

Aline Costa

**Investigação dos Mecanismos de Transdução de Sinais Envolvidos
na Apoptose Induzida pelas Chalconas Sintéticas Derivadas da 2,
4,5-Trimetoxiacetofenona e do 2',4',5'-Trimetoxibenzaldeído em
Leucemias Agudas**

Dissertação submetida ao Programa de Pós-Graduação em Farmácia, da Universidade Federal de Santa Catarina, para a obtenção do Grau de Mestre em Farmácia.

Orientadora: Prof^ª Dr.^a Maria Cláudia Santos da Silva

Florianópolis

2012

Catálogo na fonte pela Biblioteca Universitária
da
Universidade Federal de Santa Catarina

C837i Costa, Aline

Investigação dos mecanismos de transdução de sinais envolvidos na apoptose induzida pelas chalconas sintéticas derivadas da 2, 4,5-trimetoxiacetofenona e do 2',4',5'-trimetoxibenzaldeído em leucemias agudas [dissertação] / Aline Costa ; orientadora, Maria Cláudia Santos da Silva. - Florianópolis, SC, 2012.

158 p.: il., grafs., tabs.

Dissertação (mestrado) - Universidade Federal de Santa Catarina, Centro de Ciências da Saúde. Programa de Pós-Graduação em Farmácia.

Inclui referências

1. Farmácia. 2. Leucemia. 3. Apoptose. 4. Chalconas. I. Silva, Maria Cláudia Santos da. II. Universidade Federal de Santa Catarina. Programa de Pós-Graduação em Farmácia. III. Título.

CDU 615.12


“Investigação dos mecanismos de transdução de sinais envolvidos na apoptose induzida pelas chalconas sintéticas derivadas da 2,4,5-trimetoxiacetofenona e do 2',4',5'-trimetoxibenzaldeído em leucemias agudas”

POR

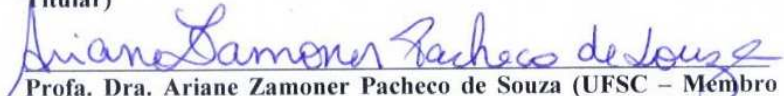
Aline Costa

Dissertação julgada e aprovada em sua forma final pelo(a) Orientador(a) e membros da Banca Examinadora, composta pelos Professores Doutores:

Banca Examinadora:



Prof. Dra. Thais Cristine Marques Sincero (UFSC – Membro Titular)



Prof. Dra. Ariane Zamoner Pacheco de Souza (UFSC – Membro Titular)



Dra. Daniela Ferraz Pereira Leite (TRIAL PHARMA - Membro Titular)



Prof. Dra. Maria Cláudia Santos Silva (UFSC – Orientadora)

Prof. Dr. Eloir Paulo Schenkel
Coordenador do Programa de Pós-Graduação em Farmácia da
UFSC

Florianópolis, 28 de fevereiro de 2012.

Dedico este trabalho aos meus pais, José Volni e Maria Rosélia, por serem meus maiores exemplos de dedicação e persistência.

AGRADECIMENTOS

A Deus, por iluminar meu caminho, me dar forças para seguir sempre em frente e por todas as oportunidades a mim oferecidas.

Aos meus queridos pais, por todo apoio, confiança, amor, carinho e atenção dedicados a mim durante toda a minha vida. Além disso, agradeço a eles, o incentivo e o investimento na minha educação, a qual sempre foi prioridade nos seus objetivos. Não há palavras suficientes para que eu possa demonstrar todo o meu amor, gratidão e admiração por vocês! Ao meu irmão Guilherme, pela paciência, pela amizade, por ser meu companheiro de todos os dias e por todo o carinho e compreensão.

A toda a minha família, avós, avós, tios, tias, primos e primas, que perto ou longe, sempre torceram por mim.

Ao Antônio, à Mafalda e aos seus filhos, que me ajudaram e me acolheram como filha em sua casa. Serei sempre grata pelo carinho e apoio que me deram. Agradeço especialmente à Susana, por todos os momentos em que convivemos juntas.

À vó Elza (*in memoriam*) e a Franciane por fazerem parte da minha vida e por todo amor e cuidado que tiveram comigo.

Ao Rodolfo, pela paciência, pelo apoio e por estar ao meu lado compartilhando bons e maus momentos.

Às minhas amigas Cintya, Marina, Jaqueline, Franciane, Francine, Rafaella e Cristine, pela amizade verdadeira e por proporcionarem momentos de alegria e descontração durante estes anos.

À minha orientadora, Prof^a Dr^a Maria Cláudia Santos da Silva, por todas as oportunidades, especialmente a de poder trabalhar em sua equipe, pelos ensinamentos e principalmente pela dedicação, atenção e carinho que dedica, não só a mim, mas a todos os seus alunos.

À Prof^a Dr^a Maria Luiza Bazzo, pelos ensinamentos, oportunidades e confiança.

A todos os colegas do laboratório, pela agradável convivência. Agradeço de forma especial à Ana Carolina, Gabriela, Haíra, Juliana, Karina, Letícia, Lorena, Manoela, Mariana, Michelle e Pâmela, por toda a ajuda, amizade e companherismo. À Marley, não só pela ajuda durante o tempo em que estive no laboratório, como pela amizade verdadeira que construímos neste período.

Ao Prof. Dr. Rosendo Augusto Yunes, ao Prof. Dr. Ricardo José Nunes, à Dr^a. Louise Domeneghini Chiaradia e à doutoranda Alessandra Mascarello do Laboratório Estrutura e Atividade do Departamento de Química da UFSC, pela colaboração, síntese das chalconas utilizadas

neste trabalho e auxílio nas discussões sobre a relação estrutura e atividade dos compostos.

A toda a equipe do Serviço de Anatomia Patológica do HU/UFSC, pelo ambiente agradável de trabalho; e principalmente às minhas chefes, Daniella e Gabriella, pela compreensão e incentivo durante a realização do mestrado. À Lilian e à Marcia, por todo carinho, ajuda, atenção e preocupação. Serei sempre grata à amizade de vocês.

À Maria Cristina, pela disponibilidade na revisão gramatical e pelas sugestões de melhorias para o trabalho. E ao Pedro e à Haíra pela revisão do abstract.

Ao Dr. João Paulo de Biaso Viola e a doutoranda Giuliana Patrícia Mognol da Divisão de Pós-graduação do Instituto Nacional do Câncer, por fornecerem as linhagens celulares utilizadas no desenvolvimento deste trabalho.

Ao Programa de Pós-Graduação em Farmácia, da Universidade Federal de Santa Catarina, pela oportunidade de concluir mais uma etapa da minha formação.

E enfim, a todos que, de alguma maneira, contribuíram para a realização deste trabalho, meus sinceros agradecimentos.

RESUMO

As leucemias constituem um grupo heterogêneo de neoplasias malignas decorrentes da proliferação clonal de células hematopoiéticas na medula óssea e/ou nos tecidos linfóides. Embora várias formas de terapia sejam utilizadas para combater as leucemias, a quimioterapia ainda é a terapia antileucêmica mais utilizada. Entretanto, a morbidade associada aos quimioterápicos ainda é um obstáculo significativo. Por isso, a busca por compostos antineoplásicos que tenham maior eficiência em induzir apoptose nas células tumorais e com insignificantes efeitos colaterais tornou-se alvo de investigação dos pesquisadores e da indústria farmacêutica. As chalconas e seus derivados têm sido descritos na literatura como promissores compostos com atividade antitumoral, no entanto, os mecanismos de ação citotóxica das chalconas ainda são controversos. Assim, neste trabalho, avaliamos o efeito citotóxico de 46 chalconas sintéticas derivadas da 2,4,5-trimetoxiacetofenona e do 2',4',5'-trimetoxibenzaldeído e os mecanismos de apoptose envolvidos nas células de leucemia mieloide aguda K562 e de leucemia linfóide aguda Jurkat, de origem humana. Nossos resultados mostram que do total de 46 chalconas testadas, 42 chalconas apresentaram efeito citotóxico significativo, e os compostos que causaram maior citototoxicidade foram as chalconas 13, 16, 19 e 26. O efeito citotóxico das chalconas avaliadas pode ser atribuído, provavelmente, às interações estéricas, pois os compostos que apresentaram efeitos citotóxicos menores possuem as mesmas características eletrônicas que as chalconas consideradas mais citotóxicas; desta forma não é possível estabelecer uma relação entre estrutura e atividade baseada nas características eletrônicas destes compostos. As chalconas com maior efeito citotóxico (chalconas 13, 16, 19 e 26) foram selecionadas para a realização de estudos citotóxicos em diferentes concentrações e tempos de incubação com as células K562 e Jurkat, e observou-se que essas chalconas causaram redução na viabilidade celular de ambas as células de maneira dependente da concentração e do tempo de incubação. Para avaliar a seletividade do efeito das chalconas sobre as células leucêmicas, as chalconas que tiveram maior efeito citotóxico também foram avaliadas quanto ao efeito citotóxico em células mononucleares de indivíduos saudáveis. Os resultados mostram que as chalconas não causaram alteração significativa na viabilidade celular dos mononucleares. Para estudar os mecanismos pelos quais esses compostos provocaram morte celular nas células K562 e Jurkat, avaliamos o ciclo celular, a indução a apoptose, o potencial mitocondrial, a expressão das proteínas Bcl-2,

survivina, Bax, p53, Ki67 e caspase-3 ativa. Os resultados mostram que as chalconas 13, 16, 19 e 26 causaram aumento na proporção de células na fase Sub G0/G1 nas células Jurkat, e as chalconas 13 e 26 causaram mesmo efeito na célula K562. Além disso, as chalconas causaram diminuição na expressão do marcador de proliferação celular Ki67, sugerindo que o mecanismo de ação destes compostos envolve a inibição da proliferação celular. A avaliação da apoptose por microscopia de fluorescência e marcação com anexina V mostrou que as chalconas causaram morte celular por indução da apoptose. O estudo do mecanismo de ação dessas chalconas mostrou que as mesmas causaram redução do potencial mitocondrial, diminuição da expressão da proteína antiapoptótica Bcl-2 e aumento da expressão da proteína proapoptótica Bax, indicando que o mecanismo de indução de apoptose destes compostos envolve a via intrínseca da apoptose. Além disso, o mecanismo de ação destes compostos envolve o aumento da caspase-3 ativa e a diminuição da expressão da proteína antiapoptótica survivina e da proteína p53 mutada.

Palavras-chave: Leucemia, apoptose e chalconas.

ABSTRACT

Investigation of Signal Transduction Mechanisms Involved in Apoptosis Induced by Synthetic Chalcones Derived from 2,4,5-Trimethoxyacetophenone and 2',4',5'-Trimethoxybenzaldehyde in Acute Leukemia

Leukemias are a diverse group of hematologic neoplasms caused by clonal proliferation of hematopoietic cells in bone marrow and/or lymphoid tissues. Although various forms of therapy are used in the treatment of leukemia, chemotherapy is still the most widely used anti-leukemic therapy. However, the morbidity associated with chemotherapy is a significant problem, thus, the search for anti-cancer compounds that induce tumor cell death more efficiently with fewer side effects became a major target for pharmaceutical research. Chalcones and their derivatives have been described in the literature as promising compounds with anti-tumor activity, however, their mechanisms of cytotoxic action are still under debate. In this work we evaluated the cytotoxic effect of 46 synthetic chalcones derived from 2,4,5-trimethoxyacetophenone and 2',4',5'-trimethoxybenzaldehyde and the apoptotic mechanisms involved in acute myeloid leukemia cells (K562) as well as acute lymphoid leukemia cells (Jurkat). Our results show that out of 46 chalcones tested, 42 chalcones showed significant cytotoxic effect, whereas the compounds with greater cytotoxic effect were chalcones 13, 16, 19, and 26. The cytotoxic effect of these active chalcones is probably due to their steric interactions, since some compounds with poor cytotoxic activity present the same electronic characteristics as that those considered active; thus it is not possible to establish a relationship based on the electronic characteristics of these compounds. The chalcones that provided the best cytotoxic effect (13, 16, 19, and 26) were chosen for a more detailed cytotoxicity study using K562 and Jurkat cells under different concentrations and incubation times. These chalcones caused a reduction in cell viability for both cell lines in a concentration and time-dependent manner. To assess the selectivity effect of chalcones on leukemic cells the most cytotoxic chalcones were also evaluated for cytotoxic effect on mononuclear cells from healthy individuals. The results show that chalcones caused no significant change in cell viability of mononuclear cells. To study the mechanisms by which these compounds caused cell death in K562 and Jurkat cells we evaluated the cell cycle, apoptosis induction, mitochondrial potential, expression of anti-apoptotic proteins Bcl-2 and

survivin, expression of pro-apoptotic protein Bax, and expression of p53, Ki67 and active caspase-3 proteins. The results show that chalcones 13, 16, 29 and 26 caused an increase in the proportion of Jurkat cells in the Sub G0/G1 phase, and chalcones 13 and 26 caused same effect in K562 cells. In addition, chalcones caused a decrease in expression of cell proliferation marker Ki67, suggesting that the mechanism of action of these compounds involves inhibition of cell proliferation. The evaluation of apoptosis by fluorescence microscopy and labeling with annexin V showed that chalcones caused cell death by inducing apoptosis. The study of mechanism of action showed that chalcones reduced mitochondrial potential, decreased Bcl-2 expression, and increased Bax expression, indicating that the mechanism of apoptosis induced by chalcones involves the intrinsic apoptosis pathway. Moreover, the chalcones' mechanism of action involves increase in active caspase-3 expression and decrease in survivin and p53 expression.

Keywords: Leukemia, apoptosis, chalcones

LISTA DE FIGURAS

Figura 1	Efeito citotóxico das chalconas sintéticas derivadas da 2,4,5-trimetoxiacetofenona (Painel A) e do 2',4',5'-trimetoxibenzaldeído (Painel B) em células de leucemia mieloide aguda K562.....	82
Figura 2	Efeito citotóxico das chalconas 13, 16, 19 e 26 em células de leucemia mieloide aguda K562.	84
Figura 3	Efeito citotóxico das chalconas 13, 16, 19 e 26 em células de leucemia linfoide aguda Jurkat.	86
Figura 4	Efeito citotóxico das chalconas 13, 16, 19 e 26 em células mononucleares de indivíduos saudáveis.....	88
Figura 5	Efeitos das chalconas 13, 16, 19 e 26 no ciclo celular das células de leucemia mieloide aguda K562.	89
Figura 6	Efeitos das chalconas 13, 16, 19 e 26 no ciclo celular das células de leucemia linfoide aguda Jurkat.....	91
Figura 7	Apoptose induzida pelas chalconas 13, 16, 19 e 26 nas células de leucemia mieloide aguda K562 e nas células de leucemia linfoide aguda Jurkat.	94
Figura 8	Efeito das chalconas 13, 16, 19 e 26 sobre a exposição dos resíduos de fosfatidilserina nas células de leucemia mieloide aguda K562.....	96
Figura 9	Efeito das chalconas 13, 16, 19 e 26 sobre a exposição dos resíduos de fosfatidilserina nas células de leucemia linfoide aguda Jurkat.	98
Figura 10	Efeito das chalconas 13 e 26 sobre o potencial mitocondrial das células de leucemia mieloide aguda K562 e das células de leucemia linfoide aguda Jurkat.	99
Figura 11	Efeito das chalconas 13 e 26 na expressão da proteína antiapoptótica Bcl-2 nas células de leucemia mieloide aguda K562 e nas células de leucemia linfoide aguda Jurkat.	101
Figura 12	Efeito das chalconas 13 e 26 na expressão da proteína proapoptótica Bax nas células de leucemia mieloide aguda K562 e nas células de leucemia linfoide aguda Jurkat.	102
Figura 13	Efeito das chalconas 13 e 26 na expressão da proteína p53 nas células de leucemia mieloide aguda K562 e nas células de leucemia linfoide aguda Jurkat.	103

Figura 14	Efeito das chalconas 13 e 26 na expressão da proteína caspase-3 ativa nas células de leucemia mieloide aguda K562 e nas células de leucemia linfoide aguda Jurkat.	104
Figura 15	Efeito das chalconas 13 e 26 na expressão da proteína antiapoptótica survivina nas células de leucemia mieloide aguda K562 e nas células de leucemia linfoide aguda Jurkat.	106
Figura 16	Efeito das chalconas 13 e 26 na expressão da proteína Ki67 nas células de leucemia mieloide aguda K562 e nas células de leucemia linfoide aguda Jurkat.....	108

LISTA DE ESQUEMAS

Esquema 1	Diferenças morfológicas entre apoptose e necrose.....	35
Esquema 2	Via extrínseca da apoptose.....	40
Esquema 3	Via intrínseca e extrínseca da apoptose.....	42
Esquema 4	Fases do ciclo celular.	49
Esquema 5	Rota de síntese utilizada para a obtenção das chalconas derivadas da 2,4,5-trimetoxiacetofenona (1-29) e do 2',4',5'-trimetoxibenzaldeído (30-46).....	68
Esquema 6	Delineamento experimental	70
Esquema 7	Mecanismo proposto de citotoxicidade induzido pelas chalconas derivadas da 2,4,5-trimetoxiacetofenona..	120

LISTA DE TABELAS

Tabela 1	Efeitos das chalconas 13, 16, 19 e 26 no ciclo celular das células de leucemia mieloide aguda K562... .. 90
Tabela 2	Efeitos das chalconas 13, 16, 19 e 26 no ciclo celular das células de leucemia linfoide aguda Jurkat..... 92

LISTA DE ABREVIATURAS

AIDS	Síndrome da Imunodeficiência Adquirida (do inglês, <i>Acquired Immunodeficiency Syndrome</i>)
AIF	Fator indutor da apoptose (do inglês, <i>Apoptosis-Inducing Factor</i>)
Apaf-1	Fator ativador de protease apoptótica 1 (do inglês, <i>Apoptotic protease activating factor 1</i>)
ATM	Ataxia-telangiectasia mutada (do inglês, <i>Ataxia-telangiectasia-mutated</i>)
ATP	Adenosina trifosfato
ATR	Ataxia e rad3 relacionados (do inglês, <i>Ataxia and rad3 related</i>)
Bcl-2	Proteína-2 de linfoma de células B (do inglês, <i>B-cell lymphoma protein-2</i>)
BH	Homologia a Bcl-2 (do inglês, <i>Bcl-2 Homology</i>)
CAD	Deoxinuclease ativada por Caspase (do inglês, <i>Caspase-Activated Deoxinuclease</i>)
CDKs	Cinases dependentes de Ciclinas (do inglês, <i>Cyclin-dependent kinases</i>)
c-FLIP	Proteína celular inibitória FLICE (do inglês, <i>Cellular FLICE-inhibitory protein</i>)
CI ₅₀	Concentração inibitória 50%
CKI	Inibidores de CDK (do inglês, <i>CDK inhibitors</i>)
DAB	3,3'-diaminobenzidina
DD	Domínio de morte (do inglês, <i>Death Domain</i>)

DED	Domínio efetor de morte (do inglês, <i>Death Effect Domain</i>)
DH3	Receptor de morte 3 (do inglês, <i>Death receptor 3</i>)
DISC	Complexo sinalizador de indução de morte (do inglês, <i>Death-inducing signaling complex</i>)
DMSO	Dimetilsulfóxido
DNA	Ácido desoxirribonucleico
DR6	Receptores de morte 6 (do inglês, <i>Death Receptors 6</i>)
EPM	Erro Padrão da Média
FAB	Grupo Cooperativo Franco-Américo-Britânico (do inglês, <i>French-American-British Cooperative Group</i>)
FADD	Domínio de morte associado à Fas (do inglês, <i>Fas-Associated Death Domain</i>)
FHA	Domínio associado ao <i>Forkhead</i> (do inglês, <i>Forkhead –associated</i>)
FITC	Isotiocianato de fluoresceína
Hepes	Ácido N-[2-Hidroxietil]piperazina-N'-[2-etanosulfônico]
IAP	Inibidores das proteínas apoptóticas (do inglês, <i>Inhibitors of apoptosis proteins</i>)
ICAD	Inibidores da deoxinuclease ativada por Caspase (do inglês, <i>Inhibitor of the Caspase-Activated Deoxinuclease</i>)
IFM	Índice de fluorescência média
INCA	Instituto Nacional do Câncer

LA	Leucemia aguda
LLA	Leucemia linfóide aguda
LMA	Leucemia mieloide aguda
LSAB	Método estreptoavidina-biotina-peroxidase (do inglês, <i>Labelled streptavidin biotin</i>)
M	Mitose
MTT	Brometo de 3-(4,5-dimetil-2-tiazolil)-2,5-difenil-2H-tetrazólio
Omi/HtrA2	Omi: proteína iniciadora não-metionina (do inglês, <i>non-methionine initiating protein</i>)/ HtrA2: Proteína de alta temperatura A2 (do inglês, <i>High Temperature Requirement protein A2</i>)
OMS	Organização Mundial de Saúde
PARP	Polimerase Poli-ADP-Ribose (do inglês, <i>Poly-ADP-Ribose Polymerase</i>)
PBS	Tampão fosfato
PI	Iodeto de Propídeo
PMM	Permeabilidade da membrana mitocondrial
PTPC	Complexo de poro de transição de permeabilidade (do inglês, <i>Permeability Transition Pore Complex</i>)
RIP	Proteína de interação com o receptor (do inglês, <i>Receptor-interacting protein</i>)
RNA	Ácido ribonucléico
RNAse	Ribonuclease

RPMI	Meio de cultura RPMI (do inglês, <i>Roswell Park Memorial Institute</i>)
Smac/DIABLO	Segundo ativador de caspases derivado da mitocôndrias (do inglês, <i>Second Mitochondria-derived Activator of Caspases</i>)/ Proteína de Ligação direta a IAP com baixo PI (do inglês, <i>Direct IAP Binding protein with low PI</i>)
TNF	Fator de Necrose Tumoral (do inglês, <i>Tumor Necrosis Factor</i>)
TRADD	Domínio de morte associado ao receptor de TNF (do inglês, <i>TNF Receptor-Associated Death Domain</i>)
TRAIL-R1	Receptor 1 do ligante relacionado ao TNF e indutor de apoptose (do inglês, <i>TNF-related apoptosis-inducing ligand receptor 1</i>)
TRAIL-R2	Receptor 2 do ligante relacionado ao TNF e indutor de apoptose (do inglês, <i>TNF-related apoptosis-inducing ligand receptor 2</i>)
UV	Ultravioleta

SUMÁRIO

1.REVISÃO DA LITERATURA.....	27
1.1 INTRODUÇÃO.....	29
1.2 LEUCEMIAS.....	30
1.3 MECANISMOS DE MORTE CELULAR.....	33
1.3.1 Necrose.....	34
1.3.2 Apoptose.....	35
1.4 CICLO CELULAR.....	46
1.5 NOVAS TERAPIAS.....	53
1.5.1 Chalconas.....	54
2.JUSTIFICATIVA.....	57
3.OBJETIVOS.....	61
3.1 OBJETIVO GERAL.....	63
3.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS.....	63
4.MATERIAIS E MÉTODOS.....	65
4.1 REAGENTES.....	67
4.2 CULTURA CELULAR.....	69
4.3 TRATAMENTO DAS CÉLULAS K562 E JURKAT COM AS CHALCONAS.....	69
4.4 DETERMINAÇÃO DAS CURVAS DE CONCENTRAÇÃO E TEMPO-RESPOSTA PARA VIABILIDADE CELULAR.....	70
4.5 OBTENÇÃO DAS CÉLULAS MONONUCLEARES DE INDIVÍDUOS SAUDÁVEIS.....	71
4.6 VIABILIDADE CELULAR (MÉTODO DO MTT).....	71
4.7 AVALIAÇÃO DA APOPTOSE.....	72
4.7.1 Avaliação da apoptose por microscopia de fluorescência com brometo de etídio e laranja de acridina.....	72

4.7.2 Avaliação da apoptose pelo método anexina V-FITC.....	73
4.8 AVALIAÇÃO DO CICLO CELULAR.....	74
4.9 AVALIAÇÃO DO POTENCIAL MITOCONDRIAL.....	74
4.10 AVALIAÇÃO DA EXPRESSÃO DAS PROTEÍNAS BAX, BCL-2, P53 E CASPASE-3 ATIVA POR CITOMETRIA DE FLUXO.....	75
4.11 AVALIAÇÃO DA EXPRESSÃO DAS PROTEÍNAS SURVIVINA E KI67 POR IMUNOCITOQUÍMICA.....	76
4.12 ANÁLISE ESTATÍSTICA.....	77

5.RESULTADOS.....79

5.1 EFEITO CITOTÓXICO DAS CHALCONAS SINTÉTICAS DERIVADAS DA 2,4,5-TRIMETOXIACETOFENONA E DO 2',4',5'-TRIMETOXIBENZALDEÍDO EM CÉLULAS DE LEUCEMIA MIELOIDE AGUDA K562 E EM CÉLULAS DE LEUCEMIA LINFOIDE AGUDA JURKAT.....	81
5.2 EFEITO CITOTÓXICO DAS CHALCONAS 13, 16, 19 E 26 EM CÉLULAS MONONUCLEARES DE INDIVÍDUOS SAUDÁVEIS.....	87
5.3 EFEITO DAS CHALCONAS 13, 16, 19 E 26 SOBRE AS FASES DO CICLO CELULAR NAS CÉLULAS DE LEUCEMIA MIELOIDE AGUDA K562 E EM CÉLULAS DE LEUCEMIA LINFOIDE AGUDA JURKAT.....	88
5.4 EFEITO DAS CHALCONAS 13, 16, 19 E 26 NA INDUÇÃO DA APOPTOSE NAS CÉLULAS DE LEUCEMIA MIELOIDE AGUDA K562 E EM CÉLULAS DE LEUCEMIA LINFOIDE AGUDA JURKAT.....	92
5.5 EFEITO DAS CHALCONAS 13 E 26 SOBRE O POTENCIAL MITOCONDRIAL DAS CÉLULAS DE LEUCEMIA MIELOIDE AGUDA K562 E DAS CÉLULAS DE LEUCEMIA LINFOIDE AGUDA JURKAT.....	99
5.6 EFEITO DAS CHALCONAS 13 E 26 NA EXPRESSÃO DA PROTEÍNA ANTIAPOPTÓTICA BCL-2 NAS CÉLULAS DE LEUCEMIA MIELOIDE AGUDA K562 E NAS CÉLULAS DE LEUCEMIA LINFOIDE AGUDA JURKAT.....	100

5.7 EFEITO DAS CHALCONAS 13 E 26 NA EXPRESSÃO DA PROTEÍNA PROAPOPTÓTICA BAX NAS CÉLULAS DE LEUCEMIA MIELOIDE AGUDA K562 E NAS CÉLULAS DE LEUCEMIA LINFOIDE AGUDA JURKAT.....	101
5.8 EFEITO DAS CHALCONAS 13 E 26 NA EXPRESSÃO DA PROTEÍNA P53 NAS CÉLULAS DE LEUCEMIA MIELOIDE AGUDA K562 E NAS CÉLULAS DE LEUCEMIA LINFOIDE AGUDA JURKAT.....	102
5.9 EFEITO DAS CHALCONAS 13 E 26 NA EXPRESSÃO DA PROTEÍNA CASPASE-3 ATIVA NAS CÉLULAS DE LEUCEMIA MIELOIDE AGUDA K562 E NAS CÉLULAS DE LEUCEMIA LINFOIDE AGUDA JURKAT.....	103
5.10 EFEITO DAS CHALCONAS 13 E 26 NA EXPRESSÃO DA PROTEÍNA ANTIAPOPTÓTICA SURVIVINA NAS CÉLULAS DE LEUCEMIA MIELOIDE AGUDA K562 E NAS CÉLULAS DE LEUCEMIA LINFOIDE AGUDA JURKAT.....	105
5.11 EFEITO DAS CHALCONAS 13 E 26 NA EXPRESSÃO DA PROTEÍNA KI67 NAS CÉLULAS DE LEUCEMIA MIELOIDE AGUDA K562 E NAS CÉLULAS DE LEUCEMIA LINFOIDE AGUDA JURKAT.....	107
6.DISSCUSSÃO	109
7.CONCLUSÕES.....	121
PERSPECTIVAS.....	125
REFERÊNCIAS.....	129
APÊNDICES.....	149
APÊNDICE A - Efeitos das chalconas 13, 16, 19 e 26 no ciclo celular das células de leucemia mieloide aguda K562.....	151
APÊNDICE B - Efeitos das chalconas 13, 16, 19 e 26 no ciclo celular das células de leucemia linfoide aguda Jurkat.....	152

APÊNDICE C – Efeito das chalconas 13 e 26 sobre o potencial mitocondrial das células de leucemia mieloide aguda K562.....	153
APÊNDICE D - Efeito das chalconas 13 e 26 sobre o potencial mitocondrial das células de leucemia linfoide aguda Jurkat.....	154
APÊNDICE E - Efeito das chalconas 13 e 26 na expressão da proteína antiapoptótica Bcl-2 nas células de leucemia mieloide aguda K562 e nas células de leucemia linfoide aguda Jurkat.....	155
APÊNDICE F - Efeito das chalconas 13 e 26 na expressão da proteína proapoptótica Bax nas células de leucemia mieloide aguda K562 e nas células de leucemia linfoide aguda Jurkat.....	156
APÊNDICE G - Efeito das chalconas 13 e 26 na expressão da proteína p53 nas células de leucemia mieloide aguda K562 e nas células de leucemia linfoide aguda Jurkat.....	157
APÊNDICE H - Efeito das chalconas 13 e 26 na expressão da proteína caspase-3 ativa nas células de leucemia mieloide aguda K562 e nas células de leucemia linfoide aguda Jurkat.....	158

1. REVISÃO DA LITERATURA

1.1 INTRODUÇÃO

A denominação neoplasia significa literalmente “crescimento novo” e pode ser entendida como uma proliferação anormal de células que tem proliferação autônoma e tendem a perder a sua capacidade de diferenciação. Quanto ao comportamento e evolução, as neoplasias podem ser classificadas como benignas, que em geral não são letais nem causam sérios transtornos para o indivíduo; e malignas, quando normalmente há proliferação rápida das células neoplásicas, as quais provocam perturbações homeostáticas graves aos pacientes (FILHO, GUIMARÃES e BOGLIOLO, 1998; KUMAR et al., 2010).

O termo câncer foi utilizado pela primeira vez por Galeno, aproximadamente 138-201 d.C., para descrever um tumor maligno da mama. Atualmente, o termo generalizou-se, e é utilizado para referir-se a qualquer neoplasia maligna (FILHO, GUIMARÃES e BOGLIOLO, 1998). O câncer representa um conjunto de mais de 100 doenças, incluindo tumores malignos de diferentes localizações (HANAHAN e WEINBERG, 2000).

Nos organismos multicelulares, a taxa de proliferação de cada tipo celular é controlada com precisão por um sistema altamente integrado, o qual permite a replicação apenas dentro dos estreitos limites que mantêm a população normal em níveis homeostáticos (FILHO, GUIMARÃES e BOGLIOLO, 1998). O processo pelo qual as células normais tornam-se progressivamente transformadas e malignas requer a aquisição sequencial de mutações que surgem como consequência de danos ao genoma. Esses danos podem ser resultantes de processos endógenos, como erros na replicação do ácido desoxirribonucléico (DNA), instabilidade química intrínseca das bases de DNA ou ação de radicais livres gerados durante o metabolismo celular; e também pode resultar de interações com agentes exógenos, como radiação ionizante, radiação ultravioleta (UV) e carcinógenos químicos. Embora as células possuam meios para reparar esses danos, vários fatores permitem que erros ocorram e provoquem mudanças permanentes no genoma, com consequente introdução de mutações. Algumas mutações ativam genes envolvidos com a estimulação da proliferação celular e com a proteção contra morte celular, denominados proto-oncogenes. Outras mutações inativam genes responsáveis pela inibição da proliferação celular, os genes supressores de tumor (BERTRAM, 2000).

Os mecanismos de transformação neoplásica de uma célula normal envolvem uma série de eventos que alteram a fisiologia celular,

tais como: a auto-suficiência dos sinais de crescimento, a insensibilidade aos sinais inibidores do crescimento, a evasão da morte celular programada (apoptose), o potencial de replicação ilimitado, a angiogênese sustentada e a invasão de tecidos e a metástase (HANAHAN e WEINBERG, 2000).

Segundo a Organização Mundial da Saúde (OMS), o câncer é uma das principais causas de morte no mundo, e foi responsável por 7,6 milhões de mortes em 2008. No mesmo ano, no Brasil, foram registrados 321 mil novos casos de câncer e 190 mil óbitos decorrentes da doença (FERLAY et al., 2010). Para o ano de 2030, a OMS estima 15,5 milhões casos novos de câncer e cerca de 11 milhões de mortes pela doença no mundo. As estimativas para 2011 no Brasil, segundo o Instituto Nacional do Câncer (INCA), foram de 489.270 novos casos de câncer, dentre os quais as leucemias encontram-se entre os dez tipos mais frequentes de câncer. Foram previstos para 2011 9.580 novos casos de leucemias no Brasil, com 360 novos casos no estado de Santa Catarina (INCA, 2009). No Brasil, as estimativas para o ano de 2012 serão válidas também para o ano de 2013 e apontam a ocorrência de aproximadamente 518.510 casos novos de câncer e 8.510 casos novos de leucemia. No estado de Santa Catarina estão previstos para o ano de 2012, 300 novos casos de leucemia (INCA, 2011).

1.2 LEUCEMIAS

As leucemias constituem um grupo heterogêneo de neoplasias malignas decorrentes da proliferação clonal de células hematopoiéticas na medula óssea e/ou nos tecidos linfoides, que, posteriormente, atingem a circulação periférica e podem infiltrar-se em outros sistemas orgânicos (ISLAM, 1992; SWERDLOW et al., 2008).

As células leucêmicas originam-se a partir de uma mutação somática em uma única célula-tronco ou célula primordial (*stem cell*), a qual forma o clone leucêmico. A transformação leucêmica pode ocorrer em diferentes fases da diferenciação de precursores linfoides ou mieloides, o que a caracteriza como uma doença heterogênea sob o aspecto biológico e morfológico. Segundo a Classificação da FAB (Grupo Cooperativo Franco-Américo-Britânico; do inglês, *French-American-British Cooperative Group*), e da OMS, em linhas gerais, as leucemias podem ser divididas em linfoides e mieloides e em agudas e crônicas, de acordo com a linha e estágio de maturação dos precursores afetados (BENNETT et al., 1976, SWERDLOW et al., 2008). Nas

leucemias agudas (LAs), há predominantemente células imaturas (linfoblastos ou mieloblastos), as quais são incapazes de se diferenciar em células maduras, devido a um bloqueio maturativo, o que consiste no marco fisiopatológico das LAs (WANG e CHEN, 2000; BÉNÉ, 2001). Já nas leucemias crônicas quase todas as células são maduras; e, é por isso que, em geral, as LAs têm pior prognóstico, e se não tratadas adequadamente, o paciente pode ir a óbito em dias ou semanas, enquanto nas leucemias crônicas o curso clínico é mais brando (FRANKS e TEICH, 1998; PUI e EVANS, 1998; BAIN, 2003; ZAGO, FALCÃO e PASQUINI, 2005; ROBAK e WIERZBOWSKA, 2009).

O diagnóstico das LAs é dado pela avaliação conjunta das características clínicas e laboratoriais apresentadas pelo indivíduo no momento do diagnóstico (KEBRIAEI, ANASTASI e LARSON, 2003). As manifestações clínicas são bastante variáveis e a sintomatologia geralmente está associada aos órgãos envolvidos (PUI e EVANS, 1998; BAIN, 2003; ZAGO, FALCÃO e PASQUINI, 2005). A proliferação acelerada de células leucêmicas e a infiltração na medula óssea resultam na inibição da produção das células hematopoiéticas normais, como os leucócitos, os eritrócitos e as plaquetas. Em decorrência disso, os indivíduos com diagnóstico de LA frequentemente apresentam sintomas como: fadiga, astenia e palidez em virtude da anemia; sangramento gengival e outras manifestações hemorrágicas resultantes da plaquetopenia; e febre, devido a complicações infecciosas associadas à neutropenia ou à liberação de citocinas secretadas pelas células leucêmicas (BAIN, 2003; BASSAN et al., 2004; GUIMARÃES, 2004). Nesses pacientes, pode-se observar linfadenopatia generalizada, esplenomegalia e hepatomegalia, devido à infiltração das células leucêmicas nos diferentes tecidos do organismo (PEJOVIC e SCHWARTZ, 2002; BASSAN et al., 2004; ZAGO, FALCÃO e PASQUINI, 2005).

