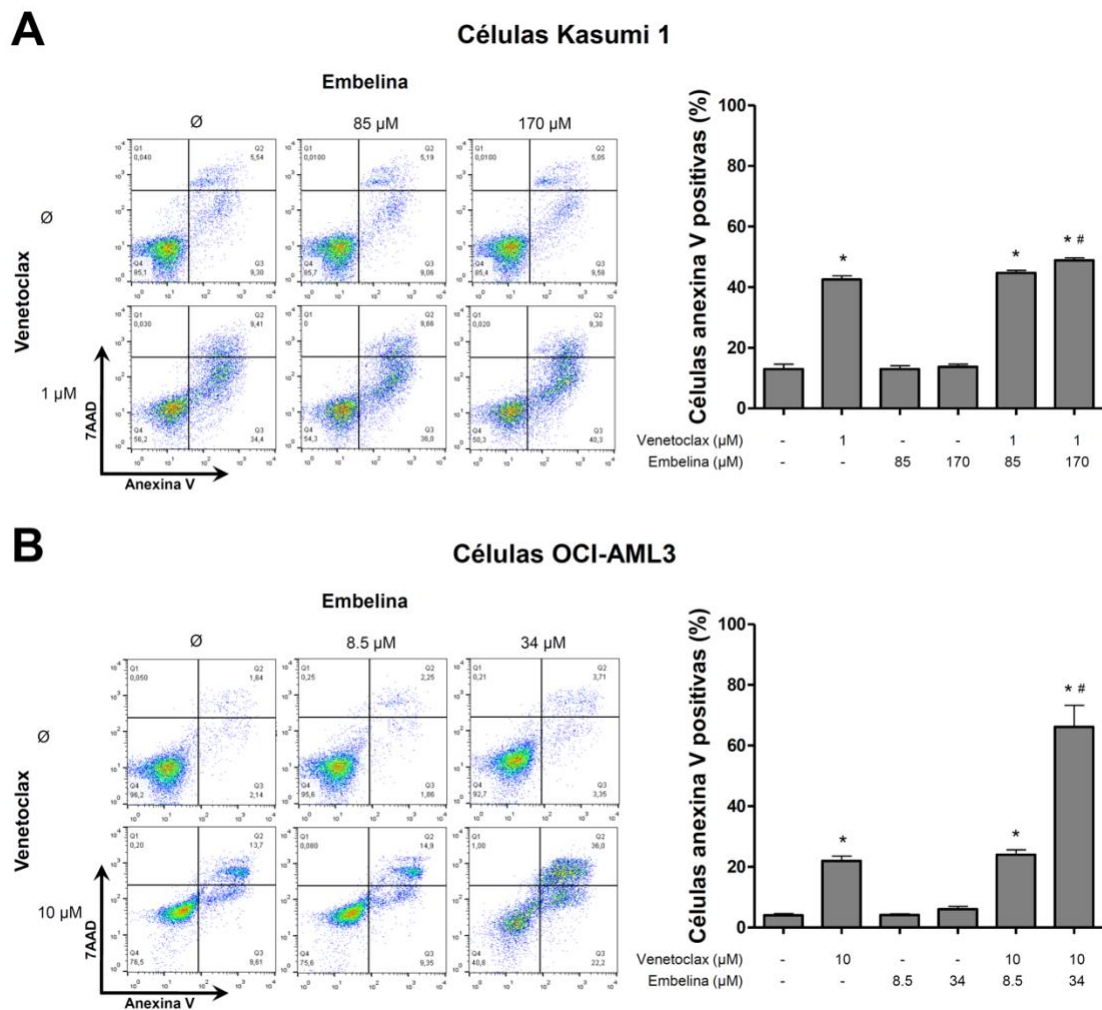


Figura 3.5: O tratamento com a combinação de venetoclax e embelina induz apoptose em celulares de leucemia. (A) Gráficos de pontos representativos de célula Kasumi 1 tratadas com venetoclax, embelina e a sua combinação ou veículo (Ø) por 48 horas. As células apoptóticas foram identificadas pela marcação com anexina V e 7AAD, detectadas por citometria de fluxo. Os quadrantes superiores e inferiores direito (Q2+Q3) contém a população apoptótica (células marcadas com anexina V). Os gráficos em barra representam a média±DP da quantificação de células apoptóticas de mínimo quatro experimentos independentes. Os valores de p são indicados nos gráficos; *p<0.05 para células tratado com venetoclax e/ou embelina versus células tratadas com veículo, #p<0.05 para células tratado com venetoclax ou embelina versus a combinação dos compostos; Teste ANOVA e pós teste Bonferroni. (B) Gráficos de pontos representativos de célula OCI-AML 3 com venetoclax, embelina e a sua combinação ou veículo (Ø) por 48 horas. As células apoptóticas foram identificadas pela marcação com anexina V e 7AAD, detectadas por citometria de fluxo. Os quadrantes superiores e inferiores direito (Q2+Q3) contém a população apoptótica (células marcadas com anexina V). Os gráficos em barra representam a média±DP da quantificação de células apoptóticas de mínimo quatro experimentos independentes. Os valores de p são indicados nos gráficos; *p<0.05 para células tratado com venetoclax e/ou embelina versus células tratadas com veículo, #p<0.05 para células tratado com venetoclax ou embelina versus a combinação dos compostos; Teste ANOVA e pós teste Bonferroni.

3.5.3. A embelina potencializa os efeitos da venetoclax por meio da regulação negativa de XIAP e da promoção de dano ao DNA e apoptose em células OCI-AML3

Considerando que nas células OCI-AML3 os efeitos da embelina na apoptose induzida por venetoclax foram mais proeminentes, essas células foram selecionadas para análise molecular. A expressão de XIAP foi reduzida e a expressão de γ H2AX foi induzida após monoterapia com embelina e venetoclax. No entanto, o tratamento combinado induziu uma forte redução da expressão de XIAP, caspase 3 e clivagem de PARP1 e fosforilação de H2AX, confirmando a indução de apoptose observada (Figura 4.6).

Os benefícios da embelina para o tratamento da LMA foram observados em Yang et al. (2015)⁶² que demonstrou células de LMA sensibilizadas com embelina para TRAIL por meio da repressão da via de sinal NF κ B, além disso, a terapia combinada de Ad-TRAIL e embelina foi atraente para aplicação clínica no tratamento de LMA.

Neste trabalho, foi demonstrado que a embelina isoladamente não induziu citotoxicidade, entretanto, quando combinada com venetoclax, mesmo em linhagens resistentes ao venetoclax, a embelina potencializou os efeitos citotóxicos. Esta característica pode ser explicada pela regulação negativa de XIAP induzida por embelina. Os inibidores de XIAP, como embelina e cloreto de dequalínio, promoveram uma capacidade clonogênica prejudicada de células-tronco de LMA⁶³ sugerindo que XIAP é um alvo promissor para LMA. Além disso, a regulação negativa de XIAP ativou genes que codificam componentes do proteassoma, levando à inibição da degradação do proteassoma em células de LMA. Em ambos os eventos, a ativação de caspases por direcionamento a proteínas antiapoptóticas, como XIAP e a inibição do crosstalk da atividade do proteassoma, cooperam para o efeito antineoplásico final em modelos de LMA⁶⁴.

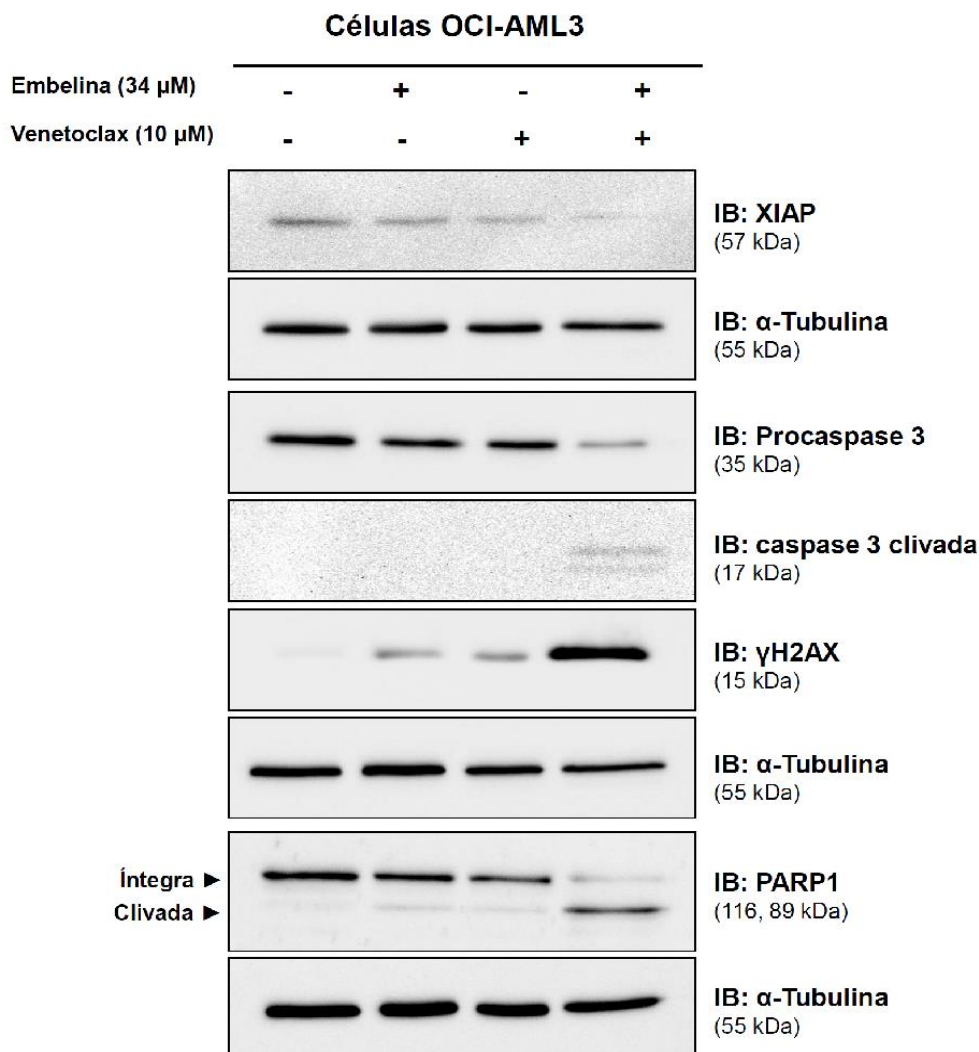


Figura 3.6: Análise de Western blot para o tratamento em monoterapia e combinação de embelina e venetoclax na linha celular OCI-AML3. A análise foi realizada avaliando XIAP, α -tubulina, procaspase 3, clivado-caspase 3, γ H2AX, PARP1 em extrato de células totais de OCI-AML3 tratado com embelina e venetoclax nas concentrações de 34 μ M e 10 μ M por 48 horas. As membranas foram testadas novamente com o anticorpo para a detecção de α -tubulina.

