



UNIVERSIDADE FEDERAL DE SANTA CATARINA
CENTRO DE CIÊNCIAS DA SAÚDE
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM FARMÁCIA

Mariana Franzoni Maioral

**INVESTIGAÇÃO DOS EVENTOS APOPTÓTICOS INDUZIDOS POR CHALCONAS
SINTÉTICAS DERIVADAS DE 1-NAFTALDEÍDO E 2-NAFTALDEÍDO SOBRE
LINHAGENS DE CÉLULAS DE LEUCEMIAS AGUDAS HUMANAS**

Florianópolis

2013

Mariana Franzoni Maioral

**INVESTIGAÇÃO DOS EVENTOS APOPTÓTICOS INDUZIDOS POR CHALCONAS
SINTÉTICAS DERIVADAS DE 1-NAFTALDEÍDO E 2-NAFTALDEÍDO SOBRE
LINHAGENS DE CÉLULAS DE LEUCEMIAS AGUDAS HUMANAS**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Farmácia, da Universidade Federal de Santa Catarina, como requisito para obtenção do título de Mestre em Farmácia na Área de Concentração de Análises Clínicas.

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

Florianópolis

2013

Mariana Franzoni Maioral

**INVESTIGAÇÃO DOS EVENTOS APOPTÓTICOS INDUZIDOS POR CHALCONAS
SINTÉTICAS DERIVADAS DE 1-NAFTALDEÍDO E 2-NAFTALDEÍDO SOBRE
LINHAGENS DE CÉLULAS DE LEUCEMIAS AGUDAS HUMANAS**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Farmácia, da Universidade Federal de Santa Catarina. Essa dissertação foi julgada adequada para obtenção do título de Mestre em Farmácia na Área de Concentração de Análises Clínicas, e aprovada em sua forma final pelo Programa de Pós- Graduação em Farmácia.

Florianópolis, 21 de fevereiro de 2013.

Prof. Dr^a. Maria Cláudia Santos Silva (Orientadora)

Banca Examinadora:

Andreza Fabro de Bem - CCB/PGBQA/UFSC

Iara Kretzer - PGFAR/UFSC

Ricardo Castilho Garcez – CCB/UFSC

*À minha avó Ruth por ter mostrado, aos 23 anos, que existem
muitos caminhos que uma mulher pode seguir.*

AGRADECIMENTOS

É uma pena que esperemos por momentos marcantes como uma defesa de mestrado para agradecer às pessoas importantes por fazerem diferença em nossas vidas. Às vezes, essa diferença é óbvia como no caso dos pais, orientadores ou aquele colega que ajudou numa técnica mais complicada. Às vezes, a diferença é muito sutil e pode vir na forma de um convite para um café num dia ruim, de uma ligação inesperada no meio da tarde de alguém que mora longe ou de um bilhete de agradecimento com canetas coloridas. Se a felicidade é mesmo feita de pequenos momentos felizes, meu agradecimento mais especial vai para todos aqueles que estiveram ali no dia a dia, não necessariamente envolvidos diretamente no trabalho de bancada, mas sempre arrancando sorrisos das coisas mais simples, ajudando e apoiando nas mais complicadas. Saibam que mesmo não sendo dito como deveria, eu sou muito grata por tê-los em minha vida.

Aos meus pais, **José e Sônia**, por todo apoio, amor e atenção dedicados a mim durante toda a minha vida, e também por terem me ensinado, desde cedo, a amar os livros. Não há palavras suficientes para demonstrar todo o meu amor por vocês e meu desejo de deixá-los orgulhosos. Aos meus irmãos, **Rafael e Daniel**, por todas as lembranças de infância e por fazerem minha vida mais divertida.

À minha família que sempre se fez presente e que sempre torceu pelo meu sucesso. Em especial à minha tia **Mirta**, por ter feito a revisão gramatical deste trabalho e por ter assumido espontaneamente o papel de minha segunda mãe.

A todos os amigos do **Colégio de Aplicação**, pela amizade, companheirismo e por todas as “histórias para contar pros netos”. Agradeço em especial às minhas meninas **Jamila, Andressa, Joana, Vanessa e Akemi**, vocês são muito mais que amigas, são as irmãs que eu não tive. Amo de coração cada uma de vocês.

À **Naia**, pela parceria, pelas quebras de rotina e, principalmente, pela certeza de estar “aí”. E ao **Felipe**, pelo apoio, amizade e pelos telefonemas que sempre iluminavam o dia. Tenho muita sorte de tê-los comigo, vocês sabem o quanto são importantes e o quanto eu amo vocês.

À **Haira**, por ter me ensinado que mudar o mundo é possível, basta um pouquinho de coragem e muita boa vontade.

Aos amigos e amigas do curso de Farmácia pelos cinco anos compartilhados, em especial à **Iris, Cris, Flora, Ellen, Fran, Chandra, Day, Alice, Milene, Bia e Leticia**. Se a universidade é mesmo a “melhor época da vida”, a minha foi graças a vocês.

À minha orientadora, Professora Dr^a. **Maria Cláudia Santos Silva**, por ser uma pessoa tão dedicada e por todo o carinho, profissionalismo, apoio e ensinamentos que me transmitiu ao longo dos últimos anos.

A todos os colegas do **Laboratório de Oncologia Experimental e Hemopatias** e do **Laboratório de Biologia Molecular e Microbactérias**, pela convivência e troca de experiências diárias, em especial à **Marley, Karina, Aline, Pâmela, Manoela e Lorena**. Um agradecimento mais que especial à **Ana Carolina** por sempre salvar o dia no citômetro, pela paciência com minhas perguntas intermináveis e pela ajuda na revisão da dissertação; à **Gabriela e Karen**, por terem sido as melhores ICs que uma mestranda poderia ter; e ao **Alisson**, pela amizade dentro e fora do laboratório e por muitas vezes me orientar quando deveria ter sido o contrário.

À Professora **Cidônia**, por aceitar me supervisionar no estágio de docência e pela atenção que me dedicou durante todo o semestre. E às “meninas de 4^a de manhã”, **Dani Coelho, Dani Sporck, Fernanda, Flávia, Giuliana, Kiuanne, Paula e Stéfanie**, pela receptividade e carinho com os quais me receberam. Eu tive muita sorte de ter vocês como primeira turma!

Ao Prof. Dr. **Rosendo Augusto Yunes**, ao Prof. Dr. **Ricardo José Nunes**, à Dra. **Louise Domeneghini Chiaradia** e à doutoranda **Alessandra Mascarello** do Laboratório Estrutura e Atividade do Departamento de Química da UFSC, pela colaboração e pela disponibilidade de sempre.

Este trabalho só foi possível porque eu tive o apoio de cada um de vocês.

Muito obrigada.

"A menos que modifiquemos a nossa maneira de pensar, não seremos capazes de resolver os problemas causados pela forma como nos acostumamos a ver o mundo."

Albert Einstein

RESUMO

As leucemias agudas são desordens heterogêneas do sistema hematopoiético caracterizadas pela expansão clonal de uma população de células neoplásicas malignas que sofrem bloqueio maturativo quanto à sua diferenciação. O tratamento mais efetivo para as leucemias, a quimioterapia, está associado a altas taxas de recidiva e a elevados índices de morbidade e mortalidade. Estudos demonstram que as chalconas e seus derivados possuem atividade citotóxica e apresentam potencial para o desenvolvimento de novos fármacos. Assim, o objetivo do presente estudo é a busca por novos compostos a partir de três chalconas sintéticas derivadas do 1- e do 2-naftaldeído que tenham atividade contra células leucêmicas com pouco ou nenhum efeito em células normais. Entre os compostos avaliados, a chalcona **A1** apresentou resultados mais promissores e foi selecionada para estudos posteriores. Para os ensaios de citotoxicidade, as células K562, Jurkat, U937, Kasumi, NB4 e CEM foram incubadas com a chalcona **A1** em concentrações crescentes por 24, 48 e 72 h. A viabilidade celular foi determinada pelo método do MTT, onde se observou que o composto reduziu a viabilidade celular das seis linhagens de forma dependente da concentração e do tempo de incubação. A fim de verificar a efetividade do composto em um modelo de tumor sólido, foram utilizadas células de adenocarcinoma de cólon humano HT-29. Os resultados demonstram que a chalcona **A1** também apresentou citotoxicidade de forma dependente do tempo e da concentração, porém com CI_{50} mais elevada em comparação às linhagens leucêmicas. Para avaliar a seletividade do composto para células tumorais, a chalcona foi incubada com fibroblastos humanos de medula óssea (JMA) e com células mononucleadas de indivíduos saudáveis. A chalcona **A1** não reduziu significativamente a viabilidade celular em ambos os modelos. A apoptose foi confirmada pela observação morfológica após coloração com brometo de etídio e laranja de acridina, pelo ensaio de fragmentação do DNA e por citometria de fluxo pelo método da Anexina V. A investigação do efeito no ciclo celular mostrou que o composto **A1** causou bloqueio significativo em diferentes fases nas seis linhagens avaliadas. A fim de investigar os mecanismos pelos quais o composto causou morte celular, investigou-se o efeito da chalcona **A1** no potencial mitocondrial e na expressão das proteínas survivina e KI-67 nas células K562, Jurkat e Kasumi, e das proteínas Bcl-2, Bax, FasR, AIF e caspase-3 nas linhagens K562 e Jurkat. Os resultados demonstraram que o composto reduziu o potencial mitocondrial, diminuiu a expressão da proteína antiapoptótica Bcl-2 e aumentou a expressão da proteína pró-apoptótica Bax, sugerindo que o mecanismo de morte celular envolve a via intrínseca. Na linhagem Jurkat, foi observado também aumento de FasR, o que indica o envolvimento da via extrínseca. Além disso, o mecanismo de ação da chalcona **A1** envolve o aumento da expressão da caspase-3 e a diminuição da expressão da proteína antiapoptótica survivina e do marcador de proliferação celular KI-67. Em experimentos *ex vivo*, a chalcona **A1** reduziu a viabilidade de células mononucleadas de oito pacientes portadores de diferentes tipos de leucemia aguda, o que confirma os resultados de citotoxicidade encontrados *in vitro*.

Palavras-chave: Leucemia aguda, citotoxicidade, apoptose, chalcona.

ABSTRACT

Acute leukemia is a heterogeneous disorder of the hematopoietic system characterized by a clonal expansion of malignant neoplastic cells that are blocked from differentiation. The most effective treatment for leukemia is chemotherapy, which is still associated with high morbidity and mortality rates. Previous studies have shown that chalcones and their derivatives have cytotoxic effect and potential application for the development of new drugs. Thus, the aim of the present study was the search for a new compound from three synthetic chalcones derived from 1- and 2-naphthaldehyde that has activity against leukemia cells with little or no effect on normal cells. Compound **A1** had the most promising results in the screening, therefore it was selected for further studies. For cytotoxicity assays, K562, Jurkat, U937, Kasumi, NB4 and CEM cells were incubated with increasing concentrations of chalcone **A1** for 24, 48 and 72 h. Cell viability was determined by MTT method, which showed that the compound reduced the cell viability in a concentration and time-dependent manner in all six cell lines. In order to verify the effectiveness of the compound in a solid tumor model, a human colon carcinoma cell line (HT-29) was used. The results were similar to the ones found in leukemia cells, but a higher IC₅₀ was observed. To evaluate the selectivity of the compound for tumor cells, chalcone **A1** was also incubated with normal human bone marrow fibroblasts (JMA) and with mononuclear cells obtained from healthy volunteers. Chalcone **A1** caused no significant reduction of cell viability in normal cells. Detection of apoptosis was confirmed by morphological observation after staining with ethidium bromide and acridine orange, by DNA fragmentation and by flow cytometry using the Annexin method. The compound also caused cell cycle arrest in different phases according to the cell line. In order to investigate the mechanisms by which the compound has caused apoptosis, we investigated the effect of chalcone **A1** in the mitochondrial potential and in the expression of the following proteins: KI-67, survivin, Bcl-2, Bax, AIF, FasR and caspase-3. The results demonstrated that the compound reduced the mitochondrial potential, decreased the expression of anti-apoptotic Bcl-2 protein and increased the expression of pro-apoptotic Bax protein, which suggests that the mechanism of cell death involves the intrinsic pathway of apoptosis. In Jurkat line, it was also found the increased expression of FasR, which indicates the involvement of the extrinsic pathway. Furthermore, the mechanism of action of chalcone **A1** involves the increased expression of caspase-3 and the decreased expression of anti-apoptotic protein survivin and of cell proliferation marker KI-67. In *ex vivo* experiments, chalcone **A1** reduced the cell viability of mononuclear cells from eight patients with different types of acute leukemia, confirming the cytotoxicity results found *in vitro*.