A Leucemia Mieloide Aguda (LMA) acomete tanto adultos como crianças. No entanto, na infância sua incidência é baixa (20% das LAs da infância), já na idade adulta representa 80% dos casos de LA, cuja incidência aumenta rapidamente com a idade, sendo mais expressiva em indivíduos acima de 70 anos (BAIN, 2003; ZAGO, FALCÃO e PASQUINI, 2005; SWERDLOW et al., 2008). Apesar de ser considerada a mesma doença, adultos e crianças com LMA apresentam diferentes características clínicas, prognósticas e resposta ao tratamento. Diferente da Leucemia Linfóide Aguda (LLA), a LMA em crianças tem pior prognóstico e aproximadamente um terço das portadoras recidivam (RUBNITZ, 2008; SHAH e AGARWAL, 2008).

Em adultos, o cenário não é muito diferente, pois apesar de 50% a 85% dos pacientes adultos com LMA atinjam a remissão após o tratamento, dependendo do subtipo de LMA, a maioria recidiva e vai a óbito após dois anos em remissão (SHIPLEY e BUTERA, 2009; ROBAK e WIERZBOWSKA, 2009).

Da mesma forma que a LMA, a LLA pode ocorrer em adultos e crianças, mas a maior incidência é observada em crianças abaixo dos cinco anos de idade; dentre as quais, 80% atingem a cura da doença. Por outro lado, embora 60-80% dos adultos possam atingir uma remissão completa, apenas 30-40% apresentam uma sobrevida prolongada livre de doença (FADERL, JEHA e KANTARJIAN, 2003).

Como visto, as LAs constituem um grupo heterogêneo de doenças; e por isso diferem-se quanto à etiologia, patogênese, prognóstico e resposta ao tratamento (PUI e EVANS, 1998; BAIN, 2003). Várias formas de terapia são utilizadas para combater as leucemias, como radioterapia, quimioterapia, imunoterapia e transplante de medula óssea. Apesar dos novos protocolos de tratamento, a quimioterapia ainda é a terapia antileucêmica mais utilizada, na qual vários quimioterápicos são utilizados de forma combinada, ou como agentes isolados (GOL B et al., 2001; ROBAK e WIERZBOWSKA, 2009).

O tratamento das LAs é dividido em quimioterapia de indução e terapia de pós-remissão ou consolidação (BASSAN et al., 2004; SHIPLEY e BUTERA, 2009; NCCN, 2011). A fase de indução tem como objetivo alcançar a remissão completa, ou seja, induzir a apoptose dos blastos leucêmicos. A terapia de pós-remissão ou consolidação é utilizada assim que a remissão completa é alcançada e objetiva evitar uma recidiva da doença, diminuindo a quantidade de células leucêmicas a quantidades não detectadas laboratorialmente (ZAGO, FALCÃO e PASQUINI, 2005). Mesmo reconhecendo a importância da fase inicial do tratamento quimioterápico para a obtenção da remissão e o controle inicial da doença, é igualmente importante que o paciente termine a fase de indução em condições de tolerar maiores doses subsequentes de tratamento na fase de consolidação, para que dessa forma a remissão atingida seja mais duradoura, uma vez que pacientes que não conseguem receber a terapia pós-remissão tendem a recidivar em 6 a 9 meses (NCCN, 2011).

Pelo menos dois fatores podem ser responsáveis pelo insucesso no tratamento de LA: a morte precoce do paciente e a resistência ao tratamento. A resistência geralmente se manifesta após um breve período de remissão completa (ESTEY, 2001). Pacientes com LA

resistentes aos quimioterápicos podem ser incluídos em várias categorias: um grupo que não responde à terapia de indução, denominados refratários, outro grupo que responde inicialmente, mas a doença recrudescer em menos de 18 meses após o diagnóstico (recaída precoce), e um terceiro grupo, cuja doença retorna depois de 18 meses da primeira recaída completa (recaída tardia). Em geral, pacientes inicialmente refratários ao tratamento ou aqueles que recaem precocemente apresentam um prognóstico pior, reduzindo as chances de sucesso com esquemas terapêuticos convencionais (MAIA, 1997; BASSAN et al., 2004).

A morbidade associada aos quimioterápicos ainda é um obstáculo significativo. Por isso, a busca por compostos antineoplásicos que tenham maior eficiência em induzir morte nas células tumorais e que sejam de fácil administração, pois a maioria dos quimioterápicos, atualmente, necessita de administração endovenosa prolongada; e com poucos ou insignificantes efeitos adversos tornou-se um grande alvo de investigação dos pesquisadores e da indústria farmacêutica. As bases do tratamento com compostos antileucêmicos estão suportadas na inibição da proliferação celular (HERR e DEBATIN, 2001), na indução de apoptose ou diferenciação dos blastos leucêmicos, o que invariavelmente evoluirá para apoptose (LESZCZYŃIECKA et al., 2001). Sendo assim, o entendimento dos mecanismos moleculares de resistência das células leucêmicas à apoptose induzida por quimioterápico e/ou outros compostos se faz necessário para o desenvolvimento de compostos antineoplásicos com citotoxicidade mais específica para as células tumorais e com menos efeitos adversos para o paciente.

1.3 MECANISMOS DE MORTE CELULAR

A morte das células em um tecido não é um acontecimento necessariamente aleatório, mas sim um fenômeno que pode ser programado no tempo e controlado na sua gênese (FERREIRA e ROCHA, 2004). A morte celular é tradicionalmente classificada em dois grupos: necrose, uma forma de morte celular passiva e não controlada; e a morte celular programada, um processo altamente regulado com vias de sinalização celular definidas (RENVOIZÉ et al., 1998; DEBNATH, BAEHRECKE e KROEMER, 2005). A morte celular programada tem como característica básica a eliminação de células de um tecido maduro ou em formação sem alterar a ontogênese, a citoarquitetura e a função

do mesmo. A esse processo dá-se o nome de apoptose (KERR, WYLLIE E CURRIE, 1972; FERREIRA e ROCHA, 2004). O termo apoptose foi utilizado pela primeira vez por Kerr, Wyllie e Currie (1972) para descrever uma forma de morte celular morfológicamente distinta com fragmentos envoltos por membrana derivados da célula. Entretanto, é importante ressaltar que outras formas de morte celular programada vêm sendo descritas, como autofagia e morte celular não lisossomal (SPERANDIO, DE BELLE, BREDESEN, 2000; DEBNATH, BAEHRECKE e KROEMER, 2005). Atualmente, até mesmo a necrose vem sendo descrita como um processo de morte celular altamente regulado (MOUBARAK et al., 2007).

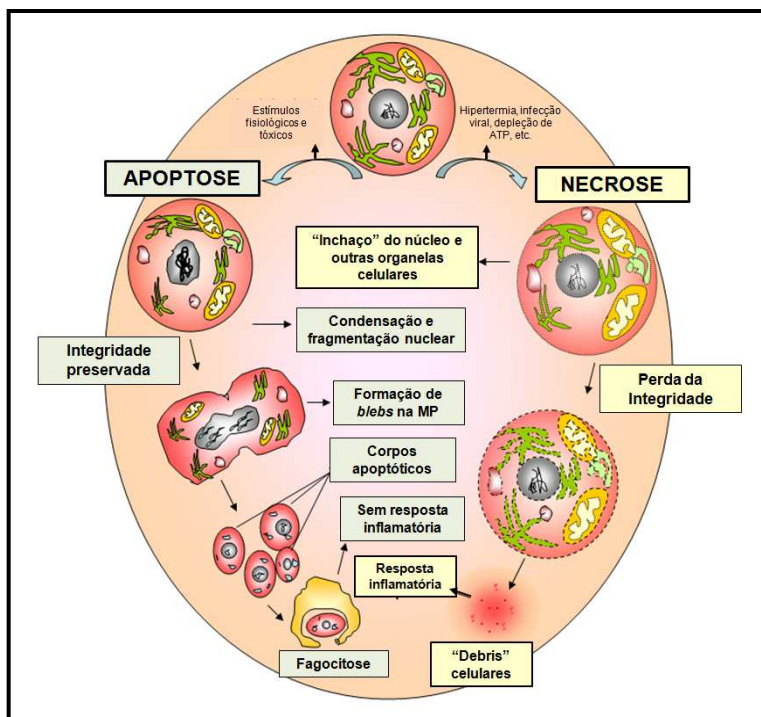
A apoptose ocorre em diversas circunstâncias como, por exemplo, na organogênese fisiológica e patológica, na hematopoiese normal e patológica, na reposição fisiológica de certos tecidos maduros, no desenvolvimento e funcionamento do sistema imune, na atrofia de órgãos, na resposta inflamatória e na eliminação de células após injúria por agentes genotóxicos (FERREIRA e ROCHA, 2004; ELMORE, 2007; RASTOGI e SINHA, 2009).

Apoptose e necrose são dois processos que podem ocorrer de forma independente, sequencial, bem como simultaneamente. Podem ser induzidas por diversos estímulos, como: alta temperatura, radiação UV, radiação ionizante, estresse oxidativo e agentes citotóxicos antitumorais (RASTOGI e SINHA, 2009). Em condições não fisiológicas, após um dano inicial, tanto a necrose quanto a apoptose podem ocorrer, entretanto, isso dependerá da intensidade do dano, dos níveis intracelulares disponíveis de ATP (Adenosina trifosfato) (RENVOIZÉ et al., 1998; ELMORE, 2007), do tipo e do estágio de desenvolvimento do tecido e do meio fisiológico em que a célula se encontra (ELMORE, 2007; RASTOGI e SINHA, 2009).

1.3.1 Necrose

A ocorrência da necrose está relacionada a agressões severas que levam à queda acentuada na produção de ATP e/ou lesão à membrana (PERES e CURI, 2005; ELMORE, 2007). Como pode ser visto no Esquema 1, algumas das principais mudanças morfológicas que ocorrem durante a necrose incluem o aumento do volume celular, a formação de vacúolos citoplasmáticos e a desorganização do citoplasma, a desnaturação de proteínas citoplasmáticas, a distensão do retículo endoplasmático, o inchaço das mitocôndrias, a agregação da cromatina

sem uma nítida mudança de distribuição, a dissolução dos ribossomas e a perda da integridade da membrana celular com vazamento de conteúdo citoplasmático e a consequente reação inflamatória local (RENVOIZÉ et al., 1998; FERREIRA e ROCHA, 2004; ELMORE, 2007; TINARI et al., 2008; RASTOGI e SINHA, 2009).



Esquema 1: Diferenças morfológicas entre apoptose e necrose.

Fonte: Adaptado de Rastogi e Sinha (2009).

1.3.2 Apoptose

A apoptose é um processo sincronizado com mecanismos bioquímicos dependentes de energia causado por uma série de estímulos endógenos e exógenos (ELMORE, 2007; RASTOGI e SINHA, 2009). As modificações na morfologia celular, no processo de apoptose, ocorrem de maneira temporalmente coordenada no núcleo, no

citoplasma e na membrana citoplasmática (RENVOIZÉ et al., 1998; FERREIRA e ROCHA, 2004).

As células perdem o contato com as vizinhas, adquirem formato arredondado e o volume celular se reduz essencialmente por perda de água e íons. O retículo citoplasmático distende-se e as cisternas fundem-se com a membrana plasmática (RENVOIZÉ et al., 1998; FERREIRA e ROCHA, 2004). As outras organelas citoplasmáticas mantêm essencialmente a sua morfologia intacta, com exceção em alguns casos, quando alterações nas mitocôndrias podem levar a ruptura da membrana externa. A cromatina se marginaliza e se condensa, formando grumos junto à membrana nuclear que se mantém intacta e o DNA se fragmenta. Sequencialmente, a membrana celular passa a formar protuberâncias (*blebs*) e o núcleo se desintegra em fragmentos delimitados pela membrana nuclear, o qual continua mantendo a sua integridade. As protuberâncias da membrana citoplasmática aumentam progressivamente em número e em tamanho, algumas delas englobam porções do núcleo, e com o evoluir do processo, a célula se rompe em estruturas contidas pela membrana citoplasmática. Estas porções celulares envolvidas pela membrana citoplasmática recebem o nome de corpos apoptóticos (Esquema 1) (FERREIRA e ROCHA, 2004; ELMORE, 2007; TINARI et al., 2008; KROEMER et al., 2009; RASTOGI e SINHA, 2009).

Durante a apoptose ocorre também a externalização da fosfatidilserina, um fosfolípídeo que normalmente está presente na camada interna da membrana plasmática, e que, quando externalizado, promove a perda da assimetria na composição dos fosfolípídeos, identificando a superfície da célula apoptótica para ser fagocitada por células vizinhas, em geral os macrófagos (PERES e CURI, 2005; ELMORE, 2007). Esses, por sua vez, reconhecem os corpos apoptóticos através da externalização da fosfatidilserina (STRASSER, O'CONNOR e DIXIT, 2000; CRUCHTEN e BROECK, 2002), fagocitam-nos e digerem-nos dentro de fagolisossomos sem gerar reação inflamatória (RENVOIZÉ et al., 1998; FERREIRA e ROCHA, 2004; ELMORE, 2007). Quando os corpos apoptóticos não são fagocitados, como ocorre quando estão dispersos em fluido, como em células em cultura, ou quando são extruídos para o lúmen de uma glândula, sofrem necrose secundária (RENVOIZÉ et al., 1998; PERES e CURI, 2005).

O processo de apoptose não envolve resposta inflamatória devido a diversos motivos, tais como, o não extravasamento do conteúdo intracelular das células apoptóticas para o meio extracelular, por serem rapidamente fagocitadas, prevenindo a necrose secundária e

pelo fato de as células que as fagocitam não produzirem citocinas inflamatórias (DANIAL e KORSMEYER, 2004; ELMORE, 2007).

Além das alterações morfológicas descritas acima, a quebra do DNA é uma importante característica deste tipo de morte celular. No processo de apoptose, ocorre a ativação de uma endonuclease que quebra o DNA nos nucleossomas e gera um padrão de fragmentação característico (ENARI et al., 1998; NAGATA, 2000; NAGATA et al., 2003). A organização macromolecular dos cromossomas em nucleossomas, distanciados entre si em aproximadamente 200 pares de base, faz com que a ação da referida endonuclease gere fragmentos de tamanhos variados, mas múltiplos de 200 pares de base. Esses, quando separados em gel de agarose, formam um padrão de quebra internucleossomal que aparece na grande maioria das células em apoptose (RENVOIZÉ et al., 1998; FERREIRA e ROCHA, 2004; ELMORE, 2007). Ao contrário dessa situação, uma célula que morre por necrose tem o seu DNA quebrado em sítios totalmente inespecíficos e, portanto, a fragmentação não gera qualquer padrão repetitivo (FERREIRA e ROCHA, 2004).

Essas alterações observadas nas células apoptóticas, as quais permitem o “empacotamento” em corpos apoptóticos e a fagocitose dos mesmos por células vizinhas, podem ser atribuídas à ação das caspases (KUROKAWA e KORNBLUTH, 2009). As caspases, do inglês *Cysteine Aspartate Proteases*, compreendem uma família de enzimas que catalisam uma série de reações biológicas. Essas enzimas possuem um resíduo de cisteína em seus sítios ativos, o qual é crítico para a atividade proteolítica das mesmas, a qual ocorre após os resíduos de ácido aspártico das proteínas-alvo (RIEDL E SHI, 2004; RASTOGI e SINHA, 2009; CRAWFORD e WELLS, 2011).

Quinze caspases (caspase-1 a 14 e 16) já foram identificadas em mamíferos, e de acordo com suas estruturas e função, podem ser divididas em três categorias: caspases iniciadoras da apoptose (caspase-2, -8, -9, e -10), caspases efetoras da apoptose (caspase-3, -6 e -7) e caspases envolvidas com a ativação de citocinas, denominadas caspases inflamatórias (caspase-1, -4, -5, -11, -12 e -13) (RIEDL e SHI, 2004; CRAWFORD e WELLS, 2011; LU e CHEN, 2011). Alguns trabalhos relatam que a caspase-13 é uma proteína expressa em bovinos (ELMORE, 2007; CRAWFORD e WELLS, 2011), e que a caspase-14 não está relacionada à apoptose e inflamação, mas sim na diferenciação de queratinócitos, o que leva a formação de uma barreira impermeável à água na pele. As caspases-15, -16, -17 e -18 foram recentemente

descritas em metazoários, mas com exceção da caspase-16, nenhuma foi encontrada em humanos e camundongos (CRAWFORD e WELLS, 2011).

Geralmente, as caspases são expressas nas células na forma inativa, denominadas pro-caspases, e uma vez ativadas, podem ativar outras pro-caspases e até mesmo realizar autoativação (RIEDL e SHI, 2004; RASTOGI e SINHA, 2009; CRAWFORD e WELLS, 2011). Quando uma célula recebe um estímulo apoptótico, ocorre a ativação das caspases iniciadoras que clivam e ativam as caspases efetoras, que por sua vez, clivam uma série de substratos, levando a morte celular por apoptose (KUROKAWA e KORNBLUTH, 2009). A ativação em excesso das caspases é relacionada a certas desordens neurodegenerativas, enquanto sua supressão inapropriada está envolvida no desenvolvimento de diversos tipos de câncer (HUNTER, LACASSE e KORNELUK, 2007). Diversas vias levam a ativação das caspases e muitas delas podem ser utilizadas como alvos para intervenção terapêutica (SCHIMMER, 2008). Assim, a grande importância da função destas enzimas no processo de apoptose faz delas um potencial alvo para desenvolvimento de novos fármacos (LAVRIK, GOLKS e KRAMMER, 2005).

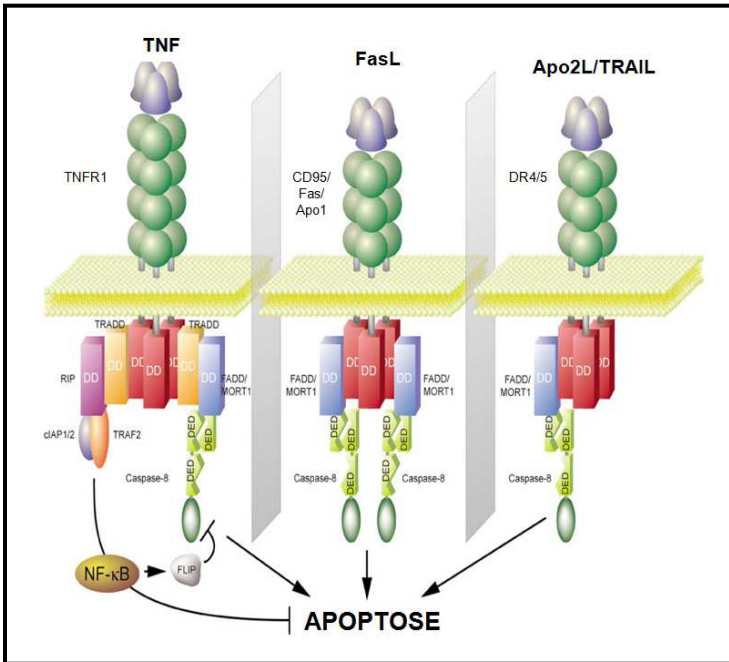
Existem duas vias principais de apoptose que levam a ativação da cascata de caspases: a extrínscica ou via de receptor de morte, e a intrínscica ou via mitocondrial, ambas estão associadas e influenciam uma à outra (ELMORE, 2007; RASTOGI e SINHA, 2009; CRAWFORD e WELLS, 2011).

1.3.2.1 Via extrínscica da apoptose

Esta via é iniciada por estímulos de morte extracelulares (YAN e SHI, 2005), por meio da ligação dos receptores de morte da membrana plasmática aos seus ligantes. Os receptores de morte são membros da família de receptor de TNF (Fator de Necrose Tumoral; do inglês, *Tumor Necrosis Factor*), os quais contêm domínios extracelulares ricos em cisteína e domínios citoplasmáticos, denominados domínios de morte ou DD (Domínio de morte; do inglês, *Death Domain*), essenciais para a propagação dos sinais apoptóticos (PERES e CURI, 2005; YAN e SHI, 2005; ELMORE, 2007; MELET et al., 2008). A família de receptores de TNF incluem o TNF-R1, Fas/APO1/CD95, receptor de morte 3 ou DH3 (Receptor de morte 3; do inglês, *death receptor 3*), TRAIL-R1 (Receptor 1 do ligante relacionado ao TNF e indutor de

apoptose; do inglês, *TNF-related apoptosis-inducing ligand receptor 1*), TRAIL-R2 (Receptor 2 do ligante relacionado ao TNF e indutor de apoptose; do inglês, *TNF-related apoptosis-inducing ligand receptor 2*) e DR6 (Receptores de morte 6; do inglês, *Death Receptors 6*) (LAVRIK, GOLKS e KRAMMER, 2005; MITA, MITA e TOLCHER, 2006). Cada receptor possui um ligante específico, por exemplo: TRAIL-R1 e TRAIL-R2 ligam ao TRAIL, Fas liga ao FasL e o TNF-R1 liga ao TNF (MITA, MITA e TOLCHER, 2006; MELET et al., 2008). Alguns dos membros dessa família, como os receptores de TNF- α , FasL e TRAIL regulam muitas funções biológicas, incluindo metabolismo celular, proliferação, produção de citocina além da apoptose (MITA, MITA e TOLCHER, 2006).

A ligação entre o receptor de morte Fas e seu ligante FasL e entre TRAIL-R e TRAIL promove a trimerização dos receptores, a qual é reconhecida pela proteína adaptadora FADD (Domínio de morte associado à Faz; do inglês, *Fas-Associated Death Domain*) através do seu domínio de morte DD; já na ligação entre TNF e seu receptor, ocorre a ligação da proteína adaptadora TRADD (Domínio de morte associado ao receptor de TNF; do inglês, *TNF Receptor-Associated Death Domain*) que recruta FADD e RIP (Proteína de interação com o receptor; do inglês, *Receptor-interacting protein*), também através dos domínios de morte DD. A FADD, por sua vez, liga-se a procaspase-8 ou -10, através do DED (Domínio efetor de morte; do inglês, *Death Effect Domain*) e forma o DISC (Complexo sinalizador de indução de morte; do inglês, *Death-inducing signaling complex*), que resulta na auto-clivagem e ativação dessas duas caspases. Uma vez ativadas, as caspases-8 e -10 clivam e ativam as caspases efetoras da apoptose (caspases-3, -6, e -7), que, por sua vez, clivam substratos celulares levando a apoptose (CHAUDHARI, MURPHY e AGRAWAL, 2006; MITA, MITA e TOLCHER, 2006; ELMORE, 2007; KUOKAWA e KORNBLUTH, 2009; RASTOGI e SINHA, 2009). A apoptose mediada pelos receptores de morte pode ser inibida pela proteína c-FLIP (Proteína celular inibitória FLICE; do inglês, *cellular FLICE-inhibitory protein*), que se liga a FADD e a caspase-8, inativando-as (Esquema 2) (MITA, MITA e TOLCHER, 2006; ELMORE, 2007; SPEIRS et al., 2011).



Esquema 2: Via extrínseca da apoptose.
 Fonte: DANIAL e KORSMEYER (2004).

1.3.2.2 Via intrínseca da apoptose

A ativação da via intrínseca da apoptose inicia-se na mitocôndria. Diversos estímulos podem levar a ativação dessa via, como: ausência de fatores de crescimento, hormônios e citocinas, radiação, toxinas, hipóxia, hipertermia, infecção viral, radicais livres, dano ao DNA, entre outros (MITA, MITA e TOLCHER, 2006; ELMORE, 2007; MELET et al., 2008; FRENZEL et al., 2009).

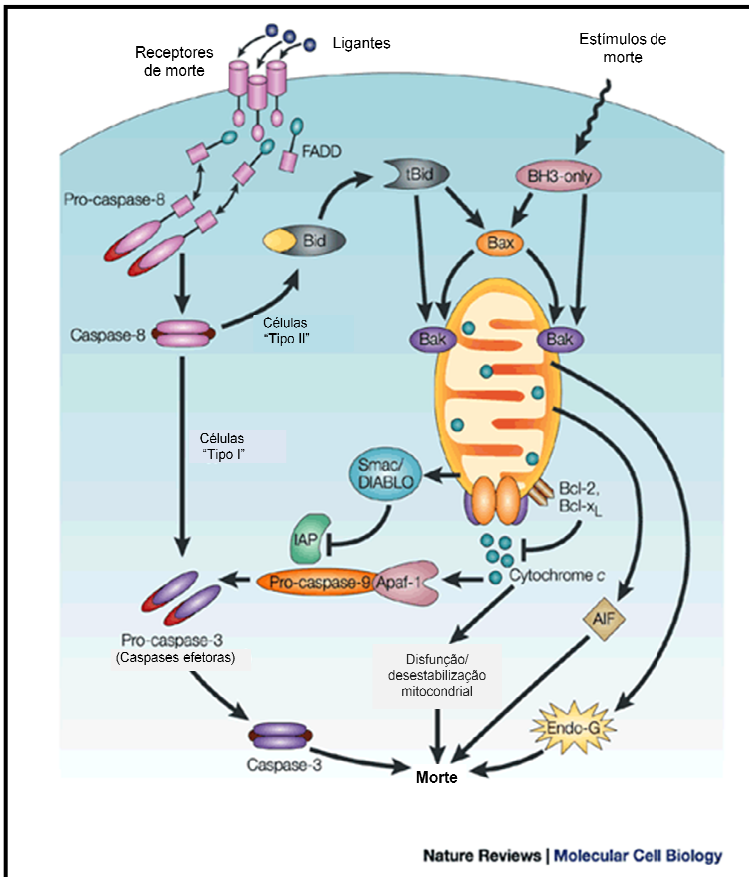
Esses estímulos causam alterações na permeabilidade da membrana mitocondrial (PMM) através da formação de poros denominados poros de transição de permeabilidade mitocondrial – PTPC (Complexo de poro de transição de permeabilidade; do inglês, *Permeability Transition Pore Complex*). Ocorre ainda perda do potencial transmembrânico mitocondrial e como consequência, a liberação de proteínas pró-apoptóticas da mitocôndria para o citoplasma

celular (ELMORE, 2007). O aumento ou inibição da permeabilização da membrana mitocondrial é descrita em diversas doenças humanas, tais como isquemia e reperfusão (HIRAKAWA et al, 2003) intoxicação com xenobióticos (WALLACE e STARKO, 2000), infecções virais (BOYA et al, 2004), neurodegeneração (MATTSON e KROEMER, 2003) e câncer (DE OLIVEIRA et al, 2006). No câncer, o comprometimento da PMM pode levar a inibição da resposta apoptótica. Por isso, a indução da permeabilidade da membrana mitocondrial constitui um dos objetivos da quimioterapia contra o câncer (KROEMER, GALLUZZI e BRENNER, 2007).

O potencial transmembrânico mitocondrial, simbolizado por $\Delta\Psi_m$, é determinado pelo gradiente de prótons da cadeia respiratória (MIGNOTTE e VAYSSIERE, 1998; CAMPBELL, 2006; KROEMER, GALLUZZI e BRENNER, 2007; OW et al., 2008). A abertura do PTPC causa a despolarização mitocondrial, a perda do potencial mitocondrial (MIGNOTTE e VAYSSIERE, 1998; BELIZÁRIO et al., 2007; KROEMER, GALLUZZI e BRENNER, 2007; OW et al., 2008), e a redistribuição de pequenos íons (BELIZÁRIO et al., 2007). Ocorre também o vazamento de proteínas na fase de indução tanto do espaço intermembranas, como o citocromo c, o Fator indutor da apoptose - AIF (do inglês, *Apoptosis-Inducing Factor*), Smac/DIABLO (Smac: Segundo ativador de caspases derivado da mitocôndrias; do inglês, *Second Mitochondria-derived Activator of Caspases*; DIABLO: Proteína de Ligação direta a IAP com baixo PI; do inglês, *Direct IAP Binding protein with low pI*) e Omi/HtrA2 (Omi: proteína iniciadora não-metionina; do inglês, *non-methionine initiating protein/* HtrA2: Proteína de alta temperatura A2; do inglês, *High Temperature Requirement protein A2*); como da matriz mitocondrial, a endonuclease G (MIGNOTTE e VAYSSIERE, 1998; JIANG e WANG, 2004; KROEMER, GALLUZZI e BRENNER, 2007; TAIT e GREEN, 2010).

O citocromo c participa da transferência de elétrons do complexo III para o IV na cadeia respiratória, reduzindo o oxigênio à água (PERES e CURI, 2005; CAMPBELL, 2006; OW et al., 2008). Por esse motivo, o vazamento do citocromo c da mitocôndria está associado à reduzida produção de ATP e ao estresse oxidativo (PERES e CURI, 2005; KROEMER, GALLUZZI e BRENNER, 2007). Como pode ser observado no Esquema 3, no citoplasma, o citocromo c liberado por um estímulo apoptótico liga-se ao Apaf-1 (Fator ativador de protease apoptótica 1; do inglês, *Apoptotic protease activating factor 1*), que, por sua vez, tem a capacidade de se ligar a pró-caspase-9. O agregado multimolecular, formado pelas moléculas de citocromo c, Apaf-1 e pró-

caspace-9, é denominado apoptossoma (MITA, MITA e TOLCHER, 2006; ELMORE, 2007; SINGH, 2007; RASTOGI e SINHA, 2009; TAIT e GREEN, 2010; SPEIRS et al., 2011). Esse, na presença de ATP ou ADP, ativa a procaspase-9 em caspase 9, a qual cliva as caspases efetoras, como as caspases-2, -3, -6 e -7, que medeiam a apoptose, clivando diversos alvos celulares (JIANG e WANG, 2004; MITA, MITA e TOLCHER, 2006; SINGH, 2007; OW et al., 2008; RASTOGI e SINHA, 2009; TAIT e GREEN, 2010).



Esquema 3: Via intrínseca e extrínseca da apoptose.

Fonte: Adaptado de TILLY (2001).

As proteínas proapoptóticas AIF e endonuclease G atuam de maneira independente das caspases (JIANG e WANG, 2004; ELMORE, 2007; KROEMER, GALLUZZI e BRENNER, 2007; RASTOGI e SINHA, 2009). Uma vez liberado no citoplasma, o AIF transloca-se para o núcleo e causa fragmentação do DNA em pedaços de aproximadamente 50 a 300 kb e a condensação da cromatina na periferia nuclear (ELMORE, 2007; KROEMER, GALLUZZI e BRENNER, 2007; RASTOGI e SINHA, 2009; SEVRIOUKOVA, 2011). Além do efeito nuclear, o AIF pode induzir a permeabilização mitocondrial, ocasionando a liberação do citocromo c. A ação do AIF depende do estímulo indutor de morte celular (MODJTAHEDI et al., 2006; SEVRIOUKOVA, 2011), por exemplo: o AIF parece não participar da apoptose causada por danos ao DNA (PERES e CURI, 2005). A endonuclease G também transloca-se para o núcleo, onde cliva a cromatina nuclear e produz fragmentos de DNA em oligonucleossomos (ELMORE, 2007; KROEMER, GALLUZZI e BRENNER, 2007; RASTOGI e SINHA, 2009).

As proteínas Smac/DIABLO e HtrA2/Omi promovem a apoptose através da inibição das proteínas inibidoras da apoptose – IAPs (do inglês, *Inhibitors of apoptosis proteins*) (MITA, MITA e TOLCHER, 2006; ELMORE, 2007; KROEMER, GALLUZZI e BRENNER, 2007; RASTOGI e SINHA, 2009). As IAPs atuam como moléculas antiapoptóticas, a partir da inibição da ativação da caspase iniciadora (caspase-9) e das caspases efetoras, caspases-3 e -7 (ADIDA et al., 2000; ZAFFARONI, PENNATI e DAIDONE, 2005; MITA, MITA e TOLCHER, 2006; HUNTER, LACASSE e KORNELUK, 2007). As IAPs, incluindo-se ML-IAP, XIAP, cIAP1, cIAP2, NIAP e a survivina, são as únicas proteínas endógenas que tem a habilidade de bloquear o passo seguinte à liberação do citocromo c pela mitocôndria e, consequentemente, regular a atividade das caspases iniciadoras e efetoras (ADIDA et al., 2000; ZAFFARONI, PENNATI e DAIDONE, 2005; HUNTER, LACASSE e KORNELUK, 2007). Vale ressaltar que um dos membros dessa família, a proteína survivina, desempenha um papel importante na divisão celular (ZAFFARONI, PENNATI e DAIDONE, 2005; FULDA, 2009). Alguns trabalhos mostram que essa proteína é expressa em altas concentrações na fase G2/M do ciclo celular e está rapidamente diminuída após a parada do mesmo (ADAMS e CORY, 1998; ZAFFARONI, PENNATI e DAIDONE, 2005). Assim, a superexpressão da survivina tem sido relacionada a um prognóstico desfavorável e diminuição de sobrevida em pacientes com câncer (ZAFFARONI, PENNATI e DAIDONE, 2005, NAKAYAMA e

KAMIHIRA, 2002), e ao desenvolvimento de resistência a quimioterápicos (ALTIERI, 2001; WRZESIEN-KUS et al., 2004; ZAFFARONI, PENNATI e DAIDONE, 2005).

A permeabilidade de membrana mitocondrial alterada, a perda do potencial mitocondrial e a liberação de proteínas da mitocôndria constituem o evento central da via intrínseca da apoptose. Entretanto, esses mecanismos sofrem uma regulação estreita por membros da família das proteínas Bcl-2 (Proteína-2 de linfoma de células B; do inglês, *B-cell lymphoma protein-2*) (ELMORE, 2007; KROEMER, GALLUZZI e BRENNER, 2007; OW et al., 2008; AUTRET e MARTIN, 2009; ROLLAND e CONRADT, 2010).

Os membros da família Bcl-2 contêm quatro grandes domínios conservados, referidos como domínios homólogos a Bcl-2 ou domínios BH (Homologia a Bcl-2; do inglês *Bcl-2 Homology*). Além disso, alguns membros possuem um domínio C terminal, que permite a inserção da proteína na membrana mitocondrial e em outras membranas intracelulares (ANTONSSON, 2004; KROEMER, GALLUZZI e BRENNER, 2007). A família Bcl-2 é constituída de proteínas com funções opostas, isto é, enquanto algumas possuem efeito antiapoptótico (Bcl-2, Bcl-XL, Bcl-W, Mcl1, Bcl-B e Bcl2A1), outras ativam a apoptose (Bax, Bak e Bok), (CORY e ADAMS, 2002; BURLACU, 2003; KROEMER, GALLUZZI e BRENNER, 2007; YOULE e STRASSER, 2008; FRENZEL et al., 2009). As proteínas antiapoptóticas acima descritas possuem os domínios BH1, BH2, BH3 e BH4, já as proapoptóticas possuem os domínios BH1, BH2 e BH3. Existe uma terceira classe de proteínas que possuem apenas o domínio BH3, denominadas proteínas “BH3-only” (Bad, Bik, Bid, Hrk, Bim, NOXA e PUMA), que podem ligar-se e regular as proteínas Bcl-2 antiapoptóticas e promover a apoptose (KROEMER, GALLUZZI e BRENNER, 2007; YOULE e STRASSER, 2008; FRENZEL et al., 2009).