3.5.4. Ligação da embelina aos domínios BIR2 e BIR3 da XIAP

Para entender a ligação entre embelina e XIAP, realizamos estudos de encaixe de ajuste induzido usando dois domínios BIR dos domínios XIAP, BIR2 (PDB 4WVS) e BIR3 (3CLX). Esses domínios BIR foram usados devido à atividade anterior relacionada na modulação de XIAP. O domínio BIR2 é conhecido por diminuir a expressão de XIAP e aumentar a atividade citotóxica após o tratamento com oligonucleotídeo antisense AEG35156 em ensaios clínicos para uma variedade de tipos de tumor, incluindo carcinoma hepatocelular⁶⁵ e leucemia mielóide aguda⁶⁶. O domínio BIR3 é conhecido por ter inspirado

o projeto e a síntese de um grande número de compostos chamados miméticos de Smac⁶⁷. Embora as faixas de afinidade não sejam muito diferentes, as simulações indicam melhores perfis de energia de ligação, juntamente com mínimos locais mais localizados para o domínio BIR2. Os mínimos com afinidade mais predita são mostrados na Figura 3.7, onde observamos a busca global em azul escuro e o refinamento local em ciano, onde é possível medir a distância entre o carbono C1 da embelina ao carbono alfa LEU 307. O melhor mínimo observado para a simulação BIR2 é em torno de -40kcal/mol, enquanto o melhor mínimo para a simulação BIR3 é em torno de -35Kcal/mol (circulado em laranja para ambas as simulações). A simulação com os melhores mínimos para BIR2 é apontada na Figura 3.7. Outras simulações utilizando diferentes valores mínimos foram realizadas demonstrando resultados semelhantes em relação ao local de ligação da embelina (Figura 3.8). Além disso, como a estrutura 3CLX é um tetrâmero, uma simulação global no tetrâmero foi realizada, não mostrando nenhuma alteração importante em relação aos modos de ligação com o do monômero BIR3 (Figura 3.9).

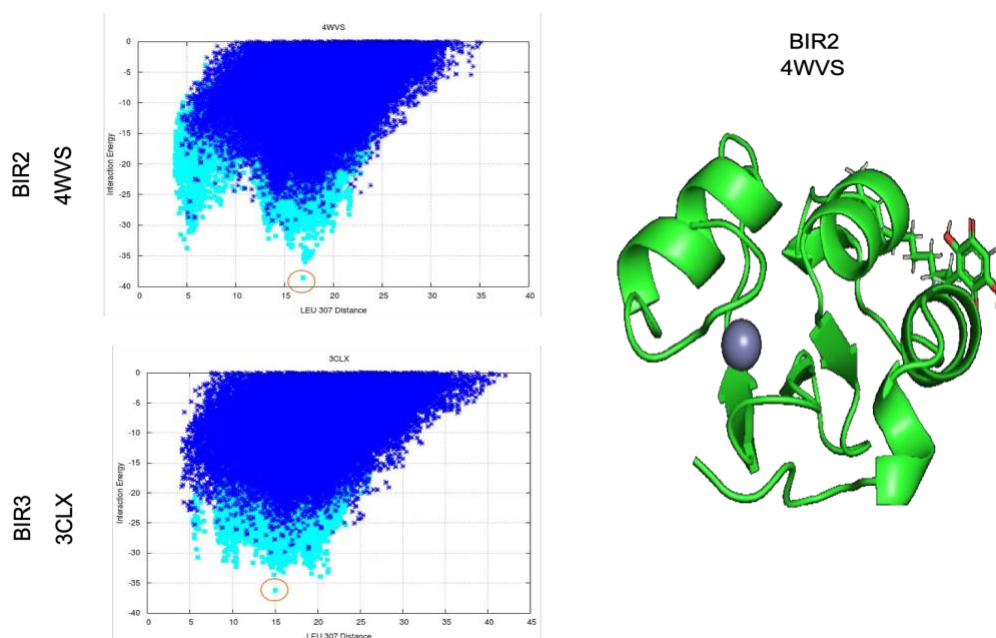


Figura 3.7: Gráfico plotado demonstrando a pesquisa global em azul escuro e o refinamento local em ciano. No eixo x, como referência, é a distância do carbono C1 (médio) da embelina ao carbono alfa LEU307 que foi escolhido devido à proximidade da pequena molécula no cristal. (B) Pose encaixada da embelina na estrutura XIAP do domínio BIR2 (PDB-4WVS) BIR3 (PDB-3CLX).

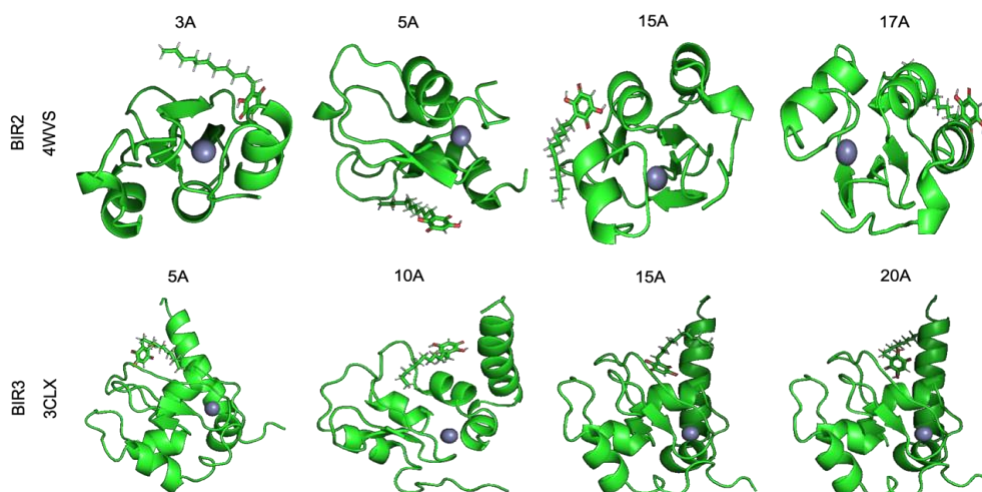


Figura 3.8: Poses de docking entre os domínios XIAP BIR2 e BIR3 e embelina usando diferentes energias mínimas. Pose encaixada da embelina na estrutura BIR 2 (PDB-4WVS) e BIR3 (PDB-3CLX) XIAP.

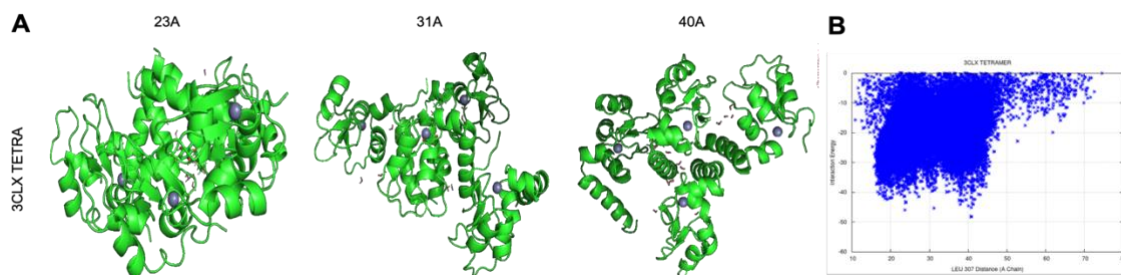


Figura 3.9: Análise de docking entre os domínios XIAP BIR2 e BIR3 e embelina usando XIAP em sua conformação de tetrâmero. (A) Ligação entre embelina e XIAP BIR 2 e 3 domínios usando PELE. Pose encaixada da embelina na estrutura BIR3 (PDB-3CLX) XIAP em sua conformação de tetrâmero. (B) Gráfico traçado demonstrando a pesquisa global em azul escuro e o refinamento local em ciano. No eixo x, como referência, é a distância do carbono C1 (médio) da embelina ao carbono-alfa LEU307 que foi escolhido devido à proximidade da pequena molécula no cristal.

3.6. Conclusão

A combinação de venetoclax e embelina reduz a viabilidade das células de LMA ao desencadear apoptose, regulação negativa de XIAP e dano ao DNA. Devido à baixa toxicidade da embelina, os achados aqui sugerem que esta substância pode ser usada em combinação para reduzir as doses de em esquemas de tratamento com venetoclax, o que poderia minimizar os efeitos colaterais com manutenção da resposta terapêutica ou até mesmo reverter mecanismos de resistência em pacientes com LMA. Estes dados reforçam que substâncias moduladoras de IAPs são uma opção anticâncer putativa para a LMA.

4. Considerações finais

O projeto inicial apresentado previa que no período de 24 meses a expressão heteróloga de ambas as proteínas, XIAP e STMN1, fossem padronizadas assim como os ensaios da cromatografia de bioafinidade. Com os resultados obtidos e os *hits* analisados então seriam purificadas substâncias ativas para os ensaios biológicos. A padronização foi concluída e ao fim foram testados 38 extratos de BRBs criando uma gama de dados que ainda podem ser trabalhados e estudados, contudo, em decorrência da pandemia mundial de Covid-19, não foi possível dar prosseguimento com a ideal inicial de purificação e isolamento de substâncias ativas impossibilitando os ensaios biológicos.

No lugar dos ensaios biológicos entraram as informações obtidas nos bancos de dados GNPS, AntiBase e Scifinder que ampliaram o conhecimento sobre o banco de bactérias do laboratório e também a sua riqueza. Desta maneira, duas substâncias foram sugeridas como potenciais moduladores dos alvos estudados, a burkholona com potencial afinidade para XIAP, e a phthoxazolin A com potencial afinidade para STMN1. Estes resultados abrem a perspectiva de estudo dessas substâncias em modelos de câncer com relevante papel da XIAP e STMN1.

Em paralelo, também foi evidenciado o efeito potenciado de indução de apoptose do tratamento combinado entre uma substância natural que atua sobre a XIAP, a embelina, e um fármaco, o venetoclax, já utilizado em clínica com atuação na proteína BCL2, também com relevante papel na regulação de apoptose em células tumorais. Neste estudo, ficou demonstrado que a abordagem combinada dos fármacos moduladores de alvos específicos e envolvidos na realização de um mesmo processo celular, a apoptose, traz um benefício significativo no aumento da atividade biológica. Mais além, estes dados ainda evidenciam a relevância da modulação de XIAP no efeito anticâncer de medicamento já em uso clínico, ressaltando a importância de se prospectar novas substâncias com capacidade de interagir com este alvo, oferecendo novas opções de tratamento anticâncer.

Durante todo o período do mestrado, período este que se estendeu além dos 24 meses iniciais, foram trabalhadas outras capacidades concomitantemente aos projetos. Utilizou-se o período para agregar conhecimento científico por meio de disciplinas, congressos nacionais/ internacionais, cursos e palestras, e organização de eventos.