Keywords: Acute leukemia, cytotoxicity, apoptosis, chalcone.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1	Avaliação da citotoxicidade do DMSO em células K562 (Painel A) e Jurkat (Painel B).....	65
Figura 2	Triagem das chalconas A1 , A23 e C24 nas células K562 (Painel A) e Jurkat (Painel B).....	66
Figura 3	Efeito citotóxico da chalcona A1 em células de linhagens de LA.....	68
Figura 4	Efeito citotóxico da chalcona A1 em células HT-29.....	70
Figura 5	Efeito citotóxico da chalcona A1 em células JMA.....	71
Figura 6	Efeito citotóxico da chalcona A1 sobre células mononucleadas de indivíduos saudáveis.....	72
Figura 7	Efeito da Chalcona A1 sobre o ciclo celular das linhagens de LA K562, Jurkat, U937, Kasumi, NB4 e CEM.....	76
Figura 8	Alterações morfológicas induzidas pela chalcona A1 em células K562, Jurkat, U937, Kasumi, NB4 e CEM.....	77
Figura 9	Efeito da Chalcona A1 na exposição dos resíduos de fosfatidilserina nas seis linhagens de LA pelo método da Anexina V conjugada a FITC....	79
Figura 10	Avaliação da indução da fragmentação do DNA nas células K562 (Painel A), Jurkat (Painel B) e Kasumi (Painel C) pela chalcona A1 ...	81
Figura 11	Efeito da chalcona A1 sobre o potencial mitocondrial das células K562 (Painel A), Jurkat (Painel B) e Kasumi (Painel C).....	82
Figura 12	Expressão da proteína KI-67 nas células K562, Jurkat e Kasumi após o tratamento com a chalcona A1	83
Figura 13	Expressão da proteína antiapoptótica survivina nas células K562, Jurkat e Kasumi após o tratamento com a chalcona A1	84
Figura 14	Efeito da chalcona A1 na expressão das proteínas Bcl-2 (Painéis A e B) e Bax (Painéis C e D) em células K562 e Jurkat.....	86
Figura 15	Efeito da chalcona A1 na expressão da proteína FasR (CD95) em células K562 e Jurkat.....	87
Figura 16	Efeito da chalcona A1 na expressão da proteína AIF em células K562 (Painel A) e Jurkat (Painel B).....	88
Figura 17	Efeito da chalcona A1 na expressão da proteína caspase-3 em células K562 e Jurkat.....	89
Figura 18	Efeito citotóxico <i>ex vivo</i> da chalcona A1 sobre células mononucleadas de pacientes portadores de LA (Painéis A-H).....	91

LISTA DE ESQUEMAS

Esquema 1	Estrutura química das chalconas sintéticas C24 , derivada do 2-naftaldeído, e A1 e A23 , derivadas do 1-naftaldeído.....	20
Esquema 2	Processos simplificados da patogenia do câncer.....	26
Esquema 3	Hematopoiese normal.....	28
Esquema 4	Principais tipos de morte celular.....	32
Esquema 5	Esquemática dos três tipos de autofagia.....	34
Esquema 6	Morfologia da apoptose.....	36
Esquema 7	Via extrínseca da apoptose.....	38
Esquema 8	Via intrínseca e via extrínseca da apoptose.....	41
Esquema 9	Regulação do ciclo celular.....	46
Esquema 10	Núcleo fundamental das chalconas.....	47
Esquema 11	Rota de síntese utilizada para a obtenção das chalconas derivadas da 2-naftilchalcona.....	53
Esquema 12	Esquema representativo de células K562 tratadas com o composto A1 após coloração com BE/LA.....	58
Esquema 13	Imagem representativa do gel de agarose de células Jurkat após tratamento com Taxol.....	60
Esquema 14	Esquema ilustrativo do mecanismo de ação da chalcona A1 em células Jurkat.....	110

LISTA DE TABELAS

Tabela 1	Efeitos descritos na literatura para diferentes chalconas em ensaios <i>in vitro</i>	48
Tabela 2	Valores de CI_{50} observados nas células K562 e Jurkat após 24 h de incubação com as chalconas A1 , A23 e C24	67
Tabela 3	Valores de CI_{50} encontrados nas linhagens K562, Jurkat, U937, Kasumi, NB4 e CEM após incubação com a chalcona A1	69
Tabela 4	Efeito da chalcona A1 (CI_{50}) nas fases do ciclo celular das linhagens de LA humana.....	73
Tabela 5	Porcentagem de células positivas para Anexina V após o tratamento com a Chalcona A1 e os respectivos grupos controle.....	80
Tabela 6	Características clínicas e laboratoriais dos pacientes com diagnóstico de LA no momento do diagnóstico incluídos no estudo.....	90
Tabela 7	Valores de CI_{50} observados nas amostras de pacientes portadores de LA após tratamento com a chalcona A1	92

LISTA DE ABREVIATURAS

AIF	Fator indutor de apoptose (<i>Apoptosis-Inducing Factor</i>)
Apaf-1	Fator ativador de apoptose 1 (<i>Apoptotic protease activating factor 1</i>)
ATP	Adenosina trifosfato (<i>Adenosine-5'-triphosphate</i>)
ATRA	Ácido holo-transretinóico
Bcl-2	<i>B-cell lymphoma protein-2</i>
BE/LA	Brometo de etídio e laranja de acridina
BH	<i>Bcl-2 Homology</i>
Caspases	Cysteine-dependent aspartate-specific proteases
CDKs	Cinases dependentes de ciclinas (<i>Cyclin-dependent kinases</i>)
CEPSH	Comitê de Ética de Pesquisa em Seres humanos
c-FLIP	Proteína reguladora das caspases-8 e -10 (<i>Cellular FLICE-like inhibitory protein</i>)
CI₅₀	Concentração inibitória 50%
CKI	Inibidores de CDK (<i>CDK inhibitors</i>)
DAB	3,3'-diaminobenzidina
DMEM	<i>Dulbecco's modified Eagle's medium</i>
DMSO	Dimetilsulfóxido
DNA	Ácido desoxirribonucleico (<i>Deoxyribonucleic acid</i>)
DR3, 4, 5, 6	Receptor de morte 3, 4, 5, 6 (<i>Death Receptor 3, 4, 5, 6</i>)
EDTA	Ácido etilenodiamino tetra-acético
EPM	Erro padrão da média
FADD	Proteína adaptadora (<i>Fas-Associated Death Domain</i>)
FasL	Ligante Fas (<i>Fas Ligand</i>)
FasR	Receptor Fas (<i>Fas Receptor</i>)
FITC	Isotiocianato de fluoresceína (<i>Fluorescein isothiocyanate</i>)
G0	<i>Gap 0</i>
G1	<i>Gap 1</i>
G2	<i>Gap 2</i>
HEPES	Ácido N-[2-hidroxi-etil]piperazina-N'-[2-etanosulfônico]
IAPs	Proteínas inibidoras da apoptose (<i>Inhibitors of apoptosis proteins</i>)
IFM	Intensidade de fluorescência média
IMDM	<i>Iscove's Modified Dulbecco's Media</i>

INCA	Instituto nacional do câncer
LA	Leucemia aguda
LC	Leucemia crônica
LLA	Leucemia linfoblástica aguda
LLA-B	Leucemia linfoblástica de células B
LLA-T	Leucemia linfoblástica de células T
LMA	Leucemia mieloide aguda
LPA	Leucemia promielocítica aguda
MDR	Proteínas de resistência a múltiplos fármacos (<i>Multiple Drug Resistance</i>)
MO	Medula óssea
MTT	Brometo de 3-(4,5-dimetil-2-tiazolil)-2,5-difenil-2H-tetrazólio
NFκB	Fator nuclear Kappa B (<i>Nuclear factor-Kappa B</i>)
NK	<i>Natural killers</i>
OMS	Organização Mundial da Saúde
PARP	<i>Poly-ADP-ribose polymerase</i>
PCA	Antígeno nuclear de proliferação celular
PBS	Tampão fosfato
PE	Ficoeritrina
PI	Iodeto de propídio (<i>Propidium iodide</i>)
PML-RARα	Proteína híbrida resultante da t(15;17)
RARα	Receptor de ácido retinóico
RNA	Ácido ribonucléico (<i>Ribonucleic acid</i>)
RNase	Ribonuclease (<i>Ribonucleasis</i>)
RPMI	<i>Roswell Park Memorial Institute</i>
S	Síntese
SBF	Soro bovino fetal
Smac/ Diablo	<i>Second Mitochondria-derived Activator of Caspases/Direct IAP Binding protein with low pI</i>
SP	Sangue periférico
TCLE	Termo de consentimento livre e esclarecido
TNF	Fator de necrose tumoral (<i>Tumor Necrosis Factor</i>)
TRADD	<i>TNF Receptor-Associated Death Domain</i>
TRAIL-R	<i>TNF-related apoptosis-inducing ligand receptor</i>

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	17
2. OBJETIVOS	21
2.1 Objetivo Geral	22
2.2 Objetivos Específicos	22
<hr/>	
3. REVISÃO DE LITERATURA	24
3.1 Aspectos Gerais do Câncer	25
3.2 Leucemias Agudas	26
3.3 Terapias Antileucêmicas	29
3.4 Tipos de Morte Celular	31
3.4.1 Necrose	32
3.4.2 Autofagia	33
3.4.3 Apoptose	34
3.4.3.1 <i>Mecanismos Reguladores da Apoptose</i>	36
3.5 Ciclo Celular	42
3.6 Chalconas Como Novos Alvos Terapêuticos	46
4. MATERIAIS E MÉTODOS	51
4.1 Cultura Celular	52
4.2 Síntese Química	53
4.3 Tratamento das Células com as Chalconas	54
4.4 Obtenção das Células Mononucleadas de Indivíduos Saudáveis	54
4.5 Obtenção das Células Leucêmicas de Pacientes	55
4.6 Viabilidade Celular (Método do MTT)	55
4.7 Avaliação do Ciclo Celular	56
4.8 Avaliação da Apoptose	57
4.8.1 Avaliação da Apoptose por Microscopia de Fluorescência com Brometo de Etídio e Laranja de Acridina	57
4.8.2 Avaliação da Apoptose pelo Método da Anexina V - FITC	58
4.8.3 Avaliação da Apoptose pelo Método de Fragmentação do DNA	59
4.9 Avaliação do Potencial Mitocondrial	60
4.10 Avaliação da Expressão das Proteínas Bax, Bcl-2, FasR, AIF e Caspase 3 por Citometria de Fluxo	61
4.11 Avaliação da Expressão das Proteínas Survivina e KI-67 por Imunocitoquímica	62
4.12 Análise Estatística	63