Em condições fisiológicas normais, a proteína Bak encontra-se associada à membrana mitocondrial, enquanto a Bax localiza-se no citoplasma. Entretanto, quando ocorre um estímulo apoptótico, a Bax sozinha, ou associada a outras moléculas proapoptóticas como Bak e Bid, insere-se na membrana mitocondrial, induzindo a permeabilidade da mesma (KROEMER, GALLUZZI e BRENNER, 2007; OW et al., 2008). As proteínas Bax e Bak são cruciais para a indução da permeabilidade da membrana mitocondrial através da formação de poros, e a subsequente liberação de moléculas apoptogênicas, tais como, citocromo c e SMAC/DIABLO, que levam a ativação das caspases

(KROEMER, GALLUZZI e BRENNER, 2007; OW et al., 2008; SHERIDAN et al., 2008; AUTRET e MARTIN, 2009; TAIT e GREEN, 2010). Além disso, Bax e Bak induzem a fragmentação da mitocôndria em pequenas e numerosas unidades (KROEMER, GALLUZZI e BRENNER, 2007; SHERIDAN et al., 2008; ROLLAND e CONRADT, 2010). Já as proteínas dessa família, que possuem efeito antiapoptótico, localizam-se principalmente na membrana mitocondrial, onde protegem a mitocôndria contra a permeabilização de membrana (KROEMER, GALLUZZI e BRENNER, 2007; SHERIDAN et al., 2008), através da inibição das proteínas proapoptóticas Bax e Bak (KROEMER, GALLUZZI e BRENNER, 2007; OW et al., 2008; YOULE e STRASSER, 2008). As proteínas *BH3-only* exercem ação proapoptótica, tanto através da inibição de proteínas Bcl-2 antiapoptóticas, como também, promovendo a translocação da Bax para a membrana mitocondrial e ativação da Bak (KROEMER, GALLUZZI e BRENNER, 2007; YOULE e STRASSER, 2008; AUTRET e MARTIN, 2009; FRENZEL et al., 2009). Alguns trabalhos relatam que o desequilíbrio entre Bcl-2 e Bax leva à resistência ou à sensibilização por estímulos de morte, como os quimioterápicos. E a superexpressão de Bcl-2 tem emergido como um fator de mau prognóstico nos pacientes com LA (KUSENDA, 1998; CAMPOS et al., 1999; ONG et al., 2000; RUVOLO, DENG e MAY, 2001; SUAREZ et al., 2001; FRENZEL *et al.*, 2009).

Em determinados tipos celulares, a mitocôndria amplifica o estímulo extrínseco de morte através da interligação da via extrínseca com a intrínseca, levando a uma cascata de sinalização complexa dependente da permeabilização da membrana mitocondrial. Nesse caso, após sua ativação, a caspase-8 cliva e leva a ativação da proteína Bid, que por sua vez, ativa Bax induzindo a permeabilização da membrana mitocondrial, com liberação de citocromo c e ativação da caspase-3 (KROEMER, GALLUZZI e BRENNER, 2007; YOULE e STRASSER, 2008; TAIT e GREEN, 2010).

As vias intrínseca e extrínseca convergem para a fase de execução da apoptose onde ocorre a ativação das caspases executoras (caspases-3, -6 e -7). Uma vez ativadas, as caspases executoras ativam endonucleases citoplasmáticas que degradam o material nuclear, e proteases que clivam proteínas do citoesqueleto e do núcleo. Entre os substratos clivados pelas caspases executoras incluem-se: as citoqueratinas, a PARP (Polimerase Poli-ADP-Ribose; do inglês, *Poly-ADP-Ribose Polymerase*), a proteína nuclear NuMa, as proteínas do ciclo celular e do próprio processo apoptótico, dentre outros (PERES e

CURI, 2005; ELMORE, 2007). A clivagem da PARP pelas caspases interfere no reparo do DNA e é um importante indicador de apoptose (SOLDANI e SCOVASSI, 2002; SCOVASSI e DIEDERICH, 2004; DIEFENBACH e BURKLE, 2005; PERES e CURI, 2005). Um dos importantes alvos da caspase-3 é a proteína ICAD (Inibidores da deoxinuclease ativada por Caspase; do inglês, *Inhibitor of the Caspase-Activated Deoxinuclease*), que se liga a CAD (Deoxinuclease ativada por Caspase; do inglês, *Caspase-Activated Deoxinuclease*), inibindo-a. A inativação da ICAD deixa a CAD livre para clivar a cromatina. A CAD cliva o DNA nos espaços internucleossomais em fragmentos de aproximadamente 200 pares de bases, gerando a fragmentação de DNA, a qual é característica das células apoptóticas (ENARI et al., 1998; NAGATA, 2000; PERES e CURI, 2005; ELMORE, 2007). Em conjunto, a clivagem desses substratos causa as alterações bioquímicas e morfológicas observadas em células apoptóticas (ENARI et al., 1998; PERES e CURI, 2005; ELMORE, 2007).

A desregulação da apoptose está envolvida em diversas doenças (ELMORE, 2007; OW et al., 2008), tais como doenças auto-imunes, Síndrome da Imunodeficiência Adquirida (AIDS; do inglês, *Acquired Immunodeficiency Syndrome*), isquemia, doenças neurodegenerativas, câncer e outras (JIANG e WANG, 2004; ELMORE, 2007; RASTOGI e SINHA, 2009). O desenvolvimento do câncer envolve a supressão do processo apoptótico e a desregulação da proliferação celular. Desta maneira, o estudo sobre como as vias apoptóticas estão alteradas no câncer é fundamental para o entendimento da progressão dessa doença, assim como, para o desenvolvimento de novas terapias antitumorais que sejam mais efetivas e confiáveis (HUNTER, LACASSE e KORNELUK, 2007).

1.4 CICLO CELULAR

O ciclo celular representa uma série de eventos integrados que permitem à célula diferenciar e proliferar (SCHAFFER, 1998; SCHWARTZ e SHAH, 2005). Além disso, possui papel fundamental na replicação do DNA e na correta segregação dos cromossomos homólogos para as células filhas, originadas durante a divisão celular (TARN e LAI, 2011). Para que este processo ocorra corretamente e o genoma seja mantido, uma série de etapas é controlada por diversas proteínas ao longo do ciclo celular. Alterações nesse conjunto de proteínas podem mudar o fenótipo de uma célula normal para tumoral

(FERREIRA e ROCHA, 2004). A definição das bases moleculares desse processo é de grande importância para o conhecimento dos mecanismos envolvidos na transformação neoplásica (JOHNSON e WALKER, 1999; FERREIRA e ROCHA, 2004; SCHWARTZ e SHAH, 2005) e para o desenvolvimento de terapêuticas efetivas contra o câncer (FERREIRA e ROCHA, 2004).

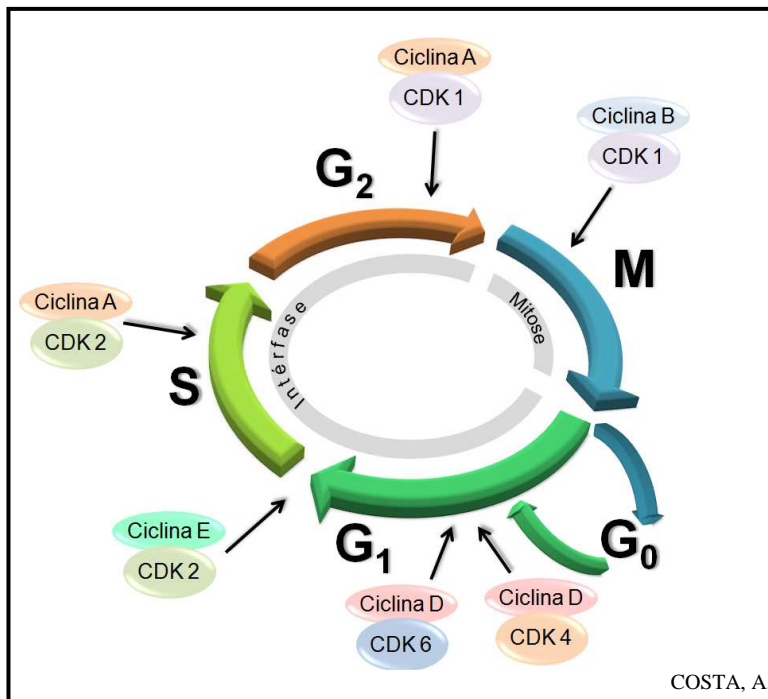
O ciclo celular eucariótico é tradicionalmente dividido em duas etapas principais: mitose (M) e intérfase. A mitose é o processo de divisão nuclear, compreendido das fases prófase, metáfase, anáfase e telófase (SCHAFFER, 1998; VERMEULEN, VAN BOCKSTAELE e BERNEMAN, 2003; FERREIRA e ROCHA, 2004; PERES e CURI, 2005) e que precede a divisão da célula em duas (citocinese) (PERES e CURI, 2005). A intérfase é um período de intenso metabolismo celular, que ocorre entre duas fases M, e é dividido em três fases: *Gap* 1 (G1), Síntese (S) e *Gap* 2 (G2) (HARTWELL e WEINERT, 1989; SCHAFFER, 1998; VERMEULEN, VAN BOCKSTAELE e BERNEMAN, 2003; FERREIRA e ROCHA, 2004). Quando as células, totalmente diferenciadas, encontram-se em estado de quiescência, ou seja, fora do ciclo celular, diz-se que elas estão na fase G0 (HARTWELL e WEINERT, 1989; JOHNSON e WALKER, 1999; VERMEULEN, VAN BOCKSTAELE e BERNEMAN, 2003; TARN e LAI, 2011). Nesse estágio, permanecem metabolicamente ativas, mas não se dividem ou, então, dividem-se apenas quando estimuladas por sinais extracelulares, com a finalidade de renovação tecidual após morte celular ou injúria (FERREIRA e ROCHA, 2004; KUMAR et al., 2010).

Durante a fase G1, período compreendido entre a mitose e a duplicação do DNA, ocorre a descondensação dos cromossomos, e o núcleo aparece morfológicamente uniforme (PERES e CURI, 2005). A célula está metabolicamente ativa e sintetiza proteínas necessárias à fase seguinte, como enzimas responsáveis pela duplicação do DNA. Além disso, a massa celular aumenta para suportar a divisão celular (VERMEULEN, VAN BOCKSTAELE e BERNEMAN, 2003; FERREIRA e ROCHA, 2004; PERES e CURI, 2005). A fase G1 é seguida pela fase S, durante a qual a célula realiza a replicação do seu DNA nuclear. Tão logo se complete a duplicação do DNA, dá-se início à fase G2, que se caracteriza pela diferenciação celular e pela síntese de proteínas necessárias para a mitose (JOHNSON e WALKER, 1999; VERMEULEN, VAN BOCKSTAELE e BERNEMAN, 2003; FERREIRA e ROCHA, 2004).

A transição de uma fase do ciclo celular para outra ocorre de maneira ordenada e controlada por diferentes proteínas celulares. A

classe de proteínas que controla essa progressão do ciclo celular é composta por enzimas cinases dependentes de ciclinas, conhecidas como CDKs (Cinases dependentes de Ciclinas; do inglês, *cyclin-dependent kinases*), que são ativadas em pontos específicos do ciclo celular (VERMEULEN, VAN BOCKSTAELE e BERNEMAN, 2003; SCHWARTZ e SHAH, 2005). A ativação dessas cinases requer sua interação com as ciclinas, além de fosforilação e desfosforilação de diferentes resíduos (JOHNSON e WALKER, 1999; VERMEULEN, VAN BOCKSTAELE e BERNEMAN, 2003).

Os níveis de CDKs permanecem estáveis durante o ciclo celular (JOHNSON e WALKER, 1999; VERMEULEN, VAN BOCKSTAELE e BERNEMAN, 2003), enquanto os de suas proteínas ativadoras, as ciclinas, alteram com a progressão do mesmo. Assim, a expressão de determinadas ciclinas determina a ativação de CDKs específicas nas diferentes fases do ciclo celular (JOHNSON e WALKER, 1999; VERMEULEN, VAN BOCKSTAELE e BERNEMAN, 2003; SCHWARTZ e SHAH, 2005; MALUMBRES e BARBACID, 2009; TARN e LAI, 2011). As ciclinas do tipo D (ciclina D1, ciclina D2 e ciclina D3) são essenciais para entrada na fase G1 e atuam através da formação de complexos com as CDK4 e CDK6. Outra ciclina relacionada à fase G1 é a ciclina E, que associada a CDK2 regula a progressão da fase G1 para a fase S. A CDK2 é também ativada pela ciclina A, e o complexo formado por elas é necessário durante a fase S. Ao fim da fase G2, o complexo CDK1-ciclina A promove o início da fase seguinte, a mitose, que por sua vez é regulada pelo complexo CDK1-ciclina B (Esquema 4) (JOHNSON e WALKER, 1999; VERMEULEN, VAN BOCKSTAELE e BERNEMAN, 2003; SCHWARTZ e SHAH, 2005; MALUMBRES e BARBACID, 2009).



Esquema 4: Fases do ciclo celular.

Fonte: Adaptado de Vermeulen, Van Bockstaele e Berneman (2003).

Como já mencionado, além da ligação às ciclinas, a atividade das CDKs também é regulada pela fosforilação de resíduos de treonina e tirosina. A ativação completa da CDK1 requer a fosforilação da treonina 161 (treonina 172 em CDK4 e treonina 160 em CDK2), catalisada pelo complexo CDK7-ciclina H, denominado CAK (VERMEULEN, VAN BOCKSTAELE e BERNEMAN, 2003; SCHWARTZ e SHAH, 2005). Essas fosforilações induzem mudanças conformacionais que aumentam a ligações com as ciclinas. Já as cinases Wee1 e Myt 1 fosforilam a CDK1 na tirosina 15 e/ou treonina 14 inativando-as, assim a defosforilação desses resíduos é necessária para a ativação da CDK1 e progressão do ciclo celular, e é efetuada pela enzima Cdc25 (SCHAFER, 1998; VERMEULEN, VAN BOCKSTAELE e BERNEMAN, 2003).

As CDKs também podem ser controladas por proteínas inibidoras do ciclo celular, denominadas inibidoras de CDK ou CKI

(Inibidores de CDK; do inglês, *CDK inhibitors*), que se ligam apenas às CDKs ou ao complexo CDK-ciclina e regulam sua atividade. São descritas duas famílias de CKI, a INK4 e Cip/Kip. A família INK4 inclui as proteínas p15, p16, p18 e p19, que inativam as CDKs da fase G1 (CDK4 e CDK6) por meio da formação de complexos com essas CDK, prevenindo a associação com a ciclina D (JOHNSON e WALKER, 1999; VERMEULEN, VAN BOCKSTAELE e BERNEMAN, 2003; SCHWARTZ e SHAH, 2005). A segunda família de inibidores, a família Cip/Kip, inclui as proteínas p21, p27 e p57 (JOHNSON e WALKER, 1999; VERMEULEN, VAN BOCKSTAELE e BERNEMAN, 2003; SCHWARTZ e SHAH, 2005; ABBAS e DUTTA, 2009), que inativam os complexos CDK-ciclina da fase G1 e em menor proporção o complexo CDK1-ciclina B (VERMEULEN, VAN BOCKSTAELE e BERNEMAN, 2003; ABBAS e DUTTA, 2009).

A ativação das CDKs leva a fosforilação de proteínas alvo, e, essas alterações são fisiologicamente relevantes para a progressão do ciclo celular (SCHAFER, 1998; VERMEULEN, VAN BOCKSTAELE e BERNEMAN, 2003). O substrato dos complexos CDK 4/6-ciclina D, o gene supressor do tumor retinoblastoma ou pRb, é fosforilado no início da fase G1, liberando os fatores de transcrição E2F-1 e DP-1 (SENDEROWICZ, 2003; VERMEULEN, VAN BOCKSTAELE e BERNEMAN, 2003), os quais regulam positivamente a transcrição de genes, cujos produtos são necessários para a progressão da fase S, como ciclina A, ciclina E e Cdc25 (VERMEULEN, VAN BOCKSTAELE e BERNEMAN, 2003). Os complexos CDK2-ciclina E e CDK1-ciclina B fosforilam a histona H1 promovendo a condensação dos cromossomos (JOHNSON e WALKER, 1999; VERMEULEN, VAN BOCKSTAELE e BERNEMAN, 2003). Outros substratos das CDKs incluem seus próprios reguladores Wee1 e Cdc25, proteínas do citoesqueleto, microtúbulos e vimentina, que são essenciais para a correta divisão celular (SCHAFER, 1998; VERMEULEN, VAN BOCKSTAELE e BERNEMAN, 2003).

A proliferação celular é associada ainda à expressão da proteína Ki67. Essa proteína, localizada no núcleo das células em interfase e sobre a superfície dos cromossomos durante a mitose, está presente em todas as fases ativas do ciclo celular, fases G1, S, G2 e mitose, e está ausente na fase G0. Devido ao fato desta proteína estar presente em todas as células em proliferação, tanto em células normais quanto em tumorais, a sua presença torna-se um excelente marcador de proliferação celular (SCHOLZEN e GERDES, 2000). Embora a estrutura,

localização e regulação da proteína Ki67 estejam bem descritas, a sua função ainda permanece pouco compreendida. Alguns autores relatam possíveis funções para a proteína Ki67, como Bridger, Kill e Lichter (1998) que sugerem a sua participação na organização do DNA, baseado na localização extranucleolar da proteína Ki67 durante estágios iniciais da fase G1. MacCallum e Hall (2000) sugerem ainda um papel estrutural à proteína Ki67 dentro do nucléolo, baseados na capacidade desta proteína em interagir de forma complexa com outras proteínas e de ligar-se ao DNA e ao ácido ribonucléico (RNA), e, sugerem também que a proteína Ki67 é essencial a síntese de ribossomos durante a divisão celular. Em parte, a dificuldade em se determinar a função desta proteína pode ser atribuída à ausência de homologia óbvia com outras proteínas (SCHOLZEN e GERDES, 2000; BROWN e GATTER, 2002). Entretanto, foi determinada uma região da proteína Ki67, denominada domínio FHA (Domínio associado ao *Forkhead*; do inglês, *forkhead-associated*), que possui similaridade com outras proteínas que detêm função na regulação do ciclo celular, como as proteínas DUN1 e RAD53, sugerindo um papel semelhante à proteína Ki67. Por outro lado, como a função do domínio FHA não é conhecida, a exata função desta proteína permanece desconhecida (BROWN e GATTER, 2002). A produção de anticorpos destinados para a avaliação imunológica da proteína Ki67 humana permitiu numerosos estudos sobre o valor prognóstico da proliferação celular em amostras clínicas de neoplasias humanas. O seu uso como diagnóstico e fator prognóstico em vários tipos de neoplasias é aprovado ou está em discussão (ENDL e GERDES, 2000).

Além da regulação das proteínas descritas anteriormente, o ciclo celular também é controlado nos chamados “pontos de checagem”, os quais permitem o desencadeamento do próximo passo somente após o término do estágio precedente (PERES e CURI, 2005). O bloqueio do ciclo celular nesses “pontos de checagem” ocorre em resposta à detecção de um dano ao DNA, para possibilitar o reparo do mesmo (VERMEULEN, VAN BOCKSTAELE e BERNEMAN, 2003; MALUMBRES e BARBACID, 2009). Os principais pontos de checagem estão posicionados antes da duplicação do DNA (entre as fases G1 e S) e depois da replicação (na fase G2) (VERMEULEN, VAN BOCKSTAELE e BERNEMAN, 2003).

O “ponto de checagem” entre as fases G1 e S é altamente regulado e afasta a possibilidade de um dano no DNA antes da sua duplicação (HARTWELL e WEINERT, 1989). Diferentes proteínas cinases são capazes de reconhecer o dano ao DNA, entre elas a ATM

(Ataxia-telangiectasia mutada; do inglês, *ataxia-telangiectasia-mutated*) e a ATR (Ataxia e rad3 relacionados; do inglês, *ataxia and rad3 related*). Essas cinases fosforilam a proteína p53 em resposta ao DNA danificado, ativando-a (VERMEULEN, VAN BOCKSTAELE e BERNEMAN, 2003; GIONO e MANFREDI, 2006; MEEK, 2009; ZILFOU e LOWE, 2009). Vários trabalhos demonstram que a p53 é responsável por esse primeiro “ponto de checagem” (KASTAN et al., 1991; KUERBITZ et al., 1992; GIONO e MANFREDI, 2006), onde na presença de dano ao DNA há indução da atividade dessa proteína, que atua como fator de transcrição de diferentes genes, como p21, Mdm2 e Bax. A transcrição do gene p21 gera uma proteína homônima responsável por inibir a atividade das enzimas CDK, o que impede a progressão do ciclo celular e previne a replicação de DNA com dano (VERMEULEN, VAN BOCKSTAELE e BERNEMAN, 2003; GIONO e MANFREDI, 2006; ABBAS e DUTTA, 2009). Caso o dano ao DNA não seja reparado durante este bloqueio, a p53 induz morte celular através da transcrição de genes como Bax, Fas e genes comprometidos com vias de estresse oxidativo, que sinalizam a indução da apoptose (FRIDMAN e LOWE, 2003; VERMEULEN, VAN BOCKSTAELE e BERNEMAN, 2003; ZUCKERMAN et al., 2009). Já a proteína Mdm2 possui papel importante na regulação da p53, ligando-se a ela e impedindo sua atividade de transcrição gênica, além disso, também contribui para a degradação da p53, facilitando sua ubiquitinação (VERMEULEN, VAN BOCKSTAELE e BERNEMAN, 2003; YEE e VOUSDEN, 2005).

O bloqueio do ciclo celular na fase G2 pode ocorrer na ausência ou presença de p53. Quando o dano ao DNA ocorre na fase G2, o início da mitose é prevenido por meio da persistência de CDK1 na sua forma inibida devido à fosforilação. Esse processo depende das cinases ATM e ATR e de seus efetores Chk1 e Chk2 que fosforilam e inibem a fosfatase Cdc25, que por sua vez, não defosforila a CDK1 evitando que o ciclo prossiga (VERMEULEN, VAN BOCKSTAELE e BERNEMAN, 2003; GIONO e MANFREDI, 2006). A p53 atua nesse segundo ponto de checagem através da inibição do complexo CDK1-ciclina B, responsável pela regulação da mitose (FERREIRA e ROCHA, 2004; ZILFOU e LOWE, 2009).

Entretanto, quando há uma mutação no gene que transcreve a proteína p53, origina-se uma proteína mutante que é incapaz de exercer a sua função de “ponto de checagem” e, nesses casos, a replicação do DNA e proliferação celular prossegue mesmo na presença de um dano genômico, o que leva a produção de clones celulares aberrantes e ao

desenvolvimento e persistência do câncer (YIN et al., 1992; LIVINGSTONE et al., 1992). Assim, a mutação no gene da proteína p53 está relacionado à grande maioria dos tumores (YEE e VOUSDEN, 2005; MEEK, 2009; WIMAN, 2010). Clinicamente, o estado funcional da proteína p53 está relacionado ao prognóstico, progressão e resposta terapêutica dos tumores. As células neoplásicas que possuem mutação nessa proteína mostram-se mais resistentes ao tratamento, dessa forma, a proteína p53 é considerada um importante alvo molecular no desenvolvimento de terapias contra o câncer (WANG, RASTINEJAD e EL-DEIRY, 2003).

As anormalidades do ciclo celular estão envolvidas na maioria das neoplasias humanas (SENDEROWICZ, 2003; SCHWARTZ e SHAH, 2005; MALUMBRES e BARBACID, 2009), podendo ser observadas alterações na expressão de diversas proteínas envolvidas no ciclo celular, como aumento da expressão de ciclinas, deficiência de CKI (SCHWARTZ e SHAH, 2005) e desregulação de CDK (MALUMBRES e BARBACID, 2009). Grandes investimentos já foram direcionados para a compreensão dos mecanismos moleculares que envolvem o controle dos processos normais de proliferação, diferenciação e morte celular programada, e as causas de alterações nestes processos que pudessem estar ligadas ao desenvolvimento tumoral. Desta forma, a busca por alvos moleculares diferentemente expressos nos tumores e o desenvolvimento de novas drogas com capacidade de atingir estes alvos representam uma maneira menos tóxica e potencialmente mais efetiva de tratar pacientes com câncer (FERREIRA E ROCHA, 2004).

1.5 NOVAS TERAPIAS

Como visto anteriormente, várias formas de quimioterapia, imunoterapia e radiação ionizante são utilizadas no tratamento de diversos tipos de câncer com o objetivo de eliminar as células tumorais. Embora o sucesso com tratamentos contra alguns tipos de câncer seja obtido, a morbidade associada a eles ainda representa um grave problema, e muitos deles apresentam resistência a várias terapias. Vê-se, então, a clara necessidade de desenvolvimento de novas terapias baseadas nos conhecimentos modernos sobre tumorigênese, mecanismos de morte das células tumorais e de resistências ao tratamento. O objetivo terapêutico no tratamento do câncer é induzir seletivamente a morte das células tumorais. Existem, a princípio, duas maneiras de atingir este

objetivo: a primeira consiste na importância em disponibilizar o fármaco no tecido que contém o tumor, favorecendo a sua acumulação nas células tumorais; e a segunda, em induzir a morte especificamente das células tumorais, preservando as células normais e os tecidos adjacentes (ZHIVOTOVSKY e ORRENIUS, 2003).

1.5.1 Chalconas

As chalconas e seus derivados têm sido descritos na literatura como promissores compostos com atividade antitumoral (SAYDAM et al, 2003; ACHANTA et al., 2006). As chalconas ou 1,3-diaril-2-pronen-1-onas foram primeiramente isoladas de plantas e são quimicamente reconhecidas como cetonas aromáticas α , β -insaturadas (DHAR, 1981). Esses compostos são precursores da via de biossíntese dos flavonóides e isoflavonóides nas plantas, possuem importância na pigmentação das flores, atuando como atrativo para os agentes polinizadores (ZUANAZZI e MONTANHA, 2004) e, além disso, desempenham função de defesa contra patógenos e insetos (BATOVSKA e TODOROVA, 2010).

Diversas propriedades biológicas das chalconas são descritas na literatura, tais como atividades antioxidante (CHENG et al., 2008; BANDGAR et al., 2010) citotóxica, antitumoral (BANDGAR et al., 2010; LI et al., 2011; ZHANG et al., 2011), antimicrobianas (NIELSEN et al., 2004; CHEN, et al., 2010), anti-inflamatória (CHENG et al., 2008; BANDGAR et al., 2010; WU et al., 2011), entre outras. Ensaios clínicos também mostram que estes compostos alcançam concentrações plasmáticas satisfatórias e não causam toxicidade (BATOVSKA e TODOROVA, 2010).

A atividade antiproliferativa, em diversas linhagens celulares, tem sido relatada para inúmeras chalconas e seus derivados sintéticos. SHEN et al. (2007) demonstraram que estes compostos causam um bloqueio do ciclo celular e induzem a apoptose pela via mitocondrial em células humanas de câncer de bexiga, através do aumento da expressão das proteínas p21, Bax e Bak, e diminuição nos níveis de Bcl-2 e Bcl-XL. O efeito das chalconas no bloqueio do ciclo celular e na indução a apoptose também foi observado em células de câncer de próstata (YUN et al, 2006) e células de câncer de mama (HSU et al, 2006).

Além disso, diversas pesquisas vêm sendo direcionadas para a avaliação do potencial efeito citotóxico das chalconas em células de linhagem leucêmica. YE et al. (2005) mostraram que as chalconas

causam indução à apoptose em células humanas de leucemia mieloide K562, possivelmente através da diminuição da expressão da proteína antiapoptótica Bcl-2. Efeitos citotóxicos e de inibição da proliferação celular das chalconas também são descritos sobre células de leucemia promielocítica humana HL-60 (SAYDAM et al, 2003; NAKATANI et al, 2005). Recentemente, demonstramos que a chalcona sintética (2*E*)-3-(2-naftalenil)-1-(3'-metoxi-4'-hidroxi-fenil) -2- propen-1-ona derivada do 2-naftaldeído causa bloqueio no ciclo celular e indução da apoptose em células murinas de leucemia linfoblástica aguda L-1210, e que o mecanismo de ação envolve o aumento da expressão de p53, diminuição da expressão de Bcl-2 e aumento da expressão de Bax; aumentando a expressão da caspase 3 ativa (PEDRINI et al., 2010). Efeitos no ciclo celular, com bloqueio na fase G2/M, em células humanas de leucemia mieloide K562 e de leucemia linfóide Jurkat, também foram relatados por ROMAGNOLI et al. (2008) e Rao, Fang e Tzeng (2004), respectivamente.

Vários autores relatam que a ação das chalconas no ciclo celular envolve principalmente o bloqueio na fase G2/M (RAO, FANG e TZENG, 2004; LIU e GO, 2006; ROMAGNOLI et al., 2008; DUCKI et al., 2009). Tal fato é atribuído a ligação das chalconas ao mesmo sítio de ligação da colchicina na tubulina, impedindo a polimerização da tubulina e a consequente inibição da mitose (LAWRENCE et al., 2006; LIU e GO, 2006). Há relatos ainda da importância dos grupamentos metoxila para a atividade antimitótica, uma vez que inibidores de tubulina conhecidos como a Combretastatina A e a Colchicina são ricos em grupamentos metoxila (DUCKI et al., 1998; LIU e GO, 2006).

Apesar de diversos estudos relatarem o efeito antiproliferativo e citotóxico das chalconas, os mecanismos de ação descritos ainda são controversos. Considerando-se o conhecimento da ampla gama de efeitos nas vias de sinalização celular, a identificação de novos análogos de chalconas e seus mecanismos de ação se fazem necessários na investigação de importantes alvos para o desenvolvimento de novos e mais seletivos compostos antitumorais. Dentro deste contexto, é de suma relevância a continuidade dos estudos da atividade antiproliferativa das chalconas sintéticas e seus derivados para a elucidação dos mecanismos de ação antitumoral envolvidos nos processos de sinalização e morte celular, em especial, nas desordens hematológicas. Assim, este trabalho teve como objetivo investigar o efeito citotóxico de 46 chalconas sintéticas derivadas da 2,4,5-trimetoxiacetofenona e do 2',4',5'-trimetoxibenzaldeído em células de

linhagens de leucemia mieloide aguda (K562) e de leucemia linfoide aguda (Jurkat) humanas.

2. JUSTIFICATIVA

A OMS estima, para o ano de 2030, 15,5 milhões de casos novos de câncer e cerca de 11 milhões de mortes pela doença no mundo. O câncer foi considerado, durante muito tempo, uma doença dos países desenvolvidos e com grandes recursos financeiros. No entanto, nas últimas quatro décadas, a situação vem mudando, e a maior parte do ônus global do câncer pode ser observada em países em desenvolvimento, principalmente aqueles com poucos e médios recursos. Desta forma, o controle do câncer necessita adquirir o mesmo foco e a mesma atenção que a área de serviços assistenciais, pois, o aumento progressivo no número de casos novos pode encontrar recursos insuficientes para atender às necessidades de diagnóstico, tratamento e acompanhamento. As consequências disso poderão atingir os aspectos sociais e econômicos e o câncer pode se tornar um grande obstáculo para o desenvolvimento socioeconômico de países emergentes como o Brasil (INCA, 2011).

As LAs apresentam inúmeros fatores prognósticos ainda não totalmente compreendidos. Por isso, os procedimentos terapêuticos para pacientes com leucemia ainda permanecem de maneira empírica e os resultados terapêuticos imprevisíveis (LUQMANNI, 2005). Além disso, o tratamento de pacientes refratários à quimioterapia é dispendioso e a sobrevida curta. Apesar da alta morbidade relacionada à quimioterapia, essa ainda é a forma terapêutica mais utilizada no tratamento de leucemias. Por isso, nas últimas duas décadas, a meta dos pesquisadores e oncologistas tem sido a descoberta de fármacos antineoplásicos, que tenham maior especificidade na indução de morte nas células tumorais, com poucos ou insignificantes efeitos adversos e, que, sejam de fácil administração, pois a maioria dos quimioterápicos, atualmente, necessita de administração endovenosa prolongada. Assim, o interesse em novos alvos terapêuticos, a partir de produtos naturais e sintéticos, cresceu exponencialmente nos últimos anos.

As chalconas têm sido relatadas como compostos atrativos, com propriedades quimioprotetoras e antitumorais. Por isso, na literatura, podemos observar muitos trabalhos que mostram a sua atividade citotóxica. No entanto, os mecanismos de ação ainda são controversos, ou a concentração inibitória 50% (CI₅₀) do composto para causar citotoxicidade é alta. Assim, considerando as propriedades antitumorais desses compostos, a investigação de novas chalconas se faz necessária para o avanço em direção ao desenvolvimento de novos fármacos antineoplásicos. Dessa forma, como em trabalhos anteriores, demonstramos que chalconas derivadas do 2-naftaldeído apresentam atividade citotóxica importante em linhagens de células leucêmicas

murinas, neste trabalho objetivamos investigar o efeito citotóxico de 46 chalconas sintéticas derivadas da 2,4,5-trimetoxiacetofenona e do 2',4',5'-trimetoxibenzaldeído em células de linhagens de leucemia mieloide aguda K562 e de leucemia linfoide aguda Jurkat de origem humana.

3. OBJETIVOS

3.1 OBJETIVO GERAL

Investigar o efeito de chalconas sintéticas derivadas da 2,4,5-trimetoxiacetofenona e do 2',4',5'-trimetoxibenzaldeído sobre o ciclo celular e os mecanismos de apoptose em células de linhagem de leucemia mieloide aguda K562 e de leucemia linfoide aguda Jurkat de origem humana.

3.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Investigar o efeito citotóxico de 46 chalconas derivadas da 2,4,5-trimetoxiacetofenona e do 2',4',5'-trimetoxibenzaldeído sobre células de linhagem de leucemia mieloide aguda K562 de origem humana.
- Selecionar os compostos com maior atividade citotóxica e determinar suas respostas em relação à concentração e ao tempo de incubação, bem como calcular sua CI_{50} em células de linhagem de leucemia linfoide aguda Jurkat e de leucemia mieloide aguda K562 de origem humana.
- Avaliar o efeito citotóxico das chalconas selecionadas em células mononucleares de indivíduos saudáveis.
- Verificar se as chalconas selecionadas causam morte celular por apoptose, nas células de linhagem de leucemia linfoide aguda Jurkat e de leucemia mieloide aguda K562 de origem humana.
- Analisar o efeito das chalconas selecionadas no ciclo celular das células de linhagem de leucemia linfoide aguda Jurkat e de leucemia mieloide aguda K562 de origem humana.
- Investigar o efeito das chalconas sobre o marcador de proliferação celular Ki67 sobre células de linhagem de leucemia linfoide aguda Jurkat e de leucemia mieloide aguda K562 de origem humana.
- Investigar o efeito das chalconas selecionadas sobre o potencial mitocondrial das células de linhagem de leucemia linfoide aguda Jurkat e de leucemia mieloide aguda K562 de origem humana.
- Investigar se o efeito citotóxico das chalconas, sobre células de linhagem de leucemia linfoide aguda Jurkat e de leucemia mieloide aguda K562 de origem humana, envolve os fatores reguladores de apoptose: proteína antiapoptótica Bcl-2, proteína

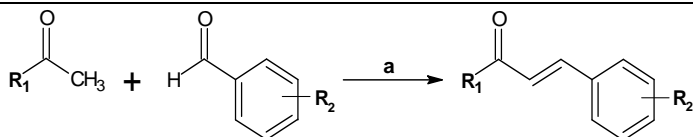
proapoptótica Bax, proteína antiapoptótica survivina, caspase-3 ativa e proteína p53.