5. Atividades realizadas no período

5.1. Disciplinas

- Novas Tendências em Farmacologia
- Seminários Gerais de Farmacologia
- Neurofarmacologia sem Fronteiras
- Farmacologia da Resposta Inflamatória
- Tópicos Avançados em Farmacologia
- Da Administração ao Sítio de Ação: Princípios de ADME e Farmacocinética
- Da Clonagem à Análise de Proteínas – Métodos e Estratégias
- Bases Moleculares e Celulares da Farmacologia Bioquímica
- Farmacologia de Produtos Naturais
- Farmacologia Cardiovascular
- Empreendedorismo, Inovação e Propriedade Intelectual – Módulo I (Curso Interunidades: Biotecnologia - Universidade de São Paulo)
- Farmacologia de Peptídeos Intracelulares
- Imunobiologia dos Tumores
- Conceitos Básicos de Cromatografia e CLAE
- Atividades de Cultura e Extensão Universitária na Pós-Graduação (Pró-Reitoria de Pós-Graduação - Universidade de São Paulo)

Foi obtido o conceito A em todas as disciplinas cursadas.

5.2. Formação complementar

2018- 2018

- Epigenetics in Pharmacology and Therapeutics. (Carga horária: 3h). Congress of Pharmacology and Experimental Therapeutics, SBFTE, Brasil.
- Writing a Scientific Paper. (Carga horária: 3h). Congress of Pharmacology and Experimental Therapeutics, SBFTE, Brasil.

2019- 2019

- Armazenamento, manuseio e descarte de produtos químicos. Instituto de Ciências Biomédicas, ICB, Brasil.
- Biossegurança e Boas Práticas de Laboratório do ICB. Instituto de Ciências Biomédicas, ICB, Brasil.

2020- 2020

- Introduction to the Biology of Cancer. John Hopkins University. Online course on coursera.

5.3. Participações em congressos

- Brazilian Congress of Pharmacology and Experimental Therapeutics (SBFTE). 2018. (Congresso).
- A.C. Camargo Cancer Centers- Next Frontiers to Cute Cancer. 2019. (Congresso).
- XVI International Symposium on Marine Natural Products & XI European Conference on Marine Natural Products. 2019.
- American Association for Cancer Research Virtual Annual Meeting II 2020.
- Brazilian Congress of Pharmacology and Experimental Therapeutics (SBFTE). 2020. (Congresso).
- Congresso Brasileiro de Hematologia, Hemoterapia e Terapia Celular - HEMOPLAY 2020

5.4. Apresentações de trabalhos

- **SILVA, C. S. M. R.**; BAUERMEISTER, A. ; MOREIRA, E. A. ; LOPES, N. P. ; TANGERINA, M. M. P. ; FERREIRA, M. J. P. ; MACHADO-NETO J.A. ; COSTA- . Use of Bioaffinity Chromatography in the Prospection of Anticancer Substances in Marine Actinomycetes: XIAP and STMN1 as pharmacological targets in cancer. 2019. (Apresentação de Trabalho/Outra).
- JIMENEZ, P. C. ; BARBOSA, G. H. ; BRANCO, P. C. ; **SILVA, C. S. M. R.** ; BAUERMEISTER, A. ; LOPES, N. P. ; COSTA- . A Target-Oriented Approach for Bioprospecting IAP Modulators in Extracts from Marine Bacteria. 2019. (Apresentação de Trabalho/Simpósio).
- **REIS-SILVA CSM**, BRANCO PC, SILVA FL, MORENO PR, LIMA K, MACHADO-NETO JA, COSTA-LOTUFO LV- Embelina potencializa a apoptose induzida por venetoclax em linhagem celular de leucemia mielode aguda kasumi 1. 2020. (Apresentação de trabalho/ Outra).

5.5. Organização de eventos

- Organização do “Curso de Inverno em Farmacologia 2019- Prof. Dr. André Luiz Colaço” – Comissão de seleção.
- Organização do “Curso de Inverno em Farmacologia 2020- Prof. Dr. André Luiz Colaço” – Comissão de seleção.
O curso de inverno não aconteceu em decorrência da Pandemia e foi adiado para o verão de 2021.
- Organização do “Curso de Férias em Farmacologia 2021- Prof. Dr. André Luiz Colaço” – Comissão de seleção.

5.6. Trabalhos publicados

- Rigato, D.B.; Branco, P.C.; **Reis Silva, C.S.M.**; Machado-Neto, J.A.; Costa-Lotufo, L.V.; Jimenez, P.C. BIRC7 (baculoviral IAP repeat containing 7). Atlas of Genetics and Cytogenetics in Oncology and Haematology, v. 24, p. 234-247, 2020.
- **Reis Silva, C.S.M.**; Barbosa, G.H.; Branco, P.C.; Jimenez, P.C.; Machado-Neto, J.A.; Costa-Lotufo, L.V. XIAP (X-linked inhibitor of apoptosis). Atlas Of Genetics And Cytogenetics In Oncology And Haematology, v. 24, p. 424-443, 2020.
- **Reis e Silva, C.S.M.**; Branco, P.C., Lima, K.; Silva, F.L.; Moreno, P.R.H.; Guallar, V.; Costa-Lotufo, L.V.; Machado-Neto. J.A. Embelin potentiates venetoclax-induced apoptosis in acute myeloid leukemia cells. Toxicology in vitro, in press. (<https://doi.org/10.1016/j.tiv.2021.105207>)

5.7. Capítulos de livros publicados

- **SILVA, C. S. M. R.**; BRANCO, P. C. ; FURTADO, L. C. ; SAHM, B. B. . Métodos de Prospecção de Novos Fármacos. In: Alice Cristina Rodrigues; Paola Cristina Branco. (Org.). Métodos de Prospecção de Novos Fármacos. 1ed. São Paulo: Editora Payá, 2019, v. 1, p. 167-175.

5.8. Aulas ministradas

- Aula de quimioterápicos II no “Curso de Férias em Farmacologia 2021- Prof. Dr. André Luiz Colaço” – Comissão de didática

6. Referências

1. Atanasov, A. *et al.* Discovery and resupply of pharmacologically active plant-derived natural products: A review - Infographic. (2008).
2. Jimenez, P. C. *et al.* Enriching cancer pharmacology with drugs of marine origin. *Br. J. Pharmacol.* **177**, 3–27 (2020).
3. Atanasov, A. G. *et al.* Natural products in drug discovery: advances and opportunities. *Nat. Rev. Drug Discov.* **2014**, (2021).
4. Cragg, G. M., Grothaus, P. G. & Newman, D. J. New horizons for old drugs and drug leads. *J. Nat. Prod.* **77**, 703–723 (2014).
5. Costa-lotufo, L. V., Wilke, D. V., Jimenez, P. C. & Epifanio, R. D. A. Marine organisms as a source of new pharmaceuticals: History and perspectives. *Quim. Nova* **32**, 703–716 (2009).
6. Ferreira, E. G. *et al.* Prospecting Anticancer Compounds in Actinomycetes Recovered from the Sediments of Saint Peter and Saint Paul’s Archipelago, Brazil. *Chem. Biodivers.* **13**, 1149–1157 (2016).
7. Gomes, N. G. M., Dasari, R., Chandra, S., Kiss, R. & Kornienko, A. Marine invertebrate metabolites with anticancer activities: Solutions to the ‘supply problem’. *Mar. Drugs* **14**, (2016).
8. Imhoff, J. F., Labes, A. & Wiese, J. Bio-mining the microbial treasures of the ocean: New natural products. *Biotechnol. Adv.* **29**, 468–482 (2011).
9. GLOBOCAN. The Global Cancer Observatory - All cancers. *Int. Agent Res. Cancer - WHO* **419**, 199–200 (2020).
10. Hanahan, D. & Weinberg, R. A. Hallmarks of cancer: The next generation. *Cell* **144**, 646–674 (2011).
11. Hanahan, D. & Weinberg, R. A. The Hallmarks of Cancer Review Douglas. *Cell* **100**, 57–70 (2000).
12. Nigam, M., Suleria, H. A. R., Farzaei, M. H. & Mishra, A. P. Marine anticancer drugs and their relevant targets: a treasure from the ocean. *DARU, J. Pharm. Sci.* **27**, 491–515 (2019).
13. Cragg, G. M. & Newman, D. J. Natural products: A continuing source of novel drug leads. *Biochim. Biophys. Acta - Gen. Subj.* **1830**, 3670–3695 (2013).
14. Wilke, D. V. *et al.* Anticancer Potential of Compounds from the Brazilian Blue Amazon. *Planta Med.* **87**, 49–70 (2021).

15. Approved Marine Drugs. <https://www.marinepharmacology.org/approved>.
16. Cragg, G. M., Grothaus, P. G. & Newman, D. J. Impact of natural products on developing new anti-cancer agents. *Chem. Rev.* **109**, 3012–3043 (2009).
17. Swinney, D. C. The value of translational biomarkers to phenotypic assays. *Front. Pharmacol.* **5 JUL**, 1–4 (2014).
18. Swinney, D. C. & Lee, J. A. Recent advances in phenotypic drug discovery. *F1000Research* **9**, 1–9 (2020).
19. Heilker, R., Lessel, U. & Bischoff, D. The power of combining phenotypic and target-focused drug discovery. *Drug Discov. Today* **24**, 526–532 (2019).
20. Bunnage, M. E., Gilbert, A. M., Jones, L. H. & Hett, E. C. Know your target, know your molecule. *Nat. Chem. Biol.* **11**, 368–372 (2015).
21. Instituto Nacional de Câncer José Alencar Gomes da Silva. *Estimativa 2020 : incidência de câncer no Brasil / Instituto Nacional de Câncer José Alencar Gomes da Silva.* (2019).
22. Lau, E. C. *et al.* Functional chromatographic technique for natural product isolation. *Org. Biomol. Chem.* **13**, 2255–2259 (2015).
23. Kang, M. J. *et al.* Functional Chromatography Reveals Three Natural Products that Target the Same Protein with Distinct Mechanisms of Action. *ChemBioChem* **15**, 2125–2131 (2014).
24. Sahm, B. D. B. *et al.* Targeting the Oncogenic TBX2 Transcription Factor With Chromomycins. *Front. Chem.* **8**, 1–9 (2020).
25. Abbas, R. & Larisch, S. Targeting XIAP for Promoting Cancer Cell Death—The Story of ARTS and SMAC. *Cells* **9**, 663 (2020).
26. Machado-Neto, J. A. *et al.* Stathmin 1 is involved in the highly proliferative phenotype of high-risk myelodysplastic syndromes and acute leukemia cells. *Leuk. Res.* **38**, 251–257 (2014).
27. Jost, P. J. & Vucic, D. Regulation of Cell Death and Immunity by XIAP. *Cold Spring Harb. Perspect. Biol.* **12**, (2020).
28. Machado-Neto, J. A., Saad, S. T. O. & Traina, F. Stathmin 1 in normal and malignant hematopoiesis. *BMB Rep.* **47**, 660–665 (2014).
29. Niu, G. Genomics-Driven Natural Product Discovery in Actinomycetes. *Trends Biotechnol.* **36**, 238–241 (2018).
30. Velasco-Alzate, K. Y. *et al.* Marine Bacteria from Rocas Atoll as a rich source of pharmacologically active compounds. *Mar. Drugs* **17**, 1–16 (2019).