5. RESULTADOS	64
5.2 Triagem das Chalconas Sintéticas A1, A23 e C24 sobre Células de LMA K562 e sobre Células de LLA Jurkat	66
5.3 Investigação do Efeito Citotóxico da Chalcona A1 Sobre Diferentes Linhagens de Células de LA	67
5.4 Efeito citotóxico da chalcona A1 sobre células de Adenocarcinoma de Cólon Humano	69
5.5 Efeito citotóxico da Chalcona A1 sobre Células de Fibroblastos Humanos de MO	70
5.6 Efeito Citotóxico da Chalcona A1 em Células Mononucleadas de Indivíduos Saudáveis	71
5.7. Efeito da Chalcona A1 sobre as Fases do Ciclo Celular das Linhagens de LA Humana	72
5.8 Efeito da Chalcona A1 na Indução da Apoptose em Células de Linhagem de LA Humana	76
5.9 Investigação do Efeito da Chalcona A1 Sobre o Potencial Mitocondrial das Células K562, Jurkat e Kasumi	81
5.10 Efeito da Chalcona A1 sobre a Proteína KI-67	83
5.11 Efeito da Chalcona A1 sobre a Proteína Antiapoptótica Survivina	84
5.12 Investigação do Efeito da Chalcona A1 Sobre a Proteína Antiapoptótica Bcl-2 e Sobre a Proteína Pró-Apoptótica Bax	85
5.13 Efeito da Chalcona A1 sobre FasR	87
5.14 Efeito da Chalcona A1 sobre o Fator Indutor de Apoptose	87
5.15 Efeito da Chalcona A1 sobre a Ativação da Caspase-3	88
5.16 Investigação do Efeito Citotóxico da Chalcona A1 sobre Células de Pacientes Portadores de LA	89
6. DISCUSSÃO	93
7. CONCLUSÕES	108
8. PERSPECTIVAS	111
REFERENCIAS	113
APÊNDICE 1 – GRÁFICOS DE CITOMETRIA	131
APÊNDICE 2 – TRABALHOS APRESENTADOS EM CONGRESSOS	140
APÊNDICE 3 – ARTIGO PUBLICADO	143

1. INTRODUÇÃO

Segundo a Organização Mundial da Saúde (OMS), o número de casos de câncer é ascendente na atualidade, sendo que em 2008, 7.6 milhões de pessoas ao redor do mundo foram a óbito por essa doença. Dessas mortes, aproximadamente 70% ocorrem em países em desenvolvimento, os quais também são responsáveis por cerca de 60% dos novos casos de câncer (WHO, 2012). Esse cenário tem se transformado em um grande desafio, uma vez que a prevenção e o controle das neoplasias exigem medidas complexas, multidisciplinares e multifatoriais, enquanto que o diagnóstico e o tratamento requerem elevados recursos financeiros. Considerando que no Brasil cerca de 80% do sistema de saúde, inclusive a assistência oncológica, é financiada por recursos públicos, o câncer pode ser considerado um importante problema de saúde pública (GUERRA et al., 2005). Espera-se para 2013, no Brasil, um total de 518.510 novos casos de câncer, sendo que as leucemias estão entre as principais causas de morte por câncer tanto em homens quanto em mulheres. Para o próximo ano, estimam-se 8.510 novos casos de leucemias, sendo 300 apenas no estado de Santa Catarina e 20 na cidade de Florianópolis (INCA, 2011).

As leucemias compreendem um grupo heterogêneo de neoplasias, as quais diferem entre si quanto à etiologia, patogênese, resposta ao tratamento e prognóstico. As leucemias agudas (LAs) são proliferações neoplásicas malignas de células progenitoras do sistema hematopoiético decorrente da mutação de uma única célula tronco cuja prole forma um clone de células leucêmicas que atinge o sangue periférico (SP) e pode invadir outros tecidos (BAIN, 2003; PUI, 2009; VARDIMAN, 2010). As neoplasias hematológicas são as mais frequentes causas de câncer em crianças, adolescentes e jovens adultos, com alta incidência também em pacientes acima de 60 anos de idade (WINTER, 2011; KRUG et al., 2011).

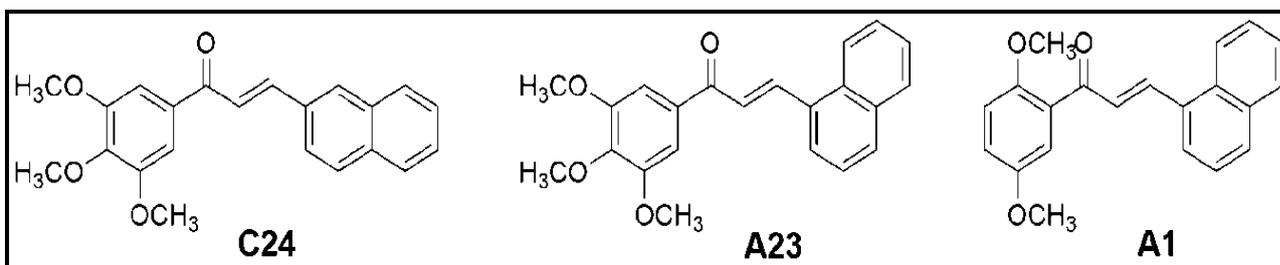
Apesar do significativo aumento do conhecimento a respeito das malignidades hematológicas e das novas estratégias terapêuticas, a maioria dos casos de leucemia permanece incurável (KOSIOR; LEWANDOWSKA-GRYGIEL; GIANNOPOULOS, 2011). A terapia mais utilizada no tratamento das LAs é a quimioterapia (BURKE; STARTZEK, 2008). No entanto, a morbidade associada aos quimioterápicos é um obstáculo significativo nos tratamentos antileucêmicos, pois a citotoxicidade não específica dos fármacos utilizados podem, inclusive, comprometer a sobrevida do paciente (KRUG et al., 2011). Por esses motivos, tem aumentado consideravelmente a investigação de novos compostos antineoplásicos que tenham maior especificidade na indução de morte celular não imunogênica nas células tumorais com o mínimo de efeitos adversos para o paciente e que sejam de fácil administração (KOSIOR; LEWANDOWSKA-GRYGIEL; GIANNOPOULOS, 2011).

Dentre os tipos de mortes celulares não imunogênicas destaca-se a apoptose, um tipo de morte celular programada que ocorre de forma natural durante toda a vida de um organismo. A apoptose é fundamental para a remoção de células comprometidas ou desnecessárias e para a manutenção da homeostase (HOTCHKISS; NICHOLSON, 2006; WILLIE, 2010; WICKMAN; JULIAN; OLSON, 2012). A capacidade de evitar a apoptose através da regulação positiva de proteínas antiapoptóticas ou da regulação negativa de proteínas pró-apoptóticas é um importante passo no desenvolvimento da carcinogênese e pode determinar a susceptibilidade do paciente às terapias quimioterápicas (LINDSAY; ESPOST; GILMORE, 2011; KOURI; JENSEN; STEGH, 2012).

Nos últimos anos, a busca por substâncias biologicamente ativas e por novas terapias antitumorais cresceu exponencialmente com o objetivo de aumentar a expectativa e a qualidade de vida dos indivíduos acometidos por neoplasias hematológicas (SILVA et al., 2010). Nesse contexto, as chalconas são compostos fenólicos de cadeia aberta que têm sido descritas na literatura junto com seus derivados sintéticos por suas propriedades antimicrobiana (MOKLE; SAYEE; CHOPDE, 2004), anti-inflamatória (VIANA; BANDEIRA; MATOS, 2003), antiviral (MIRANDA et al., 2000) e antitumoral (AKIHISA et al., 2012), além de atividades antiproliferativa e citotóxica (PATI et al., 2005; BOUMENDJEL et al., 2009; KATSORI; HADJIPAYLOU-LITINA, 2009).

Estudos prévios realizados no Laboratório de Oncologia Experimental e Hemopatias (LOEH) demonstraram o efeito citotóxico de uma série de 10 chalconas sintéticas derivadas do 2-naftaldeído. Neste estudo, foi observado que a chalcona (2E)-3-(2-naftalenil)-1-(3'-metoxi-4'-hidroxi-fenil)-2-propen-1-ona apresentou maior efeito citotóxico, com concentração inibitória 50% (CI₅₀) de 54 µM obtida sobre células de leucemia de origem murina (L-1210). Os mecanismos de apoptose foram investigados, e os resultados indicaram que esse composto causou bloqueio do ciclo celular na fase G2/M e apoptose pela via mitocondrial. O envolvimento da via mitocondrial foi sugerido devido à diminuição da expressão da proteína antiapoptótica Bcl-2 e aumento da expressão da proteína pró-apoptótica Bax, o que resultou na ativação da caspase-3 e, conseqüentemente, na execução da morte celular (PEDRINI et al.; 2010). No entanto, apesar dessa chalcona apresentar propriedades farmacológicas requeridas para o desenvolvimento de um novo fármaco antitumoral, sua CI₅₀ de 54 µM ainda é alta para um potencial uso clínico. Por esse motivo, sua estrutura química foi estudada e, a partir dela, três análogos estruturais derivados do 1-naftaldeído e do 2-naftaldeído foram sintetizados: (2E)-1-(2,5-dimetoxi-fenil)-3-(1-naftil)-2-propen-1-ona (**A1**), (2E)-1-(3,4,5-trimetoxi-fenil)-3-(1-naftil)-2-propen-1-ona (**A23**) e (2E)-1-(3,4,5-trimetoxi-

fenil)-3-(2-naftil)-2-propen-ona (**C24**) (Esquema 1). Estes compostos foram previamente sintetizados (CHIARADIA et al., 2008), mas até o presente estudo, nenhum ensaio havia sido realizado com o objetivo de identificar seus possíveis efeitos citotóxicos em células leucêmicas.



Esquema 1: Estrutura química das chalconas sintéticas C24, derivada do 2-naftaldeído, e A1 e A23, derivadas do 1-naftaldeído.

Nesse contexto, considerando as características biológicas heterogêneas e as diferentes respostas terapêuticas dos subtipos de LAs e tendo como justificativa a necessidade de novos fármacos para o tratamento dessas neoplasias, o alvo do presente estudo foi investigar um novo composto com efeito citotóxico sobre células leucêmicas que induza a morte celular por apoptose sem apresentar citotoxicidade significativa em células normais.

2. OBJETIVOS

2.1 Objetivo Geral

Investigar o efeito citotóxico das chalconas sintéticas (2E)-1-(2,5-dimetoxi-fenil)-3-(1-naftil)-2-propen-1-ona (**A1**) e (2E)-1-(3,4,5-trimetoxi-fenil)-3-(1-naftil)-2-propen-1-ona (**A23**), derivadas do 1-naftaldeído, e (2E)-1-(3,4,5-trimetoxi-fenil)-3-(2-naftil)-2-propen-1-ona (**C24**), derivada do 2-naftaldeído sobre células de linhagens de leucemias agudas humanas e selecionar o composto mais efetivo para a investigação dos possíveis mecanismos de citotoxicidade e de resistência envolvidos.

2.2 Objetivos Específicos

- Avaliar o efeito citotóxico em 24 h das chalconas sintéticas **A1**, **A23** e **C24** sobre as células de leucemia mieloide aguda humana K562 e sobre as células de leucemia linfoblástica aguda humana Jurkat.
- Selecionar o composto com maior atividade citotóxica (**A1**) e determinar sua resposta em relação à concentração e ao tempo de incubação em seis linhagens de leucemias humanas: K562, Jurkat, U937, Kasumi, NB4 e CEM.
- Investigar a capacidade do composto de causar morte celular em tumores não hematológicos utilizando, como modelo, células de linhagem de adenocarcinoma de cólon humano
- Avaliar a seletividade da chalcona **A1** para células tumorais testando seu efeito em células de linhagem de fibroblastos humanos normais de medula óssea JMA e em células mononucleadas de indivíduos saudáveis voluntários no Hospital Universitário Polydoro Ernani de São Thiago da Universidade Federal de Santa Catarina (HU/UFSC).
- Analisar o efeito da chalcona **A1** no ciclo celular das células K562, Jurkat, U937, Kasumi, NB5 e CEM.
- Verificar se a chalcona **A1** causa morte celular por apoptose nas células K562, Jurkat, U937, Kasumi, NB4 e CEM.
- Avaliar o efeito da chalcona **A1** sobre a proteína de proliferação celular KI-67 e sobre a proteína antiapoptótica survivina em três linhagens de leucemias agudas selecionadas, K562, Jurkat e Kasumi.

- Testar a resposta da chalcona **A1** sobre o potencial mitocondrial das linhagens K562, Jurkat e Kasumi.
- Investigar, nas células K562 e Jurkat, se o efeito citotóxico da chalcona **A1** envolve os seguintes fatores reguladores de apoptose: proteína antiapoptótica Bcl-2, proteína pró-apoptótica Bax, receptor Fas, fator indutor de apoptose e caspase-3.
- Avaliar a citotoxicidade da chalcona **A1** em ensaios *ex vivo*, utilizando, como modelo, células mononucleadas de sangue periférico ou medula óssea de pacientes portadores de leucemias agudas no momento do diagnóstico, atendidos no HU/UFSC.