4. MATERIAIS E MÉTODOS

4.1 REAGENTES

As linhagens celulares K562 e Jurkat foram gentilmente cedidas pelo Dr. João Paulo de Biaso Viola da Divisão de Pós-graduação do INCA. O meio de cultura *Roswell Park Memorial Institute* (RPMI) 1640, a penicilina, a estreptomomicina, o ácido N-[2-Hidroxiethyl]piperazina-N'-[2-etanosulfônico] (Hepes) e o soro fetal bovino foram adquiridos da Gibco, *Invitrogen Corporation*, Brasil. O brometo tiazolil azul de tetrazólio (brometo de 3-(4,5-dimetil-2-tiazolil)-2,5-difenil-2H-tetrazólio) MTT, o Ficoll-Hypaque (densidade 1.077 g/m³), o laranja de acridina, o brometo de etídio, o silano (3-Aminopropyl)triethoxy-silane) e a albumina bovina foram adquiridos da Sigma-Aldrich, EUA. O dimetilsulfóxido (DMSO), o ácido clorídrico PA, a acetona PA e o álcool etílico 96% foram adquiridos da Merck, Alemanha. O álcool metílico PA e o peróxido de hidrogênio PA foram adquiridos da Dinâmica Química Contemporânea LTDA, Brasil. O xilol PA foi adquirido da Proquímios, Brasil; o tampão fosfato (PBS), da Laborclin, Brasil, e o Trinton[®] X-100, da Amresco, EUA. A Hematoxilina de Harris e o meio de montagem sintético foram adquiridos da *Easy-Path*, Brasil. O “*BD Cytofix/Cytoperm kit*”, utilizado para fixação e permeabilização celular nos experimentos com citometria de fluxo e o anticorpo monoclonal anti-caspase-3 ativa conjugado ao *Pacific Blue* foram adquiridos da *BD Biosciences*, EUA. O “*PI/RNASE Solution kit*” com a solução de Iodeto de Propídeo (PI) e ribonuclease (RNase), o “*Annexin V-FITC Apoptosis Detection kit*” e o anticorpo monoclonal anti-p53 conjugado ao PE foram adquiridos da *Immunostep*, Salamanca, Espanha. O anticorpo monoclonal anti-Bax conjugado ao PerCP e o anticorpo policlonal anti-survivina foram adquiridos da Santa Cruz *Biotechnology*, EUA. O anticorpo monoclonal anti-Bcl-2 conjugado ao isotiocianato de fluoresceína (FITC) foi adquirido da *Invitrogen*, EUA. O anticorpo monoclonal anti-Ki67 e o kit de solução cromógena DAB (3,3'-diaminobenzidina-DAB) utilizado na imunocitoquímica foram adquiridos da *Biocare Medical*, EUA. O “*kit LSAB + System-HRP*” de anticorpo secundário utilizado na imunocitoquímica foi adquirido da *Dako*, USA e o “*kit MitoView 633*” para avaliação do potencial mitochondrial foi adquirido da *Biotium*, EUA. As chalconas sintéticas, derivadas da 2,4,5-trimetoxiacetofenona e do 2',4',5'-trimetoxibenzaldeído, foram sintetizadas conforme o Esquema 5 pela doutoranda Alessandra Mascarello e pela doutora Louise Domeneghini Chiaradia orientadas pelo grupo do Prof. Dr. Rosendo Augusto Yunes e do Prof. Dr. Ricardo José Nunes do

Laboratório Estrutura e Atividade do Departamento de Química da UFSC.



- | | |
|--|--|
| (1) R ₁ = 2,4,5-OMe-fenil, R ₂ = 2,4,5-OMe | (24) R ₁ = 2,4,5-OMe-fenil, R ₂ = 3-CF ₃ , 4-Cl |
| (2) R ₁ = 2,4,5-OMe-fenil, R ₂ = 3,4-Cl | (25) R ₁ = 2,4,5-OMe-fenil, R ₂ = 3,5-Cl |
| (3) R ₁ = 2,4,5-OMe-fenil, R ₂ = 4-OMe | (26) R ₁ = 2,4,5-OMe-fenil, R ₂ = 4-CF ₃ |
| (4) R ₁ = 2,4,5-OMe-fenil, R ₂ = 4-N(CH ₃) ₂ | (27) R ₁ = 2,4,5-OMe-fenil, R ₂ = 3-CF ₃ |
| (5) R ₁ = 2,4,5-OMe-fenil, R ₂ = 4-Me | (28) R ₁ = 2,4,5-OMe-fenil, R ₂ = 3-F |
| (6) R ₁ = 2,4,5-OMe-fenil, R ₂ = 4-H | (29) R ₁ = 2,4,5-OMe-fenil, R ₂ = 3-CN |
| (7) R ₁ = 2,4,5-OMe-fenil, R ₂ = 2,5-OMe | (30) R ₁ = 4-Br-fenil, R ₂ = 2,4,5-OMe |
| (8) R ₁ = 2,4,5-OMe-fenil, R ₂ = 4-F | (31) R ₁ = 2,4-OMe-fenil, R ₂ = 2,4,5-OMe |
| (9) R ₁ = 2,4,5-OMe-fenil, R ₂ = 2,6-OMe | (32) R ₁ = fenil, R ₂ = 2,4,5-OMe |
| (10) R ₁ = 2,4,5-OMe-fenil, R ₂ = 2,4,6-OMe | (33) R ₁ = 4-OMe-fenil, R ₂ = 2,4,5-OMe |
| (11) R ₁ = 2,4,5-OMe-fenil, R ₂ = 4-NO ₂ | (34) R ₁ = 3,4-OMe-fenil, R ₂ = 2,4,5-OMe |
| (12) R ₁ = 2,4,5-OMe-fenil, R ₂ = 2-COOH | (35) R ₁ = 4-NO ₂ -fenil, R ₂ = 2,4,5-OMe |
| (13) R ₁ = 2,4,5-OMe-fenil, R ₂ = 3-OCH ₃ | (36) R ₁ = 3-NO ₂ -fenil, R ₂ = 2,4,5-OMe |
| (14) R ₁ = 2,4,5-OMe-fenil, R ₂ = 3-NO ₂ | (37) R ₁ = 2,5-OMe-fenil, R ₂ = 2,4,5-OMe |
| (15) R ₁ = 2,4,5-OMe-fenil, R ₂ = 3-Cl | (38) R ₁ = 3-OMe, 4-OH-fenil, R ₂ = 2,4,5-OMe |
| (16) R ₁ = 2,4,5-OMe-fenil, R ₂ = 4-Br | (39) R ₁ = 2-OH-fenil, R ₂ = 2,4,5-OMe |
| (17) R ₁ = 2,4,5-OMe-fenil, R ₂ = 4-O(CH ₂) ₃ CH ₃ | (40) R ₁ = 1[4-(1H-imidazol-1-il)-fenil], R ₂ = 2,4,5-OMe |
| (18) R ₁ = 2,4,5-OMe-fenil, R ₂ = 3,4,5-OMe | (41) R ₁ = 1(furan-2-il), R ₂ = 2,4,5-OMe |
| (19) R ₁ = 2,4,5-OMe-fenil, R ₂ = 2-F | (42) R ₁ = 1(naftalen-2-il), R ₂ = 2,4,5-OMe |
| (20) R ₁ = 2,4,5-OMe-fenil, R ₂ = 2-Cl | (43) R ₁ = 4-Me-fenil, R ₂ = 2,4,5-OMe |
| (21) R ₁ = 2,4,5-OMe-fenil, R ₂ = 2-OH | (44) R ₁ = 4-F-fenil, R ₂ = 2,4,5-OMe |
| (22) R ₁ = 2,4,5-OMe-fenil, R ₂ = 4-COOH | (45) R ₁ = 3-CN-fenil, R ₂ = 2,4,5-OMe |
| (23) R ₁ = 2,4,5-OMe-fenil, R ₂ = 3,4-OMe | (46) R ₁ = 3-OMe-fenil, R ₂ = 2,4,5-OMe |

Esquema 5: Rota de síntese utilizada para a obtenção das chalconas derivadas da 2,4,5-trimetoxiacetofenona (**1-29**) e do 2',4',5'-trimetoxibenzaldeído (**30-46**) (a). Condições reacionais: *i.* 50% KOH p/v, MeOH, 24 h, temperature ambiente; *ii.* 10% HCl.

4.2 CULTURA CELULAR

Foram utilizadas as células de linhagem de leucemia mieloide aguda K562 e de leucemia linfóide aguda Jurkat, ambas de origem humana. As células foram mantidas em garrafas plásticas para cultura celular contendo meio de cultura RPMI 1640, suplementado com 10% de soro fetal, 100 U/mL de penicilina, 100 µg/mL de estreptomicina, 10 mM de tampão Hepes, pH 7,4, em estufa úmida a 37°C, com 5% CO₂. As células foram semeadas a uma densidade de $2,5 \times 10^4$ células/mL e repicadas a cada 48 ou 72 h, em fluxo laminar.

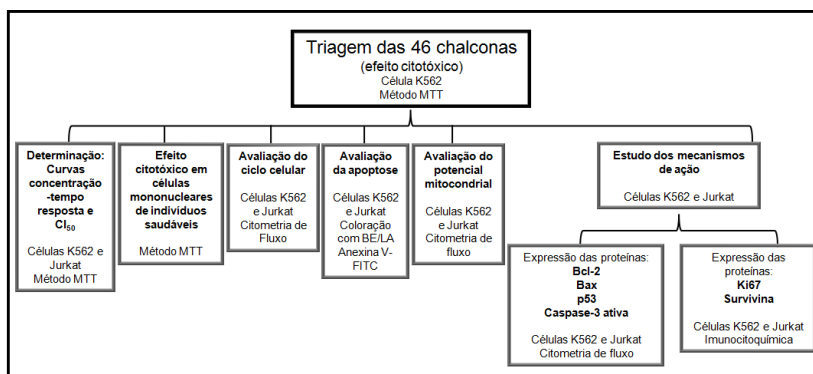
Para a realização dos experimentos, a suspensão celular foi centrifugada a 200 x g, por 10 minutos, em temperatura ambiente. O sobrenadante foi descartado e o sedimento celular ressuspenso em 1,0 mL de meio de cultura RPMI 1640. O número de células viáveis foi avaliado pelo método de exclusão do corante Azul de Trypan (0,5%) e as amostras com viabilidade celular inferior a 90% foram excluídas. A quantidade de células viáveis adicionadas às placas de cultura variou conforme protocolo experimental, mantendo a relação de $2,5 \times 10^5$ células/mL para as células K562 e de $5,0 \times 10^5$ células/mL para as células Jurkat, para o tempo de tratamento de 24 h. Para o tratamento por 48 e 72 h, foram utilizadas $1,25 \times 10^5$ células/mL e $0,62 \times 10^5$ células/mL respectivamente para as células K562, e $2,5 \times 10^5$ células/mL e $1,25 \times 10^5$ células/mL respectivamente para as células Jurkat. Todos os procedimentos de preparação das amostras foram realizados em fluxo laminar e todo material utilizado foi previamente esterilizado.

4.3 TRATAMENTO DAS CÉLULAS K562 E JURKAT COM AS CHALCONAS

As chalconas sintéticas, derivadas da 2,4,5-trimetoxiacetofenona e do 2',4',5'-trimetoxibenzaldeído, foram dissolvidas em DMSO na concentração de 10 mM e armazenadas a 4°C. Para a utilização nos experimentos, foram utilizadas soluções preparadas a partir dessa solução estoque e diluídas em meio de cultura. Nos ensaios, a concentração das chalconas utilizadas variou de 1 a 100 µM, não ultrapassando a concentração de 2% (v/v) para o DMSO.

O tratamento foi realizado pela adição das chalconas sintéticas às células K562 e Jurkat, em um volume máximo de 10% do volume da suspensão celular adicionada ao poço da placa de cultura. As células

foram mantidas em estufa nas condições descritas acima, por períodos que variaram conforme o protocolo experimental. Foram utilizados dois controles, um de células sem tratamento, e outro acrescido de 2% do solvente (DMSO) ao meio de cultura. O delineamento experimental deste estudo está representado do Esquema 6.



Esquema 6: Delineamento experimental.

4.4 DETERMINAÇÃO DAS CURVAS DE CONCENTRAÇÃO E TEMPO-RESPOSTA PARA VIABILIDADE CELULAR

Inicialmente realizou-se uma triagem para avaliar o efeito citotóxico de 46 chalconas sintéticas derivadas da 2,4,5-trimetoxiacetofenona e do 2',4',5'-trimetoxibenzaldeído, na concentração de 100 μM , sobre as células humanas de leucemia mieloide aguda K562. Os compostos que demonstraram maior redução na viabilidade celular das células K562 foram selecionados para a determinação da curva concentração e tempo-resposta. Para isso, as células K562 e Jurkat foram adicionadas a poços de 200 μL de placa de cultura, respeitando a concentração celular descrita no item 4.2, e foram incubadas com as chalconas selecionadas, em concentrações crescentes (1, 10, 25, 50 e 100 μM), em estufa úmida a 37°C com 5% de CO_2 . Após 24, 48 e 72 h de incubação, a viabilidade celular foi avaliada pelo método do MTT. A CI_{50} foi obtida a partir de uma curva concentração-resposta em 24, 48 e 72 h, utilizando-se o *software* GraphPad Prism 5.

Além disso, como controle positivo, foi determinada a CI_{50} do Taxol nas células K562 e Jurkat, nos tempos de incubação de 24, 48 e 72 h.

4.5 OBTENÇÃO DAS CÉLULAS MONONUCLEARES DE INDIVÍDUOS SAUDÁVEIS

As amostras de sangue periférico de seis indivíduos saudáveis foram colhidas com anticoagulante EDTA por punção venosa e processadas em até 30 minutos após a coleta. As amostras foram diluídas em PBS numa proporção de 1 mL de amostra para 0,5 mL de PBS. Após diluição, cada amostra foi colocada sobre 4 mL de Ficoll-Hypaque e centrifugada a $300 \times g$ por 30 minutos. A interfase contendo as células mononucleadas foi transferida para um tubo cônico de 15 mL, ressuspensas em 10 mL de tampão PBS e centrifugada a $200 \times g$ por 10 minutos. Após a centrifugação, o sobrenadante foi descartado e as células foram novamente lavadas com PBS e centrifugadas. Ao fim da última lavagem, as células foram ressuspensas em 1 mL de meio RPMI 1640 e o número de células viáveis foi avaliado pelo método de exclusão do corante Azul de Trypan (0,5%). A cada poço da placa de cultura celular foram adicionadas $8,0 \times 10^5$ células/ 200 μ L de meio. Em seguida, as células foram incubadas com as chalconas citotóxicas, selecionadas na triagem, nas suas CI_{50} de 24 h. Após 24 h de incubação a 37°C em 5% de CO_2 , a viabilidade celular foi avaliada pelo método do MTT.

4.6 VIABILIDADE CELULAR (MÉTODO DO MTT)

O efeito citotóxico das chalconas sobre as células de linhagem leucêmica K562 e Jurkat e sobre as células mononucleares de sangue periférico de indivíduos saudáveis foi avaliado pelo método do MTT. Esse método consiste em um ensaio colorimétrico que se baseia na redução do MTT ao seu derivado formazan de cor azulada pelo metabolismo mitocondrial (VAN DE LOOSDRECHT et al., 1991). Dessa maneira, o ensaio funciona como um indicador da função mitocondrial e, por conseguinte, da viabilidade celular. Após o tempo de incubação de cada experimento, as placas foram centrifugadas, o sobrenadante removido e adicionado o meio de cultura contendo 10% (v/v) de uma solução de MTT (5 mg/ml em PBS). Após 3 h de incubação a 37°C , as placas foram novamente centrifugadas e o

sobrenadante removido. Os precipitados formados em cada poço foram dissolvidos em 100 μ L de solução de álcool isopropílico/HCL 0,04 N e as placas foram submetidas a nova centrifugação para a remoção dos restos celulares. O sobrenadante límpido (85 μ L) foi transferido para outra placa, onde foi realizada a leitura das absorbâncias em espectrofotômetro Microwell Systems (Organon Teknika, Belgium) no comprimento de onda 540 nm. A densidade óptica do grupo controle (células sem tratamento) foi considerada como 100% de células viáveis.

4.7 AVALIAÇÃO DA APOPTOSE

Para avaliar a indução de morte celular por apoptose causada pelas chalconas, foram utilizados os seguintes métodos: microscopia de fluorescência com brometo de etídio e laranja de acridina e anexina V-FITC.

4.7.1 Avaliação da apoptose por microscopia de fluorescência com brometo de etídio e laranja de acridina

Para a avaliação das células apoptóticas por microscopia de fluorescência, foram utilizados os corantes fluorescentes laranja de acridina e brometo de etídio. O laranja de acridina é permeável à membrana intacta e confere fluorescência verde às células quando observadas ao microscópio de fluorescência; enquanto que o brometo de etídio é permeável à membrana somente quando a integridade da mesma está alterada, conferindo fluorescência vermelha ao núcleo das células. A fluorescência do brometo de etídio predomina sobre a fluorescência do laranja de acridina; assim, as células viáveis apresentam fluorescência verde, células em apoptose inicial apresentam núcleo com fluorescência verde e cromatina condensada ou fragmentada, células em apoptose tardia apresentam núcleo com fluorescência laranja e cromatina condensada ou fragmentada e células necróticas apresentam fluorescência laranja uniforme (RENVOIZÉ et al., 1998).

As células K562 ($1,0 \times 10^6$ células/ 4 mL) e Jurkat ($1,0 \times 10^6$ células/ 2 mL) foram tratadas com as chalconas nas suas CI_{50} de 24 h em placas de cultura celular. Após 24 h, as células foram lavadas com PBS, o sobrenadante foi removido e o sedimento celular foi ressuspendido com 40 μ L de uma solução constituída de brometo de etídio (5 μ g/mL) e laranja de acridina (10 μ g/mL) na proporção 1:1.

Após incubação por 10 minutos à temperatura ambiente, 25 μL da suspensão celular foi transferida para uma lâmina de vidro e recoberta com lamínula. As lâminas foram observadas em microscópio de fluorescência (Olympus BX-FLA), usando objetiva de 40x. Campos representativos foram fotografados com câmera fotográfica (Olympus BX40, Japan).

4.7.2 Avaliação da apoptose pelo método anexina V-FITC

Durante o estágio inicial da apoptose ocorre a perda da assimetria da membrana citoplasmática, com a consequente externalização dos resíduos de fosfatidilserina. A anexina V possui a propriedade de ligar-se especificamente aos resíduos de fosfatidilserina e quando conjugada ao FITC, permite identificar e quantificar as células que expõem esses resíduos por citometria de fluxo (ENGELAND et al., 1998).

Para a quantificação dos resíduos de fosfatidilserina, após o tratamento das células K562 e Jurkat com as chalconas nas suas CI_{50} de 24 h, utilizou-se o *Annexin V-FITC Apoptosis Detection kit*. Os procedimentos foram realizados de acordo com as instruções do fabricante. As células K562 ($1,0 \times 10^6$ células/ 4 mL) e Jurkat ($1,0 \times 10^6$ células/ 2 mL) foram tratadas com as chalconas e incubadas durante 16 h em estufa úmida a 37°C com 5% de CO_2 . Após esse período, as células foram lavadas duas vezes com tampão PBS e submetidas à centrifugação a $200 \times g$, por 10 minutos. O sobrenadante foi removido e ao sedimento celular, foram adicionados 100 μL de tampão de anexina na diluição 1:10. Em seguida, foram acrescentados 5 μL de anexina V-FITC em cada tubo contendo a suspensão celular. Depois, a suspensão de células com anexina V-FITC foi mantida ao abrigo da luz durante 15 minutos em temperatura ambiente. Transcorrido o tempo, foram adicionados 400 μL do tampão de anexina (1:10) para posterior análise. O controle negativo dos experimentos foi preparado com as células sem tratamento, a fim de definir uma quantificação basal de marcação com anexina V-FITC. As análises foram realizadas no citômetro de fluxo BD FACSCanto™ (Becton Dickinson Immunocytometry Systems) e avaliadas pelos *software WinMID versão 2.8 e Infinicyt versão 1.3*.

4.8 AVALIAÇÃO DO CICLO CELULAR

Para avaliar os efeitos das chalconas nas fases do ciclo celular foi utilizado o *PI/RNASE Solution kit* cujo princípio consiste na coloração dos ácidos nucleicos pelo PI, após a digestão do RNA. O PI, dependendo da fase do ciclo celular, emite diferentes intensidades de fluorescência que, por sua vez, são captadas pelos detectores fotomultiplicadores do citômetro de fluxo, por variações no seu conteúdo de DNA, e, dessa forma, quantifica a porcentagem de células em cada fase do ciclo celular (GONG et al., 1994).

Os procedimentos foram realizados de acordo com as instruções do fabricante. As células K562 ($1,0 \times 10^6$ células/ 4 mL) e Jurkat ($1,0 \times 10^6$ células/ 2 mL) foram tratadas com as chalconas nas suas CI_{50} de 24 h, e incubadas durante 24 h em estufa úmida a 37°C com 5% de CO₂. Após esse período, as células foram lavadas duas vezes com PBS, submetidas à centrifugação a 200 x g por 10 minutos e o sobrenadante foi descartado. Em seguida, as células foram fixadas com 200 µL de etanol 70% e incubadas durante 30 minutos a -4°C. Após esse período, as células foram lavadas duas vezes em PBS contendo 2% de albumina bovina e centrifugadas a 200 x g durante 10 minutos. Então, adicionou-se ao sedimento celular 500 µL de solução de PI contendo RNase e as células foram mantidas ao abrigo da luz durante 15 minutos em temperatura ambiente. As análises foram realizadas no citômetro de fluxo BD FACSCanto™ (Becton Dickinson Immunocytometry Systems) e avaliadas pelo *software* WinMID versão 2.8. O controle negativo foi preparado com células sem tratamento para caracterização dos parâmetros a serem analisados no citômetro de fluxo.

4.9 AVALIAÇÃO DO POTENCIAL MITOCONDRIAL

Para avaliar os efeitos da chalconas no potencial mitocondrial das células K562 e Jurkat foi utilizado o *kit* MitoView 633. Segundo o fabricante, o MitoView 633 é um corante fluorescente mitocondrial de coloração vermelha que se difunde através da membrana plasmática e se acumula na mitocôndria em concentrações nanomolares. As mitocôndrias com atividade fisiológica do potencial mitocondrial são coradas com o MitoView 633 e fluorescem após o acúmulo do corante no ambiente de lipídios das mitocôndrias. Quando há uma diminuição no potencial mitocondrial, as mitocôndrias perdem essa fluorescência.

Os procedimentos foram realizados de acordo com as instruções do fabricante. As células K562 ($1,0 \times 10^6$ células/ 4 mL) e Jurkat ($1,0 \times 10^6$ células/ 2 mL) foram tratadas com as chalconas nas suas CI_{50} de 24 h, e incubadas durante 12 h em estufa úmida a 37°C com 5% de CO_2 . Após esse período, as células foram lavadas duas vezes com PBS, submetidas à centrifugação a $200 \times g$ por 10 minutos e o sobrenadante foi descartado. Em seguida foram adicionados sobre o sedimento celular 100 μL da solução de MitoView 633 diluído 1:10.000. As células foram incubadas por 30 minutos a temperatura ambiente no escuro. Após esse período, as células foram centrifugadas a $200 \times g$ por 10 minutos, o sobrenadante foi descartado e o sedimento foi ressuspensionado em 1 mL de PBS. As análises foram realizadas no citômetro de fluxo BD FACSCanto™ (Becton Dickinson Immunocytometry Systems) e avaliadas pelo *software Infinicyt* versão 1.3.

4.10 AVALIAÇÃO DA EXPRESSÃO DAS PROTEÍNAS BAX, BCL-2, P53 E CASPASE-3 ATIVA POR CITOMETRIA DE FLUXO

As células K562 ($1,0 \times 10^6$ células/ 4 mL) e Jurkat ($1,0 \times 10^6$ células/ 2 mL) foram tratadas com as chalconas nas suas CI_{50} de 24 h, e incubadas durante 3, 6, 9 e 12 h em estufa úmida a 37°C com 5% de CO_2 . Para a fixação e permeabilização das células foi utilizado o *kit BD Cytofix/Cytoperm*. Após os períodos de incubação, as células foram lavadas duas vezes com PBS, submetidas à centrifugação a $200 \times g$ por 10 minutos e o sobrenadante foi descartado. Ao sedimento celular foram adicionados 200 μL do reagente *BD Fix/Perm* e as amostras foram incubadas a 8°C por 20 minutos. Em seguida, as amostras foram submetidas à centrifugação a $200 \times g$ por 10 minutos, o sobrenadante descartado e o sedimento celular foi ressuspensionado com 100 μL de tampão de lavagem *Fix/Perm*. Foram adicionados então, 3 μL do anticorpo monoclonal anti-Bcl-2 conjugado ao FITC, 5 μL do anticorpo monoclonal anti-Bax conjugado ao PerCP, 5 μL do anticorpo monoclonal anti-p53 conjugado ao PE e 3 μL do anticorpo monoclonal anti-caspase-3 ativa conjugado ao Pacific Blue, e as amostras foram incubadas a 8°C por 15 minutos no escuro. Após a incubação, foram adicionados 500 μL do tampão de lavagem e as amostras foram centrifugadas a $200 \times g$ por 10 minutos. Adicionou-se 1 mL de PBS ao sedimento celular para a posterior análise no citômetro de fluxo BD FACSCanto™ (Becton Dickinson Immunocytometry Systems). A avaliação dos resultados foi realizada pelo *software Infinicyt* versão 1.3.

O controle negativo foi preparado com células sem tratamento com as chalconas.

4.11 AVALIAÇÃO DA EXPRESSÃO DAS PROTEÍNAS SURVIVINA E KI67 POR IMUNOCITOQUÍMICA

A expressão das proteínas survivina e Ki67 foi avaliada pela técnica de imunocitoquímica, utilizando o método estreptoavidina-biotina-peroxidase (*labelled streptavidin biotin* - LSAB). As células K562 ($5,0 \times 10^4$ células/ 200 μ L) e Jurkat ($1,0 \times 10^5$ células/ 200 μ L) foram tratadas com as chalconas nas suas CI_{50} de 24 h, e incubadas durante 24 h em estufa úmida a 37°C com 5% de CO_2 . Após o período de incubação, as células foram centrifugadas em citocentrífuga (CYTOPROTM – Wescor) em lâminas pré-tratadas com solução de silano a 5% em acetona PA. Em seguida, as células foram fixadas em etanol 95% por 1 hora a temperatura ambiente. Após a fixação, as lâminas foram lavadas duas vezes com PBS por 5 minutos e realizou-se o bloqueio da peroxidase endógena, para evitar reações inespecíficas falso-positivas, com solução de peróxido de hidrogênio a 3% em metanol absoluto por 20 minutos. Posteriormente, as lâminas foram lavadas duas vezes com PBS por 5 minutos, e submetidas à permeabilização celular com solução de Triton X-100-PBS 0,2%. O anticorpo monoclonal antiturvivina, diluído a 1:50, e o anticorpo monoclonal anti-Ki67, diluído a 1:100 foram adicionados sobre as células nas lâminas, e as mesmas foram mantidas em câmara úmida a 8°C por 12 h. Após esse período, as lâminas foram lavadas duas vezes com tampão PBS e incubadas com anticorpo secundário biotinizado do *kit LSAB + System-HRP* por 30 minutos. Logo após esta etapa, as lâminas foram novamente lavadas com PBS e incubadas com estreptoavidina conjugada à peroxidase do *kit LSAB + System-HRP* por 40 minutos. Posteriormente às duas lavagens com PBS, as amostras foram submetidas à revelação colorimétrica com uma solução cromógena DAB, conforme recomendação do fabricante. Após a revelação, foi realizada a contracoloração das lâminas com solução de hematoxilina de Harris, desidratação através de passagem das lâminas em concentrações crescentes de etanol, diafanização em xilol e montagem em meio de montagem sintético. Utilizaram-se, como controles positivos, tecidos sabidamente positivos para os antígenos pesquisados (carcinoma de mama para a proteína survivina e linfonodo para a proteína Ki67), e o controle negativo foi realizado pela abolição

do anticorpo primário nas reações. O resultado positivo foi revelado pelo aparecimento de coloração castanha no local da marcação pelo anticorpo. A leitura das lâminas foi realizada em microscópio ótico NIKON ECLIPSE 50i, em aumento de 400X e as fotografias foram realizadas no microscópio citado, com a câmera NIKON DIGITAL SIGHT DS-5M e o programa NIS ELEMENTS F, VERSION 2.10.

4.12 ANÁLISE ESTATÍSTICA

Os resultados obtidos foram expressos como a média \pm erro padrão da média (EPM). Cada experimento foi repetido pelo menos três vezes. A análise estatística foi realizada utilizando-se a análise de variância de uma e duas vias (ANOVA), seguida pelo pós-teste “t” de Bonferroni. Um valor de $p < 0,05$ foi considerado estatisticamente significativo.

5. RESULTADOS

5.1 EFEITO CITOTÓXICO DAS CHALCONAS SINTÉTICAS DERIVADAS DA 2,4,5-TRIMETOXIACETOFENONA E DO 2',4',5'-TRIMETOXIBENZALDEÍDO EM CÉLULAS DE LEUCEMIA MIELOIDE AGUDA K562 E EM CÉLULAS DE LEUCEMIA LINFOIDE AGUDA JURKAT

A incubação das células de leucemia mieloide aguda K562 com 100 μM de chalconas derivadas da 2,4,5-trimetoxiacetofenona (chalconas 1 a 29) e do 2',4',5'-trimetoxibenzaldeído (chalconas 30 a 46) por 24 h causou redução significativa da viabilidade celular, quando comparados ao grupo controle (células sem tratamento com as chalconas), ao qual foi atribuída a viabilidade celular de 100%. Dentre as 46 chalconas testadas, apenas as chalconas 1, 27, 39 e 45 não apresentaram redução da viabilidade celular estatisticamente significativa (Figura 1, Painéis A e B). As chalconas que causaram maior citotoxicidade foram as chalconas 13, 16, 19 e 26 com viabilidade celular de $28,46 \pm 0,73 \%$, $28,78 \pm 2,12 \%$, $36,48 \pm 4,79 \%$ e $25,33 \pm 1,72 \%$, respectivamente. O grupo controle com 2% de DMSO não apresentou nenhuma alteração estatisticamente significativa na viabilidade celular, quando comparado ao grupo de células sem tratamento.

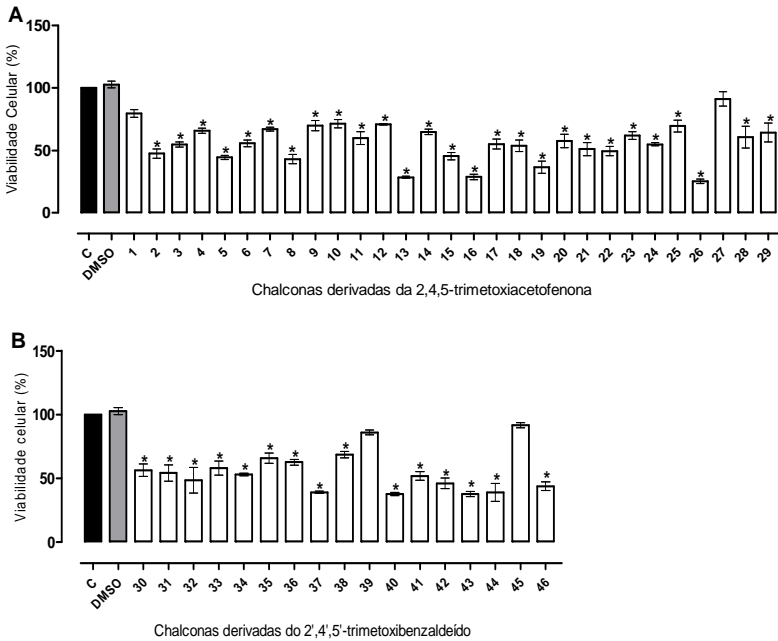


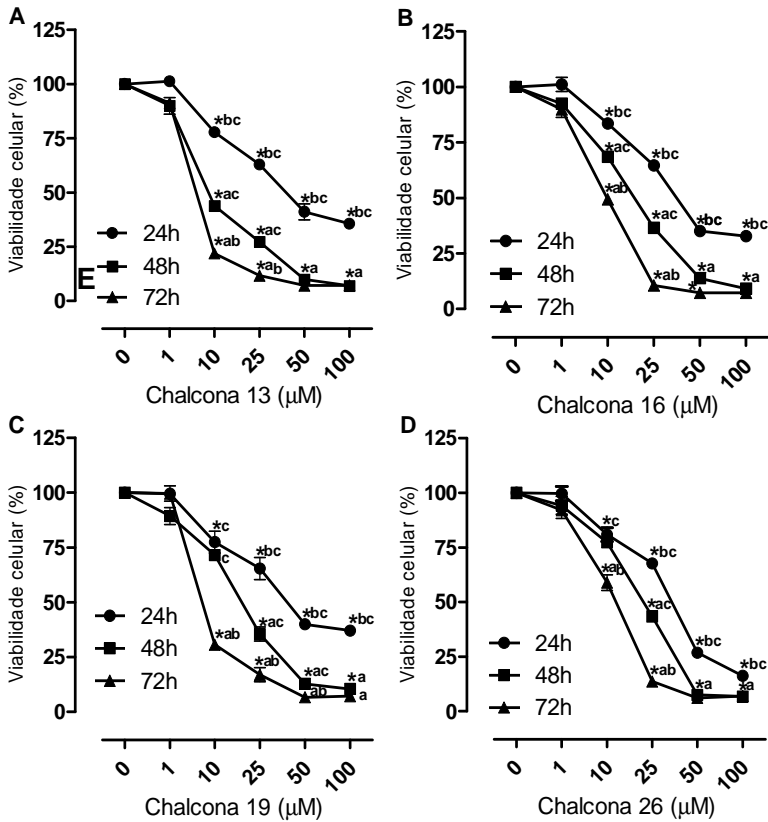
Figura 1: Efeito citotóxico das chalconas sintéticas derivadas da 2,4,5-trimetoxiacetofenona (Painel A) e do 2',4',5'-trimetoxibenzaldeído (Painel B) em células de leucemia mieloide aguda K562. As chalconas (1 a 46) foram adicionadas às células K562 ($2,5 \times 10^5$ células/mL) na concentração de $100 \mu\text{M}$ e incubadas por 24 h. O grupo controle do veículo no qual as chalconas foram diluídas foi realizado pela avaliação da viabilidade das células incubadas com 2% de DMSO. A viabilidade celular foi avaliada pelo método do MTT. A densidade óptica do grupo controle (C), sem tratamento, corresponde a 100% da viabilidade celular. Cada ponto representa a média \pm EPM de seis experimentos independentes. *Diferença estatisticamente significativa em relação ao grupo controle, $p < 0,05$, ANOVA seguida de pós-teste t de Bonferroni.

Posteriormente, foi avaliado o efeito citotóxico das chalconas 13, 16, 19 e 26 em diferentes concentrações (1, 10, 25, 50 e $100 \mu\text{M}$) e tempos de incubação (24, 48 e 72 h) sobre as células K562 e Jurkat. Como pode ser observado abaixo, as chalconas causaram diminuição na viabilidade celular de maneira dependente da concentração e do tempo

de incubação nas células de LMA K562 (Figura 2) e de LLA Jurkat (Figura 3). Os compostos testados causaram citotoxicidade estatisticamente significativa a partir da concentração de 10 μM ; com exceção da chalcona 16 na célula Jurkat (Figura 3, Painel B), que no período de incubação de 24 h apresentou redução estatisticamente significativa na viabilidade celular somente a partir da concentração de 25 μM , e da chalcona 26 na célula Jurkat (Figura 3, Painel D), que apresentou redução estatisticamente significativa na viabilidade celular a partir da concentração de 25 μM nos tempos de incubação de 24 e 48 h.

Para comparar o efeito citotóxico das chalconas sobre as células leucêmicas foram calculadas as CI_{50} das chalconas 13, 16, 19 e 26 nos diferentes tempos de incubação para as células K562 (Figura 2, Painel E) e para as células Jurkat (Figura 3, Painel E), e foi observado que os valores de CI_{50} diminuem conforme o aumento do tempo de incubação. As CI_{50} de 24 h, nas células K562, das chalconas 13, 16, 19 e 26 foram de $41,48 \pm 0,70 \mu\text{M}$, $39,79 \pm 0,77 \mu\text{M}$, $42,76 \pm 0,99 \mu\text{M}$ e $31,07 \pm 0,90 \mu\text{M}$ respectivamente, e nas células Jurkat de $31,68 \pm 0,88 \mu\text{M}$, $40,61 \pm 1,12 \mu\text{M}$, $37,56 \pm 1,20 \mu\text{M}$ e $33,74 \pm 1,35 \mu\text{M}$ respectivamente. No tempo de incubação de 72 h, os valores de CI_{50} das chalconas 13, 16, 19 e 26 foram de $4,10 \pm 0,28 \mu\text{M}$, $6,87 \pm 0,35 \mu\text{M}$, $5,99 \pm 0,42 \mu\text{M}$ e $8,56 \pm 0,48 \mu\text{M}$ respectivamente e nas células Jurkat de $4,95 \pm 0,43 \mu\text{M}$, $5,42 \pm 0,48 \mu\text{M}$, $5,18 \pm 0,36 \mu\text{M}$ e $7,48 \pm 0,44 \mu\text{M}$, respectivamente. O grupo tratado com Taxol apresentou valor de CI_{50} menor, quando comparado aos grupos tratados com as chalconas, em ambas as linhagens celulares e nos três tempos de incubação.