31. Jeong, H. *et al.* Genome Sequences of Escherichia coli B strains REL606 and BL21(DE3). *J. Mol. Biol.* **394**, 644–652 (2009).
32. Büssow, K. *et al.* Structural genomics of human proteins - Target selection and generation of public catalog of expression clones. *Microb. Cell Fact.* **4**, 1–13 (2005).
33. Mongkolthanasarak, W. Classification of bacillus beneficial substances related to plants, humans and animals. *J. Microbiol. Biotechnol.* **22**, 1597–1604 (2012).
34. Ortiz, A. & Sansinenea, E. Chemical Compounds Produced by Bacillus sp. Factories and Their Role in Nature. *Mini-Reviews Med. Chem.* **19**, 373–380 (2018).
35. Juni, E. & Heym, G. A. Composed of Gram-Negative , Aerobic , Oxidase-Positive C occob acilli. *Int. J. Syst. Bacteriol.* **36**, 388–391 (1986).
36. Zachariah, S., Kumari, P. & Das, S. K. Psychrobacter pocilloporae sp. Nov., isolated from a coral, pocillopora eydouxi. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* **66**, 5091–5098 (2016).
37. Evans-yamamoto, D. *et al.* crossm Complete Genome Sequence of Psychrobacter sp . Strain. 18–19 (2019).
38. Kothe, C. I., Delbarre-Ladrat, C., Renault, P. & Passerini, D. Draft-genome sequence data and phylogenomic comparison of two marine-sourced bacterial strains Pseudoalteromonas sp. MIP2626 and Psychrobacter sp. BI730. *Data Br.* **31**, (2020).
39. Lasa, A. & Romalde, J. L. Genome sequence of three Psychrobacter sp. strains with potential applications in bioremediation. *Genomics Data* **12**, 7–10 (2017).
40. Mori, T. *et al.* Burkholone, a new cytotoxic antibiotic against IGF-I dependent cells from Burkholderia sp. *J. Antibiot. (Tokyo)*. **60**, 713–716 (2007).
41. OMURA, S., TANAKA, Y., KANAYA, I., SHINOSE, M. & TAKAHASHI, Y. Phthoxazolin, a specific inhibitor of cellulose biosynthesis, produced by a strain of Streptomyces sp. *J. Antibiot. (Tokyo)*. **43**, 1034–1036 (1990).
42. Kawada, M., Inoue, H., Usami, I. & Ikeda, D. Phthoxazolin A inhibits prostate cancer growth by modulating tumor-stromal cell interactions. *Cancer Sci.* **100**, 150–157 (2009).
43. Kirtonia, A. *et al.* A comprehensive review of genetic alterations and molecular targeted therapies for the implementation of personalized medicine in acute myeloid leukemia. *J. Mol. Med.* **98**, 1069–1091 (2020).
44. Ko, J. H. *et al.* The application of embelin for cancer prevention and therapy. *Molecules* **23**, 1–14 (2018).

45. Prabhu, K. S. *et al.* Targeting of X-linked inhibitor of apoptosis protein and PI3-kinase/AKT signaling by embelin suppresses growth of leukemic cells. *PLoS One* **12**, 1–17 (2017).
46. Chen, K. *et al.* Preclinical evaluation of a regimen combining chidamide and ABT-199 in acute myeloid leukemia. *Cell Death Dis.* **11**, (2020).
47. Fulda, S. & Vucic, D. Targeting IAP proteins for therapeutic intervention in cancer. *Nat. Rev. Drug Discov.* **11**, 109–124 (2012).
48. Elmore, S. Apoptosis: A Review of Programmed Cell Death. *Toxicol. Pathol.* **35**, 495–516 (2007).
49. Pistritto, G., Trisciuglio, D., Ceci, C., Alessia Garufi & D’Orazi, G. Apoptosis as anticancer mechanism: Function and dysfunction of its modulators and targeted therapeutic strategies. *Aging (Albany, NY)*. **8**, 603–619 (2016).
50. D’Arcy, M. S. Cell death: a review of the major forms of apoptosis, necrosis and autophagy. *Cell Biol. Int.* **43**, 582–592 (2019).
51. Mosmann, T. Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: Application to proliferation and cytotoxicity assays. *J. Immunol. Methods* **65**, 55–63 (1983).
52. Lima, K., Vicari, H.P., Carlos, J.A.E.G., Silva, J.C.L., Pontes, L.L.F., Rego, E.M., Machado-Neto, J. A. Obatoclax reduces cell viability of acute myeloid leukemia cell lines independently of their sensitivity to venetoclax. *Hematol Transfus Cell Ther* **in press**, in press (2021).
53. Souers, A. J. *et al.* ABT-199, a potent and selective BCL-2 inhibitor, achieves antitumor activity while sparing platelets. *Nat. Med.* **19**, 202–208 (2013).
54. Roberts, A. W., Stilgenbauer, S., Seymour, J. F. & Huang, D. C. S. Venetoclax in patients with previously treated chronic lymphocytic leukemia. *Clin. Cancer Res.* **23**, 4527–4533 (2017).
55. Pollyea, D. A. *et al.* Enasidenib, an inhibitor of mutant IDH2 proteins, induces durable remissions in older patients with newly diagnosed acute myeloid leukemia. *Leukemia* **33**, 2575–2584 (2019).
56. DiNardo, C. D. *et al.* Venetoclax combined with decitabine or azacitidine in treatment-naïve, elderly patients with acute myeloid leukemia. *Blood* **133**, 7–17 (2019).
57. DiNardo, C. D. *et al.* Azacitidine and Venetoclax in Previously Untreated Acute Myeloid Leukemia. *N. Engl. J. Med.* **383**, 617–629 (2020).
58. Liu, T., Zhang, J., Li, K., Deng, L. & Wang, H. Combination of an Autophagy

- Inducer and an Autophagy Inhibitor: A Smarter Strategy Emerging in Cancer Therapy. *Front. Pharmacol.* **11**, 1–14 (2020).
59. Nishi, R. *et al.* Venetoclax and alvocidib are both cytotoxic to acute myeloid leukemia cells resistant to cytarabine and clofarabine. *BMC Cancer* **20**, 1–13 (2020).
 60. Samra, B. *et al.* Outcome of adults with relapsed/refractory T-cell acute lymphoblastic leukemia or lymphoblastic lymphoma. *Am. J. Hematol.* **95**, E245–E247 (2020).
 61. Castelli, G., Pelosi, E. & Testa, U. Emerging therapies for acute myelogenous leukemia patients targeting apoptosis and mitochondrial metabolism. *Cancers (Basel)*. **11**, (2019).
 62. Yang, T. *et al.* Embelin Sensitizes Acute Myeloid Leukemia Cells to TRAIL through XIAP Inhibition and NF- κ B Inactivation. *Cell Biochem. Biophys.* **71**, 291–297 (2015).
 63. Moreno-Martínez, D. *et al.* XIAP inhibitors induce differentiation and impair clonogenic capacity of acute myeloid leukemia stem cells. *Oncotarget* **5**, 4337–4346 (2014).
 64. Carter, B. Z. *et al.* XIAP downregulation promotes caspase-dependent inhibition of proteasome activity in AML cells. *Leuk. Res.* **37**, 974–979 (2013).
 65. Lee, F. A. S. *et al.* Randomized Phase II Study of the X-linked Inhibitor of Apoptosis (XIAP) Antisense AEG35156 in Combination with Sorafenib in Patients with Advanced Hepatocellular Carcinoma (HCC). *Am. J. Clin. Oncol. Cancer Clin. Trials* **39**, 609–613 (2016).
 66. Schimmer, A. D. *et al.* Phase I/II trial of AEG35156 X-linked inhibitor of apoptosis protein antisense oligonucleotide combined with idarubicin and cytarabine in patients with relapsed or primary refractory acute myeloid leukemia. *J. Clin. Oncol.* **27**, 4741–4746 (2009).
 67. Cossu, F., Milani, M., Mastrangelo, E. & Lecis, D. Targeting the BIR Domains of Inhibitor of Apoptosis (IAP) Proteins in Cancer Treatment. *Computational and Structural Biotechnology Journal* vol. 17 142–150 (2019).



Embelin potentiates venetoclax-induced apoptosis in acute myeloid leukemia cells

Catarina Sofia Mateus Reis-Silva^a, Paola Cristina Branco^a, Keli Lima^{a,b}, Fabiana Lima Silva^c, Paulo Roberto Hrihorowitsch Moreno^c, Victor Guallar^{d,e}, Leticia Veras Costa-Lotufo^a, João Agostinho Machado-Neto^{a,*}

^a Department of Pharmacology, Institute of Biomedical Sciences, University of Sao Paulo, Sao Paulo, Brazil

^b Laboratory of Medical Investigation in Pathogenesis and Targeted Therapy in Onco-Immuno-Hematology (LIM-31), Department of Hematology, Faculty of Medicine, University of Sao Paulo, Sao Paulo, Brazil

^c Institute of Chemistry, University of Sao Paulo, Sao Paulo, Brazil

^d Barcelona Supercomputing Center (BSC), Barcelona, Spain

^e Institutio Catalana de Recerca i Estudis Avançats (ICREA), Barcelona, Spain

ARTICLE INFO

Keywords:

Acute myeloid leukemia
Embelin
Venetoclax
Apoptosis

ABSTRACT

Acute myeloid leukemia (AML) belongs to a group of hematological cancer whose relapse cases are often associated with chemoresistance that impairs treatment success and contributes to a poor outcome. For this reason, there is an urgent need for the development of new therapeutic strategies. Herein, we explore the combination of venetoclax, a BCL2 inhibitor, and embelin, an XIAP inhibitor, in the AML cell lines. Combinatory treatment of venetoclax and embelin potentiated cytotoxic effects of these drugs, demonstrating that both in combination present lower IC₅₀ values than single treatment of either venetoclax or embelin alone in both cell lines analyzed. The combinatory treatment further increased the apoptosis-inducing properties of both compounds. Computer simulations suggest that embelin binds to both BIR2 and BIR3 domains of XIAP, reinforcing this inhibitory apoptosis protein as an embelin target. Although all AML cell lines presented similar basal levels of XIAP, the combinatory treatment effectively inhibited XIAP expression in OCI-AML3 cells. In conclusion, the inhibition of both apoptosis inhibitory players, BCL2 and XIAP, by venetoclax and embelin, respectively, potentiated their cytotoxic effects in AML cell lines.