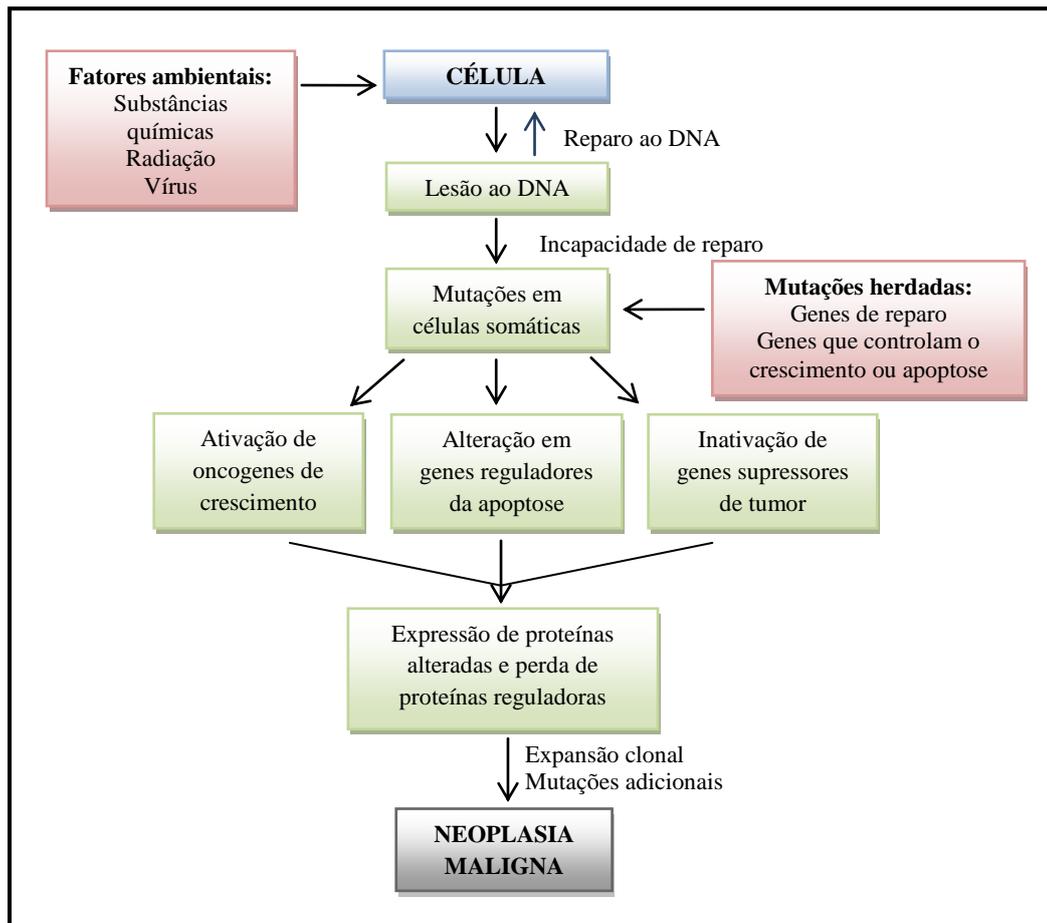
3. REVISÃO DA LITERATURA

3.1 Aspectos Gerais do Câncer

O termo neoplasia significa literalmente “crescimento novo” e se refere a massas anormais de tecido de crescimento autônomo, provenientes de células do organismo e à custa do qual se nutrem (DE FARIA, 2003). O termo tumor foi originalmente aplicado ao intumescimento causado por processos inflamatórios, porém, como as neoplasias também são capazes de induzir intumescimentos, as duas palavras acabaram tornando-se sinônimos (COTRAN; KUMAR; COLLINS, 2010).

As neoplasias são classificadas basicamente em neoplasias benignas e neoplasias malignas. As neoplasias malignas são massas indiferenciadas com mitoses anormais, capazes de invadir os tecidos adjacentes e causar metástase. Em geral, quanto maior a rapidez de crescimento e quanto mais indiferenciada for a célula tumoral, maior a malignidade da neoplasia (DE FARIA, 2003; ALMEIDA et al., 2005; BERRIDGE; HERST; TAN, 2010). Assim, a palavra câncer que tem origem no grego *Karkinos*, “caranguejo”, referindo-se ao seu potencial invasivo, é um termo comum a mais de 100 doenças e utilizado para referir-se a todos os tumores malignos (HANAHAN; WEINBERG, 2000; DE FARIA, 2003).

O processo de carcinogênese, em geral, ocorre lentamente, podendo chegar a 10 anos ou mais, e é dividido em três fases. O início, ou Iniciação, normalmente, ocorre por uma mutação, a qual pode ser adquirida por fatores ambientais ou pode ser herdada da linhagem germinativa. A massa tumoral resulta, assim, da expansão clonal de uma única célula que sofreu lesão genética. No segundo estágio, ou Promoção, a célula geneticamente alterada sofre ação de agentes oncopromotores. Os principais alvos da lesão celular envolvem proto-oncogenes promotores do crescimento, genes supressores de tumor, genes que regulam a morte celular programada (apoptose) e genes de reparo ao DNA (COTRAN; KUMAR; COLLINS, 2010). Os proto-oncogenes são genes inativos em células normais, mas que, uma vez ativados, transformam-se em oncogenes responsáveis pela malignização de células normais. Estas células malignas passam a se comportar de maneira desordenada, multiplicando-se descontroladamente. Assim, a última etapa, ou Progressão, é caracterizada pelo crescimento excessivo da massa tumoral, com início de sintomas clínicos, invasão local e capacidade de migrar para outros tecidos formando metástases. Em nível molecular ocorre um acúmulo de lesões genéticas decorrentes de mutações adicionais. Assim, a carcinogênese é um processo em múltiplas etapas, tanto em nível fenotípico quanto em nível genético (Esquema 2) (ALMEIDA et al., 2005; BERRIDGE; HERST; TAN, 2010; COTRAN; KUMAR; COLLINS, 2010; INCA, 2011).



Esquema 2: Processos simplificados da patogênese do câncer. O processo de carcinogênese envolve lesões ao DNA de células somáticas provocadas por fatores ambientais ou geradas por mutações geneticamente adquiridas. O resultado é a ativação de proto-oncogenes e a inativação de genes supressores de tumor, levando à expansão clonal das células mutadas e, ocasionalmente, à invasão de outros tecidos. (Adaptado de COTRAN; KUMAR; COLLINS, 2010).

3.2 Leucemias Agudas

As LAs são neoplasias malignas do sistema hematopoiético na medula óssea (MO) e/ou nos tecidos linfoides, caracterizadas pela parada da diferenciação normal e pela proliferação clonal de uma única célula-tronco que progressivamente substitui a medula normal e atinge o SP (BAIN, 2003; PUI, 2009; VARDIMAN, 2010). Uma vez na circulação periférica, as células neoplásicas podem se infiltrar e invadir outros tecidos, com preferência pelo fígado e baço. A evolução das LAs parece ser o resultado da aquisição de alterações genéticas e epigenéticas que envolvem a ativação de proto-oncogenes e mutações em genes

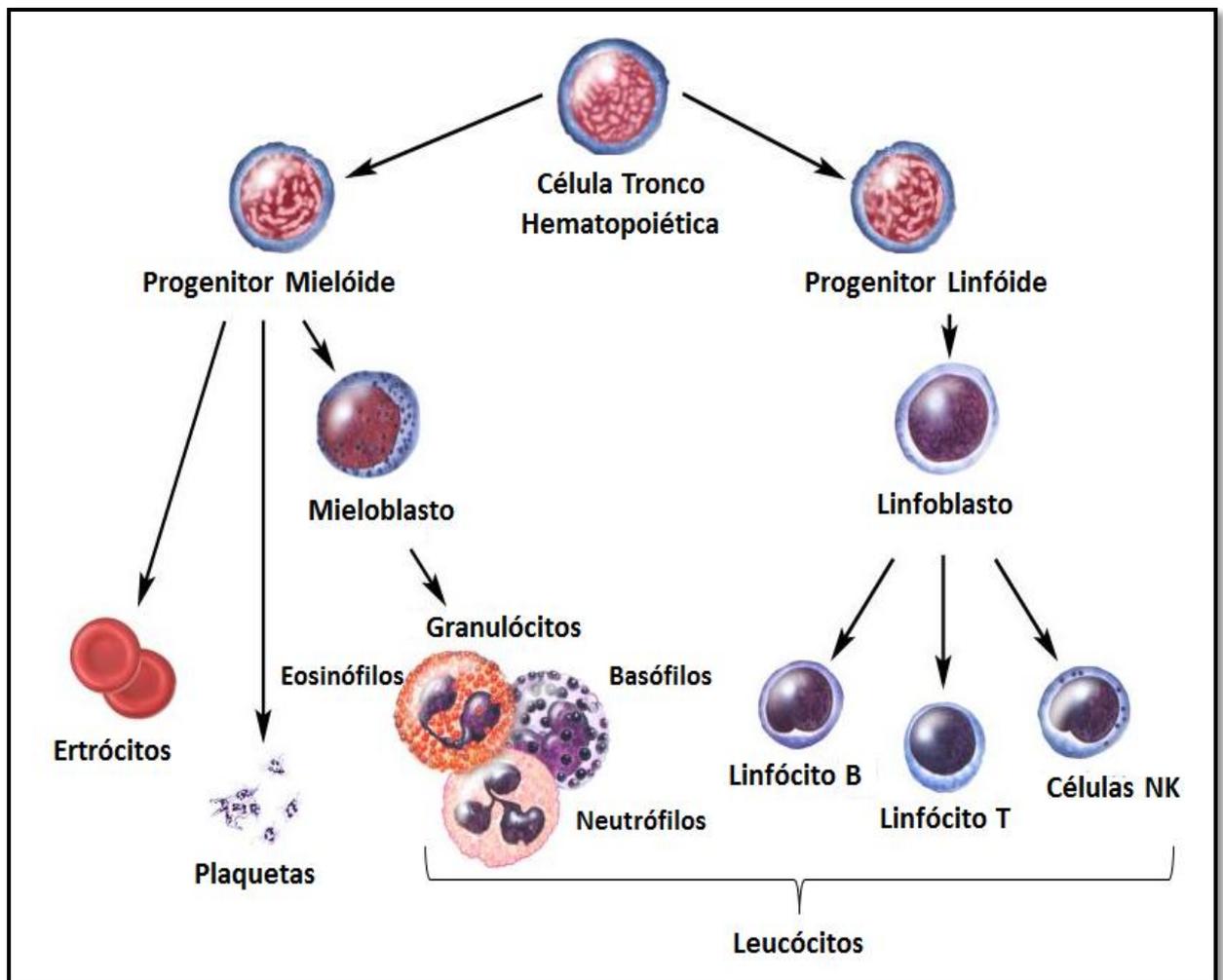
supressores, os quais conduzem à desregulação das cascatas de proteínas que, por sua vez, regulam o ciclo celular e medeiam as respostas antiapoptóticas e pró-apoptóticas (WILLIAMS, 2006; RUBNITZ, 2008; SWERDLOW et al., 2008; ABDEL-WAHAB; LEVINE, 2010). A proliferação do clone leucêmico pode surgir em diferentes fases de diferenciação dos precursores linfoides e mieloides, o que caracteriza esse tipo de neoplasia como uma doença heterogênea do ponto de vista biológico e morfológico (LUSIS, 2000; BAIN, 2003; SWERDLOW et al., 2008; KOH et al., 2009).

As leucemias são caracterizadas clinicamente por uma contagem muito elevada de leucócitos no SP e/ou na MO, podendo chegar a $10^5 - 10^6$ leucócitos/ mm^3 no SP, sendo que o valor normal é em torno de $7,5 \times 10^3$ leucócitos/ mm^3 . A diferenciação anormal e sem limites de autorrenovação resultam na desregulação da hematopoiese normal, caracterizada pelo acúmulo de células neoplásicas na MO e/ou no SP e pela diminuição da produção de células sanguíneas normais (ALMEIDA et. al.; 2005). Assim, os principais sinais e sintomas dos pacientes portadores de LAs ocorrem devido à insuficiência medular por substituição dos elementos hematopoiéticos normais pelas células leucêmicas. Dentre os principais sinais e sintomas encontram-se fadiga, astenia e palidez, em virtude da anemia, a qual, por sua vez, ocorre em função da eritropenia; fenômenos hemorrágicos devido à plaquetopenia e febre e infecções decorrentes da neutropenia (BAIN, 2003; BASSAN, 2004; BRASILEIRO FILHO, 2006).