Um grupo controle com 2% de DMSO, veículo no qual as chalconas foram diluídas, foi realizado em todos os experimentos de viabilidade celular e nenhum efeito estatisticamente significativo foi observado nos valores de viabilidade celular.



E

Chalcona	Anel B	CI ₅₀ (24h)	CI ₅₀ (48h)	CI ₅₀ (72h)
13	3-OCH ₃	41,48 μM ± 0,70	8,01 μM ± 0,22	4,10 μM ± 0,28
16	4-Br	39,79 μM ± 0,77	14,72 μM ± 0,41	6,87 μM ± 0,35
19	2-F	42,76 μM ± 0,99	14,97 μM ± 0,52	5,99 μM ± 0,42
26	4-CF ₃	31,07 μM ± 0,90	16,73 μM ± 0,74	8,56 μM ± 0,48
Taxol	--	8,02 μM ± 0,83	1,67 μM ± 0,28	1,46 μM ± 1,01

Figura 2: Efeito citotóxico das chalconas 13, 16, 19 e 26 em células de leucemia mieloide aguda K562. As chalconas 13 (Painel A), 16 (Painel B), 19 (Painel C) e 26 (Painel D) foram adicionadas às células K562 nas concentrações de 1, 10, 25, 50 e 100 μM e incubadas por 24, 48 e 72 h. A viabilidade celular foi avaliada pelo método do MTT. A densidade óptica do grupo controle (C), células sem tratamento, corresponde a 100% da viabilidade celular. Os valores

das CI_{50} em 24, 48 e 72 h foram calculados para as chalconas 13, 16, 19, 26 e para o Taxol (Painel E). Cada ponto representa a média \pm EPM de seis experimentos independentes. *Diferença estatisticamente significativa em relação ao grupo controle e diferença estatisticamente significativa em relação ao tempo de incubação de 24^a, 48^b e 72^c h, $p < 0,05$, ANOVA seguida de pós-teste t de Bonferroni.

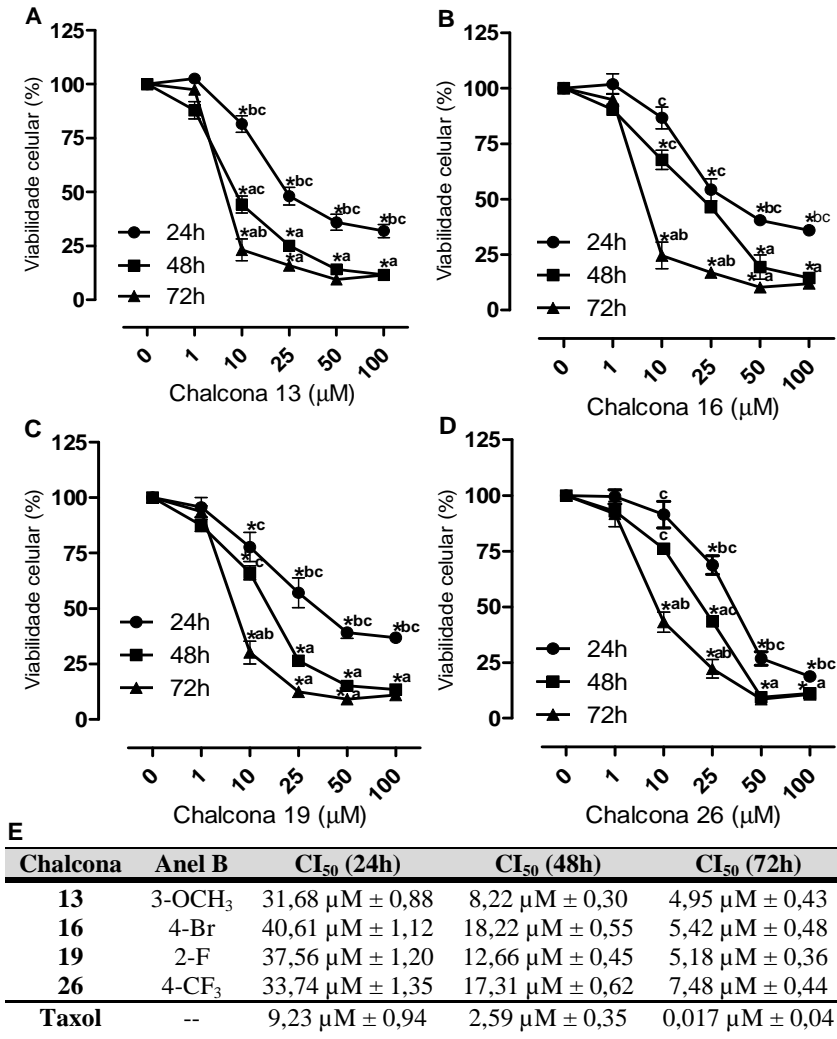


Figura 3: Efeito citotóxico das chalconas 13, 16, 19 e 26 em células de leucemia linfóide aguda Jurkat. As chalconas 13 (Painel A), 16 (Painel B), 19 (Painel C) e 26 (Painel D) foram adicionadas às células Jurkat nas concentrações de 1, 10, 25, 50 e 100 μM e incubadas por 24, 48 e 72 h. A viabilidade celular foi avaliada pelo método do MTT. A densidade óptica do grupo controle (C), células sem tratamento, corresponde a 100% da viabilidade

celular. Os valores das CI_{50} em 24, 48 e 72 h foram calculados para as chalconas 13, 16, 19, 26 e para o Taxol (Painel E). Cada ponto representa a média \pm EPM de seis experimentos independentes. *Diferença estatisticamente significativa em relação ao grupo controle e diferença estatisticamente significativa em relação ao tempo de incubação de 24^a, 48^b e 72^c h, $p < 0,05$, ANOVA seguida de pós-teste t de Bonferroni.

5.2 EFEITO CITOTÓXICO DAS CHALCONAS 13, 16, 19 E 26 EM CÉLULAS MONONUCLEARES DE INDIVÍDUOS SAUDÁVEIS

O efeito citotóxico das chalconas 13, 16, 19 e 26 em suas respectivas CI_{50} de 24 h foi avaliado sobre células mononucleares isoladas do sangue periférico de seis indivíduos saudáveis após 24 h de incubação. Como pode ser visto na Figura 4, as chalconas 13, 16, 19 e 26 não causaram nenhuma alteração estatisticamente significativa na viabilidade celular dos mononucleares em relação ao controle de células sem tratamento. Nesse grupo de experimentos, também se realizou um controle positivo com Taxol (30 μ M), o qual apresentou redução estatisticamente significativa na viabilidade celular em relação ao grupo controle; e um controle com DMSO, veículo no qual foram diluídas as chalconas, que não apresentou alteração estatisticamente significativa na viabilidade celular.

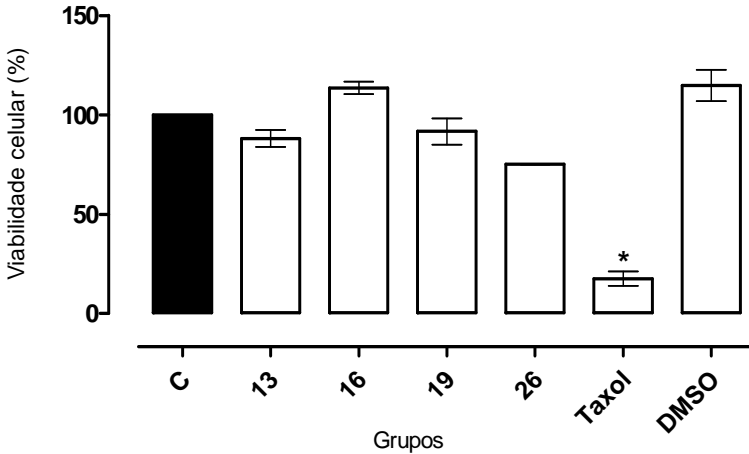


Figura 4: Efeito citotóxico das chalconas 13, 16, 19 e 26 em células mononucleares de indivíduos saudáveis. As chalconas 13, 16, 19 e 26 foram adicionadas às células mononucleares de indivíduos saudáveis ($2,5 \times 10^6$ células/mL) nas suas respectivas CI_{50} de 24 h e incubadas por 24 h. A viabilidade celular foi avaliada pelo método do MTT. A densidade óptica do grupo controle (C), células sem tratamento, corresponde a 100% da viabilidade celular. Foram utilizados dois controles: um grupo tratado com Taxol na concentração de $30 \mu\text{M}$ e um grupo tratado com 2% de DMSO, veículo no qual foram diluídas as chalconas. Cada ponto representa a média \pm EPM. *Diferença estatisticamente significativa em relação ao grupo controle, $p < 0,05$, ANOVA seguida de pós-teste t de Bonferroni.

5.3 EFEITO DAS CHALCONAS 13, 16, 19 E 26 SOBRE AS FASES DO CICLO CELULAR NAS CÉLULAS DE LEUCEMIA MIELOIDE AGUDA K562 E EM CÉLULAS DE LEUCEMIA LINFOIDE AGUDA JURKAT

O efeito das chalconas 13, 16, 19 e 26 (nas suas respectivas CI_{50} de 24 h) na progressão do ciclo celular das células K562 e Jurkat foi avaliado após 24 h de incubação, pela determinação do conteúdo de DNA por citometria de fluxo. A população celular foi dividida nas fases G0/G1, S e G2/M do ciclo celular e ainda em uma fase denominada Sub G0/G1 que representa as células em processo de morte celular. Os histogramas representativos de um experimento para avaliação do ciclo celular das células K562 e Jurkat encontram-se nos Apêndices A e B respectivamente.

Em comparação com o grupo controle (células sem tratamento com as chalconas), as células K562 tratadas com as chalconas 13 e 26 apresentaram um aumento estatisticamente significativo na proporção de células na fase Sub G0/G1; e, embora os compostos 16 e 19 também tenham aumentado a proporção de células nessa fase, esse efeito não foi estatisticamente significativo. Esses quatro compostos causaram um aumento na proporção de células nas fases S e G2/M, entretanto, sem significância estatística, e ainda uma diminuição na fase G0/G1 que foi estatisticamente significativa apenas para a chalcona 26 (Figura 5 e Tabela 1).

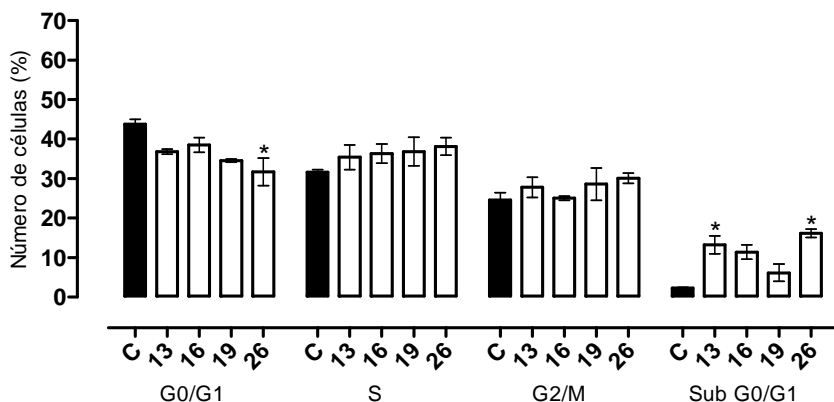


Figura 5: Efeitos das chalconas 13, 16, 19 e 26 no ciclo celular das células de leucemia mieloide aguda K562. As células K562 foram incubadas por 24 h na ausência, grupo controle (C), e na presença das chalconas 13, 16, 19 e 26, nas suas respectivas CI_{50} de 24 h. As fases G0/G1, S, G2/M e Sub G0/G1 foram determinadas pela análise do conteúdo de DNA no citômetro de fluxo BD FACSCanto™ (Becton Dickinson Immunocytometry Systems) e avaliadas pelo *software* WinMID versão 2.8. Cada ponto representa a média \pm EPM de três experimentos independentes. *Diferença estatisticamente significativa em relação ao grupo controle, $p < 0,05$. ANOVA seguida de pós-teste t de Bonferroni.

Tabela 1. Efeitos das chalconas 13, 16, 19 e 26 no ciclo celular das células de leucemia mieloide aguda K562. As chalconas 13, 16, 19 e 26 foram adicionadas às células K562 nas suas respectivas CI_{50} e incubadas por 24 h. A porcentagem de células em cada fase do ciclo celular foi determinada pela avaliação do conteúdo de DNA no citômetro de fluxo BD FACSCanto™ (Becton Dickinson Immunocytometry Systems) e analisada pelo *software* WinMID versão 2.8.

Grupos	G0/G1 (%) ^a	S (%) ^a	G2/M (%) ^a	Apoptose Sub G0/G1 (%) ^a
Controle	43,80 ± 1,24	31,58 ± 0,64	24,62 ± 1,88	2,30 ± 0,16
13	36,78 ± 0,62	35,40 ± 3,16	27,81 ± 2,54	13,28 ± 2,27*
16	38,56 ± 1,88	36,36 ± 2,40	25,08 ± 0,52	11,40 ± 1,86
19	34,54 ± 0,44	36,84 ± 3,64	28,62 ± 4,08	6,14 ± 2,16
26	31,71 ± 3,49*	38,16 ± 2,22	30,12 ± 1,28	16,12 ± 1,08*

^a Resultados representativos de três experimentos independentes: média (% ± EPM) em cada fase do ciclo celular. *Diferença estatisticamente significativa em relação ao grupo controle, $p < 0,05$. ANOVA seguida de pós-teste t de Bonferroni.

Em relação ao ciclo celular das células Jurkat, pode-se observar na Figura 6 e Tabela 2 que as chalconas 13, 16, 19 e 26 apresentaram um aumento estatisticamente significativo na proporção de células na fase Sub G0/G1, quando comparadas ao grupo controle (células sem tratamento com as chalconas). Além disso, as chalconas 13, 19 e 26 apresentaram aumento estatisticamente significativo na proporção de células na fase S e as chalconas 13 e 19, diminuição na proporção de células na fase G2/M. Apesar de as chalconas 16 e 26 também terem reduzido a proporção de células na fase G2/M, não se encontrou significância estatística para esse efeito. A proporção de células na fase G0/G1, em relação ao grupo controle, não apresentou nenhuma alteração estatisticamente significativa.

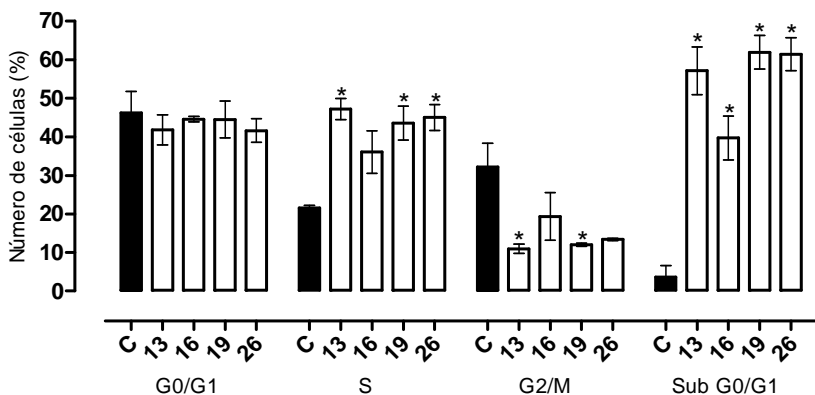


Figura 6: Efeitos das chalconas 13, 16, 19 e 26 no ciclo celular das células de leucemia linfóide aguda Jurkat. As células Jurkat foram incubadas por 24 h na ausência, grupo controle (C), e na presença das chalconas 13, 16, 19 e 26. As fases G0/G1, S, G2/M e Sub G0/G1 foram determinadas pela análise do conteúdo de DNA no citômetro de fluxo BD FACSCanto™ (Becton Dickinson Immunocytometry Systems) e avaliadas pelo *software* WinMID versão 2.8. Cada ponto representa a média \pm EPM de três experimentos independentes. *Diferença estatisticamente significante em relação ao grupo controle, $p < 0,05$. ANOVA seguida de pós-teste t de Bonferroni.

Tabela 2. Efeitos das chalconas 13, 16, 19 e 26 no ciclo celular das células de leucemia linfóide aguda Jurkat. As chalconas 13, 16, 19 e 26 foram adicionadas às células Jurkat nas suas respectivas CI_{50} e incubadas por 24 h. A porcentagem de células em cada fase do ciclo celular foi determinada pela avaliação do conteúdo de DNA no citômetro de fluxo BD FACSCanto™ (Becton Dickinson Immunocytometry Systems) e analisada pelo *software* WinMID versão 2.8.

Grupos	G0/G1 (%) ^a	S (%) ^a	G2/M (%) ^a	Apoptose Sub G0/G1 (%) ^a
Controle	46,27 ± 5,49	21,55 ± 0,65	32,18 ± 6,14	3,62 ± 3,00
13	41,82 ± 3,92	47,23 ± 2,72*	10,94 ± 1,20*	57,12 ± 6,15*
16	44,58 ± 0,68	36,07 ± 5,49	19,34 ± 6,16	39,68 ± 5,68*
19	44,48 ± 4,78	43,53 ± 4,39*	12,00 ± 0,40*	61,94 ± 4,35*
26	41,61 ± 3,10	45,02 ± 3,38*	13,36 ± 0,28	61,43 ± 4,29*

^a Resultados representativos de três experimentos independentes: média (% ± EPM) em cada fase do ciclo celular. *Diferença estatisticamente significante em relação ao grupo controle, $p < 0,05$. ANOVA seguida de pós-teste t de Bonferroni.

5.4 EFEITO DAS CHALCONAS 13, 16, 19 E 26 NA INDUÇÃO DA APOPTOSE NAS CÉLULAS DE LEUCEMIA MIELOIDE AGUDA K562 E EM CÉLULAS DE LEUCEMIA LINFOIDE AGUDA JURKAT

O tipo de morte celular causada pela chalconas 13, 16, 19 e 26 sobre as células leucêmicas foi avaliada por microscopia de fluorescência com os corantes LA e BE e pela marcação com anexina V.

Como pode ser observado na Figura 7 as células K562 e Jurkat que não receberam tratamento (grupo controle) com as chalconas apresentaram-se viáveis (fluorescência verde), Painéis A e B, respectivamente. Após 24 h de incubação das células com as chalconas 13 (Painel C), 16 (Painel E), 19 (Painel G) e 26 (Painel I), nas suas respectivas CI_{50} de 24 h, as células K562 apresentaram características de células em apoptose, as quais apresentaram cromatina condensada ou fragmentada com fluorescência laranja, e estão indicadas na Figura 7 por setas brancas. O mesmo efeito foi observado com as células Jurkat, que após 24 h de incubação com as chalconas 13 (Painel D), 16 (Painel F), 19 (Painel H) e 26 (Painel J), nas suas respectivas CI_{50} de 24 h,

apresentaram células em apoptose, indicadas na Figura 7 por setas brancas.

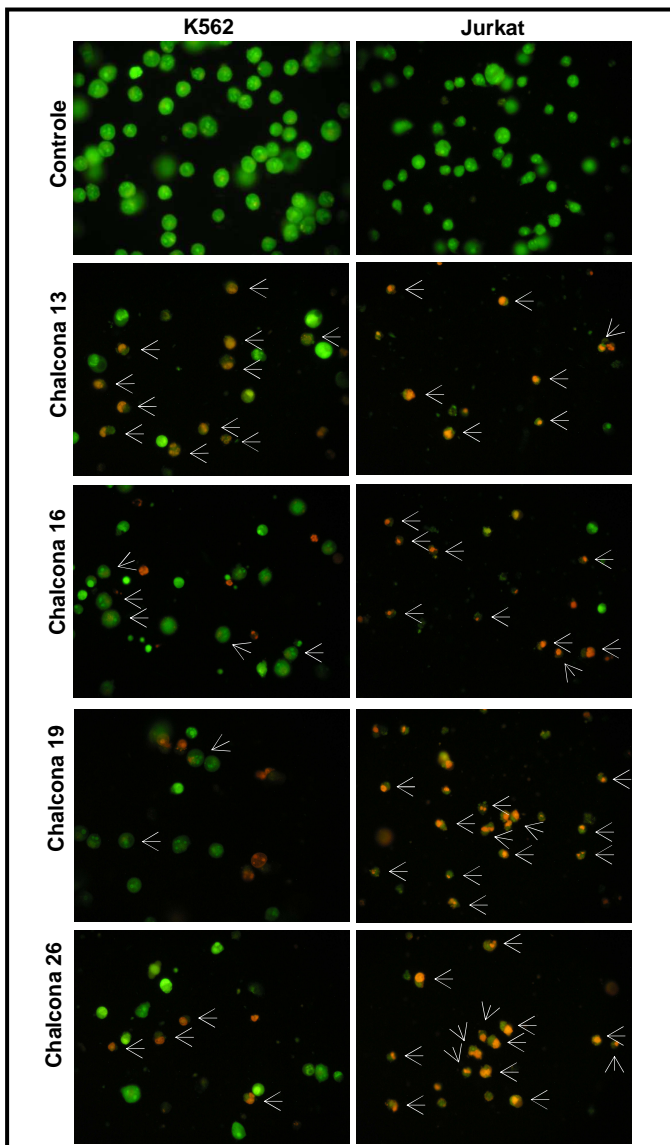


Figura 7: Apoptose induzida pelas chalconas 13, 16, 19 e 26 nas células de leucemia mieloide aguda K562 e nas células de leucemia linfoide aguda Jurkat. As chalconas 13 (Painéis C e D), 16 (Painéis E e F), 19 (Painéis G e H) e 26 (Painéis I e J) foram adicionadas, nas suas respectivas CI_{50} , às células K562

($1,0 \times 10^6$ células/ 4 mL) ou células Jurkat ($1,0 \times 10^6$ células/ 2 mL) e incubadas por 24 h. Os grupos controle (Painéis A e B) representam as células sem tratamento com as chalconas. A avaliação da apoptose foi realizada por microscopia de fluorescência com os corantes LA e BE. As células viáveis apresentam fluorescência verde; e as células em apoptose tardia, cromatina condensada ou fragmentada com fluorescência laranja (as setas brancas indicam as células em apoptose).

A avaliação quantitativa da apoptose foi realizada pelo método da anexina V-FITC . O processo apoptótico recente é identificado pela externalização da fosfatidilserina, que se liga à anexina V após incubação. Assim, após 16 h de incubação das células K562 (Figura 8) e das células Jurkat (Figura 9) com as chalconas 13, 16, 19 e 26 (nas suas respectivas CI_{50} de 24 h), a apoptose foi determinada pela marcação com anexina V por citometria de fluxo.

Pode-se observar na Figura 8 (Painel F) que apenas $5,66 \pm 0,63$ % das células que não receberam tratamento com as chalconas (grupo controle) apresentaram marcação positiva para a anexina V. No entanto, quando as células foram tratadas com as chalconas 13 (Painel B), 16 (Painel C), 19 (Painel D) e 26 (Painel E) houve um aumento estatisticamente significativo no número de células com marcação positiva para anexina V, em relação ao grupo controle. A marcação positiva para a anexina V foi de $32,61 \pm 3,12$ %, $16,72 \pm 2,00$ %, $25,31 \pm 2,27$ % e $41,99 \pm 0,75$ % para as chalconas 13, 16, 19 e 26, respectivamente (Figura 8, Painel F).

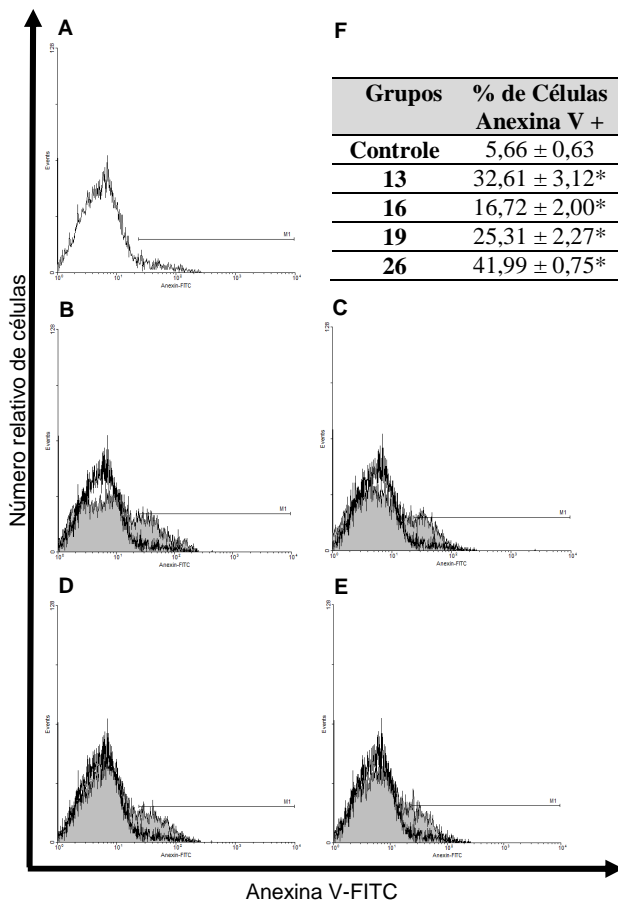


Figura 8: Efeito das chalconas 13, 16, 19 e 26 sobre a exposição dos resíduos de fosfatidilserina nas células de leucemia mieloide aguda K562. A apoptose foi determinada pela análise da marcação com anexina V-FITC nas células K562 sem tratamento (Painel A), ou incubadas por 16 h com as chalconas 13 (Painel B), 16 (Painel C), 19 (Painel D) e 26 (Painel E), nas suas respectivas CI_{50} de 24 h. Os resultados representam a média \pm EPM de três experimentos independentes (Painel F). M1 representa as células com marcação positiva para anexina V. O controle está representado em branco e as chalconas, em cinza. Os histogramas representam os resultados de um, dentre os três experimentos independentes realizados. As análises foram realizadas no citômetro de fluxo BD FACSCanto™ (Becton Dickinson Immunocytometry Systems) e avaliadas pelos *softwares* WinMID versão 2.8 e *Infinicyt* versão 1.3. *Diferença estatisticamente significativa em relação ao grupo controle, $p < 0,05$. ANOVA seguida de pós-teste t de Bonferroni.

Em relação às células Jurkat, o grupo controle (células sem tratamento com as chalconas) apresentou $9,90 \pm 3,89$ % das células com marcação positiva para a anexina V (Figura 9, Painel F). Após 16 h de incubação com as chalconas 13 (Painel B), 16 (Painel C), 19 (Painel D) e 26 (Painel E), observou-se um aumento estatisticamente significativo no número de células com marcação positiva para anexina V em relação ao grupo controle. A marcação positiva para a anexina V foi de $98,36 \pm 0,14$ %, $94,65 \pm 1,08$ %, $93,34 \pm 1,26$ % e $94,18 \pm 4,30$ % para as chalconas 13, 16, 19 e 26 respectivamente (Figura 9, Painel F).

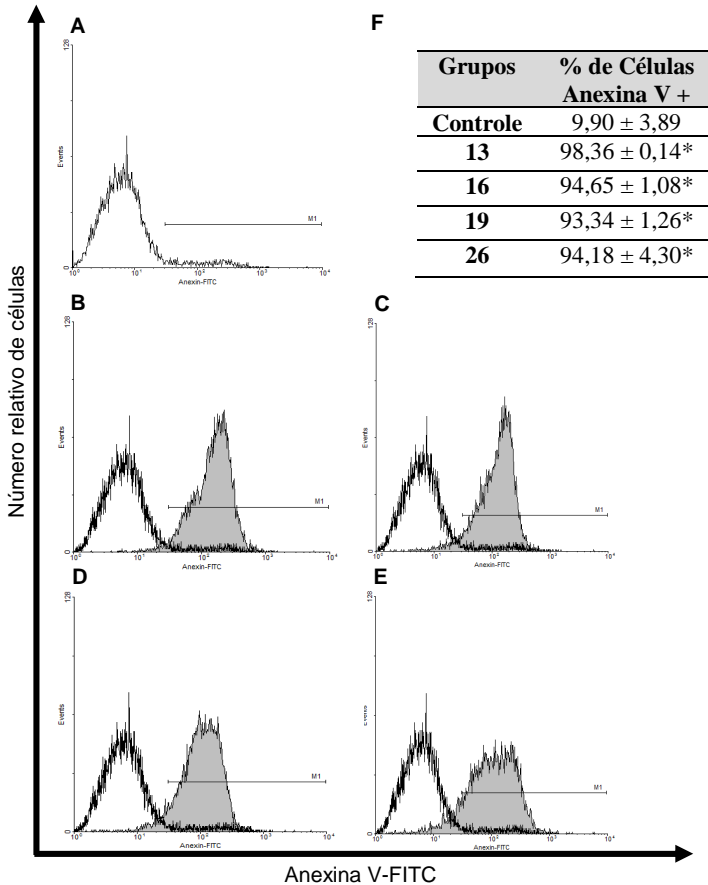


Figura 9: Efeito das chalconas 13, 16, 19 e 26 sobre a exposição dos resíduos de fosfatidilserina nas células de leucemia linfóide aguda Jurkat.

A apoptose foi determinada pela análise da marcação com anexina V-FITC nas células Jurkat sem tratamento (Painel A), ou incubadas por 16 h com as chalconas 13 (Painel B), 16 (Painel C), 19 (Painel D) e 26 (Painel E), nas suas respectivas CI_{50} de 24 h. Os resultados representam a média \pm EPM de três experimentos independentes (Painel F). M1 representa as células com marcação positiva para anexina V. O controle está representado em branco e as chalconas, em cinza. Os histogramas representam os resultados de um, dentre os três experimentos independentes realizados. As análises foram realizadas no citômetro de fluxo BD FACSCanto™ (Becton Dickinson Immunocytometry Systems) e avaliadas pelos softwares WinMID versão 2.8 e *Infinicyt* versão 1.3.

*Diferença estatisticamente significativa em relação ao grupo controle, $p < 0,05$. ANOVA seguida de pós-teste t de Bonferroni.

5.5 EFEITO DAS CHALCONAS 13 E 26 SOBRE O POTENCIAL MITOCONDRIAL DAS CÉLULAS DE LEUCEMIA MIELOIDE AGUDA K562 E DAS CÉLULAS DE LEUCEMIA LINFOIDE AGUDA JURKAT.

Para avaliar se a apoptose causada pelas chalconas envolvia dano mitocondrial, o potencial mitocondrial das células K562 e Jurkat foi analisado após 12 h de incubação com as chalconas 13 e 26, nas suas respectivas CI_{50} de 24 h. Como pode ser observado na Figura 10, o potencial mitocondrial, avaliado pelo índice de fluorescência média (IFM), apresentou redução estatisticamente significativa após o tratamento com as chalconas 13 e 26 em ambas as linhagens celulares. Os histogramas representativos de um experimento para avaliação do potencial mitocondrial das células K562 e Jurkat encontram-se nos Apêndices C e D respectivamente.

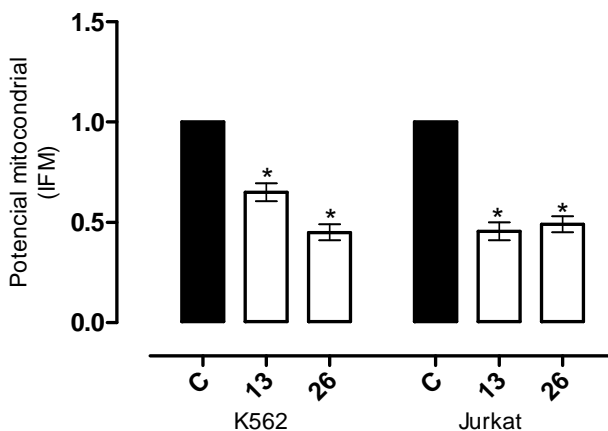


Figura 10: Efeito das chalconas 13 e 26 sobre o potencial mitocondrial das células de leucemia mieloide aguda K562 e das células de leucemia linfóide aguda Jurkat. As células K562 ($1,0 \times 10^6$ células/ 4 mL) e Jurkat ($1,0 \times 10^6$ células/ 2 mL) foram incubadas por 12 h na ausência, grupo controle (C), e na presença das chalconas 13 e 26, nas suas respectivas CI_{50} de 24 h. A determinação do IFM para avaliação do potencial mitocondrial foi realizada por citometria de fluxo. Cada ponto representa a média \pm EPM de dois experimentos independentes. As análises foram realizadas no citômetro de fluxo BD FACSCanto™ (Becton Dickinson Immunocytometry Systems) e avaliadas com o software *Infinicyt* versão 1.3. *Diferença estatisticamente significativa em relação ao grupo controle, $p < 0,05$. ANOVA seguida de pós-teste t de Bonferroni.

5.6 EFEITO DAS CHALCONAS 13 E 26 NA EXPRESSÃO DA PROTEÍNA ANTIAPOPTÓTICA BCL-2 NAS CÉLULAS DE LEUCEMIA MIELOIDE AGUDA K562 E NAS CÉLULAS DE LEUCEMIA LINFOIDE AGUDA JURKAT

A expressão da proteína antiapoptótica Bcl-2 foi avaliada após 3, 6, 9 e 12 h de incubação das células K562 e Jurkat com as chalconas 13 e 26 (nas suas respectivas CI_{50} de 24 h) por citometria de fluxo. Como pode ser observado na Figura 11, as células K562 não apresentaram nenhuma alteração estatisticamente significativa na expressão da proteína Bcl-2 após o tratamento com a chalcona 13. Entretanto, esse mesmo composto apresentou redução estatisticamente significativa na expressão da proteína Bcl-2 nas células Jurkat, após 9 e 12 h de incubação. Já a chalcona 26 reduziu a expressão da proteína Bcl-2, de maneira estatisticamente significativa, após 9 h de incubação com as células K562 e após 9 e 12 h com as células Jurkat. Os histogramas representativos de um experimento para avaliação da expressão da proteína Bcl-2 nas células K562 e Jurkat encontram-se no Apêndice E.

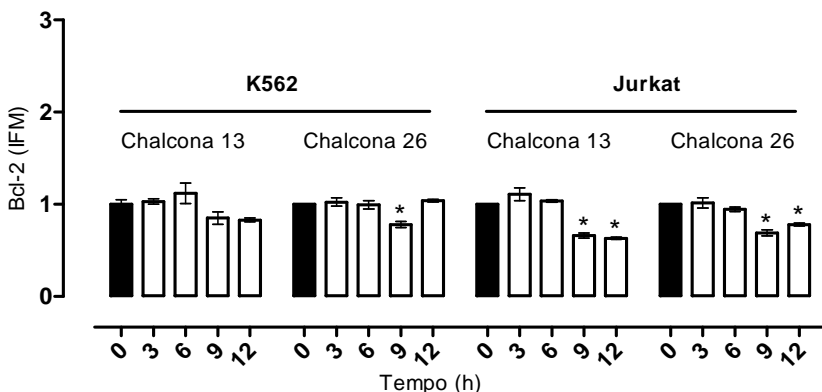


Figura 11: Efeito das chalconas 13 e 26 na expressão da proteína antiapoptótica Bcl-2 nas células de leucemia mieloide aguda K562 e nas células de leucemia linfóide aguda Jurkat. As células K562 ($2,5 \times 10^5$ células/mL) e Jurkat ($5,0 \times 10^5$ células/mL) foram incubadas com as chalconas 13 e 26, com suas respectivas CI_{50} de 24 h, por 3, 6, 9 e 12 h. O grupo controle, sem tratamento, está representado pelo tempo 0 h. A determinação do IFM para avaliação da expressão da proteína Bcl-2, em cada um dos tempos de incubação, foi avaliada por citometria de fluxo. Cada ponto representa a média \pm EPM de dois experimentos independentes. As análises foram realizadas no citômetro de fluxo BD FACSCanto™ (Becton Dickinson Immunocytometry Systems) e avaliadas pelo do *software* *Infinicyt* versão 1.3. *Diferença estatisticamente significativa em relação ao grupo controle, $p < 0,05$. ANOVA seguida de pós-teste t de Bonferroni.