1. Introduction

Acute myeloid leukemia (AML) is characterized by clonal expansion of myeloid progenitors in the bone marrow and peripheral blood. It is a heterogeneous disease, whose genetic alterations are frequently associated with poor chemotherapeutic responses and disease relapse. Thus, it is necessary to search for new compounds and targets to overcome AML resistance (Kirtonia et al., 2020). Venetoclax (ABT-199) is an oral bioavailability drug that selectively inhibits the anti-apoptotic protein BCL2. It was approved by the FDA, in 2016, for the treatment of chronic lymphocytic leukemia, presenting positive results in 70% of treated patients, especially as a first-line treatment. Recently, clinical trials indicated that venetoclax therapy displays effective results in unfavorable risk or elderly AML patient groups (DiNardo et al., 2020; DiNardo

et al., 2019). Venetoclax activates intrinsic apoptosis, mediated by caspase 9 (Konopleva et al., 2006). Despite the promising results, both chemoresistance and relapse have been reported (Pei et al., 2020) and this is linked to positive regulation of anti-apoptotic proteins, including those of the Inhibitory Apoptosis Proteins (IAP) family (Chen et al., 2020).

Embelin (2,5-dihydroxy-3-undecyl-1,4-benzoquinone), a natural product isolated mainly from some species of Primulaceae, has been described to inhibit X-linked inhibitor of apoptosis (XIAP) (Nikolovska-Coleska et al., 2004; Ogawa and Natori, 1968). Among the IAPs, XIAP, also known as BIRC4, is recognized for its inhibitory activity of both initiator and executioner caspases, playing an important role in venetoclax resistance. XIAP has three characteristic functional domains in N-terminal, known as zinc finger baculoviral IAP repeats (BIRs), that

* Corresponding author at: Department of Pharmacology, Institute of Biomedical Sciences of the University of São Paulo, Av. Prof. Lineu Prestes, 1524, CEP 05508-900 São Paulo, SP, Brazil.

E-mail address: jamachadoneto@usp.br (J.A. Machado-Neto).

<https://doi.org/10.1016/j.tiv.2021.105207>

Received 29 April 2021; Received in revised form 28 June 2021; Accepted 29 June 2021

Available online 1 July 2021

0887-2333/© 2021 Elsevier Ltd. All rights reserved.

bind to active caspases 9, 3, and 7 (Reis-Silva et al., 2020). Embelin binds to the BIR3 domain of the protein preventing its association with caspase 9 resulting in suppression of cell growth, proliferation, and migration in different tumor models (Prabhu et al., 2017). Its antitumor activity has been demonstrated for a variety of cancer types, including leukemia (Coyle et al., 2019).

Since the mechanisms that suppress the activation of caspases (i.e., XIAP) may attenuate the effects of venetoclax, contributing to the observed chemoresistance in treated patients, here we investigate whether embelin potentiates the effects of venetoclax in AML cellular models.

2. Material and methods

2.1. Cell culture and reagent chemicals

AML cell lines, MOLM13, MV4-11, OCI-AML3, and Kasumi 1, were kindly provided by Prof. Eduardo Magalhães Rego (University of São Paulo, Ribeirão Preto, Brazil). Cell culture conditions were performed in accordance with the recommendations of the American Type Culture Collection (ATCC) and Leibniz Institute DSMZ-German Collection of Microorganisms and Cell Cultures (DSMZ). Venetoclax (ABT-199) was purchased from TargetMol (Target Molecule Corp., Boston, MA, USA) and prepared as a 50 mM stock solution in dimethyl sulfoxide (Me₂SO₄; DMSO) (Fig. 1A). Embelin was isolated from the ripe fruits of *Myrsine umbellata* Mart. (Primulaceae) collected at São José dos Alpes, Campos do Jordão (7°48'063" S, 452°648" W), São Paulo, Brazil (December 2014) as previously described with some modifications (Bisrat et al., 2014). The species was identified by Dr. Inês Cordeiro from Instituto de Botânica do Estado de São Paulo, São Paulo, Brazil. A voucher was deposited at the herbarium of the same institution (SILVA-3). Briefly,

252 g of dried fruits were extracted with 70% ethanol in a turbo-extractor. The resulting extract was filtered, and the solvent evaporated under reduced pressure at 40 °C, obtaining crude hydroethanolic extract. It was then successively partitioned between MeOH-water mixture (1:9) and *n*-hexane. The solution was completely evaporated to give the corresponding dried fraction. It was subjected to column chromatography on silica gel using step gradients of *n*-hexane-ethyl acetate to obtain twelve main fractions (Fh-1 to Fh-12). Fraction Fh-3 was purified by preparative TLC (*n*-hexane-ethyl acetate, 1:1, v/v) to give embelin (Fig. 1A).

The purity of the embelin was analyzed by an analytical HPLC Agilent 1260 chromatograph equipped with an ultraviolet spectrum scanning detector by the arrangement of photodiodes with a 60 mm flow cell. Zorbax Eclipse plus reverse phase C18 (4.6 × 150 mm) containing 3.5 μm particle diameter was used as the stationary phase and a flow rate of 1.0 ml/min was employed for analysis. HPLC analysis was carried out using the following elution gradient: solvent A) milli-Q water acidified with 0.1% acetic acid (v/v); solvent B) acetonitrile (ACN) and the ratios were 0–10 min - 10 → 25% B; 10–30 min - 25 → 50% B; 30–50 min - 50 → 100% B; 50–60 min - 100% B. The column temperature was 45 °C, the injection volume of the sample was 3 μl and the sample was dissolved in methanol at a concentration of 1 mg/ml. The purity of the compound was calculated based on the percentage of peak area, corresponding to 98.2% (Supplementary Fig. 1).

2.2. Cell viability assay

The effects of venetoclax and/or embelin on cell viability were investigated by methylthiazole tetrazolium (MTT) assays. Briefly, a total of 2×10^4 cells per well were plated in a 96-well plate and exposed to increasing concentrations of the venetoclax (0.1; 0.5; 1; 5; 10 and 50

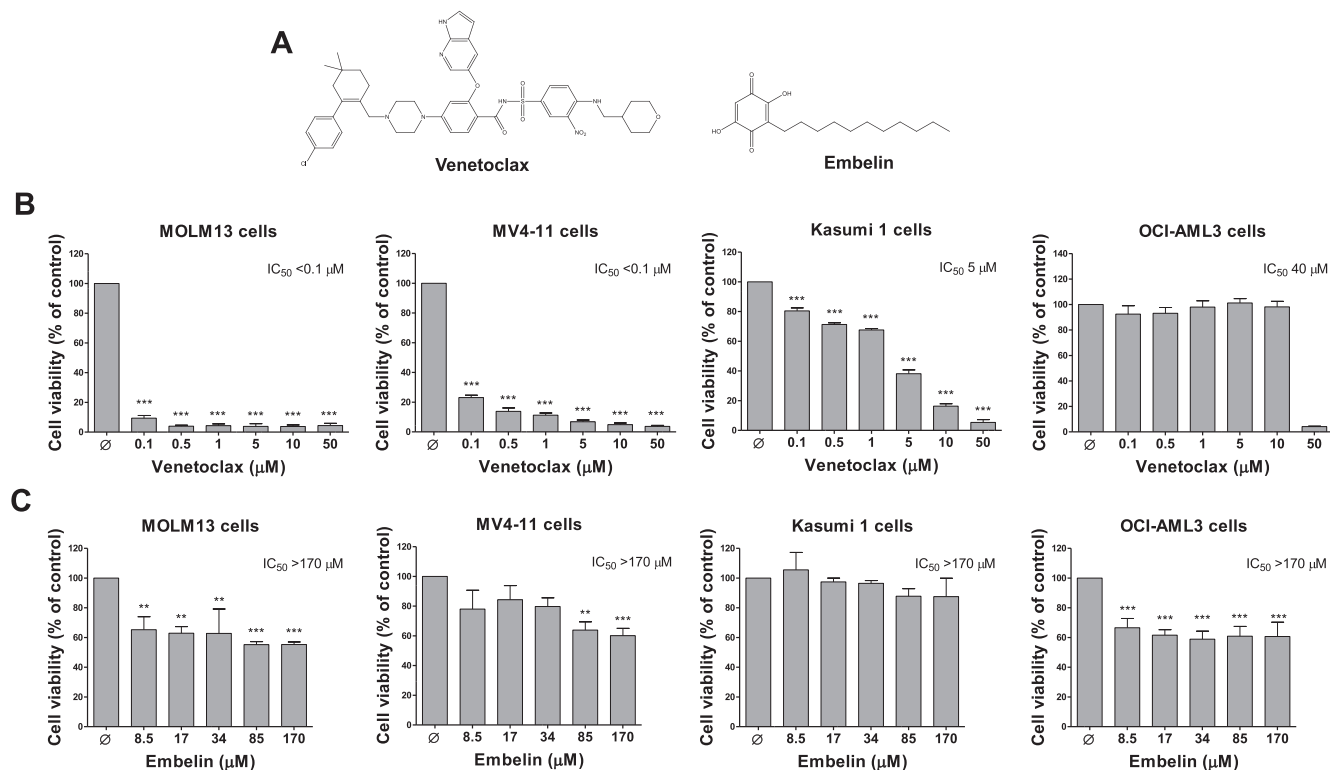


Fig. 1. Cell viability upon treatment with venetoclax and embelin in AML cell lines. (A) structures of embelin and venetoclax are illustrated. MOLM13, MV4-11, Kasumi 1, and OCI-AML3 cells were exposed to increasing concentrations of venetoclax (B) and embelin (C) for 48 h. The values expressed represent the percentage of viable cells for each condition compared to the control (cells treated with vehicle [∅]). The bar graphs represent the mean ± SD of at least four independent experiments. The IC₅₀ values are indicated in the graphs. The *p*-values and cell lines are shown in the graphs; * *p* < 0.05, ** *p* < 0.01, *** *p* < 0.0001; ANOVA and Bonferroni post-test.