Em linhas gerais, as leucemias são divididas de acordo com a linhagem celular afetada em mieloides e linfoides. Nas leucemias mieloides a mutação responsável pela formação do clone leucêmico ocorre em células comprometidas com a linhagem mielóide, as quais, em situações normais, dariam origem aos granulócitos, monócitos, eritrócitos e plaquetas. As leucemias linfoides, por sua vez, são decorrentes de mutações em células comprometidas com a linhagem linfóide e que, normalmente, originariam os linfócitos B e T e as células *Natural Killers* (NK) (Esquema 3). A outra forma de se classificar as leucemias é de acordo com o estágio de maturação dos precursores afetados. Assim, as LAs caracterizam-se pela proliferação clonal de células progenitoras imaturas (blastos) e, em geral, apresentam pior prognóstico, pois, se não tratadas adequadamente, costumam ter uma evolução rápida e fatal. Já as leucemias crônicas (LCs) caracterizam-se pela presença de células que mantêm a capacidade de maturação, porém perdem a capacidade de exercer suas funções como células maduras (BAIN, 2003; SWERDLOW et al., 2008; VARDIMAN et al., 2009).

A classificação atual, proposta pela OMS em 2008, envolve informações morfológicas, citoquímicas, imunofenotípicas e genéticas associadas às características clínicas

do paciente (SWERDLOW et al., 2008; VARDIMAN et al., 2009). De acordo com essa classificação, a LMA está subdividida em sete subcategorias, como segue: LMA associada a anormalidades genéticas recorrentes, LMA com alterações relacionadas com mielodisplasia, neoplasias mieloides associadas ao tratamento, LMA não categorizada nos itens anteriores, sarcoma mielóide, proliferação mielóide relacionada com síndrome de Down e neoplasia de células blásticas dendríticas plasmocitóides. A LLA está subdividida em três categorias: leucemia/linfoma linfoblástica T, (LLA-T), leucemia/linfoma linfoblástica B (LLA-B) associada a anormalidades genéticas recorrentes e leucemia/linfoma linfoblástica B, não categorizada anteriormente (SWERDLOW et al., 2008).



Esquema 3: Hematopoiese normal. De acordo com a linhagem e com o estágio maturativo, as leucemias são classificadas em agudas ou crônicas e em mieloides ou linfóides. (Adaptado de DE FARIA, 2008).

O diagnóstico das LAs é feito com base nas características morfológicas, citoquímicas e imunofenotípicas. Segundo a classificação da OMS, considera-se como leucemia mieloide aguda (LMA) quando o paciente apresenta 20% ou mais de mieloblastos na MO e/ou no SP. (SWERDLOW et al., 2008; WEINBERG et al., 2009). Já o diagnóstico das leucemias linfoblásticas agudas (LLA) é confirmado pela presença de 25% ou mais de linfoblastos na MO. No entanto, em alguns casos específicos nos quais a LMA ou a LLA estão associadas a anormalidades genéticas recorrentes, o diagnóstico é feito independentemente da contagem de blastos (LUSIS, 2000; MILLIGAN et al., 2005; VARDIMAN et al., 2009; WEINBERG et al., 2009).

A LMA é a forma mais frequente de leucemia em indivíduos adultos, principalmente naqueles com mais de 60 anos de idade. Apesar de apresentar baixa incidência em crianças (corresponde a 20% das LAs na infância e 80% na idade adulta), é essa fase que apresenta o pior prognóstico, com aproximadamente um terço dos pacientes sofrendo recidivas (SHAH; AGARWAL, 2008; ABDEL-WAHAB; LEVINE, 2010). Diferente da LMA, a LLA é mais comum em crianças com idade inferior a cinco anos (85% dos casos), dentre os quais 95% atingem a remissão completa. A LLA corresponde a aproximadamente 25% dos casos de câncer e 76% dos casos de leucemia na infância. (TABONE; LEVERGER, 2009; RAM et al., 2010). Em adultos, a LLA é menos frequente (corresponde a menos de 20% dos casos de LAs) e, geralmente, apresenta um pior prognóstico, com probabilidade de sobrevida, por mais de cinco anos, menor que 35 - 40% (THOMAS, 2009; LACOBUCCI et al., 2012).

O tratamento das LAs tem por objetivo eliminar o clone leucêmico da MO, permitindo assim, a restauração da hematopoiese normal (GRIMWADE; HILLS, 2009).

3.3 Terapias Antileucêmicas

Mesmo considerando os grandes avanços nas pesquisas básicas e clínicas, o tratamento para pacientes com LA continua sendo um desafio para a comunidade científica. Apesar das diferentes terapias disponíveis, como o transplante de MO, a radioterapia e a imunoterapia com anticorpos monoclonais, a terapia sistêmica com fármacos citotóxicos (quimioterapia) continua sendo o tratamento mais utilizado (ALTMAN; SASSANO; PLATANIAS, 2011; KADOWAKI; KITAWAKI, 2011).

Para que o paciente entre em remissão completa, o tratamento das LAs costuma ser bastante agressivo, uma vez que a remissão parcial não oferece benefícios à sobrevida do

indivíduo (MILLIGAN et al, 2005). Em geral, o tratamento com quimioterápicos consiste em duas fases. A primeira fase, chamada de Indução, tem por objetivo alcançar a remissão completa, a qual é definida como a ausência de manifestações extramedulares, valores hematológicos normais no SP, menos de 5% de blastos na MO e ausência de fenótipos leucêmicos. A segunda fase, chamada de Consolidação, tem o propósito de manter esta remissão e de eliminar elementos celulares malignos residuais que possam levar o paciente à recidiva. Dependendo do tipo de LA, existe ainda uma terceira fase, chamada de Manutenção, que pode durar de um a dois anos e que tem por objetivo reforçar o efeito alcançado nas fases anteriores (CRUZ et al., 2006).

Apesar de ser o método mais utilizado no tratamento das leucemias, a quimioterapia apresenta evidentes limitações de sua efetividade, pois o desenvolvimento de resistência ao tratamento é um fator recorrente (KADOWAKI; KITAWAKI, 2011). A resistência à quimioterapia pode ocorrer de três formas diferentes, ou seja, quando o paciente não responde à terapia de indução (pacientes refratários), quando o paciente responde inicialmente, mas a doença retorna em até 18 meses após o diagnóstico (recidiva precoce) ou quando a doença retorna após 18 meses (recidiva tardia) (BASSAN et al., 2004).

Outra limitação a ser ressaltada é a alta toxicidade dos quimioterápicos, a qual aumenta a morbidade dos pacientes levando-os, muitas vezes, a óbito antes do término do tratamento (ALTMAN; SASSANO; PLATANIAS, 2011).

Apesar de cerca de 80% dos pacientes portadores de LA atingirem a remissão completa em uma série inicial de quimioterapia, a recidiva é frequente para a maioria deles, sendo que a cura ou mesmo remissões prolongadas são incomuns, principalmente acima dos 60 anos de idade. Em pacientes idosos, a sobrevida de dois anos após o diagnóstico ocorre em apenas 6% dos casos (KADOWAKI; KITAWAKI, 2011). A sobrevida das células leucêmicas após a remissão completa durante a quimioterapia pode ter diferentes explicações. A primeira delas está relacionada à expressão de proteínas de resistência a múltiplos fármacos (MDR), que promovem o efluxo de uma grande variedade de substratos químicos a partir da célula. Outra possibilidade é a existência de efeitos citoprotetores induzidos pela célula tumoral, como o aumento da expressão da proteína survivina, e a incapacidade dos quimioterápicos de eliminar as células tronco leucêmicas, responsáveis pelo início e manutenção do fenótipo leucêmico. Como estas células são quiescentes, elas não são sensíveis aos quimioterápicos que normalmente têm como alvo as células em divisão (LANCET; KARP, 2010).

Nesse contexto, devido à elevada morbidade dos quimioterápicos disponíveis atualmente e às frequentes recidivas, a busca por novos fármacos antileucêmicos que tenham

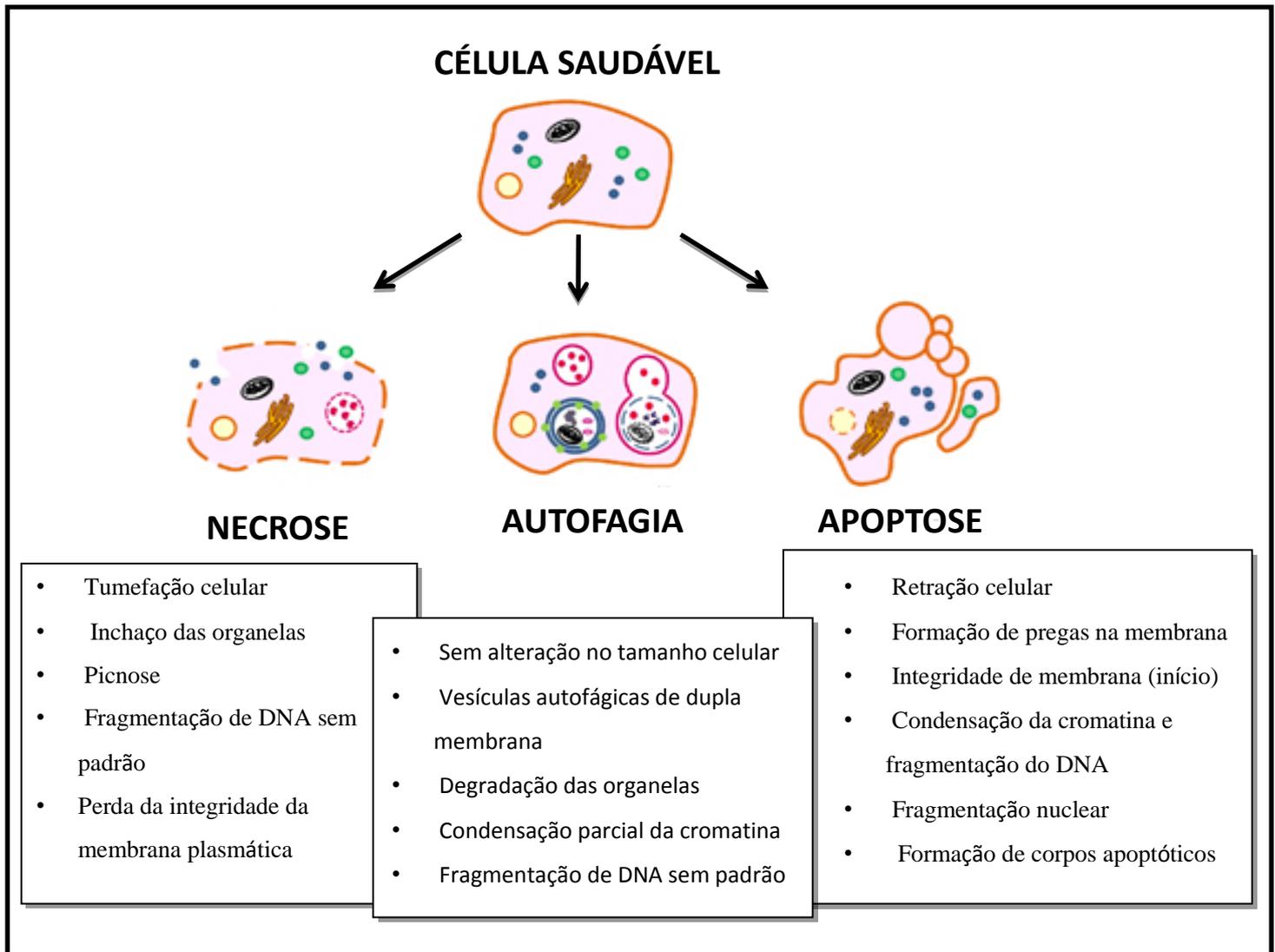
maior eficiência em induzir a apoptose nas células tumorais com o mínimo de efeitos adversos para o paciente e que sejam de fácil administração, tornou-se um grande alvo de investigação da indústria farmacêutica.