5.7 EFEITO DAS CHALCONAS 13 E 26 NA EXPRESSÃO DA PROTEÍNA PROAPOPTÓTICA BAX NAS CÉLULAS DE LEUCEMIA MIELOIDE AGUDA K562 E NAS CÉLULAS DE LEUCEMIA LINFOIDE AGUDA JURKAT

A expressão da proteína proapoptótica Bax foi avaliada após 3, 6, 9 e 12 h de incubação das células K562 e Jurkat com as chalconas 13 e 26 (nas suas respectivas CI_{50} de 24 h) por citometria de fluxo. Pode-se observar na Figura 12 que as células Jurkat não apresentaram nenhuma alteração estatisticamente significativa na expressão da proteína Bax após o tratamento com as chalconas 13 e 26. Contudo, as células K562 tiveram um aumento estatisticamente significativo na expressão dessa proteína após 9 e 12 h de tratamento com a chalcona 13 e após 6, 9 e 12

h de tratamento com a chalcona 26. Os histogramas representativos de um experimento para avaliação da expressão da proteína Bax nas células K562 e Jurkat encontram-se no Apêndice F.

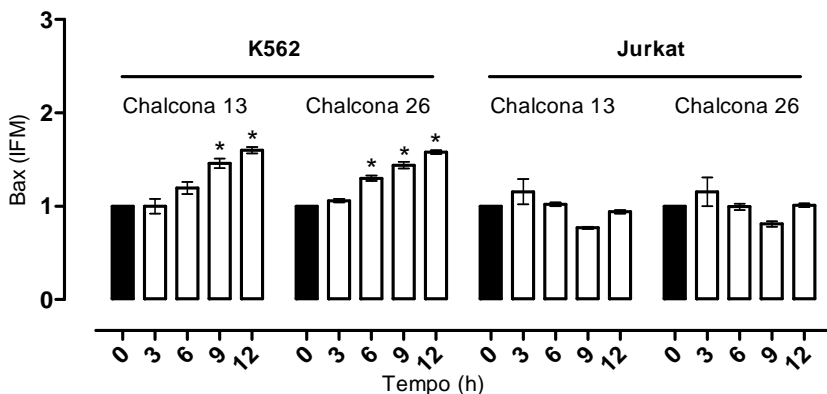


Figura 12: Efeito das chalconas 13 e 26 na expressão da proteína proapoptótica Bax nas células de leucemia mieloide aguda K562 e nas células de leucemia linfóide aguda Jurkat. As células K562 ($2,5 \times 10^5$ células/mL) e Jurkat ($5,0 \times 10^5$ células/mL) foram incubadas com as chalconas 13 e 26, nas suas respectivas CI_{50} de 24 h, por 3, 6, 9 e 12 h. O grupo controle, sem tratamento, está representado pelo tempo 0 h. A determinação do IFM para avaliação da expressão da proteína Bax, em cada um dos tempos de incubação, foi realizada por citometria de fluxo. Cada ponto representa a média \pm EPM de dois experimentos independentes. As análises foram realizadas no citômetro de fluxo BD FACSCanto™ (Becton Dickinson Immunocytometry Systems) e avaliadas pelo *software* *Infinicyt* versão 1.3. *Diferença estatisticamente significativa em relação ao grupo controle, $p < 0,05$. ANOVA seguida de pós-teste t de Bonferroni.

5.8 EFEITO DAS CHALCONAS 13 E 26 NA EXPRESSÃO DA PROTEÍNA P53 NAS CÉLULAS DE LEUCEMIA MIELOIDE AGUDA K562 E NAS CÉLULAS DE LEUCEMIA LINFOIDE AGUDA JURKAT

A expressão da proteína p53 foi avaliada após 3, 6, 9 e 12 h de incubação das células K562 e Jurkat com as chalconas 13 e 26 (em suas respectivas CI_{50} de 24 h) por citometria de fluxo. A Figura 13 mostra que as chalconas 13 e 26 causaram redução estatisticamente

significativa na expressão da proteína p53 após 3, 6, 9 e 12 h de incubação com as células K562, e após 9 h de incubação com as células Jurkat. Os histogramas representativos de um experimento para avaliação da expressão da proteína p53 nas células K562 e Jurkat encontram-se no Apêndice G.

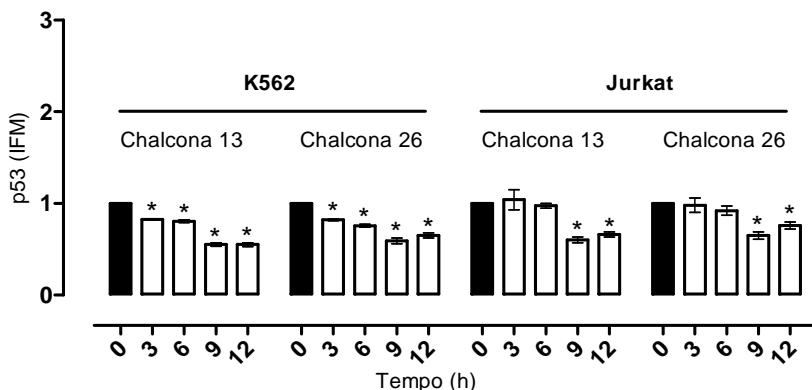


Figura 13: Efeito das chalconas 13 e 26 na expressão da proteína p53 nas células de leucemia mieloide aguda K562 e nas células de leucemia linfóide aguda Jurkat. As células K562 ($2,5 \times 10^5$ células/mL) e Jurkat ($5,0 \times 10^5$ células/mL) foram incubadas com as chalconas 13 e 26, em suas respectivas CI_{50} de 24 h, por 3, 6, 9 e 12 h. O grupo controle, sem tratamento, está representado pelo tempo 0 h. A determinação do IFM para avaliação da expressão da proteína p53, em cada um dos tempos de incubação, foi realizada por citometria de fluxo. Cada ponto representa a média \pm EPM de dois experimentos independentes. As análises foram realizadas no citômetro de fluxo BD FACSCantoTM (Becton Dickinson Immunocytometry Systems) e avaliadas pelo *software Infinicyt* versão 1.3. *Diferença estatisticamente significativa em relação ao grupo controle, $p < 0,05$. ANOVA seguida de pós-teste t de Bonferroni.

5.9 EFEITO DAS CHALCONAS 13 E 26 NA EXPRESSÃO DA PROTEÍNA CASPASE-3 ATIVA NAS CÉLULAS DE LEUCEMIA MIELOIDE AGUDA K562 E NAS CÉLULAS DE LEUCEMIA LINFOIDE AGUDA JURKAT

A expressão da proteína caspase-3 ativa foi avaliada após 3, 6, 9 e 12 h de incubação das células K562 e Jurkat com as chalconas 13 e 26

(nas suas respectivas CI_{50} de 24 h) por citometria de fluxo. Pode-se observar na Figura 14 que a chalcona 13 causou um aumento estatisticamente significativo na expressão da proteína caspase-3 ativa após 6, 9 e 12 h de incubação nas células K562 e Jurkat. De maneira semelhante, a chalcona 26 causou aumento estatisticamente significativo após 6, 9 e 12 h de incubação com a célula Jurkat e após 9 e 12 h com a célula K562. Os histogramas representativos de um experimento para avaliação da expressão da caspase-3 ativa nas células K562 e Jurkat encontram-se no Apêndice H.

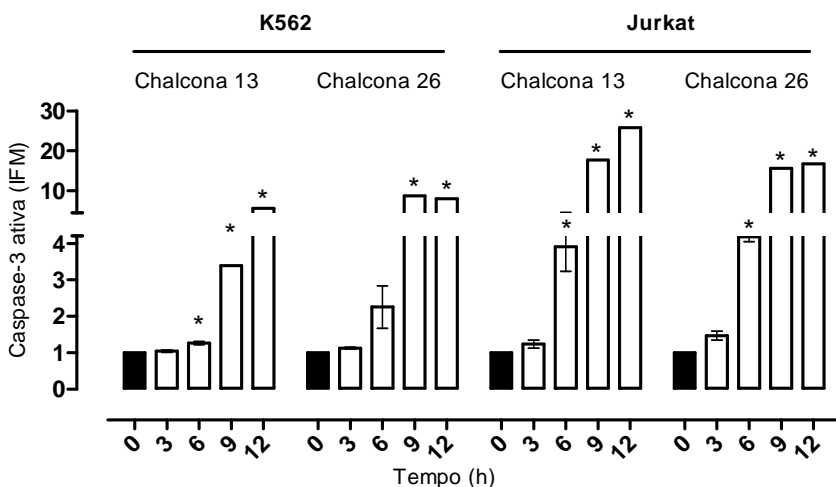


Figura 14: Efeito das chalconas 13 e 26 na expressão da proteína caspase-3 ativa nas células de leucemia mieloide aguda K562 e nas células de leucemia linfóide aguda Jurkat. As células K562 ($2,5 \times 10^5$ células/mL) e Jurkat ($5,0 \times 10^5$ células/mL) foram incubadas com as chalconas 13 e 26, nas suas respectivas CI_{50} de 24 h, por 3, 6, 9 e 12 h. O grupo controle, sem tratamento, está representado pelo tempo 0 h. A determinação IFM para avaliação da expressão da proteína caspase-3 ativa, em cada um dos tempos de incubação, foi realizada por citometria de fluxo. Cada ponto representa a média \pm EPM de dois experimentos independentes. As análises foram realizadas no citômetro de fluxo BD FACSCanto™ (Becton Dickinson Immunocytometry Systems) e avaliadas pelo do *software* Infinicyt versão 1.3. *Diferença estatisticamente significante em relação ao grupo controle, $p < 0,05$. ANOVA seguida de pós-teste t de Bonferroni.

5.10 EFEITO DAS CHALCONAS 13 E 26 NA EXPRESSÃO DA PROTEÍNA ANTIAPOPTÓTICA SURVIVINA NAS CÉLULAS DE LEUCEMIA MIELOIDE AGUDA K562 E NAS CÉLULAS DE LEUCEMIA LINFOIDE AGUDA JURKAT

O efeito das chalconas 13 e 26 (nas suas respectivas CI_{50} de 24 h) na expressão da proteína antiapoptótica survivina foi avaliado após incubação por 24 h com as células K562 e Jurkat. A Figura 15 mostra que a expressão da proteína survivina, a qual é evidenciada pela coloração acastanhada no citoplasma, apresentou-se menor nas células K562 e Jurkat tratadas com as chalconas 13 e 16, do que nos grupos controles (células K562 e Jurkat sem tratamento).

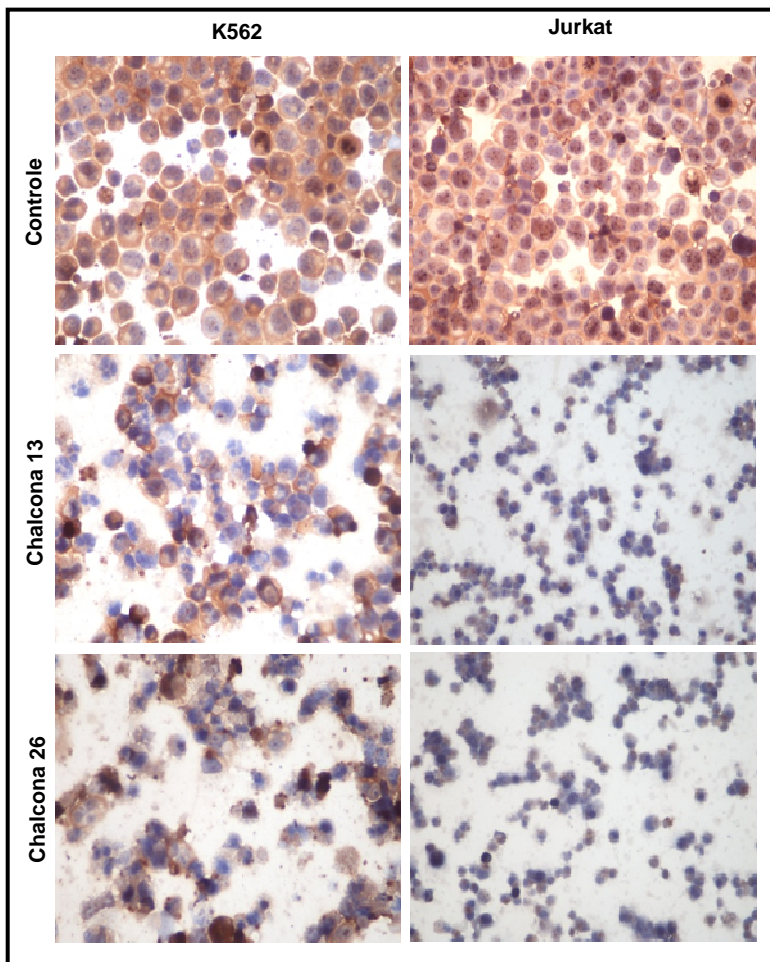


Figura 15: Efeito das chalconas 13 e 26 na expressão da proteína antiapoptótica survivina nas células de leucemia mieloide aguda K562 e nas células de leucemia linfóide aguda Jurkat. As células K562 ($2,5 \times 10^5$ células/mL) e Jurkat ($5,0 \times 10^5$ células/mL) foram incubadas por 24 h na ausência (grupo controle) e na presença das chalconas 13 e 26, nas suas respectivas CI_{50} de 24 h. A detecção da proteína survivina foi realizada por imunocitoquímica, utilizando o método estreptoavidina-biotina-peroxidase. O resultado positivo foi revelado pelo aparecimento de coloração castanha citoplasmática no local da marcação pelo anticorpo anti-survivina. As fotografias das lâminas foram realizadas no microscópio ótico NIKON ECLIPSE 50i, em aumento de 400X, com a câmera NIKON DIGITAL SIGHT DS-5M e o programa NIS ELEMENTS F, VERSION 2.10.

5.11 EFEITO DAS CHALCONAS 13 E 26 NA EXPRESSÃO DA PROTEÍNA KI67 NAS CÉLULAS DE LEUCEMIA MIELOIDE AGUDA K562 E NAS CÉLULAS DE LEUCEMIA LINFOIDE AGUDA JURKAT

O efeito das chalconas 13 e 26 (nas suas respectivas CI_{50} de 24 h) na expressão da proteína Ki67 foi avaliado após incubação por 24 h com as células K562 e Jurkat. Pode-se observar na Figura 16 que a expressão da proteína Ki67, evidenciada pela coloração nuclear acastanhada, apresentou-se diminuída nas células K562 e Jurkat tratadas com as chalconas 13 e 16, quando comparadas aos grupos controles (células K562 e Jurkat sem tratamento).

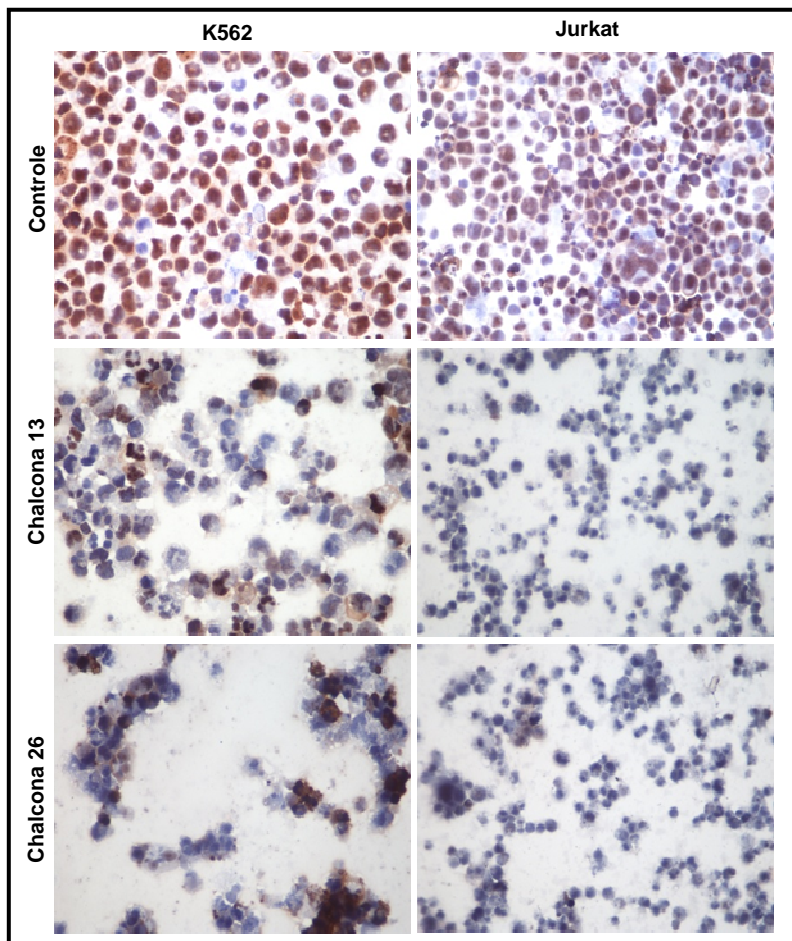


Figura 16: Efeito das chalconas 13 e 26 na expressão da proteína Ki67 nas células de leucemia mieloide aguda K562 e nas células de leucemia linfóide aguda Jurkat. As células K562 ($2,5 \times 10^5$ células/mL) e Jurkat ($5,0 \times 10^5$ células/mL) foram incubadas por 24 h na ausência (grupo controle), e na presença das chalconas 13 e 26, nas suas respectivas CI_{50} de 24 h. A detecção da proteína Ki67 foi realizada por imunocitoquímica, utilizando o método estreptoavidina-biotina-peroxidase. O resultado positivo foi revelado pelo aparecimento de coloração castanha nuclear no local da marcação pelo anticorpo anti-Ki67. As fotografias das lâminas foram realizadas no microscópio ótico NIKON ECLIPSE 50i, em aumento de 400X, com a câmera NIKON DIGITAL SIGHT DS-5M e o programa NIS ELEMENTS F, VERSION 2.10.

6. DISCUSSÃO

Segundo a OMS, o câncer é uma das principais causas de morte no mundo e foi responsável por 190 mil óbitos no Brasil em 2008. No mesmo ano, no Brasil, registraram-se 7.905 casos novos de leucemias e 6.679 óbitos decorrentes desta doença (FERLAY et al., 2010). As estimativas para o ano de 2012 no Brasil apontam a ocorrência de aproximadamente 518.510 casos novos de câncer e 8.510 casos novos de leucemia (INCA, 2011).

Como já descrito anteriormente, várias formas de terapia vem sendo utilizadas para combater as leucemias; e, apesar dos novos protocolos de tratamento, a quimioterapia ainda é a terapia antileucêmica mais utilizada (GOL B et al., 2001; ROBAK e WIERZBOWSKA, 2009). Entretanto, a morbidade associada aos quimioterápicos ainda é um obstáculo significativo. Por isso, a busca por compostos antineoplásicos que tenham maior eficiência em induzir morte nas células tumorais e que sejam de fácil administração, pois a maioria dos quimioterápicos, atualmente, necessita de administração endovenosa prolongada; e com poucos ou insignificantes efeitos colaterais tornou-se um grande alvo de investigação dos pesquisadores e da indústria farmacêutica.

Neste contexto, as chalconas e seus derivados tem sido descritos na literatura como promissores compostos com atividade antitumoral (SAYDAM et al, 2003; ACHANTA et al., 2006) e de grande interesse para possíveis usos terapêuticos, devido à abundância em que são encontradas nas plantas e à facilidade de sua síntese (ORLIKOVA et al., 2011). Além disso, diversas pesquisas vêm sendo direcionadas para a avaliação do potencial efeito citotóxico das chalconas em células de linhagem leucêmica (SAYDAM et al, 2003; NAKATANI et al, 2005; YE ET AL., 2005). No entanto, os mecanismos de ação citotóxica das chalconas ainda são controversos, ou a CI_{50} do composto é alta. Assim, nesse trabalho, avaliamos o efeito citotóxico de 46 chalconas sintéticas derivadas da 2,4,5-trimetoxiacetofenona e do 2',4',5'-trimetoxibenzaldeído e os mecanismos de apoptose induzidos pelas chalconas mais ativas em células de linhagem de leucemia mieloide aguda K562 e de leucemia linfóide aguda Jurkat, de origem humana.

A avaliação inicial do efeito citotóxico das 46 chalconas sintéticas sobre as células K562 mostra que do total de chalconas testadas, 42 chalconas apresentaram efeito citotóxico significativo. Apenas as chalconas 1, 27, 40 e 46 não causaram redução significativa da viabilidade celular (Figura 1). Além disso, os resultados desta triagem inicial mostram que os compostos que causaram maior efeito citotóxico foram as chalconas 13, 16, 19 e 26, com viabilidade celular

de $28,46 \pm 0,73 \%$, $28,78 \pm 2,12 \%$, $36,48 \pm 4,79 \%$ e $25,33 \pm 1,72 \%$, respectivamente. De acordo com os resultados obtidos no ensaio de viabilidade celular para as chalconas avaliadas, algumas relações biológico-estruturais podem ser consideradas. Provavelmente, o efeito citotóxico das chalconas analisadas pode ser atribuído às interações estéricas, uma vez que compostos que apresentaram efeitos citotóxicos menores, como as chalconas 11, 12, 20 e 22, possuem as mesmas características eletrônicas que as chalconas 13, 16, 19 e 26, consideradas as mais citotóxicas; desta forma não é possível estabelecer uma relação entre estrutura e atividade baseada nas características eletrônicas destes compostos.

A partir dos resultados encontrados nessa etapa inicial, as chalconas com maior efeito citotóxico (chalconas 13, 16, 19 e 26) foram selecionadas para a realização de estudos citotóxicos e mecanismo de atividade. A incubação das chalconas 13, 16, 19 e 26 em diferentes concentrações (1, 10, 25, 50 e 100 μM) e tempos de incubação (24, 48 e 72 h), com as células K562 (Figura 2) e Jurkat (Figura 3) causou redução na viabilidade celular de ambas as células de maneira dependente da concentração e do tempo, quando comparadas ao grupo controle. Comparativamente, a CI_{50} da chalcona 26 ($31,07 \pm 0,90 \mu\text{M}$) após 24 h de incubação foi menor do que as chalconas 13, 16 e 19 sobre as células K562 (Figura 2, Painel E). No entanto, após 48 e 72 h de incubação, a chalcona 13 apresentou menor CI_{50} (CI_{50} : $8,01 \pm 0,22 \mu\text{M}$ e CI_{50} : $4,10 \pm 0,28 \mu\text{M}$, respectivamente), do que as chalconas 16, 19 e 26. Para as células Jurkat (Figura 3, Painel E), a chalcona 13 foi mais potente que as demais analisadas após 24, 48 e 72 h de incubação, CI_{50} : $31,68 \pm 0,88 \mu\text{M}$, CI_{50} : $8,22 \pm 0,30 \mu\text{M}$ e CI_{50} : $4,95 \pm 0,43 \mu\text{M}$, respectivamente.

Na literatura, a busca por novos compostos terapeuticamente úteis para o tratamento do câncer e que sejam bioativos em concentrações muito baixas é evidente. Diversos autores avaliam o efeito citotóxico de chalconas sintéticas pelos valores de CI_{50} . Rao, Fang e Tzeng (2004) demonstraram que a CI_{50} para o efeito citotóxico de chalconas sobre células Jurkat variava entre 1,7 e 66,8 μM , entretanto não relataram o tempo de incubação e a concentração celular utilizados no estudo. Outro trabalho mostra valores de CI_{50} entre 1,4 e 2,9 μM para chalconas incubadas com células Jurkat por 72 h, com uma concentração celular de 1×10^5 células/ mL (LIU e GO, 2005). Lawrence et al. (2006) encontraram valores de CI_{50} entre 0,0043 e 10 μM após 5 dias de incubação das chalconas com células K562, mas também não determinaram a concentração celular utilizada nos

experimentos. Valores de CI_{50} entre 0,0045 e 30 μ M foram determinados em outro estudo no qual as chalconas foram incubadas com células K562 (2×10^3 células/ mL) por 5 dias (DUCKI et al., 2009). Apesar da comparação entre os estudos ficar prejudicada devido às diferenças nas condições experimentais relatadas, nossos resultados corroboram os valores de CI_{50} encontrados pelos trabalhos citados acima, principalmente aos valores de CI_{50} de 72 h.

Para avaliar a seletividade do efeito das chalconas sobre as células leucêmicas, as chalconas que tiveram maior efeito citotóxico nas células de linhagem leucêmica também foram avaliadas quanto ao efeito citotóxico em células mononucleares de indivíduos saudáveis. Os resultados encontrados, após 24 h de incubação das chalconas com as células mononucleares de indivíduos saudáveis (Figura 4), mostram que as chalconas não causaram alteração significativa na viabilidade celular destas células; ao contrário do controle positivo tratado com Taxol 30 μ M, que diminuiu significativamente a viabilidade celular. Apesar de o Taxol possuir valores de CI_{50} menores nas células de linhagem leucêmica, esse quimioterápico apresenta também maior efeito citotóxico em células normais. Embora diversos estudos utilizem esta metodologia para analisar a especificidade dos compostos estudados em células tumorais, e assim prever possíveis efeitos adversos; acreditamos que estudos mais detalhados devam ser realizados para que se possa concluir algo a respeito da especificidade de ação das chalconas sobre as células tumorais.

Os resultados promissores relacionados ao efeito citotóxico das chalconas estudadas conduziram este estudo à investigação do mecanismo de ação desses compostos. Muitos mecanismos de ação já foram propostos para as chalconas (SAYDAM et al, 2003; NAKATANI et al, 2005; YE et al., 2005), no entanto os mecanismos pelos quais as chalconas exercem seu efeito citotóxico ainda são controversos. Considerando os avanços alcançados em pesquisas sobre os mecanismos básicos envolvidos na oncogênese e na indução da apoptose, sabe-se que a regulação do ciclo celular exerce função na transformação maligna e no desenvolvimento de resistência à quimioterapia (SCHWARTZ e SHAH, 2005). Assim, com o objetivo de investigar esses mecanismos, selecionamos os compostos mais ativos (chalconas 13, 16, 19 e 26) para avaliar seus efeitos sobre a progressão do ciclo celular e na indução da apoptose em células de linhagem leucêmica K562 e Jurkat.

Inicialmente, foi avaliado o efeito das chalconas 13, 16, 19 e 26 na progressão do ciclo celular das células K562 (Tabela 1, Figura 5) e Jurkat (Tabela 2, Figura 6). Em comparação com o grupo controle, as

células K562 (Tabela 1, Figura 5) tratadas com as chalconas apresentaram aumento da proporção de células na fase Sub G0/G1, ou seja, células que sofreram morte celular possivelmente por apoptose. Entretanto, esse efeito foi estatisticamente significativo apenas para as chalconas 13 e 26. Além disso, esse efeito foi acompanhado por diminuição na proporção de células na fase G0/G1 que teve significância estatística apenas para a chalcona 26. As células Jurkat apresentaram um perfil diferente ao observado para as células K562. Após 24 h de tratamento das células Jurkat com as chalconas, observou-se que uma grande proporção de células encontravam-se na fase SubG0/G1, ou seja em morte celular.

Diversos estudos mostram que a atividade antiproliferativa das chalconas interfere em diferentes fases do ciclo celular. Acredita-se que a atividade antitumoral de algumas chalconas está relacionada à sua ligação à tubulina, o que evita a polimerização dos microtúbulos (LAWRENCE et al., 2006; ROMAGNOLI et al., 2008). É relatado também que chalconas metoxiladas bloqueiam o ciclo celular na fase G2/M, o que é consistente com sua capacidade de inibir a formação do fuso mitótico pela interação com a proteína tubulina. Um estudo realizado com piperidinilchalconas em células HCT 116 (linhagem celular humana de câncer de cólon) mostrou que a atividade antiproliferativa destes compostos está relacionada ao bloqueio nas fases G1 e G2/M do ciclo celular (LIU e GO, 2006). Para as células Jurkat, foi relatado que chalconas causam bloqueio na fase G2/M com diminuição concomitante na proporção de células na fase S (RAO, FANG e TZENG, 2004). Os resultados referentes ao efeito das chalconas derivadas da 2,4,5-trimetoxiacetofenona no ciclo celular encontrados no presente estudo diferem dos resultados apresentados nos trabalhos descritos acima. Porém, a grande proporção de células em apoptose nas células Jurkat, representada pelas células na fase Sub G0/G1 encontradas neste estudo, pode ter prejudicado a avaliação do ciclo celular e a consequente detecção de alterações no mesmo.

Sabe-se que o ciclo celular é regulado por diversas proteínas e que a proliferação celular é associada à expressão da proteína Ki67. Esta proteína está presente em todas as fases ativas do ciclo celular (fases G1, S, G2 e mitose), e está ausente na fase G0. Devido ao fato desta proteína estar presente em todas as células em proliferação, tanto em células normais quanto em tumorais, a sua presença torna-se um excelente marcador de proliferação celular (SCHOLZEN e GERDES, 2000). Embora a sua função ainda permaneça pouco compreendida, acredita-se que esta proteína exerça função na regulação do ciclo celular (BROWN

e GATTER, 2002). Assim, avaliamos se as chalconas 13 e 26, as que apresentaram maior efeito significativo sobre o ciclo celular, alteram a expressão da proteína Ki67 nas células K562 e Jurkat. Após 24 h de incubação, observamos que as chalconas 13 e 26 provocaram uma diminuição da expressão da proteína Ki67, quando comparadas ao grupo controle (Figura 16). A diminuição na expressão deste marcador de proliferação celular sugere que o mecanismo de ação destes compostos envolve a inibição da proliferação celular.

As desordens no ciclo celular geralmente são associadas ao crescimento neoplásico, desta forma o conhecimento desses mecanismos é um importante alvo para o desenvolvimento de novos fármacos efetivos contra o câncer. O bloqueio no ciclo celular ativa mecanismos de reparo do DNA (LODISH et al., 2000; VERMEULEN, BOCKSTAELE e BERNEMAN, 2003), entretanto, se este reparo não ocorrer corretamente, a proteína p53 induz a célula a apoptose (KASTAN et al., 1991; LEVINE, 1997; GHOBRIAL, WITZIG e ADJEI, 2005). Na presença de um dano genômico, podem ocorrer as seguintes situações: o reparo do dano do DNA, a indução da apoptose ou a morte celular por necrose. Se o dano no DNA tiver proporções suficientes para diminuir as concentrações de ATP ou inativar as caspases, a apoptose não ocorre e a célula morre por necrose. Porém, se o dano for moderado, a proteína p53 possibilita o reparo do DNA pelo bloqueio do ciclo celular ou induz a apoptose. Além disso, em algumas situações, a célula pode iniciar o processo apoptótico, mas com a diminuição da concentração de ATP e inativação das caspases, pode ocorrer morte celular por necrose (LEIST e NICOTERA, 1997; VERMEULEN, BOCKSTAELE e BERNEMAN, 2003).

O interesse por fármacos indutores de morte celular por apoptose se fundamenta no resultado indesejável do extravasamento do conteúdo citoplasmático e a consequente reação inflamatória ocasionada por uma célula em necrose. Assim, o sucesso no tratamento com agentes quimioterápicos é dependente da sua capacidade em induzir apoptose das células tumorais, na qual a ativação das vias apoptóticas exerce importante papel. A fim de investigar se a morte celular induzida pelas chalconas 13, 16, 19 e 26, nas células K562 e Jurkat, envolvia a apoptose, utilizamos duas metodologias diferentes: coloração com LA e BE e marcação com anexina V.

As características morfológicas compatíveis com apoptose, nas células K562 e Jurkat, foram avaliadas pela coloração com LA e BE. Após 24 h de incubação das células K562 e Jurkat com as chalconas 13, 16, 19 e 26 (Figura 7), nas suas CI_{50} de 24 h, observou-se que os grupos

que receberam tratamento com estes compostos apresentaram grande quantidade de células em apoptose tardia, evidenciada pela presença de células com cromatina condensada ou fragmentada com fluorescência laranja, quando comparadas aos grupos controles, os quais apresentaram células viáveis (fluorescência verde). Além disso, comparando o efeito das chalconas nas duas linhagens celulares, nota-se que as células Jurkat apresentaram menos células viáveis após tratamento com as chalconas do que as células K562. Tal fato sugere que as células Jurkat apresentam uma maior sensibilidade à ação das chalconas avaliadas.

Durante a apoptose, ocorre a externalização da fosfatidilserina, a qual promove a perda da assimetria na composição dos fosfolipídeos, identificando a superfície da célula apoptótica para ser fagocitada por células vizinhas, em geral os macrófagos (PERES e CURI, 2005; ELMORE, 2007). Assim, a detecção destes fosfolipídeos permite reconhecer um dos eventos iniciais do processo apoptótico. Desta forma, a apoptose induzida pelas chalconas foi confirmada pela detecção da externalização dos resíduos de fosfatidilserina, avaliada pelo método da anexina V. Após 16 h de incubação com as chalconas 13, 16, 19 e 26, as células K562 (Figura 8) apresentaram um aumento significativo na exposição de resíduos de fosfatidilserina, os quais foram marcados com anexina V-FITC (32,61%, 16,72%, 25,31% e 41,99% respectivamente), quando comparados ao grupo controle (5,66% de células positivas). A apoptose induzida pelas chalconas também foi observada nas células Jurkat (Figura 9). Após o tratamento com as chalconas, esta linhagem celular apresentou um aumento significativo na exposição de resíduos de fosfatidilserina (98,36%, 94,65%, 93,34% e 94,18% para as chalconas 13, 16, 19 e 26 respectivamente), quando comparados ao grupo controle (9,90% de células positivas para anexina V), e maior do que o observado nas células K562. Este resultado foi concordante com aquele observado na avaliação das características morfológicas, ou seja, ambos mostram que as chalconas causam morte celular por apoptose, e, que as células Jurkat apresentam maior sensibilidade à ação das chalconas do que as células K562.

Como descrito anteriormente, a proteína p53 exerce papel importante na regulação do ciclo celular e apoptose. Quando ocorre uma mutação no gene desta proteína, a mesma perde sua capacidade de ligação ao DNA e de transcrição gênica, causando a proliferação celular descontrolada e consequentemente o desenvolvimento de vários tumores (WIMAN, 2010). Além disso, foi demonstrado recentemente por Muller et al. (2009) que a expressão da p53 mutada pode promover a invasão tecidual, a perda de direção da migração e o comportamento metastático,

por meio da interação com a proteína integrina e por interferir no trânsito do fator de crescimento epidermal. Como a p53 apresenta-se mutada em mais da metade dos tumores humanos e os tumores que apresentam a p53 sem mutação usualmente são mais sensíveis à quimioterapia, esta proteína constitui um importante alvo para o desenvolvimento de novos fármacos antitumorais (WANG, RASTINEJAD e EL-DEIRY, 2003). Desta maneira, investigamos o efeito das chalconas 13 e 26 na expressão da proteína p53 nas células K562 e Jurkat, as quais apresentam a proteína p53 na forma mutada (LAW et al., 1993; CAI et al., 2001). Os resultados mostram que a incubação das células K562 e Jurkat com as chalconas 13 e 26 provocou redução significativa na expressão da proteína p53 mutada. Embora, este resultado possa mostrar benefícios quanto à redução da possibilidade de invasão tecidual, o mesmo não permite uma interpretação clara de seus benefícios, pois as estratégias atuais para o desenvolvimento de novas terapias contra os cânceres com p53 mutada buscam o restabelecimento da função desta proteína (WANG, RASTINEJAD e EL-DEIRY, 2003; WIMAN, 2010) e não necessariamente uma alteração quantitativa de sua expressão.

A avaliação da expressão da proteína p53 e os demais ensaios não foram realizados com as chalconas 16 e 19, pois as mesmas não apresentaram reprodutibilidade nas avaliações de citotoxicidade repetidas em paralelo a esses experimentos, como controle interno do experimento. Tal fato deve-se, provavelmente, à formação de cristais e precipitação dos compostos observados na solução estoque, o que revela uma instabilidade de suas características físico-químicas. Assim, considerando a falta de reprodutibilidade nos resultados com as chalconas 16 e 19 e que os mesmos não apresentaram estabilidade de suas características físico-químicas, optou-se por excluir estes dois compostos das análises realizadas posteriormente.