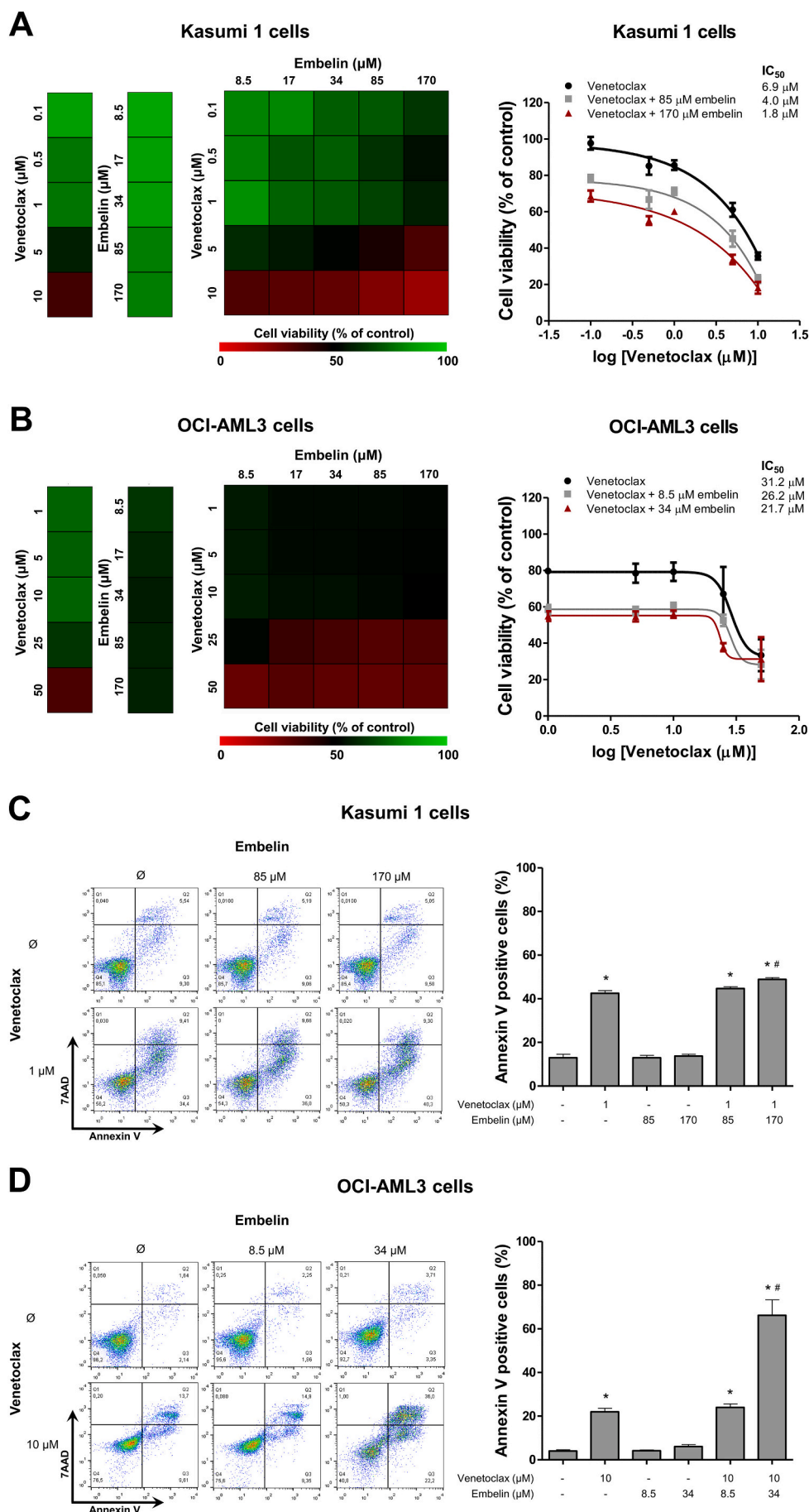


Fig. 2. Embelin potentiates venetoclax effects in Kasumi 1 and OCI-AML3 cells. Dose-response cytotoxicity for combined treatment were analyzed by methylthiazole tetrazolium (MTT) assay for Kasumi 1 (A) and OCI-AML3 (B) cells treated with graded concentrations of embelin and venetoclax alone or in combination with each other for 48 h, as indicated. Values are expressed as the percentage of viable cells for each condition relative to untreated controls. Results are shown as the mean of at least three independent experiments. Note that the IC_{50} in Kasumi 1 for treatment with venetoclax alone was 6.9 μM while in the combined treatment was reduced to 4.0 and 1.8 μM . Similarly, the IC_{50} in OCI-AML3 in treatment with only venetoclax was 31.2 μM , while in the combined treatment was reduced to 26.2 μM and 21.7 μM . Apoptosis was detected by flow cytometry in Kasumi 1 (C) and OCI-AML3 (D) cells treated with embelin and/or venetoclax for 48 h using an annexin V/7AAD staining method. Representative dot plots are shown for each condition; the upper and lower right quadrants (Q2 plus Q3) cumulatively contain the apoptotic population (annexin V+ cells). Bar graphs represent the mean \pm SD of at least three independent experiments quantifying apoptotic cell death. The p values and cell lines are indicated in the graphs; * $p < 0.05$ for venetoclax- and/or embelin-treated cells versus vehicle-treated cells, # $p < 0.05$ for venetoclax- or embelin-treated cells versus combination treatment at the corresponding dose; ANOVA test and Bonferroni post-test.

μM) or embelin (8.5; 17; 34; 85; 170 μM) for 48 h. For combined treatment analysis, Kasumi 1 and OCI-AML3 cells were treated with graded doses of venetoclax (0.1; 0.5; 1; 5; 10, 25 or 50 μM) and embelin (8.5; 17; 34; 85 or 170 μM) alone or in combination with each other for 48 h (Supplementary Table 1 and 2) and data were illustrated using multiple experiment viewer (MeV) 4.9.0 software (Saeed et al., 2003). Then, after incubation, 10 μl MTT solution (5 mg/mL) (Thermo Fisher Scientific, San Jose, CA, USA) was added and incubated at 37 °C, 5% CO₂ for 4 h. The reaction was stopped by using 100 μl of 0.1 N HCl in anhydrous isopropanol. Cell viability was evaluated by spectrophotometry measuring the absorbance at 570 nm (Thermo Fisher Scientific, USA). The inhibitory concentration of 50% (IC₅₀) values was calculated using non-linear regression analysis on GraphPad Prism 8 (GraphPad Software, Inc., San Diego, CA, USA).

2.3. Western blot analysis

Total protein extraction was performed using a buffer containing 100 mM Tris (pH 7.6), 1% Triton X-100, 150 mM NaCl, 2 mM PMSF, 10 mM Na₃VO₄, 100 mM NaF, 10 mM Na₄P₂O₇, and 4 mM EDTA. Equal amounts of protein (30 μg) were used from total extracts followed by SDS-PAGE and Western blot analysis with the indicated antibodies and was carried out using a SuperSignal™ West Dura Extended Duration Substrate System (Thermo Fisher Scientific, San Jose, CA, USA) and a G:BOX Chemi XX6 gel doc system (Syngene, Cambridge, UK). Antibodies directed against XIAP (#2042), caspase 3 (#9665), cleaved-caspase 3 (#9661), PARP1 (#9542) and α -tubulin (#2144) were from Cell Signaling Technology (Danvers, MA, USA). Antibody directed against γ H2AX (sc-51,748) was from Santa Cruz Biotechnology (Santa Cruz, CA, USA).

2.4. Quantitative RT-PCR (qRT-PCR)

Total RNA was obtained using TRIzol reagent (Thermo Fisher Scientific). cDNA was synthesized from 1 μg of RNA using a High-Capacity

cDNA Reverse Transcription Kit (Thermo Fisher Scientific). Quantitative PCR (qPCR) was performed using a QuantStudio 3 Real-Time PCR System (Thermo Fisher Scientific) and a SybrGreen System for the following expressions: XIAP (FW: GACAGTATGCAAGATGAGTCAAGTCA; RV: GCAAAGCTTCTCCTCTTGCAG), HPRT1 (FW: GAACGTCTTGCTCGA-GATGTGA; RV: TCCAGCAGGTCAGCAAAGAAT), and ACTB (FW: AGGCCAACCGGAGAAG; RV: ACAGCCTGGATAGCAACGTACA). HPRT1 and ACTB were used as reference genes. Relative quantification values were calculated using the 2^{- $\Delta\Delta$ CT} equation (Livak and Schmittgen, 2001). A negative 'No Template Control' was included for each primer pair.

2.5. Apoptosis assay

A total of 1 \times 10⁵ cells per well were seeded in a 24-well plate in the presence of vehicle or venetoclax (Kasumi 1: 1 μM ; OCI-AML3: 10 μM) and/or embelin (Kasumi 1: 85 and 170 μM ; OCI-AML3: 8.5 and 34 μM) for 48 h. Next, the cells were washed with ice-cold phosphate buffered saline (PBS) and resuspended in a binding buffer containing 1 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 7AAD and 1 $\mu\text{g}/\text{ml}$ allophycocyanin (APC) labeled annexin V. All specimens were analyzed by flow cytometry (FACS Calibur; Becton Dickinson) after incubation for 15 min at room temperature in a light-protected area. Ten thousand events were acquired for each sample.

2.6. Computational docking

Computational docking was modeled with Protein Energy Landscape Exploration (PELE) using a global and a refinement local sampling. The global sampling was to find possible binding sites. For this, PELE uses larger ligand translations and rotations and starts multiple simulations (128 in this case) with the ligand covering the entire protein surface. The local one takes the best binding sites found in the global search and performs a local refinement, where the ligand is asked to perform smaller translations and rotations, which are coupled to more thorough