3.4 Tipos de Morte Celular

A reação da célula a qualquer tipo de mudança em suas condições endógenas ou exógenas envolvem respostas complexas que eventualmente levam à adaptação celular e à sobrevivência, ou à iniciação e execução da morte celular (RING et al., 2012). Durante muito tempo, a morte celular foi considerada um processo passivo e de caráter degenerativo que ocorria em situações de lesão celular, infecção ou ausência de fatores de crescimento. Entretanto, hoje é sabido que nem toda morte celular ocorre por um processo passivo, pois organismos multicelulares são capazes de induzir a morte celular programada em resposta a estímulos intra ou extracelulares (GRIVICICH; REGNER; ROCHA, 2007).

A morte celular programada tem como característica básica a eliminação de células de um tecido maduro ou em formação de forma rigorosamente controlada. É um aspecto fundamental para o desenvolvimento de organismos multicelulares, sendo importante durante o desenvolvimento embrionário, contribuindo para a formação dos órgãos e tecidos, e por toda a vida adulta como um componente essencial da resposta imune a agentes infecciosos (HEDRICK; CH'EM; ALVES, 2010). Desordens em um dos processos de sobrevivência ou morte celular têm consequências patológicas que podem levar a distúrbios embrionários, doenças neurodegenerativas ou ao desenvolvimento de neoplasias (BRÖKER, KRUYT; GIACCONE, 2005; FULDA, 2009).

Atualmente, são descritos na literatura três principais tipos de morte celular, a necrose, a autofagia e a apoptose (Esquema 4). (GRIVICICH; REGNER; ROCHA, 2007; KROMER et al., 2009; HEDRICK; CH'EM; ALVES, 2010). Além destas, tem crescido o número de estudos envolvendo outros tipos de morte celular menos conhecidos, como a mitose catastrófica e a necroptose (KREUZALER; WATSON, 2012), a netose (REMIJSEN et al., 2011) e a anoikis (BUCHHEIT; RAYAVARAPU; SCHAFER, 2012).



Esquema 4: Principais tipos de morte celular. Principais características morfológicas da necrose, apoptose e autofagia. (Adaptado de LONG; RYAN, 2012).

3.4.1 Necrose

A necrose é tradicionalmente considerada um tipo de morte celular não programada e não sujeita a regulações celulares. Normalmente, a necrose é resultado de circunstâncias externas à célula como agentes infecciosos, radiação, fármacos ou agentes químicos (GOLSTEIN; KROEMER, 2007).

Morfologicamente, a necrose é caracterizada pelo aumento do volume celular e das organelas, condensação da cromatina e ruptura da membrana plasmática, o que leva à desorganização do citoplasma e à liberação dos componentes celulares. O extravasamento do

conteúdo celular causa dano às células vizinhas e, por fim, gera uma importante resposta inflamatória tecidual local (BRÖKER; KRUYT; GIACCONE, 2005; RUBIN et al., 2010).

Além disso, as células necróticas são caracterizadas pela produção de espécies reativas de oxigênio, depleção de adenosina trifosfato (ATP), desregulação do equilíbrio do cálcio, ativação de proteases como as calpaínas e catepsinas e ruptura lisossomal. Vale ressaltar que nenhuma das alterações citadas acima serve como um marcador bioquímico ou imunológico específico para caracterizar a necrose. Por esse motivo, sua avaliação, normalmente, é feita por exclusão dos demais tipos de mortes celulares ou através de avaliação morfológica (GOLSTEIN; KROEMER, 2007; HEDRICK; CH'EM; ALVES, 2010).

Recentemente, a literatura sugere que pelo menos uma parcela das mortes celulares por necrose seja executada de forma rigorosamente regulada por mecanismos intracelulares próprios. A necrose programada foi renomeada como necroptose, e pode ser considerada um tipo de morte desejável por compostos quimioterápicos (KREUZALER; WATSON, 2012).

3.4.2 Autofagia

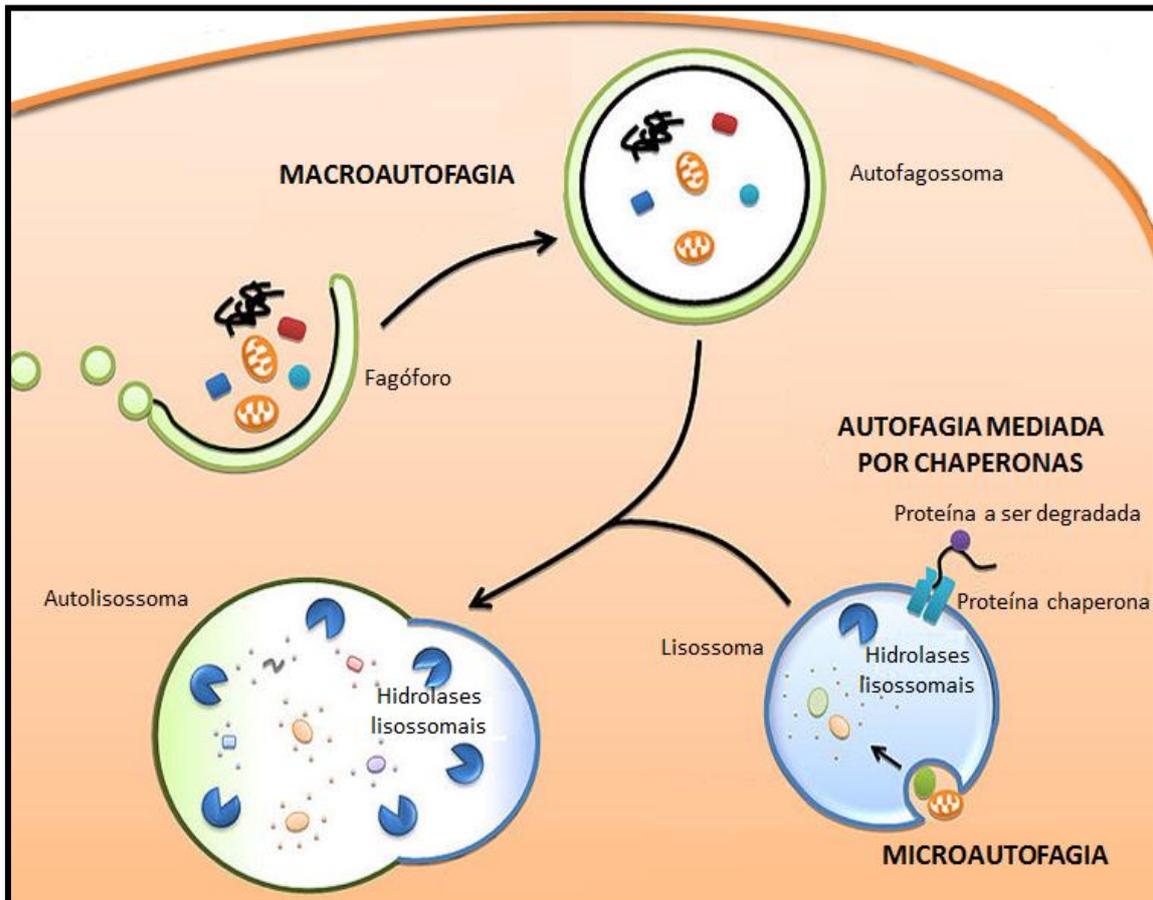
O termo autofagia tem origem grega e significa literalmente “comer a si mesmo”, referindo-se ao processo controlado no qual a célula digere seu próprio conteúdo. Estudos recentes sugerem que a autofagia represente outro tipo de morte celular programada tão desejada quanto a apoptose no desenvolvimento de fármacos com atividade citotóxica para células neoplásicas (ELMORE, 2007; WALSH; EDINGER, 2010).

Existem três tipos definidos de autofagia: a macroautofagia, a microautofagia e a autofagia mediada por chaperonas (Esquema 5):

- **Macroautofagia:** É caracterizada pelo englobamento do citoplasma por vesículas de dupla membrana denominadas de autofagossomas, distinguíveis de outras vesículas celulares ou de corpos apoptóticos. Os autofagossomas com o conteúdo celular no seu interior se fundem ao lisossoma formando o autofagolisossoma. Dentro dos autofagolisossomas, tanto o material englobado quanto a vesícula são degradados por hidrolases lisossomais. Esse é o tipo mais frequente de autofagia.

- **Microautofagia:** Diferente da macroautofagia, na microautofagia os componentes citosólicos são diretamente englobados pelo lisossoma por meio de invaginações da membrana lisossomal.

- **Autofagia mediada por chaperonas:** Nesse tipo de autofagia, proteínas específicas são translocadas para a membrana lisossomal junto de proteínas chaperonas, onde são reconhecidas por receptores que resultam na sua degradação (BRÖKER; KRUYT; GIACCONE, 2005; ELMORE, 2007; MELÉNDEZ; LEVINE, 2009; GLICK; BARTH; MACLEOD, 2010; WATSON; MORTENSEN; SIMON, 2011).



Esquema 5: Esquemática dos três tipos de autofagia. Macroautofagia e o englobamento de partículas citoplasmáticas nos autofagossomas. Microautofagia e digestão direta pelo lisossomo e autofagia mediada por proteínas chaperonas. (Adaptado de CHEUNG; IP, 2009).

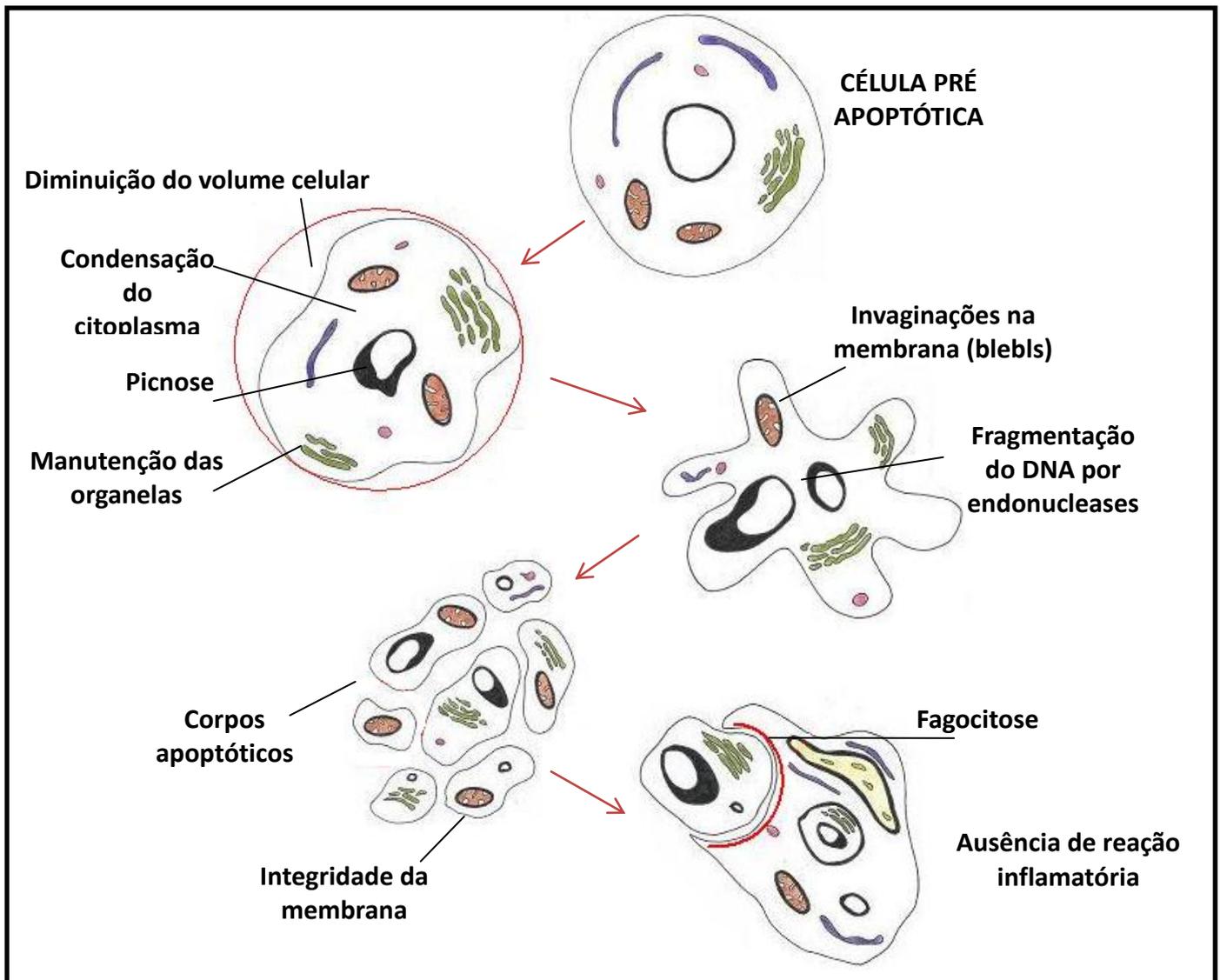
3.4.3 Apoptose

O termo apoptose foi introduzido em 1972 por Kerr, Wyllie e Currie para descrever um modelo de morte celular com morfologia característica e com mecanismos endógenos altamente regulados, a qual está envolvida na homeostase dos tecidos e na carcinogênese (WYLLIE, 2010). A apoptose ocorre nas mais diversas situações, como, por exemplo, na organogênese e na hematopoiese normal e patológica, no desenvolvimento embrionário, na

reposição fisiológica de alguns tecidos maduros, na atrofia dos órgãos, na resposta inflamatória e na eliminação de células após dano por agentes genotóxicos (GRIVICICH; REGNER; ROCHA, 2007).