A apoptose pode ser iniciada por meio de duas vias principais que levam a ativação da cascata de caspases: a via extrínica ou via de receptor de morte e a via intrínica ou via mitocondrial (ELMORE, 2007; RASTOGI e SINHA, 2009; CRAWFORD e WELLS, 2011). A ativação da via intrínica da apoptose inicia-se na mitocôndria, e os estímulos que a ativam (MITA, MITA e TOLCHER, 2006; ELMORE, 2007; MELET et al., 2008; FRENZEL et al., 2009) causam alterações na permeabilidade da membrana mitocondrial e a perda do potencial transmembrânico mitocondrial. Como consequência, ocorre a liberação de proteínas proapoptóticas da mitocôndria para o citoplasma celular (ELMORE, 2007). A permeabilidade da membrana mitocondrial

alterada, a perda do potencial mitocondrial e a liberação de proteínas da mitocôndria constituem o evento central da via intrínseca da apoptose. Entretanto, esses mecanismos sofrem uma regulação estreita por membros da família das proteínas Bcl-2 (ELMORE, 2007; KROEMER, GALLUZZI e BRENNER, 2007; OW et al., 2008; AUTRET e MARTIN, 2009; ROLLAND e CONRADT, 2010). Como já descrito, a família Bcl-2 é constituída de proteínas com funções opostas, isto é, enquanto algumas possuem efeito antiapoptótico, como a Bcl-2, outras ativam a apoptose, como a Bax (CORY e ADAMS, 2002; BURLACU, 2003; KROEMER, GALLUZZI e BRENNER, 2007; YOULE e STRASSER, 2008; FRENZEL et al., 2009). Assim, com o objetivo de avaliar se a apoptose induzida pelas chalconas 13 e 26 envolvia a via intrínseca, analisamos o efeito destes compostos sobre a expressão das proteínas Bcl-2 e Bax e sobre o potencial mitocondrial das células K562 e Jurkat.

Como pode ser observado na Figura 11 a chalcona 26 causou diminuição significativa da expressão da proteína antiapoptótica Bcl-2 nas células K562 e Jurkat, entretanto, a incubação dessas células com a chalcona 13, somente causou diminuição significativa na expressão da proteína Bcl-2 nas células Jurkat. A avaliação da expressão da proteína proapoptótica Bax (Figura 12) revelou que a incubação das chalconas 13 e 26 com as células K562 causou aumento significativo na expressão dessa proteína. No entanto, a expressão da proteína Bax não apresentou alteração significativa após a incubação das células Jurkat com as chalconas 13 e 26. Estes resultados concordam com o estudo de Hsu et al. (2006), o qual demonstrou que chalconas induzem células de câncer de mama humano a apoptose por meio do aumento da expressão da proteína Bax e diminuição da proteína Bcl-2. Mecanismo semelhante foi demonstrado por Pedrini et al. (2010), onde chalconas derivadas do 2-naftaldeído causaram aumento da expressão da proteína Bax e diminuição da proteína Bcl-2 em células murinas de leucemia linfoblástica aguda L-1210. Alguns trabalhos relatam que a superexpressão da proteína Bcl-2 tem mostrado ser um fator de mau prognóstico nos pacientes com LA (KUSENDA, 1998; RUVOLO, DENG e MAY, 2001), e que a mudança da proporção Bax:Bcl-2 predispõe a célula à apoptose (CORY e ADAMS, 2002). Nossos resultados corroboram com essa afirmativa, pois, o tratamento com as chalconas causou uma redução da expressão da proteína antiapoptótica Bcl-2 e/ou aumento da proteína proapoptótica Bax e indução da apoptose.

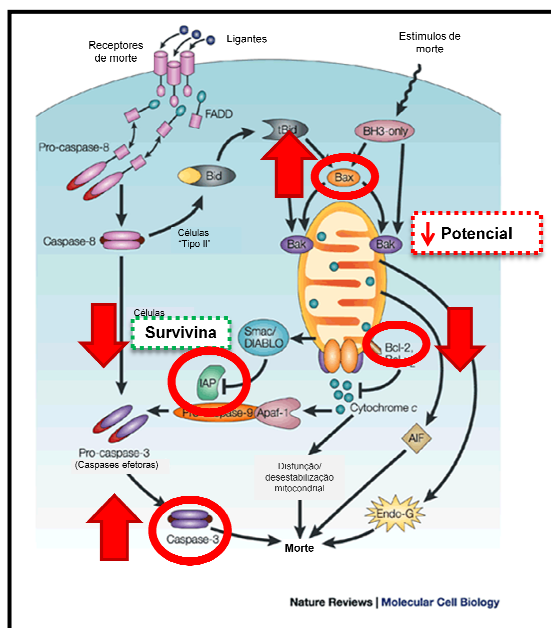
Como citado anteriormente, as proteínas da família Bcl-2 regulam a permeabilidade de membrana mitocondrial e o potencial da mesma. Após 12 h de incubação com as chalconas 13 e 26, observou-se que ambas as linhagens celulares apresentaram redução significativa do potencial de membrana mitocondrial (Figura 10). Esses resultados aliados às alterações de expressão das proteínas Bcl-2 e Bax indicam que o mecanismo de indução de apoptose destes compostos envolve a via intrínseca da apoptose.

Tanto a via intrínseca como a extrínseca convergem para a fase de execução da apoptose, quando ocorre a ativação das caspases executoras (caspases-3, -6 e -7) (PERES e CURI, 2005; ELMORE, 2007). Desta forma, investigamos se a ativação da via intrínseca causada pelas chalconas 13 e 26 levava a um aumento de expressão da caspase-3 ativa. Os resultados encontrados mostram que a incubação das células K562 e Jurkat com essas chalconas causa um aumento expressivo da expressão da caspase-3 ativa, após 6 h de incubação. Esses resultados corroboram com Winter et al. (2010), que demonstraram que chalconas derivadas da 2-naftilacetofenona causam morte celular por apoptose com aumento da atividade da caspase-3.

Tanto as caspases iniciadoras quanto as efetoras têm sua atividade inibida pelas proteínas antiapoptóticas IAPs (ADIDA et al., 2000; ZAFFARONI, PENNATI, DAIDONE, 2005; MITA, MITA e TOLCHER, 2006; HUNTER, LACASSE e KORNELUK, 2007). Uma destas IAPs, a proteína survivina, desempenha um papel importante na divisão celular (ZAFFARONI, PENNATI, DAIDONE, 2005; FULDA, 2009). Alguns trabalhos mostram que essa proteína é expressa em altas concentrações na fase G2/M do ciclo celular e está rapidamente diminuída após a parada do mesmo (ADAMS e CORY, 1998; ZAFFARONI, PENNATI, DAIDONE, 2005). Assim, a superexpressão da survivina tem sido relacionada a um prognóstico desfavorável e diminuição de sobrevida em pacientes com câncer (ZAFFARONI, PENNATI, DAIDONE, 2005, NAKAYAMA e KAMIHIRA, 2002), e ao desenvolvimento de resistência a quimioterápicos (ALTIERI, 2001; WRZESIEN-KUS et al., 2004; ZAFFARONI, PENNATI, DAIDONE., 2005). Como a survivina também representa um alvo para o tratamento do câncer, investigamos se alterações na expressão desta proteína estão relacionadas ao mecanismo de ação citotóxico das chalconas 13 e 26. Como pode ser observado na Figura 15, as células K562 e Jurkat apresentaram diminuição na expressão da survivina após 24 h de incubação com as chalconas 13 e 26. Este resultado corrobora com o trabalho de Sakai et al. (2011), no qual mostraram que chalconas

possuem efeitos proapoptóticos em células de linhagem de sarcoma sinovial e que o mecanismo pelo qual atuam envolve a diminuição da expressão da proteína survivina; e com o trabalho de LOU et al. (2010), que relata que 2',4'-diidroxichalconas causam apoptose em células humanas de câncer gástrico por meio da diminuição da expressão de survivina e aumento da atividade de caspase-3.

Em conjunto, os resultados obtidos neste trabalho permitem concluir que as chalconas 13, 16, 19 e 26 causam apoptose em células de leucemia mieloide aguda K562 e de leucemia linfóide aguda Jurkat humanas. E que esta atividade envolve a inibição da proliferação celular e a indução da apoptose por meio da ativação da via intrínseca, como pode ser observado no Esquema 7, o qual mostra o mecanismo proposto de citotoxicidade induzido por essas chalconas. Desta maneira, chalconas derivadas da 2,4,5-trimetoxiacetofenona consistem em compostos bioativos promissores para o possível desenvolvimento como fármaco antileucêmico, no entanto, estudos mais detalhados serão necessários.



Esquema 7: Mecanismo proposto de citotoxicidade induzido pelas chalconasalchalconas derivadas da 2,4,5-trimetoxiacetofenona.

Fonte: Adaptado de TILLY (2001).

7. CONCLUSÕES

Os resultados do presente estudo permitem concluir que:

- As chalconas derivadas da 2,4,5-trimetoxiacetofenona e do 2',4',5'-trimetoxibenzaldeído apresentaram efeito citotóxico estatisticamente significativo contra as células humanas de leucemia mieloide aguda K562, exceto as chalconas 1, 27, 40 e 46. E dentre as chalconas avaliadas, as chalconas 13, 16, 19 e 26 apresentaram maior redução da viabilidade celular, entretanto não há uma relação entre estrutura e atividade baseada nas características eletrônicas destes compostos.
- As chalconas 13, 16, 19 e 26 causam redução na viabilidade celular das células humanas de leucemia mieloide aguda K562 e das células humanas de leucemia linfóide aguda Jurkat de maneira dependente da concentração e do tempo de incubação.
- As chalconas 13, 16, 19 e 26 não causaram efeito citotóxico contra as células mononucleares de indivíduos saudáveis.
- As chalconas 13, 16, 19 e 26 causaram aumento na proporção de células na fase Sub G0/G1 nas células Jurkat, e as chalconas 13 e 26 causaram mesmo efeito na célula K562.
- As chalconas 13 e 26 causaram diminuição da expressão da proteína Ki67 nas células K562 e Jurkat.
- As chalconas 13, 16, 19 e 26 causam morte celular por meio da indução da apoptose nas células K562 e Jurkat.
- A apoptose induzida pelas chalconas 13 e 26 envolve a ativação da via intrínseca, evidenciada pela diminuição do potencial mitocondrial, diminuição da expressão da proteína antiapoptótica Bcl-2 e aumento da expressão da proteína proapoptótica Bax nas células K562 e Jurkat.
- A apoptose induzida pelas chalconas 13 e 26 envolve também o aumento da expressão da caspase-3 ativa, diminuição da expressão da proteína antiapoptótica survivina e diminuição da expressão da proteína p53 mutada.

PERSPECTIVAS

Para elucidar mais detalhadamente o mecanismo de apoptose induzido pelas chalconas derivadas da 2,4,5-trimetoxiacetofenona tem-se como perspectivas:

- Investigar outras proteínas reguladoras do ciclo celular para avaliar mais detalhadamente os efeitos das chalconas sobre o ciclo celular.
- Investigar o envolvimento da via extrínseca e a interligação entre as vias extrínseca e intrínseca na apoptose induzida por estas chalconas.

REFERÊNCIAS

ABBAS, T.; DUTTA, A. P21 in Cancer: Intricate Networks and Multiple Activities. **Nat Rev Cancer**. v. 9, n. 6, p. 400-414, 2009

ACHANTA, G.; MODZELEWSKA, A.; FENG, L.; KHAN, S. R.; HUANG, P. A Boronic-Chalcone Derivative Exhibits Potent Anticancer Activity through Inhibition of the Proteasome. **Mol Pharmacol**, v. 70, p. 426-433, 2006.

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

ADIDA, C.; HAIOUN, C.; GAULARD, P.; LEPAGE, E.; MOREL, P.; BRIERE, J.; REYES, D. F.; DIEBOLD, J.; GISSELBRECHT, C.; SALLES, G.; ALTIERI, D. C.; MOLINA, A. T. Prognostic Significance of Survivin Expression in Diffuse Large B-cell Lymphomas. **Blood**, v. 96, n.5, p. 1921-1925, 2000.

ALTIERI, D. C. The molecular basis and potencial role of survivin in cancer diagnosis and therapy. **Trends mol med**, v. 7, n. 12, p. 542-547, 2001.

ANTONSSON, B. Mitochondria and the Bcl-2 Family Proteins in Apoptosis Signaling Pathways. **Mol Cell Biochem**, v. 256/257, p. 141-155, 2004.

AUTRET, A.; MARTIN, S. J. Emerging role for members of the Bcl-2 family in Mitochondrial morphogenesis. **Molecular cell**, v. 36, n. 3, p. 355-363, 2009.

BAIN, B. J. **Diagnóstico em Leucemias**. 2. ed. Rio de Janeiro: Revinter Ltda, 2003.

BANDGAR, B. P.; GAWANDE, S. S.; BODADE, R. G.; TOTRE, J. V.; KHOBRAGADE, C. N. Synthesis and biological evaluation of simple methoxylated chalcones as anticancer, anti-inflammatory and antioxidant agents. **Bioorg Med Chem**, v. 18, n. 3, p. 1364-1370, 2010.

BASSAN, R.; GATTA, G.; TONDINI, C.; WILLEMZE, R. Adult acute lymphoblastic leukaemia. **Crit Rev Oncol Hematol**, v.50, n.3, p.223-261, 2004.

- BATOVSKA, D.I.; TODOROVA, I. T. Trends in utilization of the pharmacological potential of chalcones. **Curr Clin Pharmacol**, v.5, n.1, p.1-29, 2010.
- BELIZÁRIO, J. E.; ALVES, J.; OCCHIUCCI, J. M.; GARAY-MALPARTIDA, M.; SESSO, A. A mechanistic view of mitochondrial death decision pores. **Braz J Med Biol Res**, v. 40, n. 8, p. 1011-1024, 2007.
- BÉNÉ, M. C.; BERNIER, M.; CASASNOVAS, R.O.; CASTOLDI, G.; DOEKHARAN, D.; VAN DER HOLT. B.; KNAPP, W.; LEMEZ, P.; LUDWIG, W. D.; MATUTES, E.; ORFAO, A.; SCHOCH, C.; SPERLING, C.; VANT VEER, M. B. Acute myeloid leukaemia M0: haematological, immunophenotypic and cytogenetic characteristics and their prognostic significance: an analysis in 241 patients. **Br J Haematol**, v. 113, n. 3, p. 737-745, 2001.
- BENNETT, J. M.; CATOVSKY, D.; DANIEL, M. T.; FLANDRIN, G.; GALTON, D. A.; GRALNICK, H. R.; SULTAN, C. Proposals for the classification of the acute leukaemias. French-American-British (FAB) co-operative group. **Br J Haematol**, v.33, n.4, p.451-458, 1976.
- BERTRAM, J. S. The molecular biology of cancer. **Mol Aspects Med**, v. 21, n. 6, p. 167-223, 2000.
- BOYA, P.; PAULEAU, A-L.; PONCET, D.; GONZALEZ-POLO, R-A.; ZAMZAMI, N.; KROEMER, G. Viral proteins targeting mitochondria: controlling cell death. **Biochim Biophys Acta**, v.1659, p.178 – 189, 2004.
- BRIDGER, J. M.; KILL, I. R.; LICHTER, P. Association of pKi-67 with satellite DNA of the human genome in early G1 cells. **Chromosome Res**, v. 6, n. 1, p. 13-24, 1998.
- BROWN, D. C.; GATTER, K. C. Ki67 protein: the immaculate deception? **Histopathology**, v. 40, n. 1, p. 2-11, 2002.
- BURLACU, A. Regulation of Apoptosis by Bcl-2 Family Proteins. **J Cell Mol Med**, v. 7, n. 3, p. 249-257, 2003.

CAI, Z.; LIN, M.; WUCHTER, C.; RUPPERT, V.; DORKEN, B.; LUDWIG, W. D.; KARAWAJEW, L. Apoptotic response to homoharringtonine in human wt p53 leukemic cells is independent of reactive oxygen species generation and implicates Bax translocation, mitochondrial cytochrome c release and caspase activation. **Leukemia**, v. 15, p.567-574, 2001.

CAMPBELL, M. K. **Bioquímica/ Mary K Campbell**. 3 ed. Porto Alegre: Artmed Editora, 2006. 752 p.

CAMPOS, L.; SABIDO, O.; VIALLET, A.; VASSELON, C.; GUYOTAT, D. Expression of apoptosis-controlling proteins in acute leukemia cells. **Leuk Lymphoma**, v.33, n.5-6, p.499-509, 1999.

CHAUDHARI, B. R.; MURPHY, R. F.; AGRAWAL, D. K. Following the TRAIL to apoptosis. **Immunol Res**, v. 35, n. 3, p. 249-262, 2006.

CHEN, Z. H.; ZHENG, C. J.; SUN, L. P.; PIAO, H. R. Synthesis of new chalcone derivatives containing a rhodanine-3-acetic acid moiety with potential anti-bacterial activity. **Eur J Med Chem**, v. 45, n. 12, p. 5739-5743, 2010.

CHENG, J. H.; HUNG, C. F.; YANG, S.C.; WANG, J. P.; WON ,S. J.; LIN, C. N. Synthesis and cytotoxic, anti-inflammatory, and anti-oxidant activities of 2',5'-dialkoxylchalcones as cancer chemopreventive agents. **Bioorg Med Chem**, v. 16, n. 15, p. 7270-7276, 2008.

CORY, S.; ADAMS, J. M. The Bcl-2 Family: Regulators of the Cellular Life-or-Death Switch. **Nature Reviews**, v. 2, p. 647-656, 2002.

CRAWFORD, E. D.; WELLS, J. A. Caspase substrates and cellular remodeling. **Annu Rev Biochem**, v. 80, p. 1055-87, 2011.

CRUCHTEN, S. VAN; DEN BROECK, W. VAN. Morphological and biochemical aspects of apoptosis, oncosis and necrosis. **Anat Histol Embryol**, v. 31, n. 4, p. 2142-23, 2002.

DANIAL, N.; KORSMEYER, S. J. Cell DeathCritical Control Points. **Cell**, v. 116, n. 2, p. 205-219, 2004.

DE OLIVEIRA, F.; CHAUVIN, C.; RONOT, X.; MOUSSEAU, M.; LEVERVE, X.; FONTAINE, E. Effects of permeability transition inhibition and decrease in cytochrome c content on doxorubicin toxicity in K562 cells. **Oncogene**, v.25, p.2646-2655, 2006.

DEBNATH, J.; BAEHRECKE, E. H.; KROEMER, G. Does Autophagy Contribute to Cell Death ? **Autophagy**, v. 1, n.2, p. 66-74, 2005.

DHAR, D.N. **The Chemistry of Chalcones and Related Compounds**, John Wiley, New York, 1981.

DIEFENBACH, J.; BÜRKLE, A. Introduction to poly(ADP-ribose) metabolism. **Cell Mol Life Sci**, v. 62, p. 721-730, 2005.

DUCKI, S.; FORREST, R.; HADFIELD, J. A.; KENDALL, A.; LAWRENCE, N. J.; MCGOWN, A. T.; RENNISON, D. Potent antimetabolic and cell growth inhibitory properties of substituted chalcones. **Bioorg Med Chem Lett**, v. 8, p. 1051-1056, 1998.

DUCKI, S.; RENNISON, D.; WOO, M.; KENDALL, A.; CHABERT, J. F. D.; MCGOWN, A. T.; LAWRENCE, N. J. Combretastatin-like chalcones as inhibitors of microtubule polymerization. Part 1: Synthesis and biological evaluation of antivascular activity. **Bioorg Med Chem**, v. 17, p.7698-7710, 2009.

ELMORE, S. Apoptosis: a review of programmed cell death. **Toxicol Pathol**, v. 35, n. 4, p. 495-516, 2007.

ENARI, M.; SAKAHIRA, H.; YOKOYAMA, H.; OKAWA, K.; IWAMATSU, A.; NAGATA, S. A caspase-activated DNase that degrades DNA during apoptosis, and its inhibitor ICAD. **Nature**, v. 391, n. 6662, p. 43-50, 1998.

ENDL, E.; GERDES, J. The Ki-67 protein: fascinating forms and an unknown function. **Exp Cell Res**, v. 257, n. 2, p. 231-237, 2000.

ENGELAND, M. V.; NIELAND, L. J. W.; RAMAEKERS, F. C. S.; SCHUTTE, B.; REUTELINGSPERGER, C. P. M. Annexin V-affinity assay: a review on an apoptosis detection system based on phosphatidylserine exposure. **Cytometry**, v. 31, n. 1, p. 1-9, 1998.

ESTEY, E. H. Therapeutic options for acute myelogenous leukemia. **Cancer**, v.92, n.5, p.1059-1073, 2001.

FADERL, S.; JEHA, S.; KANTARJIAN, H. The Biology and Therapy of Adult Acute Lymphoblastic Leukemia. **Cancer**, v.98, n.7, p. 1337-1354, 2003.

FERLAY, J.; SHIN, H. R.; BRAY, F.; FORMAN, D.; MATHERS, C.; PARKIN, D. M. GLOBOCAN 2008 v1.2, Cancer Incidence and Mortality Worldwide: IARC CancerBase N°. 10. Lyon, France: International Agency for Research on Cancer; 2010. Disponível em: <<http://globocan.iarc.fr>, accessed on day/month/year> Acesso em: 06 de dezembro de 2011.

FERREIRA, C. G.; ROCHA, J. C. **Oncologia Molecular**. São Paulo: Editora Atheneu, 2004. 469 p.

FILHO, G. B.; GUIMARÃES, R. C.; BOGLIOLO, L. Capítulo 8: Distúrbios do crescimento e da diferenciação celular. In: FILHO, G. B. **BOGLIOLO: Patologia Geral**. 2 ed. Rio de Janeiro: Editora Guanabara Koogan S.A., 1998. p. 148-192.

FRANKS, L.M.; TEICH, N.M. **Introduction to the cellular and molecular biology of cancer**. Oxford University Press Inc: New York, 1998.

FRENZEL, A.; GRESPI, F.; CHMELEWSKIJ, W.; VILLUNGER, A. Bcl2 family proteins in carcinogenesis and the treatment of cancer. **Apoptosis**, v. 14, n. 4, p. 584-596, 2009.

FRIDMAN, J. S.; LOWE, S. W. Control of apoptosis by p53. **Oncogene**, v. 22, n. 56, p. 9030-9040, 2003.

FULDA, S. Cell death in hematological tumors. **Apoptosis**, v. 14, n. 4, p. 409-423, 2009.

GHOBRIAL, I. M.; WITZIG, T. E.; ADJEI, A. A. Targeting apoptosis pathways in cancer therapy. **CA Cancer J Clin**, n. 55, p. 178-194, 2005.

GIONO, L. E.; MANFREDI, J. J. The p53 Tumor Suppressor Participates in Multiple Cell Cycle Checkpoints **J Cell Physiol**, v. 209, n.1, p. 13-20, 2006.

GOL B, J.; ZAGOZDZON, R.; KAMINSKI, R.; KOZAR, K.; GRYSKA, K.; IZYCKI, D.; MACKIEWICZ, A.; STOKLOSA, T.; GIERMASZ, A.; LASEK, W.; JAKOBISIAK, M. Potentiated antitumor effectiveness of combined chemo-immunotherapy with interleukin-12 and 5-fluorouracil of L1210 leukemia in vivo. **Leukemia**, v.15, n.4, p.613-620, 2001.

GONG, J.; TRAGANOS, F.; DARZYNKIEWICZ, Z. A Selective Procedure for DNA Extraction from Apoptotic Cells Applicable for Gel Electrophoresis and Flow Cytometry. **Analytical Biochemistry**, v. 218, n. 2, p. 314-319, 1994.

GUIMARÃES, J. R. Q. **Manual de Oncologia**. 1. São Paulo: BBS Editora, 2004.

HANAHAN, D.; WEINBERG, R. A. The hallmarks of cancer. **Cell**, v.100, n.1, p.57-70, 2000.

HARTWELL, L. H.; WEINERT, T. A. Checkpoints: Controls that Ensure the Order of Cell Cycle Events. **Science**, v. 246, p. 629-634, 1989.

HERR, I.; DEBATIN, K. M. Cellular stress response and apoptosis in cancer therapy. **Blood**, v.98, n.9, p.2603-14, 2001.

HIRAKAWA, A; TAKEYAMA, N; NAKATANI, T.; TANAKA, T. Mitochondrial Permeability Transition and Cytochrome c Release in Ischemia-Reperfusion Injury of the Rat Liver. **J Surg Res**, v. 111, p. 240-247, 2003.

HSU, Y.L.; KUO, P.L.; TZENG, W.S.; LIN, C.C. Chalcone inhibits the proliferation of human breast cancer cell by blocking cell cycle progression and inducing apoptosis. **Food Chem Toxicol**, v.44, p. 704–713, 2006.

HUNTER, A. M.; LACASSE, E. C.; KORNELUK, R. G. The Inhibitors of Apoptosis (IAPs) as Câncer Targets. **Apoptosis**, v. 12, p. 1543-1568, 2007.

INCA. **Estimativa 2010: incidência de câncer no Brasil**. Rio de Janeiro: INCA, 2009.

INCA. **Estimativa 2012 : incidência de câncer no Brasil**. Rio de Janeiro: INCA, 2011.

ISLAM, A. The origin and spread of human leukemia. **Med hypotheses**, v. 39, n. 1, p. 110-118, 1992.

JIANG, X.; WANG, X. Cytochrome C-mediated apoptosis. **Annu Rev Biochem**, v. 73, p. 87-106, 2004.

JOHNSON, D. G.; WALKER, C. L. Cyclins and cell cycle checkpoints. **Annu. Rev. Pharmacol. Toxicol**, v. 39, p. 295-312, 1999.

KASTAN, M. B.; ONYEKWERE, O.; SIDRANSKY, D.; VOGELSTEIN, B.; CRAIG, R. Participation of p53 Protein in the Cellular Response to DNA Damage. **Cancer Res**, v. 51, p. 6304-6311, 1991.

KEBRIAIEI, P.; ANASTASI, J.; LARSON, R. A. Acute lymphoblastic leukemia: diagnosis and classification. **Best Pract Res Clin Hematology**, v.15, n.4, p.597-621, 2003.

KERR, J. F. R.; WYLLIE, A. H.; CURRIE, A. R. Apoptosis: a basic biological phenomenon with wide-ranging implications in tissue kinetics. **Br. J. Cancer**, v. 26, p. 239-257, 1972.

KROEMER, G.; GALLUZZI, L.; BRENNER, C. Mitochondrial Membrane Permeabilization in Cell Death. **Physiol Rev**, v.87, p. 99 - 163, 2007.

KROEMER, G.; GALLUZZI, L.; VANDENABEELE, P.; ABRAMS, J.; ALNEMRI, E. S.; BAEHRECKE, E. H.; BLAGOSKLONNY, M. V.; EL-DEIRY, W. S.; GOLSTEIN, P.; GREEN, D. R.; HENGARTNER, M.; KNIGHT, R. A.; KUMAR, S.; LIPTON, S.

A.; MALORNI, W.; NUÑEZ, G.; PETER, M. E.; TSCHOPP, J.; YUAN, J.; PIACENTINI, M.; ZHIVOTOVSKY, B.; MELINO, G. Classification of cell death: recommendations of the Nomenclature Committee on Cell Death 2009. **Cell Death Differ**, v. 16, n. 1, p. 3-11, 2009.

KUERBITZ, S. J.; PLUNKETT, B. S.; WALSH, W. V.; KASTAN, M. B. Wild-type p53 is a Cell Cycle Checkpoint Determinant Following Irradiation. **Proc Natl Acad Sci USA**, v. 89, p. 7491-7495, 1992.

KUMAR, V.; ABBAS, A. K.; FAUSTO, N.; ASTER, J. C. **Robbins & Cotran: Bases patológicas das doenças**. 8 ed. Rio de Janeiro: Elsevier, 2010. 1458 p.

KUROKAWA, M.; KORNBLUTH, S. Caspases and kinases in a death grip. **Cell**, v. 138, n. 5, p. 838-854, 2009.

KUSENDA, J. Bcl-2 family proteins and leukemia. Minireview. **Neoplasma**, v.45, n.3, p.117-122, 1998.

LAVRIK, I. N.; GOLKS, A.; KRAMMER, P. H. Caspases : pharmacological manipulation of cell death. **J Clin Invest**, v. 115, n. 10, 2005.

LAW, J. C.; RITKE, M. K.; YALOWICH, J. C.; LEDER, G. H. FERREL, R. E. Mutational inactivation of the p53 gene in the human erythroid leukemic K562 cell line. **Leuk Res**, v. 17, n.12, p. 1045-1050, 1993.

LAWRENCE, N. J.; PATTERSON, R.P.; OOI, L. L.; COOK, D.; DUCKI, S. Effects of alpha-substitutions on structure and biological activity of anticancer chalcones. **Bioorg Med Chem Lett**, v. 16, n. 22, p. 5844-5848, 2006.

LEIST, M.; NICOTERA, P. The shape of cell death. **Biochem. Biophys. Res. Commun**, v. 236, p. 236, 1-9, 1997.

LESZCZYŃECKA, M.; ROBERTS T.; DENT P.; GRANTE, S.; FISCHER, P. B. Differentiation Therapy of Human Cancer: Basic Science and Clinical Applications. **Pharmacol Ther**, v. 90, p. 105-156, 2001.

LEVINE, A. J. p53, the cellular gatekeeper for growth and division. **Cell**, n. 88, p.323-331, 1997.

LI, L.; ZHAO, X. T.; LUO, Y. P.; ZHAO, J. F.; YANG, X. D.; ZHANG, H. B. Novel cytotoxic chalcones from *Litsea rubescens* and *Litsea pedunculata*. **Bioorg Med Chem Lett**, v.21, n.24, p.7431-7433, 2011.

LIU, X.; GO, M. L. Antiproliferative properties of piperidinylchalcones. **Bioorg Med Chem**, v. 14, n. 1, p. 153-163, 2005.

LIVINGSTONE, L.; WHITE, A.; SPROUSE, J.; LIVANOS, E.; JACKS, T.; TLSTY, T. Altered Cell Cycle Arrest and Gene Amplification Potencial Accompany Loss of Wild-Type p53. **Cell**, v. 70, p. 923-935, 1992.

LODISH, H.; BERK, A.; ZIPURSKY, S. L.; MATSUDAIRA, P.; BALTIMORE, D.; DARNRLL, J. E. **Molecular Cell Biology**. 4 ed. New York, W. H. Freeman. W. H. Reeman, 2000. 1184 p.

LOU, C.; YANG, G.; CAI, H.; ZOU, M.; XU, Z.; LI, Y.; ZHAO, F.; LI, W.; TONG, L.; WANG, M.; CAI, B. 2',4'-Dihydroxychalcone-induced apoptosis of human gastric cancer MGC-803 cells via down-regulation of survivin Mrna. **Toxicol In Vitro**, v. 24, p. 1333-1337, 2010.

LU, Y.; CHEN, G. Q. Effector caspases and leukemia. **Int J Cell Biol** [In press]. 2011.

LUQMANI, Y. A. Mechanisms of drug resistance in cancer chemotherapy. **Med Princ Pract**, v.14, p.35-48, 2005.

MACCALLUM, D. E.; HALL, P. A. The location of pKi67 in the outer dense fibrillary compartment of the nucleolus points to a role in ribosome biogenesis during the cell division cycle. **J. Pathol**, v. 190, p. 537-544, 2000.

MAIA, R.C.; CARRICO, M. K.; KLUMB, C. E.; NORONHA, H.; COELHO, A. M.; VASCONCELOS, F.C.; RUIMANEK, V. M. Clinical approach to circumvention of multidrug resistance in refractory leukemic patients: association of cyclosporin A with etoposide. **J Exp Clin Cancer Res**, v. 16, n. 14, p. 419-424, 1997.

MALUMBRES, M.; BARBACID, M. Cell cycle, CDKs and cancer: a changing paradigm. **Nat Rev Cancer**, v. 9, n. 3, p. 153-166, 2009.

MATTSON, M.; KROEMER, G. Mitochondria in cell death: novel targets for neuroprotection and cardioprotection. **Trends Mol Med**, v.9, p.196-205, 2003.

MEEK, D. W. Tumour suppression by p53: a role for the DNA damage response? **Nature Rev Cancer**, v. 9, n. 10, p. 714-723, 2009.

MELET, A.; SONG, K.; BUCUR, O.; JAGANI, Z.; GRASSIAN, A. R.; KHOSRAVI-FAR, R. Apoptotic pathways in tumor progression and therapy. **Adv Exp Med Biol**, v. 615, p. 47-79, 2008.

MIGNOTTE, B.; VAYSSIERE, J. L. Review Mitochondria and apoptosis. **Eur. J. Biochem**, v. 252, p. 1-15, 1998.

MITA, M. M.; MITA, A. C.; TOLCHER, A. W. Apoptosis: mechanisms and implications for cancer therapeutics. **Targeted Oncology**, v. 1, n. 4, p. 197-214, 2006.

MODJTAHEDI, N.; GIORDANETTO, F.; MADEO, F.; KROEMER, G. Apoptosis-inducing factor: vital and lethal. **Trends in cell biology**, v. 16, n. 5, p. 264-272, 2006.

MOUBARAK, R. S. YUSTE, V. J. ARTUS, C., BOUHARROUR, A.; GREER, P. A.; MENISSIER-DE MURCIA, J.; SUSIN, S. A. Sequential activation of poly(ADP-ribose) polymerase 1, calpains, and Bax is essential in apoptosis-inducing factor-mediated programmed necrosis. **Molecular and cellular biology**, v. 27, n. 13, p. 4844-62, 2007.

MULLER, P. A. J.; CASWELL, P. T.; DOYLE, B.; IWANICKI, M. P.; TAN, E. H.; KARIM, S.; LUKASHCHUK, N.; GILLESPIE, D. A.; LUDWIG, R. L.; GOSSELIN, P.; CROMER, A.; BRUGGE, J. S.; SANSOM, O. J.; NORMAN, J. C.; VOUSDEN, K. H. Mutant p53

Drives Invasion by Promoting Integrin Recycling. **Cell**, v. 139, p. 1327-1341, 2009.

NAGATA, S. Apoptotic DNA fragmentation. **Exp Cell Res**, v. 256, n. 1, p. 12-18, 2000.

NAGATA, S.; NAGASE, H.; KAWANE, K.; MUKAE, N.; FUKUYAMA, H. Degradation of chromosomal DNA during apoptosis. **Cell Death Differ**, v. 10, n. 1, p. 108-116, 2003.

NAKATANI, N.; ICHIMARU, M.; MORIYASU, M.; KATO, A. Induction of Apoptosis in Human Promyelocytic Leukemia Cell Line HL-60 by C-Benzylated Dihydrochalcones, Uvaretin, Isouvaretin and Diuvaretin. **Biol. Pharm. Bull**, v. 28, p. 83-86, 2005.

NAKAYAMA, K.; KAMIHIRA, S. Survivin an important determinant for prognosis in adult T-cell leukemia: a novel miomarker in practical hemato-oncology. **Leuk Lymphoma**, v. 43, n. 12, p. 2249-2255, 2002.

NCCN. NCCN Clinical Practice Guidelines in Oncology: Acute Myeloid Leukemia Disponível em:
<http://www.nccn.org/professionals/physician_gls/f_guidelines.asp#site>. Acesso em: 14 de dezembro de 2011.

NIELSEN, S. F.; BOESEN, T.; LARSEN, M.; SCHONNING, K.; KROMANN, H. Antibacterial chalcones-bioisosteric replacement of the 4'-hydroxy group. **Bioorg Med Chem**, v. 12, n. 11, p. 3047-3054, 2004.

OMS. WORLD HEALTH ORGANIZATION. **Cancer. Fact sheet N°297**. Geneva: World Health Organization; c2007 [cited 2007 oct. 10]. Disponível em:
<<http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs297/en/>>. Acesso em: 04 de dezembro de 2011.