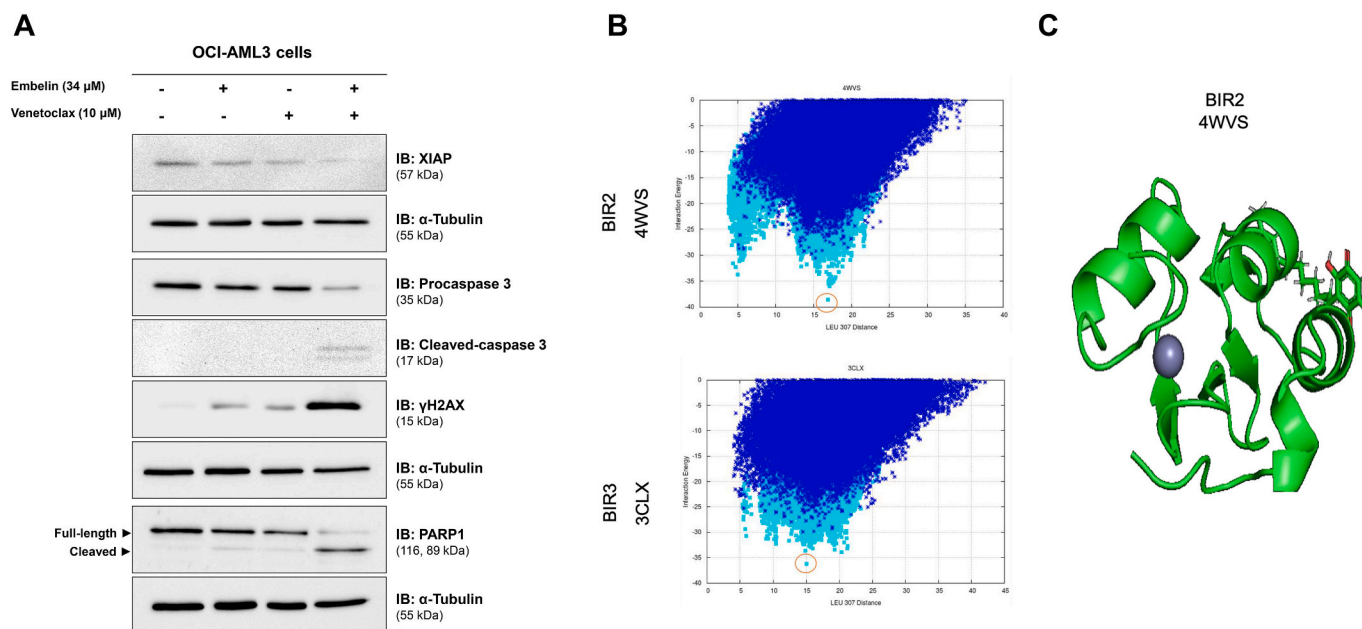


Fig. 3. Embelin increases venetoclax-induced XIAP reduction and caspase 3 activation in OCI-AML3 and docking analysis between XIAP domains BIR2 and BIR3 and embelin. (A) Western blot analysis for the treatment in monotherapy and combination of embelin and venetoclax in OCI-AML3 cell line. The analysis was performed evaluating XIAP, α -tubulin, procaspase 3, cleaved-caspase 3, γ H2AX, and PARP1 in total cells extracted from OCI-AML3 treated with embelin and venetoclax in concentrations of 34 μM and 10 μM for 48 h. Membranes were reprobed with the antibody for the detection of α -tubulin. Note that embelin plus venetoclax strongly induced molecular markers of apoptosis and DNA damage in OCI-AML3 cells. (B) Plotted graphic demonstrating the global search in dark blue and the local refinement in cyan. On the x axis, as a reference, is the distance of the C1 (middle) carbon of embelin to the LEU307 alpha carbon which was chosen due to the close proximity to the small molecule in the crystal. (C) Docked pose of embelin to the BIR2 domain (PDB- 4WVS) BIR3 (PDB- 3CLX) XIAP structure. (For interpretation of the references to colour in this figure legend, the reader is referred to the web version of this article.)

side chain predictions and minimization of the whole complex.

Herein, embelin bindings were modeled to two different BIR domains of XIAP protein. Therefore, a BIR2 conformation (PDB – 4WVS structure) with 1.4 Å resolution and a BIR3 conformation (PDB – 3CLX structure) with 1.4 Å resolution were used. Moreover, to confirm the binding site, the BIR3 domain was also modeled in its tetramer conformation (PDB – 3CLX structure). Default global and local protocols, as shown in the PELE web server (<https://pele.bsc.es/pele.wt>) were used.

2.7. Statistical analysis

Statistical analyses were performed using GraphPad Prism 8 (GraphPad Software, Inc.). For comparisons, ANOVA and Bonferroni post-test were used. A *p* value <0.05 was considered statistically significant.

3. Results

3.1. Venetoclax and embelin promote different cytotoxic effects on leukemia cells

In the present study, we confirmed that venetoclax was active against leukemia cell lines MOLM13, MV4–11, and Kasumi 1, with IC₅₀ values ranging from lower than 0.1 to 5 μM. By contrast, the OCI-AML3 cell line was resistant to venetoclax treatment, with IC₅₀ value of 40 μM (Fig. 1B), corroborating with Lima et al. (2021). For this reason, Kasumi 1 and OCI-AML3 cells were selected for drug combination assays.

Embelin treatment did not promote cytotoxicity in any cell line evaluated, with IC₅₀ values superior to 170 μM. Even though it is possible to point out some cell lines that had a minimum drop in the cell viability, such as MOLM13 and OCI-AML3, the cell viability has not been compromised by 50% (Fig. 1C).

The baseline XIAP expression was evaluated in AML cell lines used in the present study. In the mRNA assay, it was seen that although all of them express XIAP at different levels, the differences were not statistically significant (Supplementary Fig. 2A). Western blot assay also revealed that all AML cell lines expressed high XIAP levels (Supplementary Fig. 2B).

3.2. Venetoclax plus embelin combination potentiates cytotoxic effects on Kasumi 1 and OCI-AML3 cells through induction of apoptosis

In the combinatory treatment for Kasumi 1 cells, after 48 h, IC₅₀ values decreased from 6.9 μM for venetoclax alone to 4 μM for venetoclax when combined with 85 μM embelin (Fig. 2A). Upon a higher concentration of embelin (170 μM), the IC₅₀ of venetoclax was further reduced to 1.8 μM, demonstrating that although embelin did not have cytotoxic properties, when the cells were treated with venetoclax, it increased the cytotoxicity of the BCL2 antagonist. Similar results were obtained with OCI-AML3 cells, where the IC₅₀ values reduced from 31.2 μM to 26.2 μM and 21.7 μM when venetoclax was combined to embelin at 8.5 μM and 34 μM, respectively (Fig. 2B). The results obtained with OCI-AML3 were even more exciting because of the non-responsive nature of the cell.

To evaluate whether combinatory treatment promotes apoptosis in OCI-AML3 and Kasumi1 cell lines, we treated cells with venetoclax at 10 μM combined with embelin at 8.5 or 24 μM for OCI-AML3 cells and venetoclax at 1.0 μM combined with embelin at 85 or 170 μM for Kasumi 1 cells for 48 h. The concentration was chosen based on the cell viability assay. There was no increase in the number of apoptotic and/or necrotic cells in the presence of embelin based on the analysis of annexin-V externalization assay for both cell lines. Venetoclax, on the other hand, increased annexin V positive cells, which indicated the presence of an increasing number of apoptotic cells compared to the control in both tested cell lines.

While the lowest concentration of embelin (8.5 μM for OCI-AML3

cells and 85 μM for Kasumi 1) did not change apoptosis-inducing effects of venetoclax, combined treatment with the highest concentration of embelin (34 μM for OCI-AML3 cells and 170 μM for Kasumi 1) further increased apoptosis in the presence of venetoclax, indicating potentiating effects for both cell lines (Fig. 2C-D).

3.3. Embelin potentiates venetoclax effects through downregulating XIAP and promoting DNA damage and apoptosis in OCI-AML3 cells

Considering that the potentializing effects of embelin in venetoclax-induced apoptosis were more prominent in OCI-AML3 cells, these cells were selected for molecular analysis. XIAP expression was reduced and γH2AX expression was induced upon the single treatment with embelin and venetoclax. However, embelin plus venetoclax induced a strong reduction of XIAP expression, caspase 3 and PARP1 cleavage, and H2AX phosphorylation, confirming the observed apoptosis induction (Fig. 3A).

3.4. Embelin binds to BIR2 and BIR3 domains of XIAP

To better understand the binding between embelin and XIAP, we performed induced-fit docking studies using two BIR domains of XIAP, BIR2 (PDB 4WVS) and BIR3 (3CLX). These BIR domains were used due to the previous related activity of embelin in modulating XIAP (Prabhu et al., 2017). While affinity ranges are not too different, our simulations indicate better binding energy profiles along with more localized local minima for the BIR2 domain. The minimum interaction energy with predicted affinity is shown in Fig. 3B, where we observe the global search in dark blue and the local refinement in cyan, where it is possible to measure the distance between the C1 carbon of embelin to the LEU 307 alpha carbon. The minimum interaction energy observed for BIR2 simulation was around -40 kcal/mol, while the minimum interaction energy for BIR3 simulation was around -35 kcal/mol (circled in orange for both simulations). The simulation with minimum interaction energy for BIR2 is indicated in Fig. 3C. Other simulation using different values were performed demonstrating similar results regarding the binding site of embelin (Supplementary Fig. 3). Moreover, since the 3CLX structure is a tetramer, a global simulation on the tetramer was performed, showing no major alteration regarding the binding modes with that of the BIR3 monomer (Supplementary Fig. 4).

4. Discussion

Venetoclax, also named ABT-199 or GDC-0199, was the first potent and highly selective BH3 mimetic antagonist of BCL2 (Souers et al., 2013). Since its approval for the treatment of chronic lymphocytic leukemia, venetoclax has been extensively studied, with over 150 clinical trials underway, mainly for the treatment of AML patients (www.clinicaltrials.org). Despite the promising results, survival rates for AML remain low, mainly due to resistance to chemotherapy and high rates of relapse. Combinatory therapy has been extensively studied and demonstrated better results (Liu et al., 2019; Nishi et al., 2020; Samra et al., 2020). Altogether, due to the multiplicity of phenotypes for AML, combinatory strategies have been exploited, and herein we described the positive combinatory effects of venetoclax and embelin, an XIAP inhibitor.

Embelin benefits for AML treatment were already observed in research by Yang et al. (2015) that demonstrated embelin sensitized AML cell to TRAIL through the repression of NFκB signal pathway; moreover, combined therapy of Ad-TRAIL and embelin was attractive for clinical application in the treatment of AML. In the current study, we demonstrated that embelin alone did not induce cytotoxicity however, when combined with venetoclax, even in resistant-venetoclax cell lines, embelin potentiated the cytotoxic effects. This feature may be explained by the downregulation of XIAP induced by embelin. XIAP inhibitors, such as embelin and dequalinium chloride, promoted an impaired clonogenic capacity of AML stem cells (Moreno-Martinez et al., 2014),

suggesting that XIAP is a promising target for AML. In addition, XIAP downregulation activated genes encoding proteasomal components, leading to the inhibition of proteasome degradation in AML cells. Both events, activation of caspases by targeting antiapoptotic proteins, such as XIAP, and inhibition of proteasome activity crosstalk, contributed to the final antineoplastic effect in AML models (Carter et al., 2013). Present results suggested a direct interaction of embelin with both BIR2 and BIR3 domain of XIAP proteins, both already recognized as promising targets for cancer therapy (Cossu et al., 2019; Lee et al., 2016; Schimmer et al., 2009).

In summary, we found that venetoclax and embelin combination reduces the viability of AML cells by triggering apoptosis, XIAP downregulation, and induced DNA damage. Due to the low toxicity of embelin, this drug can be used in combination to reduce doses of venetoclax, which could minimize side effects with maintenance of the therapeutic response or even reverse resistance mechanisms in AML patients. Our findings further highlight IAP-targeting drugs as a putative anticancer option for AML.

Author's contribution

Execution of experiments, data analysis and interpretation, and manuscript writing and editing [C.M.S.R.S., P.C.B., K.L., F.L.S., V.G., and P.R.H.M.]. Conceptualization, formal analysis, supervision, manuscript writing and editing [L.V.C.-L. and J.A.M.-N].

Declaration of Competing Interest

The authors declare that there is no conflict of interest regarding the publication of this article.

Acknowledgements

The authors want to express their acknowledgements to Prof. Dr. Eduardo Magalhães Rego (University of São Paulo, Ribeirão Preto, Brazil) for providing leukemia cell lines. We are also grateful for the embelin HPLC analysis by Prof. Marcelo José Pena Ferreira (IB-USP). This work was supported by Fundação de Amparo a Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP), Brazil, under processes 2019/23864-7, 2018/06522-2, 2017/09022-8, and 2015/17177-6. This study was financed in part by the Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior - Brasil (CAPES) - Finance Code 001.