Morfologicamente, durante o processo inicial de apoptose ocorre picnose e encolhimento da célula, de forma que o citoplasma se torna mais denso e as organelas mais empacotadas. A picnose é resultado da condensação da cromatina, uma característica marcante da apoptose. As organelas mantêm sua morfologia, com exceção das mitocôndrias, as quais podem adquirir poros na sua membrana. Assim, nesse primeiro estágio, as células apoptóticas aparecem como uma massa oval ou arredondada, com citoplasma denso e núcleo compacto, podendo apresentar, ainda, aumento da granulidade citoplasmática. Durante o segundo estágio, ocorre a formação de invaginações e pregas na membrana plasmática, denominadas *blebs*, o que culmina com a separação dos fragmentos celulares em corpos apoptóticos. Os corpos apoptóticos são formados por organelas íntegras e pelo conteúdo citoplasmático envolvidos pela membrana plasmática, podendo ou não conter fragmentos nucleares. Essas estruturas são reconhecidas como alvos fagocitários e são fagocitadas por células do sistema imune, como os macrófagos, e degradadas nos fagolisossomas (Esquema6). A apoptose gera pouca reação inflamatória, uma vez que as células apoptóticas não liberam o seu conteúdo celular para o tecido circundante, pois são digeridas rapidamente impedindo a necrose secundária e a liberação de citocinas inflamatórias (ELMORE, 2007; KROEMER et al., 2008; RUBIN et al., 2010). Outra característica importante da apoptose é a fragmentação do DNA, que ocorre pela ação de endonucleases ativas, as quais produzem fragmentos de tamanhos variáveis, sempre múltiplos de 200 pares de base. Esses fragmentos formam um padrão de quebra internucleossomal quando separados em gel de agarose e estão presentes na maioria das células em apoptose (GRIVICICH; REGNER; ROCHA, 2007; RUBIN et al.; 2010).

A mitocôndria, além de fornecer energia para a célula sob a forma de ATP, apresenta um papel central na indução da apoptose. Danos nessa organela resultam na formação de um canal de alta condutância que leva à perda do potencial de membrana, o que resulta em falha na fosforilação oxidativa e depleção de ATP. Além disso, o aumento da permeabilidade da membrana externa libera, para o citosol, proteínas que ativam as vias apoptóticas, como o citocromo *c* (COTRAN; KUMAR; COLLINS, 2010; POKORNÝ et al., 2012).



Esquema 6: Morfologia da apoptose. Principais características morfológicas da célula em apoptose, com posterior digestão celular pelos fagócitos e reação inflamatória mínima devido à ausência de liberação do conteúdo citoplasmático para o meio externo. (Adaptado de BJELAKOVIC et al., 2005).

3.4.3.1 Mecanismos Reguladores da Apoptose

Os processos responsáveis pela regulação da apoptose envolvem duas vias principais: a via extrínseca ou via dos receptores de morte, iniciada pela superfamília de receptores de necrose tumoral (TNF); e a via intrínseca, ou mitocondrial, controlada por membros da família Bcl-2 (MITCHELL et al., 2005; NDOZANGUE-TOURIGUINE, et al., 2008; HEDRICK; CH'EM; ALVES, 2010). Ambas as vias convergem para a ativação das caspases,

as quais podem funcionar como iniciadoras ou efetoras da propagação do sinal apoptótico (FESIK, 2005; LO et al.; 2011).

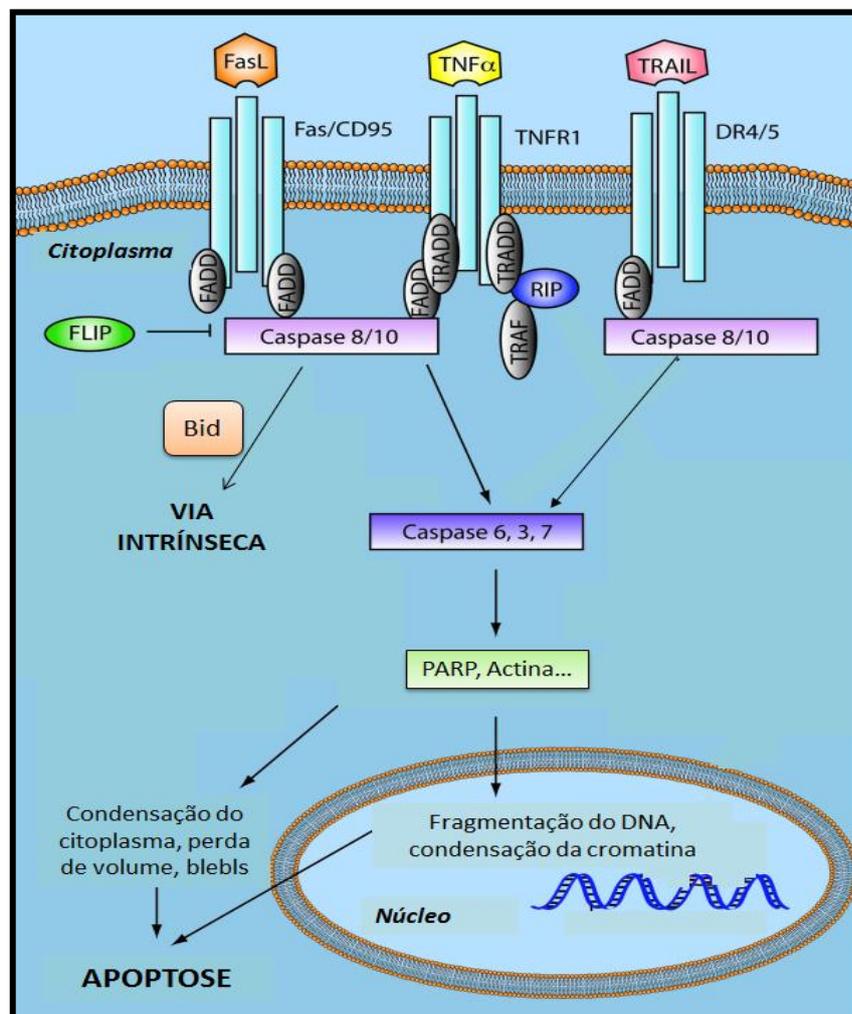
As caspases compreendem uma família de proteases que possuem um resíduo de cisteína em seus sítios ativos, tornando-as capazes de clivar resíduos de ácido aspártico de proteínas específicas. Estas enzimas são expressas nas células na forma de zimógenos inativos ou de baixa atividade denominados pró-caspases, sendo necessária sua oligomerização e/ou clivagem para que se tornem ativas (ALAN; CLARKE, 2009). As caspases são divididas em iniciadoras (caspase-8, -2, -9 e -10) e em efetoras (caspase-3, -6 e 7). As caspases iniciadoras são, por definição, as primeiras a serem ativadas durante a via apoptótica. Quando ativas, elas promovem a clivagem das caspases efetoras, as quais, por sua vez, desencadeiam uma série de eventos proteolíticos que, eventualmente, levam à execução da morte celular (TESTA; RICCONI, 2007; DEL POETA et al., 2008). O fato de tanto a via intrínseca quanto a via extrínseca estarem envolvidas na ativação das caspases, faz com que estas enzimas sejam um potencial alvo para o desenvolvimento de novos fármacos no combate às neoplasias malignas (FULDA; DEBATIN, 2006; LO et al.; 2011).

A via extrínseca da apoptose (Esquema 7) é iniciada pela ativação de uma família de receptores localizados na superfície da membrana plasmática da maioria das células, conhecidos como receptores de morte. Fazem parte dessa família os receptores TNF-R, TRAIL-R (DR4 e DR5), DR3 (Apo-2), DR6 e FasR (Apo-1 ou CD95). Esses receptores apresentam certa homologia entre si, uma vez que todos fazem parte da superfamília TNF. Todos os receptores dessa família são formados por um domínio citoplasmático, chamado de domínio de morte, o qual está envolvido nas interações proteicas e na propagação do sinal apoptótico, e um domínio extracelular rico em cisteína que se liga ao seu ligante específico.

Um dos receptores de morte mais estudados na literatura é o FasR, cujo gene está localizado no braço longo do cromossomo 10 e que contém 319 aminoácidos e estrutura trímica. Quando o FasR liga-se ao ligante Fas (FasL), ocorre a formação do complexo sinalizador indutor de apoptose, composto pelo FasR, pela proteína adaptadora FADD, pelas pró-caspases-8 e -10 e por c-FLIP, o regulador das caspases-8 e -10. A ligação entre TRAIL-R e TRAIL-L também promove a formação de um complexo com FADD e desencadeia eventos semelhantes aos de FasR, enquanto que a ligação entre TNF e TNF-R, promove a ligação da proteína TRADD. A oligomerização da caspase-8 resulta na sua clivagem e na sua liberação do complexo sinalizador na forma de um heterotetrâmero ativo. A caspase-8 ativa inicia o processo de apoptose de duas formas distintas. Nos tipos celulares que apresentam uma intensa ativação da caspase-8 (tipo I), os membros efetores da família das caspases são

ativados diretamente, levando à execução da apoptose de forma totalmente independente da via mitocondrial. Em outros tipos de células (tipo II), a caspase-8 provoca a clivagem da proteína Bid, a qual inicia a via que leva a liberação de fatores pró-apoptóticos pela mitocôndria, além de amplificar a ativação da caspase-8. Tanto a caspase-8 quanto o FADD são essenciais para a indução da apoptose pelo FasR. A via extrínseca pode ser inibida pela proteína c-FLIP e pelo fator de transcrição NF κ B, os quais se ligam ao complexo sinalizador modulando-o e inativando-o (NAGATA, 2007; PETER; LEGEMBRE; BARNHART et al., 2004; RÖDER; TRAUZOLD; KALTHOFF, 2011; LEE et. al., 2012).

O FasR e o seu ligante desempenham um importante papel na tumorigênese, pois foi demonstrado que mutações que afetam a funcionalidade de FasR estão associadas a um pior prognóstico em diferentes tipos de neoplasias (GRIVICICH; REGNER; ROCHA, 2007; GHOBRIA et al., 2009).



Esquema 7: Via extrínseca da apoptose. A via extrínseca é ativada pela união de ligantes específicos aos receptores de morte (TNF-R, FasR/CD95 e TRAIL-R), o que resulta na

ativação da cascata das caspases e na clivagem de substratos citoplasmáticos e nucleares. A via extrínseca pode ativar a via mitocondrial através da clivagem da proteína Bid pela caspase-8. (Adaptado de KRAKSTAD e CHEKENYA, 2010).