ONG, Y. L.; MCMULLIN, M. F.; BAILIE, K. E.; LAPPIN, T. R.; JONES, F. G.; IRVINE, A. E. High bax expression is a good prognostic indicator in acute myeloid leukaemia. **Br J Haematol**, v.111, n.1, p.182- 189, 2000.

ORLIKOVA, B.; TASDEMIR, D.; GOLAIS, F.; DICATO, M.; DIEDERICH, M. Dietary chalcones with Chemopreventive and chemotherapeutic potential. **Genes Nutr**, v. 6, p.125-147, 2011.

OW, Y. L. P.; GREEN, D. R.; HAO, Z.; MAK, T. W. Cytochrome c : functions beyond respiration. **Cancer**, v. 9, p. 532-542, 2008.

PEDRINI, F. S.; CHIARADIA, L. D.; LICÍNIO, M. A.; MORAES, A. C. R.; CURTA, J. C.; COSTA, A.; MASCARELLO, A.; CRECZINSKY-PASA, T. B.; NUNES, R. J.; YUNES, R. A.; SANTOS-SILVA, M. C. Induction of apoptosis and cell cycle arrest in L-1210 murine lymphoblastic leukaemia cells by (2E)-3-(2-naphthyl)-1-(3'-methoxy-4'-hydroxy-phenyl)-2-propen-1-one. **J Pharm Pharmacol**, v. 62, n. 9, p. 1128-1136, 2010.

PEJOVIC, T.; SCHWARTZ, P. E. Leukemias. **Clin Obstet Gynecol**, v.45, n.3, p.866-78, 2002.

PERES, C. M.; CURI, R. **Como cultivar células**. Rio de Janeiro: Editora Guanabara Koogan, 2005, 283p.

PUI, C. H.; EVANS, W. E. Acute Lymphoblastic Leukemia. **N Engl J Med**, v. 339, p. 605-615, 1998.

RAO, Y. K.; FANG, S. H.; TZENG, Y. M. Differential effects of synthesized 2'-oxygenated chalcone derivatives: modulation of human cell cycle phase distribution. **Bioorg Med Chem**, v. 12, n. 10, p. 2679-2686, 2004.

RASTOGI, R. P.; SINHA, R. P. Apoptosis: molecular mechanisms and pathogenicity. **Organization**, v. 8, p. 155-181, 2009.

RENVOIZÉ, C.; BIOLA, A.; PALLARDY, M.; BRÉARD, J. Apoptosis : Identification of dying cells. **Cell Biol Toxicol**, v. 14, n.2, p. 111-120, 1998.

RIEDL, S. J.; SHI, Y. Molecular mechanisms of caspase regulation during apoptosis. **Nat Rev Mol Cell Biol**, v. 5, n. 11, p. 897-907, 2004.

ROBAK, T.; WIERZBOWSKA, A. Current and Emerging Therapies for Acute Myeloid Leukemia. **Clin Ther**, v. 31, p. 2349-2370, 2009.

ROLLAND, S. G.; CONRADT, B. New role of the BCL2 family of proteins in the regulation of mitochondrial dynamics. **Curr Opin Cell Biol**, v. 22, n. 6, p. 852-858, 2010.

ROMAGNOLI, R.; BARALDI, P. G.; CARRION, M. D.; CARA, C. L.; CRUZ-LOPEZ, O.; PRETI, D.; TOLOMEO, M.; GRIMAUDO, S.; DI CRISTINA, A.; ZONTA, N.; BALZARINI, J.; BRANCALE, A.; SARKAR, T.; HAMEL, E. Design, synthesis, and biological evaluation of tiophene analogues of chalcones. **Bioorg Med Chem**, v. 16, p. 5367-5376, 2008.

RUBNITZ, J. E. Childhood acute myeloid leukemia. **Curr Treat Options Oncol**, v.9, n.1, p.95-105, 2008.

RUVOLO, P. P.; DENG, X.; MAY, W. S. Phosphorylation of Bcl2 and regulation of apoptosis. **Leukemia**, v.15, n.4, p.515-522, 2001.

SAKAI, T.; ESKANDER, R. N.; GUO, Y.; KIM, K. J.; MEFFORD, J.; HOPKINS, J.; BHATIA, N. N.; ZI, X.; HOANG, B. H. Flavokawain B, a Kava Chalcone, Induces Apoptosis in Synovial Sarcoma Cell Lines. **J Orthop Res** [In press]. 2011.

SAYDAM, G.; AYDIN, H. H.; SAHIN, F.; KUCUKOGLU, O.; ERCIYAS, E.; TERZIOGLU, E.; BUYUKKECECI, F.; OMAI, S. B. Cytotoxic and inhibitory effects of 4,4_-dihydroxy chalcone (RVC-588) on proliferation of human leukemic HL-60 cells. **Leuk Res**, v. 27, p. 57-64, 2003.

SCHAFFER, K. A. The Cell Cycle: A Review. **Vet Pathol**, v. 35, n. 6, p. 461-478, 1998.

SCHIMMER, A. D. Apoptosis in leukemia: from molecular pathways to targeted therapies. **Best Pract Res Clin Haematol**, v. 21, n. 1, p. 5-11, 2008.

SCHOLZEN, T.; GERDES, J. The Ki-67 Protein: From the known and the Unknown. **J Cell Physiol**, v. 182, p. 311-322, 2000.

SCHWARTZ, G. K.; SHAH, M. Targeting the Cell Cycle: A New Approach to Cancer Therapy. **J Clin Oncol**, v. 23, n. 36, p. 9408-9421, 2005.

SCOVASSI, A. I.; DIEDERICH, M. Modulation of poly(ADP-ribose) in apoptotic cells. **Biochem Pharmacol**, v. 68, n. 6, p. 1041-1047, 2004.

SENDEROWICZ, A. M. Novel direct and indirect cyclin-dependent kinase modulators for the prevention and treatment of human neoplasms. **Cancer Chemother Pharmacol**, v. 52 p. 61-73, 2003.

SEVRIOUKOVA, I. F. Apoptosis-inducing factor: structure, function, and redox regulation. **Antioxid Redox Signal**, v. 14, n. 12, p. 2545-2579, 2011.

SHAH, M.; AGARWAL, B. Recent advances in management of acute myeloid leukemia (AML). **Indian J Pediatr**, v.75, n.8, p.831-837, 2008.

SHEN, K-H.; CHANG, J-K.; HSU, Y-L.; KUO, P-L. Chalcone Arrests Cell Cycle Progression and Induces Apoptosis through Induction of Mitochondrial Pathway and Inhibition of Nuclear Factor Kappa B Signalling in Human Bladder Cancer Cells. **Basic Clin Pharmacol Toxicol**, v. 101, p. 254–261, 2007.

SHERIDAN, C.; DELIVANI, P.; CULLEN, S. P.; MARTIN, S. J. Bax- or Bak-induced mitochondrial fission can be uncoupled from cytochrome C release. **Molecular cell**, v. 31, n. 4, p. 570-585, 2008.

SHIPLEY, J. L.; BUTERA, J. N. Acute myelogenous leukemia. **Exp Hematol**, v.37, n.6, p.649-58, 2009.

SINGH, N. Apoptosis in health and disease and modulation of apoptosis for therapy: An overview. **Indian J Clin Biochem**, v. 22, n. 2, p. 6-16, set 2007.

SOLDANI, C.; SCOVASSI, A. I. Poly (ADP-ribose) polymerase-1 cleavage during apoptosis: An update. **Apoptosis**, v. 7, n. 4, p. 321-328, 2002.

SPEIRS, C. K.; HWANG, M.; KIM, S.; LI, W.; CHANG, S.; VARKI, V.; MITCHELL, L.; SCHLEICHER, S.; LU, B. Harnessing the cell death pathway for targeted cancer treatment. **Am J Cancer Res**, v. 1, n. 1, p. 43-61, 2011.

SPERANDIO, S.; DE BELLE, I.; BREDESEN, D. E. An alternative, nonapoptotic form of programmed cell death. **Proc Natl Acad Sci U S A**, v. 97, n. 26, p. 14376-14381, 2000.

STRASSER, A. CONNOR, L. O.; DIXIT, V. M. Apoptosis signaling. **Annu Rev Biochem**, v. 69, p. 217-245, 2000.

SUAREZ, L.; VIDRIALES, B.; GARCIA-LARANA, J.; LOPEZ, A.; MARTINEZ, R.; MARTIN-REINA, V.; TORMO, M.; GONZALEZSAN MIGUEL, J. D.; LAVILLA, E.; GARCIA-BOYERO, R.; ORFAO, A.; SAN MIGUEL, J. F. Multiparametric analysis of apoptotic and multi-drug resistance phenotypes according to the blast cell maturation stage in elderly patients with acute myeloid leukemia. **Haematologica**, v.86, n.12, p.1287-95, 2001.

SWERDLOW, S. H.; CAMPO, E.; HARRIS, N. L.; JAFFE, E. S.; PILERI, S. A.; STEIN, H.; THIELE, J.; VARDIMAN, J. W. **WHO Classification of Tumours of Haematopoietic and Lymphoid Tissues**. 4. Geneva: WHO Press, 2008.

TAIT, S. W. G.; GREEN, D. R. Mitochondria and cell death: outer membrane permeabilization and beyond. **Nat Rev Mol Cell Biol**, v. 11, n. 9, p. 621-32, 2010.

TARN, W. Y.; LAI, M. C. Translational control of cyclins. **Cell division**, v. 6, n. 1, p. 1-9, 2011.

TILLY, J.L. Commuting the death sentence: how oocytes strive to survive. **Nature**, v.2, n.11, p. 838-848, 2001.

TINARI, A.; GIAMMARIOLI, A. M.; MANGANELLI, V.; CIARLO, L.; MALORNI, W. Analyzing morphological and ultrastructural features in cell death. **Methods Enzymol**, v. 442, n. 8, p. 1-26, 2008.

VAN DE LOOSDRECHT, A. A.; NENE, E.; OSSENKOPPELE, G. J.; BEELEN, R. H. J.; LANGENHUIJSE, M. M. A. C. Cell Mediated Cytotoxicity Against U937 Cells by Human Monocytes and Macrophages in a Modified Molorimetric MTT Assay. **J Immunol Methods**, v. 141, p. 15-22, 1991.

VERMEULEN, K.; VAN BOCKSTAELE, D. R.; BERNEMAN, Z. N. The cell cycle: a review of regulation, deregulation and therapeutic targets in cancer. **Cell prolifer**, v. 36, n. 3, p. 131-149, 2003.

WALLACE, K. B.; STARKOV, A. A. Mitochondrial targets of drug toxicit. **Annu. Rev. Pharmacol. Toxicol**, v. 40, p. 353-388, 2000.

WANG, W.; RASTINEJAD, F.; EL-DEIRY, W. S. Restoring p53-Dependent Tumor Suppression. **Cancer Biol Ther**, v. 2, n. 4, p. 55-63, 2003.

WANG, Z. Y.; CHEN, Z. Differentiation and apoptosis induction therapy in acute promyelocytic leukaemia. *Lancet Oncol*, v.1, p.101-6, 2000.

WIMAN, K. G. Pharmacological reactivation of mutant p53: from protein structure to the cancer patient. **Oncogene**, v. 29, n. 30, p. 4245-4252, 2010.

WINTER, E.; CHIARADIA, L. D.; CORDOVA, C. A. S.; NUNES, R. J.; YUNES, R. A.; CRECZYNSKI-PASA, T.B. Naphthylchalcones induce apoptosis and caspase activation in a leukemia cell line: The relationship between mitochondrial damage, oxidative stress, and cell death. **Bioorg Med Chem**, v. 18, p. 8026–8034, 2010.

WRZESIEN-KUS, A.; SMOLEWSKI, P.; SOBCZAK-PLUTA, A.; WIERBOWSKA, A.; ROBAK, T. The inhibitor of apoptosis protein family and its antagonists in acute leukemia. **Apoptosis**, v.9, n. 6, p. 705-715, 2004.

WU, J.; LI, J.; CAI, Y.; PAN, Y.; YE, F.; ZHANG, Y.; ZHAO, Y.; YANG, S.; LI, X.; LIANG, G. Evaluation and discovery of novel synthetic chalcone derivatives as anti-inflammatory agents. **J Med Chem**, v. 54, n. 23, p. 8110-8123, 2011.

YAN, N.; SHI, Y. Mechanisms of apoptosis through structural biology. **Annu Rev Cell Dev Biol**, v. 21, p. 35-56, 2005.

YE, C-L.; QIAN, F.; WEI, D-Z.; LU, Y-H.; LIU, J-W. Induction of apoptosis in K562 human leukemia cells by 2',4'-dihydroxy-6'-methoxy-3',5'-dimethylchalcone. **Leuk Res**, v. 29, p. 887-892, 2005.

YEE, K. S.; VOUSDEN, K. H. Complicating the complexity of p53. **Carcinogenesis**, v. 26, n. 8, p. 1317-1322, 2005.

YIN, Y.; TAINSKY, M.; BISCHOFF, F. Z.; STRONG, L. C.; WAHL, G. M. Wild-type p53 Restores Cell Cycle Control and Inhibits Gene Amplification in Cells with Mutant p53 Alleles. **Cell**, v. 70, p. 937-948, 1992.

YOULE, R. J.; STRASSER, A. The Bcl-2 Protein Family: Opposing Activities that Mediate Cell Death. **Nat Rev Mol Cell Biol**, v. 9, p. 47-59, 2008.

YUN, J. M.; KWEON, M. H.; KWON, H.; HWANG, J. K.; MUKHTAR, H. Induction of apoptosis and cell cycle arrest by a chalcone panduratin A isolated from *Kaempferia Pandurata* in androgen-independent human prostate cancer cells PC3 and DU145. **Carcinogenesis**, v. 27, n.7, p.1454-1464, 2006.

ZAFFARONI, N.; PENNATI, M.; DAIDONE, M. G. Survivin as a Target for New Anticancer Interventions. **J Cell Mol Med**, v. 9, n. 2, p. 360-372, 2005.

ZAGO, M.; FALCÃO, R.; PASQUINI, R. **Hematologia Fundamentos e Prática**. São Paulo: Atheneu, 2005.

ZHANG, H. J.; QIAN, Y.; ZHU, D. D.; YANG, X. G.; ZHU, H. L. Synthesis, molecular modeling and biological evaluation of chalcone thiosemicarbazide derivatives as novel anticancer agents. **Eur J Med Chem**, v. 46, n. 9, p. 4702-4708, 2011.

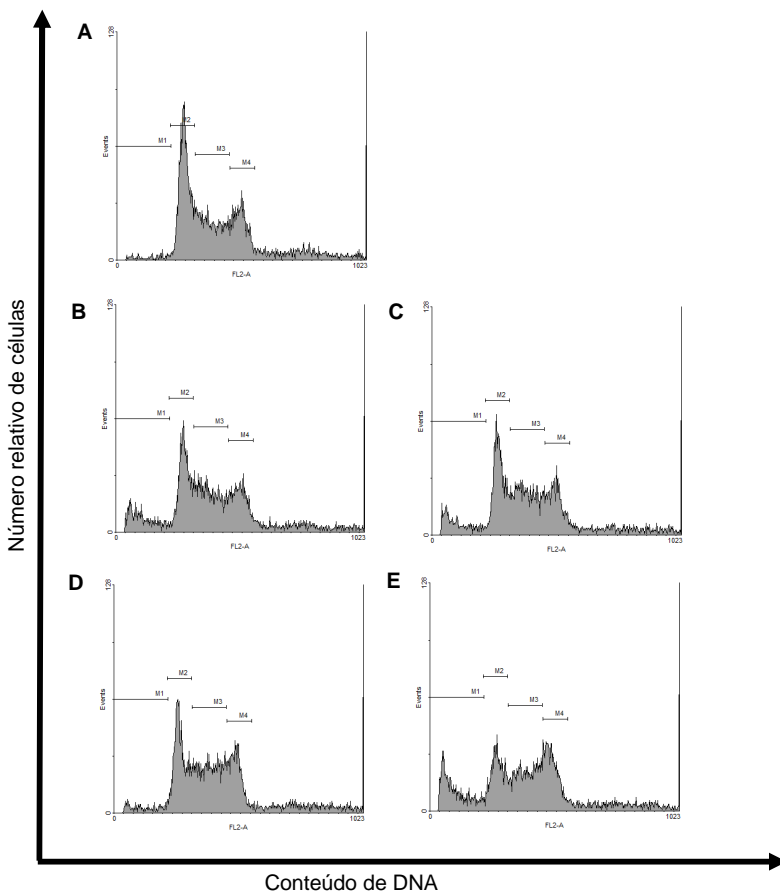
ZHIVOTOVSKY, B.; ORRENIUS, S. Defects in the apoptotic machinery of cancer cells: role in drug resistance. **Semin Cancer Biol**, v. 13, n. 2, p. 125-134, 2003.

ZILFOU, J. T.; LOWE, S. W. Tumor suppressive functions of p53. **Cold Spring Harb perspect biol**, v. 1, n. 5, p. 1-12, 2009.

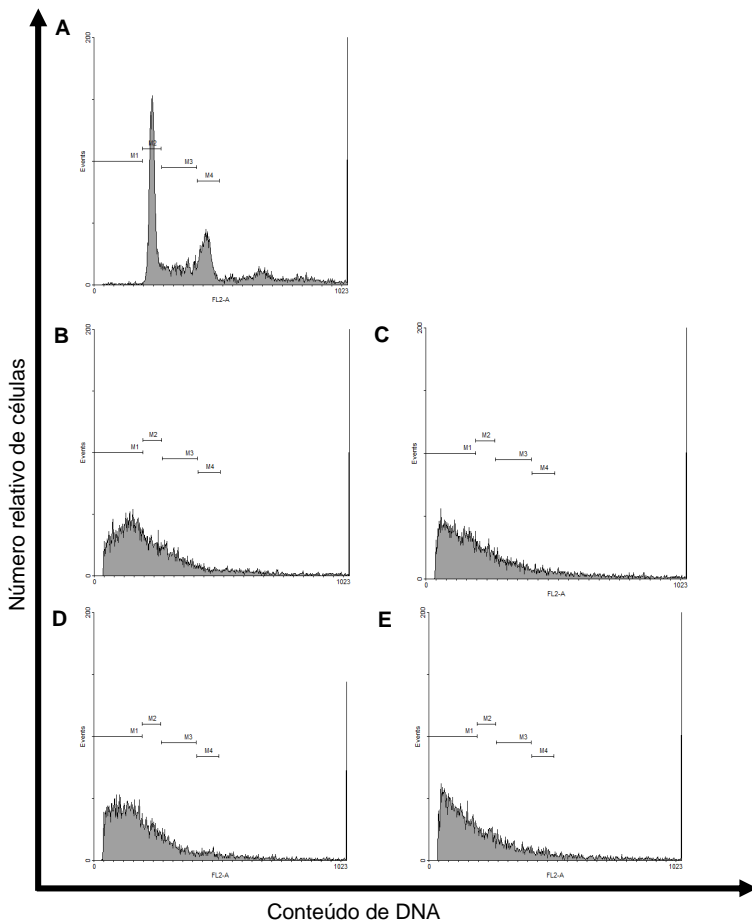
ZUANAZZI, J. A. S; MONTANHA, J. A. Flavonóides. In: SIMOES, C. M. O.; SCHENKEL, E. P.; GOSMANN, G.; MELLO, J. C. P.; MENTZ, L. A.; PETROVICK, P. R. **Farmacognosia: da planta ao medicamento**. 5 ed. Florianópolis/Porto Alegre: Editora da UFSC/ Editora da UFRGS, 2004. p. 577-614.

ZUCKERMAN, V.; WOLYNIEC, K.; SIONOV, R. V.; HAUPT, S.; HAUPT, Y. Tumour suppression by p53: the importance of apoptosis and cellular senescence. **J Pathol**, v. 219, n.1, p. 3-15, 2009.

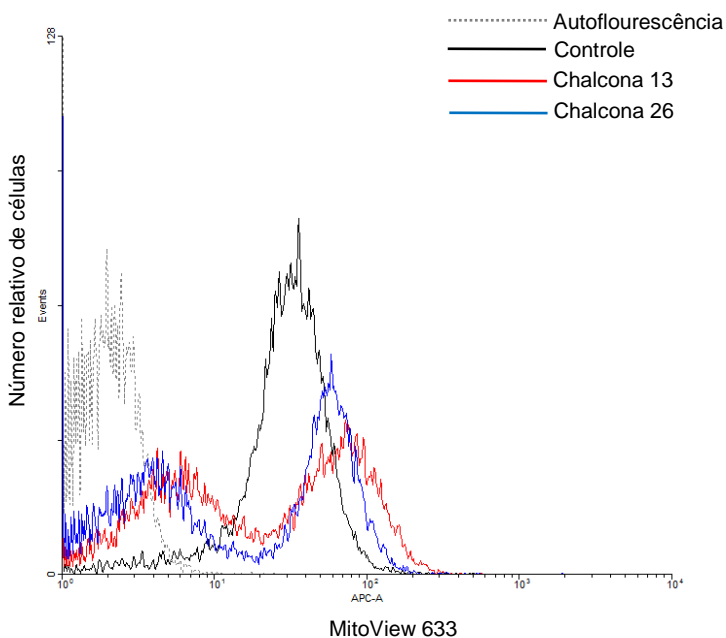
APÊNDICE A - Efeitos das chalconas 13, 16, 19 e 26 no ciclo celular das células de leucemia mieloide aguda K562. As células K562 foram incubadas por 24 h na ausência, grupo controle (Painel A), e na presença das chalconas 13 (Painel B), 16 (Painel C), 19 (Painel D) e 26 (Painel E) e o ciclo celular foi analisado pela intensidade de coloração dos ácidos nucléicos pelo PI, conforme descrito em materiais e métodos. M1, M2, M3 e M4 representam as fases Sub G0/G1, G0/G1, S e G2/M, respectivamente. Os histogramas representam os resultados de um experimento, dentre os três experimentos independentes realizados. As análises foram realizadas no citômetro de fluxo BD FACSCanto™ (Becton Dickinson Immunocytometry Systems) e avaliadas pelo software WinMID versão 2.8.



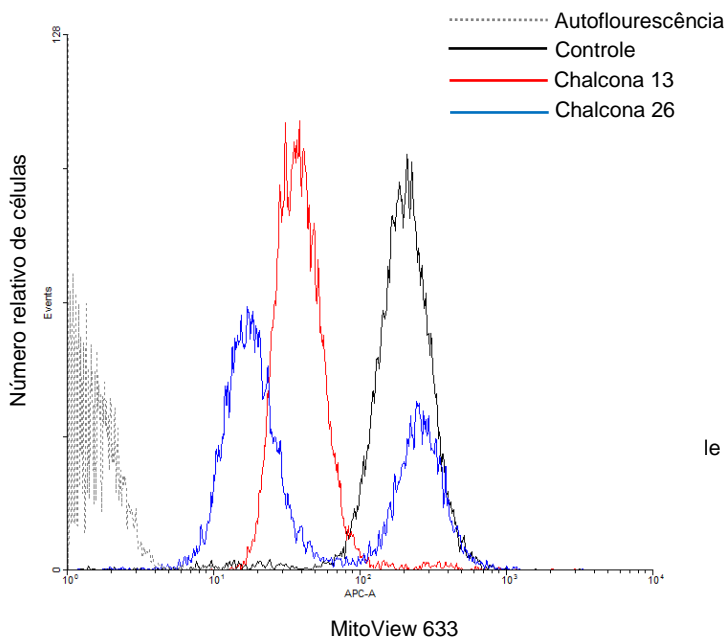
APÊNDICE B - Efeitos das chalconas 13, 16, 19 e 26 no ciclo celular das células de leucemia linfóide aguda Jurkat. As células Jurkat foram incubadas por 24 h na ausência, grupo controle (Painel A), e na presença das chalconas 13 (Painel B), 16 (Painel C), 19 (Painel D) e 26 (Painel E) e o ciclo celular foi analisado pela intensidade de coloração dos ácidos nucleicos pelo PI, conforme descrito em materiais e métodos. M1, M2, M3 e M4 representam as fases Sub G0/G1, G0/G1, S e G2/M, respectivamente. Os histogramas representam os resultados de um experimento, dentre os três experimentos independentes realizados. As análises foram realizadas no citômetro de fluxo BD FACSCanto™ (Becton Dickinson Immunocytometry Systems) e avaliadas pelo software WinMID versão 2.8.



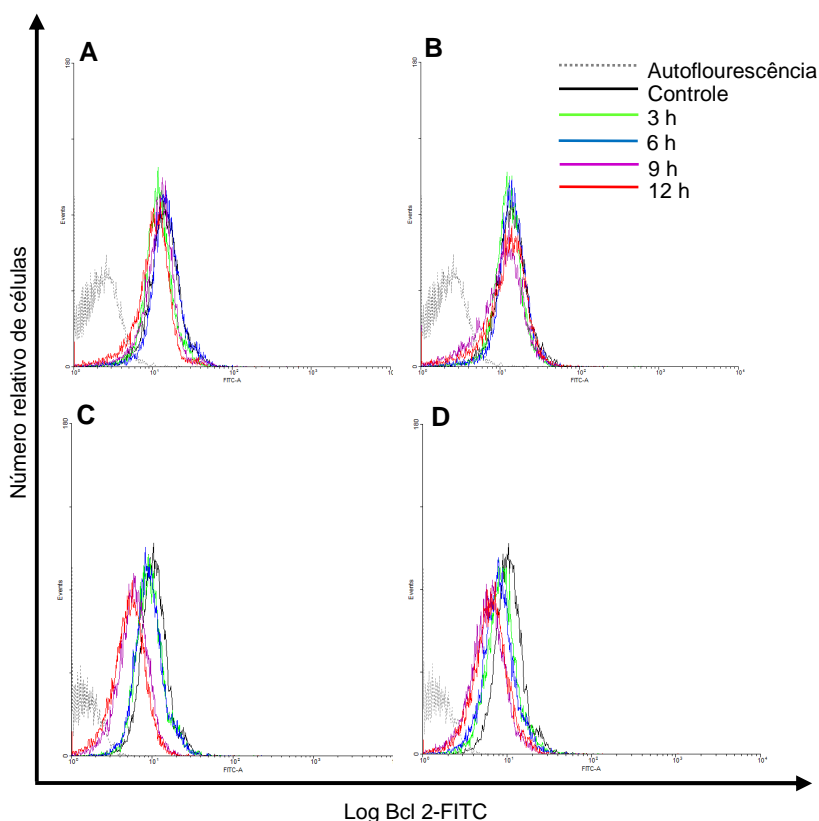
APÊNDICE C – Efeito das chalconas 13 e 26 sobre o potencial mitocondrial das células de leucemia mieloide aguda K562. As células K562 ($2,5 \times 10^5$ células/mL) foram incubadas por 12 h na ausência, grupo controle, e na presença das chalconas 13 e 26, nas suas respectivas CI_{50} de 24 h. A avaliação do potencial mitocondrial foi realizada por citometria de fluxo. O histograma representa o resultado de um experimento, dentre os dois experimentos independentes realizados. As análises foram realizadas no citômetro de fluxo BD FACSCanto™ (Becton Dickinson Immunocytometry Systems) e avaliadas pelo software *WinMID* versão 2.8.



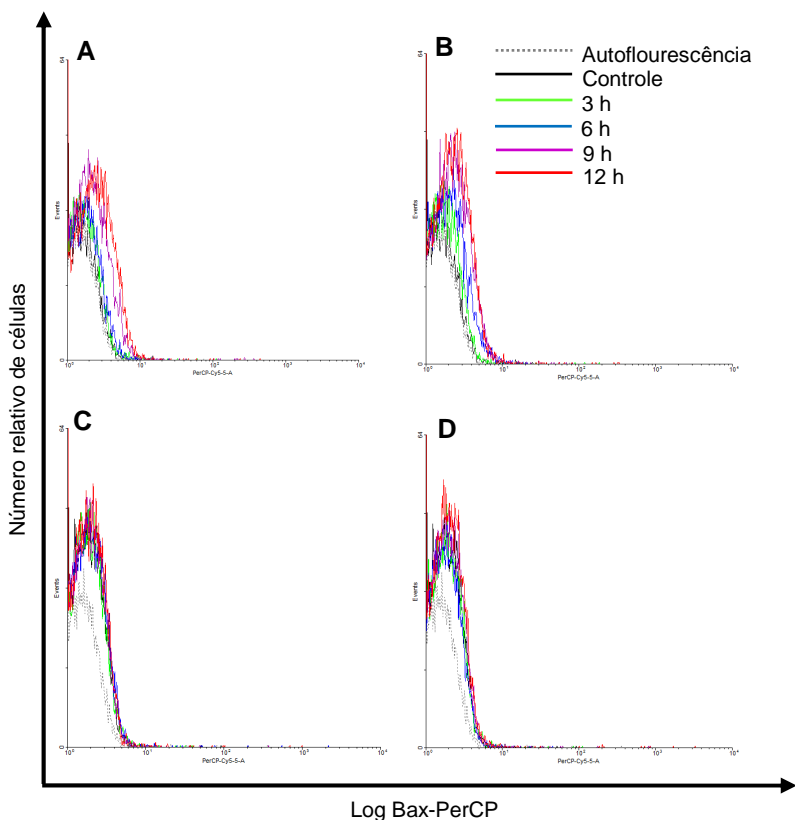
APÊNDICE D - Efeito das chalconas 13 e 26 sobre o potencial mitocondrial das células de leucemia linfóide aguda Jurkat. As células K562 ($2,5 \times 10^5$ células/mL) foram incubadas por 12 h na ausência, grupo controle, e na presença das chalconas 13 e 26, nas suas respectivas CI_{50} de 24 h. A avaliação do potencial mitocondrial foi realizada por citometria de fluxo. O histograma representa o resultado de um experimento, dentre os dois experimentos independentes realizados. As análises foram realizadas no citômetro de fluxo BD FACSCanto™ (Becton Dickinson Immunocytometry Systems) e avaliadas pelo *software WinMID* versão 2.8.



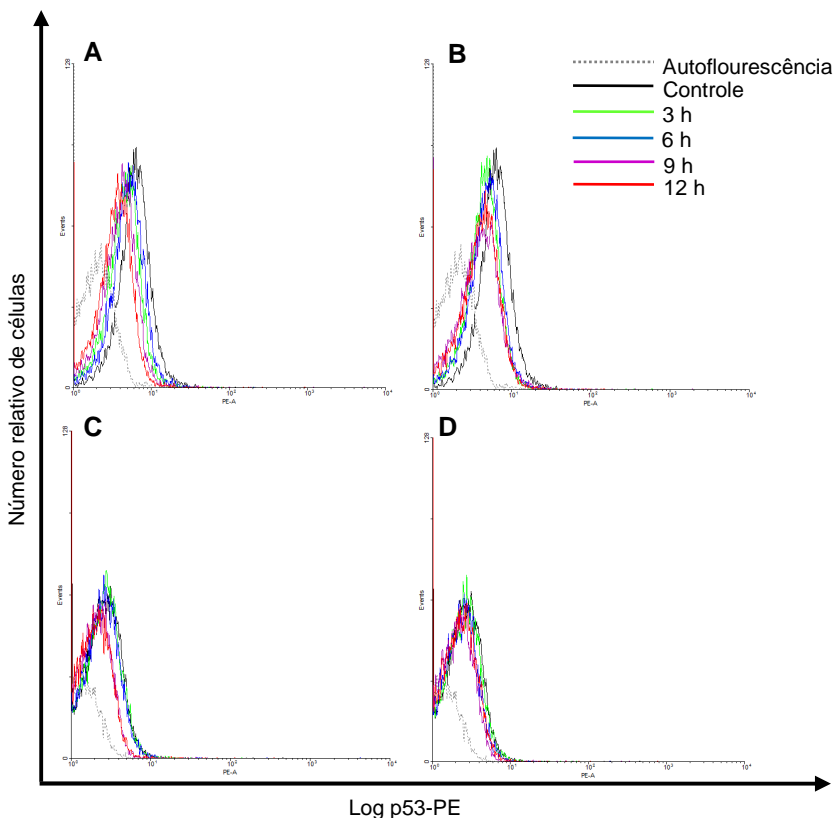
APÊNDICE E - Efeito das chalconas 13 e 26 na expressão da proteína antiapoptótica Bcl-2 nas células de leucemia mieloide aguda K562 e nas células de leucemia linfóide aguda Jurkat. As chalconas 13 e 26 foram adicionadas às células K562 e Jurkat, nas suas respectivas CI_{50} de 24 h, por 3, 6, 9 e 12 h. O grupo controle representa o grupo sem tratamento. A avaliação da expressão da proteína Bcl-2, em cada um dos tempos de incubação, foi realizada por citometria de fluxo. O histograma representa o resultado de um experimento, dentre os dois experimentos independentes realizados. As análises foram realizadas no citômetro de fluxo BD FACSCanto™ (Becton Dickinson Immunocytometry Systems) e avaliadas pelo *software* WinMID versão 2.8. Painel (A) – chalcona 13 e célula K562; Painel (B) – chalcona 26 e célula K562; Painel (C) – chalcona 13 e célula Jurkat; Painel (D) – chalcona 26 e célula Jurkat.



APÊNDICE F - Efeito das chalconas 13 e 26 na expressão da proteína proapoptótica Bax nas células de leucemia mieloide aguda K562 e nas células de leucemia linfóide aguda Jurkat. As chalconas 13 e 26 foram adicionadas às células K562 e Jurkat, nas suas respectivas CI_{50} de 24 h, por 3, 6, 9 e 12 h. O grupo controle representa o grupo sem tratamento. A avaliação da expressão da proteína Bax, em cada um dos tempos de incubação, foi realizada por citometria de fluxo. O histograma representa o resultado de um experimento, dentre os dois experimentos independentes realizados. As análises foram realizadas no citômetro de fluxo BD FACSCanto™ (Becton Dickinson Immunocytometry Systems) e avaliadas pelo *software WinMID* versão 2.8. Paineis (A) – chalcona 13 e célula K562; Paineis (B) – chalcona 26 e célula K562; Paineis (C) – chalcona 13 e célula Jurkat; Paineis (D) – chalcona 26 e célula Jurkat.



APÊNDICE G - Efeito das chalconas 13 e 26 na expressão da proteína p53 nas células de leucemia mieloide aguda K562 e nas células de leucemia linfóide aguda Jurkat. As chalconas 13 e 26 foram adicionadas às células K562 e Jurkat, nas suas respectivas CI_{50} de 24 h por 3, 6, 9 e 12 h. O grupo controle representa o grupo sem tratamento. A avaliação da expressão da proteína p53, em cada um dos tempos de incubação, foi realizada por citometria de fluxo. O histograma representa o resultado de um experimento, dentre os dois experimentos independentes realizados. As análises foram realizadas no citômetro de fluxo BD FACSCanto™ (Becton Dickinson Immunocytometry Systems) e avaliadas pelo *software WinMID* versão 2.8. Painel (A) – chalcona 13 e célula K562; Painel (B) – chalcona 26 e célula K562; Painel (C) – chalcona 13 e célula Jurkat; Painel (D) – chalcona 26 e célula Jurkat.



APÊNDICE H - Efeito das chalconas 13 e 26 na expressão da proteína caspase-3 ativa nas células de leucemia mieloide aguda K562 e nas células de leucemia linfóide aguda Jurkat. As chalconas 13 e 26 foram adicionadas às células K562 e Jurkat, nas suas respectivas CI_{50} de 24 h, por 3, 6, 9 e 12 h. O grupo controle representa o grupo sem tratamento. A avaliação da expressão da proteína caspase-3 ativa, em cada um dos tempos de incubação, foi realizada por citometria de fluxo. O histograma representa o resultado de um experimento, dentre os dois experimentos independentes realizados. As análises foram realizadas no citômetro de fluxo BD FACSCanto™ (Becton Dickinson Immunocytometry Systems) e avaliadas pelo do *software* WinMID versão 2.8. Paineis (A) – chalcona 13 e célula K562; Paineis (B) – chalcona 26 e célula K562; Paineis (C) – chalcona 13 e célula Jurkat; Paineis (D) – chalcona 26 e célula Jurkat.