Appendix A. Supplementary data

Supplementary data to this article can be found online at <https://doi.org/10.1016/j.tiv.2021.105207>.

References

Bisrat, D., Mazumder, A., Asres, K., 2014. In vitro antimicrobial activity of a semi-synthetic derivative of embelin. *Ethiop. Pharm. J.* 30, 50–56.

Carter, B.Z., Mak, D.H., Wang, Z., Ma, W., Mak, P.Y., Andreeff, M., Davis, R.E., 2013. XIAP downregulation promotes caspase-dependent inhibition of proteasome activity in AML cells. *Leuk. Res.* 37, 974–979.

Chen, K., Yang, Q., Zha, J., Deng, M., Zhou, Y., Fu, G., Bi, S., Feng, L., Xu-Monette, Z.Y., Chen, X.L., Dai, Y., Young, K.H., Xu, B., 2020. Preclinical evaluation of a regimen combining chidamide and ABT-199 in acute myeloid leukemia. *Cell Death Dis.* 11, 778.

Cossu, F., Milani, M., Mastrangelo, E., Lecis, D., 2019. Targeting the BIR domains of inhibitor of apoptosis (IAP) proteins in cancer treatment. *Comput. Struct. Biotechnol. J.* 17, 142–150.

Coyle, R., Slattery, K., Ennis, L., O'Sullivan, M.J., Zisterer, D.M., 2019. The XIAP inhibitor embelin sensitizes malignant rhabdoid tumour cells to TRAIL treatment via enhanced activation of the extrinsic apoptotic pathway. *Int. J. Oncol.* 55, 191–202.

DiNardo, C.D., Pratz, K., Pullarkat, V., Jonas, B.A., Arellano, M., Becker, P.S., Frankfurt, O., Konopleva, M., Wei, A.H., Kantarjian, H.M., Xu, T., Hong, W.J., Chyla, B., Potluri, J., Pollyea, D.A., Letai, A., 2019. Venetoclax combined with decitabine or azacitidine in treatment-naïve, elderly patients with acute myeloid leukemia. *Blood* 133, 7–17.

DiNardo, C.D., Jonas, B.A., Pullarkat, V., Thirman, M.J., Garcia, J.S., Wei, A.H., Konopleva, M., Dohner, H., Letai, A., Fenaux, P., Koller, E., Havelange, V., Leber, B., Esteve, J., Wang, J., Pejsa, V., Hajek, R., Porkka, K., Illes, A., Lavie, D., Lemoli, R.M., Yamamoto, K., Yoon, S.S., Jang, J.H., Yeh, S.P., Turgut, M., Hong, W.J., Zhou, Y., Potluri, J., Pratz, K.W., 2020. Azacitidine and venetoclax in previously untreated acute myeloid leukemia. *N. Engl. J. Med.* 383, 617–629.

Kirtonia, A., Pandya, G., Sethi, G., Pandey, A.K., Das, B.C., Garg, M., 2020. A comprehensive review of genetic alterations and molecular targeted therapies for the implementation of personalized medicine in acute myeloid leukemia. *J. Mol. Med. (Berl.)* 98, 1069–1091.

Konopleva, M., Contractor, R., Tsao, T., Samudio, I., Ruvolo, P.P., Kitada, S., Deng, X., Zhai, D., Shi, Y.X., Sneed, T., Verhaegen, M., Soengas, M., Ruvolo, V.R., McQueen, T., Schober, W.D., Watt, J.C., Jiffar, T., Ling, X., Marini, F.C., Harris, D., Dietrich, M., Estrov, Z., McCubrey, J., May, W.S., Reed, J.C., Andreeff, M., 2006. Mechanisms of apoptosis sensitivity and resistance to the BH3 mimetic ABT-737 in acute myeloid leukemia. *Cancer Cell* 10, 375–388.

Lee, F.A., Zee, B.C., Cheung, F.Y., Kwong, P., Chiang, C.L., Leung, K.C., Siu, S.W., Lee, C., Lai, M., Kwok, C., Chong, M., Jolivet, J., Tung, S., 2016. Randomized phase II study of the X-linked inhibitor of apoptosis (XIAP) antisense AEG35156 in combination with sorafenib in patients with advanced hepatocellular carcinoma (HCC). *Am. J. Clin. Oncol.* 39, 609–613.

Lima, K., Vicari, H.P., Carlos, J.A.E.G., da Silva, J.C.L., Figueiredo-Pontes, L.L., Rego, E. M., Machado-Neto, J.A., 2021. Obatoclax reduces cell viability of acute myeloid leukemia cell lines independently of their sensitivity to venetoclax. *Hematol Transfus Cell Ther.* <https://doi.org/10.1016/j.htct.2021.01.004>.

Liu, F., Knight, T., Su, Y., Edwards, H., Wang, G., Wang, Y., Taub, J.W., Lin, H., Sun, L., Ge, Y., 2019. Venetoclax synergistically enhances the anti-leukemic activity of vosaroxin against acute myeloid leukemia cells ex vivo. *Target. Oncol.* 14, 351–364.

Livak, K.J., Schmittgen, T.D., 2001. Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2(-Delta Delta C(T)) Method. *Methods* 25, 402–408.

Moreno-Martinez, D., Nomdedeu, M., Lara-Castillo, M.C., Etxabe, A., Pratorcorona, M., Tesi, N., Diaz-Beya, M., Rozman, M., Montserrat, E., Urbano-Ispizua, A., Esteve, J., Risueno, R.M., 2014. XIAP inhibitors induce differentiation and impair clonogenic capacity of acute myeloid leukemia stem cells. *Oncotarget* 5, 4337–4346.

Nikolovska-Coleska, Z., Xu, L., Hu, Z., Tomita, Y., Li, P., Roller, P.P., Wang, R., Fang, X., Guo, R., Zhang, M., Lippman, M.E., Yang, D., Wang, S., 2004. Discovery of embelin as a cell-permeable, small-molecular weight inhibitor of XIAP through structure-based computational screening of a traditional herbal medicine three-dimensional structure database. *J. Med. Chem.* 47, 2430–2440.

Nishi, R., Shigemi, H., Negoro, E., Okura, M., Hosono, N., Yamauchi, T., 2020. Venetoclax and alvocidib are both cytotoxic to acute myeloid leukemia cells resistant to cytarabine and clofarabine. *BMC Cancer* 20, 984.

Ogawa, H., Natori, S., 1968. Hydroxybenzoquinones from Myrsinaceae plants – II. Distribution among Myrsinaceae plants in Japan. *Phytochemistry* 7, 773–782.

Pei, S., Pollyea, D.A., Gustafson, A., Stevens, B.M., Minhajuddin, M., Fu, R., Riemondy, K. A., Gillen, A.E., Sheridan, R.M., Kim, J., Costello, J.C., Amaya, M.L., Inguva, A., Winters, A., Ye, H., Krug, A., Jones, C.L., Adane, B., Khan, N., Ponder, J., Schowinsky, J., Abbott, D., Hammes, A., Myers, J.R., Ashton, J.M., Nemkov, T., D'Alessandro, A., Gutman, J.A., Ramsey, H.E., Savona, M.R., Smith, C.A., Jordan, C. T., 2020. Monocytic subclones confer resistance to venetoclax-based therapy in patients with acute myeloid leukemia. *Cancer Discov.* 10, 536–551.

Prabhu, K.S., Siveen, K.S., Kuttikrishnan, S., Iskandarani, A., Tsakou, M., Achkar, I.W., Therachiyil, L., Krishnankutty, R., Parraj, A., Kulinski, M., Merhi, M., Dermime, S., Mohammad, R.M., Uddin, S., 2017. Targeting of X-linked inhibitor of apoptosis protein and PI3-kinase/AKT signaling by embelin suppresses growth of leukemic cells. *PLoS One* 12, e0180895.

Reis-Silva, C.S.M., Barbosa, G.H., Branco, P.C., Jimenez, P.C., Machado-Neto, J.A., Costa-Lotufo, L.V., 2020. XIAP (X-linked inhibitor of apoptosis). *Atlas Genet. Cytogenet. Oncol. Haematol.* 24, 424–443.

Saeed, A.I., Sharov, V., White, J., Li, J., Liang, W., Bhagabati, N., Braisted, J., Klapa, M., Currier, T., Thiagarajan, M., Sturn, A., Snuffin, M., Rezantsev, A., Popov, D., Ryltsov, A., Kostukovich, E., Borisovskiy, I., Liu, Z., Vinsavich, A., Trush, V., Quackenbush, J., 2003. TM4: a free, open-source system for microarray data management and analysis. *Biotechniques* 34, 374–378.

Samra, B., Konopleva, M., Isidori, A., Daver, N., DiNardo, C., 2020. Venetoclax-based combinations in acute myeloid leukemia: current evidence and future directions. *Front. Oncol.* 10, 562558.

Schimmer, A.D., Estey, E.H., Borthakur, G., Carter, B.Z., Schiller, G.J., Tallman, M.S., Altman, J.K., Karp, J.E., Kassis, J., Hedley, D.W., Brandwein, J., Xu, W., Mak, D.H., LaCasse, E., Jacob, C., Morris, S.J., Jolivet, J., Andreeff, M., 2009. Phase I/II trial of AEG35156 X-linked inhibitor of apoptosis protein antisense oligonucleotide combined with idarubicin and cytarabine in patients with relapsed or primary refractory acute myeloid leukemia. *J. Clin. Oncol.* 27, 4741–4746.

Souers, A.J., Levenson, J.D., Boghaert, E.R., Ackler, S.L., Catron, N.D., Chen, J., Dayton, B.D., Ding, H., Enschede, S.H., Fairbrother, W.J., Huang, D.C., Hymowitz, S. G., Jin, S., Khaw, S.L., Kovar, P.J., Lam, L.T., Lee, J., Maecker, H.L., Marsh, K.C., Mason, K.D., Mitten, M.J., Nimmer, P.M., Oleksijew, A., Park, C.H., Park, C.M., Phillips, D.C., Roberts, A.W., Sampath, D., Seymour, J.F., Smith, M.L., Sullivan, G. M., Tahir, S.K., Tse, C., Wendt, M.D., Xiao, Y., Xue, J.C., Zhang, H., Humerickhouse, R.A., Rosenberg, S.H., Elmore, S.W., 2013. ABT-199, a potent and selective BCL-2 inhibitor, achieves antitumor activity while sparing platelets. *Nat. Med.* 19, 202–208.

Yang, T., Lan, J., Huang, Q., Chen, X., Sun, X., Liu, X., Yang, P., Jin, T., Wang, S., Mou, X., 2015. Embelin sensitizes acute myeloid leukemia cells to TRAIL through XIAP inhibition and NF-kappaB inactivation. *Cell Biochem. Biophys.* 71, 291–297.