A via intrínseca da apoptose ocorre na mitocôndria e é iniciada por uma série de estímulos externos, como lesão ao DNA, radiação ultravioleta, alguns tipos de hormônios (ex. glicocorticoides), algumas toxinas, privação de fatores tróficos e outros estresses celulares. A exposição a estes agentes leva à despolarização da membrana mitocondrial externa, com perda do potencial transmembrana ($\Delta\Psi_m$) e a consequente liberação para o citosol de fatores de apoptose como o citocromo *c*, a proteína Smac/Diablo e o fator indutor de apoptose (AIF). A liberação destes fatores é regulada por membros da família de proteínas Bcl-2. (LY; GRUBB; LAWEN, 2003; LO et al.; 2011; ALLAN; CLARKE, 2011).

Os membros da família Bcl-2 contêm até quatro grandes domínios conservados, denominados domínios homólogos à Bcl-2 (BH). Essa família é dividida em duas classes de moléculas que apresentam efeitos opostos: os membros antiapoptóticos como Bcl-2 e Bcl-xL, os quais protegem a célula contra a apoptose; e os membros pró-apoptóticos como Bax, Bid, Bak, Noxa que desencadeiam a apoptose (SCHULZE-BERGMEN; KRAMMER, 2004; ADAMS; CORY, 2007; GHOBRIA et al., 2009).

As proteínas antiapoptóticas descritas acima possuem os quatro domínios BH1, BH2, BH3 e BH4, enquanto que as proteínas pró-apoptóticas são divididas em um grupo que apresenta os domínios BH1, BH2 e BH3 (Bax, Bak) e um grupo denominado BH3-*only* que apresenta apenas o domínio BH3 (Bid, Noxa). Diante de um sinal estimulador, membros pró-apoptóticos da família Bcl-2, os quais se encontram inicialmente na sua forma inativa no citosol, são translocados para a membrana mitocondrial externa. A oligomerização dessas proteínas induz a célula à apoptose por dois mecanismos distintos: tanto pela formação direta de poros proteicos na membrana mitocondrial, permeabilizando-a e permitindo a distribuição do citocromo *c* pelo citoplasma, quanto pela ligação, via domínios BH3, às proteínas Bcl-2 e Bcl-xL, antagonizando-as (ZAFFARONI et al., 2005; ADAMS; CORY, 2007).

Dessa forma, o grupo BH3-*only*, funciona como uma ligação entre as vias extrínseca e intrínseca, pois pode atuar tanto como ativador direto das proteínas pró-apoptóticas, quanto como inibidor das proteínas antiapoptóticas, sendo que a interação entre seus membros leva à desestabilização da membrana mitocondrial e à morte celular por apoptose. (CORY;

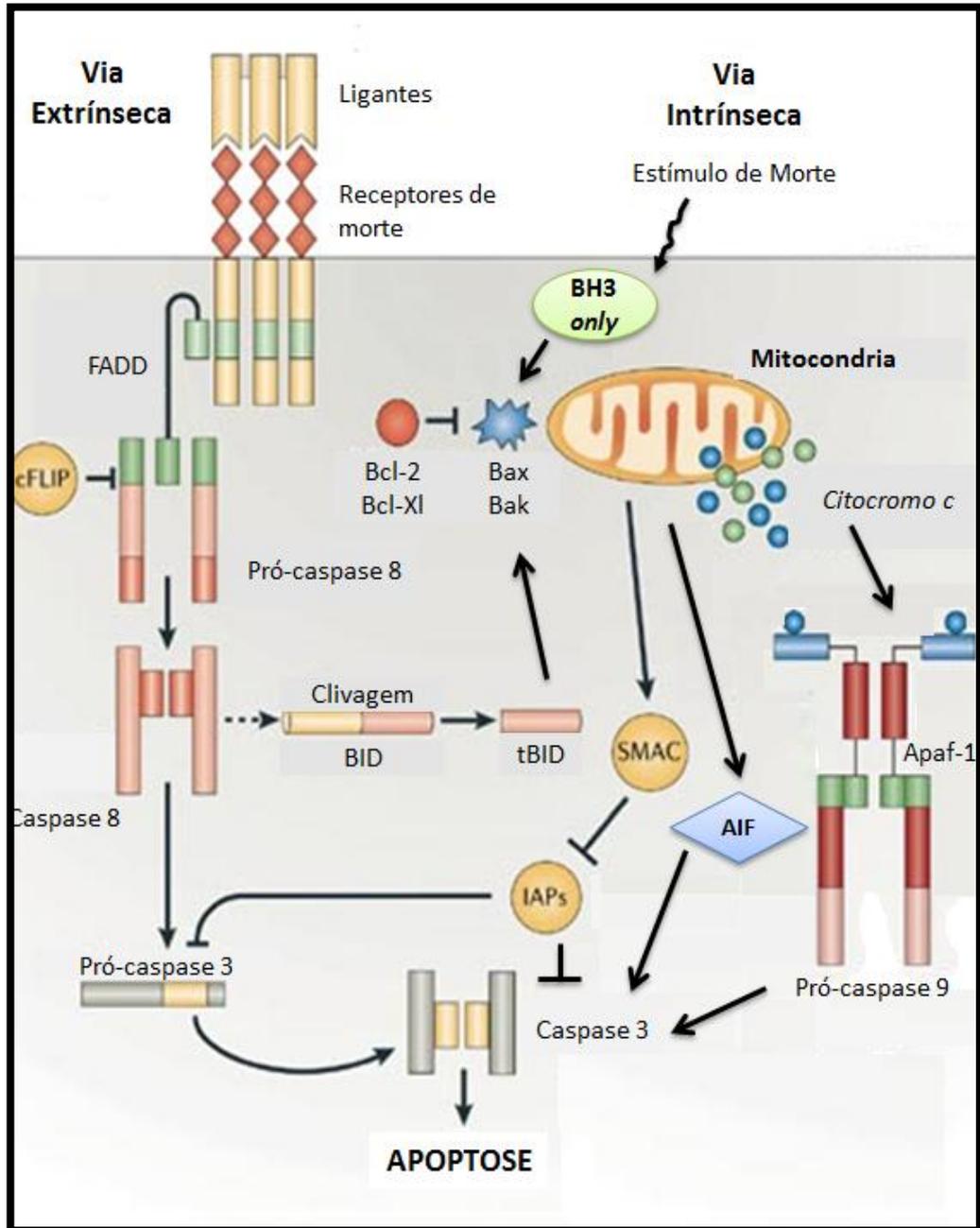
ADAMS, 2002; REIMERTZ et al., 2003; FRANKLIN, 2011; LINDSAY; ESPOSTI; GILMORE, 2011).

Em células saudáveis, o citocromo *c* está localizado no espaço entre as membranas interna e externa da mitocôndria, onde funciona como transportador de elétrons do complexo respiratório III (complexo *bc1*) para o complexo IV (citocromo oxidase) na cadeia transportadora de elétrons. Dessa forma, a liberação do citocromo *c* está associada à diminuição da produção de ATP e ao estresse oxidativo (FRANKLIN, 2011). A liberação de citocromo *c* pela mitocôndria induz à formação do apoptossoma, um complexo multimérico formado pelo fator ativador de apoptose 1 (Apaf-1) e pela pró-caspase-9. A pró-caspase-9 é considerada a proteína iniciadora da via intrínseca, a qual, quando clivada, resulta na ativação das caspases efetoras -3 e -7. A regulação da ativação da caspase-9 é feita por proteínas cinases, incluindo ERK1/2 e PKA, as quais são ativadas por sinais extracelulares de crescimento e sobrevivência (ALLAN; CLARKE, 2009).

Apesar de o citocromo *c* ser a principal proteína mitocondrial envolvida na apoptose, diversas outras proteínas liberadas pela mitocôndria apresentam atividades pró-apoptóticas independente das caspases. Os principais exemplos são o AIF e as proteínas Smac/Diablo. O AIF está envolvido na fragmentação do DNA, na condensação da cromatina e na alteração do potencial de membrana mitocondrial. Já as proteínas Smac/Diablo promovem a apoptose por impedirem a inibição das caspases pelos seus inibidores endógenos (FRANKLIN, 2011). Dentre esses inibidores encontram-se os membros da família de proteínas inibidoras de apoptose (IAPs), como a survivina. Esta proteína é considerada antiapoptótica devido à sua capacidade de inibir a caspase iniciadora -9 e as caspases efetoras -3 e -7. A survivina é superexpressa na maioria das neoplasias humanas e também está envolvida na resistência ao tratamento, estando, assim, associada a um pior prognóstico (ZAFFARONI et al., 2005; HUNTER et al., 2007; FULDA, 2009).

A última etapa da cascata de apoptose envolve a via comum, na qual ocorre a ativação das caspases efetoras (caspase-3, caspase-6 e caspase-7), tanto pela caspase-8 da via extrínseca, quando pela caspase-9 da via intrínseca. As caspases efetoras têm como alvo final a clivagem de proteínas como a poli-ADP-ribose polimerase (PARP) e a ICAD/DFF45. A clivagem e a inativação de ICAD-DFF45 possibilitam que CAD entre no núcleo e fragmente o DNA, provocando o característico padrão “em escada” visto nas células apoptóticas. A função exata de muitos substratos das caspases não foi totalmente elucidada, mas, normalmente, são proteínas de reparo ao DNA, proteínas do citoesqueleto e proteínas cinases que degradam o material nuclear, originando eventos responsáveis pela maioria das mudanças

morfológicas pelas quais a apoptose é caracterizada (FULDA, 2009; WYLLIE, 2010; LO et al.; 2011).



Esquema 8: Via intrínseca e via extrínseca da apoptose. A via intrínseca é iniciada por estímulos externos, resultando na despolimerização da membrana mitocondrial externa e na liberação de fatores como o citocromo *c*, evento regulado pela família de proteínas Bcl-2. A via intrínseca ocorre pela ativação dos receptores de morte. O resultado é a ativação da caspase-3, a qual leva a célula à apoptose. Outras proteínas como AIF, IAPs e Smac/Diablo também participam da cascata em diferentes momentos e com diferentes funções. Adaptado de HOTCHKISS; NICHOLSON, 2006.

De acordo com a literatura, além da via tradicional existe, ainda, uma via adicional de morte celular independente de caspases que envolve a citotoxicidade mediada por células T e células NK através de serina proteases denominadas perforinas e granzimas. A morte celular pode ocorrer pela ação das granzimas A, B, C ou outras. A via das perforinas/granzimas, assim como a via intrínseca e a via extrínseca, pode convergir para a via comum, com clivagem da caspase-3 e resultando nas já citadas características da apoptose. No entanto, a via mediada pela granzima A é capaz de ativar uma via paralela que induz à célula alvo todas as características morfológicas da apoptose, sem influência da superexpressão de Bcl-2 ou da inibição das caspases. O dano ao DNA e sua fragmentação ocorre, neste caso, através de uma clivagem hidrolítica de uma ligação fosfodiéster em uma única fita de DNA, e não através do corte em ambas as fitas como ocorreria nas vias tradicionais. Esse fato explica porque é possível observar morte celular por apoptose sem o característico padrão de fragmentação “em escada” (DEBATIN, 2004; MARTINVALET; ZHU; LIEBERMAN, 2005).

Os principais mecanismos de resistência resultantes na proliferação constante das células leucêmicas estão relacionados principalmente à resistência da célula à morte por apoptose e à manutenção de um sinal mitogênico. Conforme citado anteriormente, a resistência à apoptose pode ocorrer devido a expressão de proteínas MDR, como, por exemplo, a PgP, MRP e LRP, ao aumento da expressão de proteínas antiapoptóticas como a Bcl-2, Bcl-XL e survivina, e à diminuição da expressão de proteínas pró-apoptóticas como a Bax e o AIF (LANCET; KARP, 2010). Assim, o estudo dos mecanismos indutores de apoptose é imprescindível para a investigação do uso terapêutico de novos compostos antileucêmicos e para a compreensão dos mecanismos de resistência à quimioterapia. A elucidação de alguns dos mecanismos moleculares podem abrir perspectivas para a modulação desses processos.

3.5 Ciclo Celular

Os processos envolvidos na evolução de uma célula normal para uma célula potencialmente maligna envolvem, ainda, diversos mecanismos relacionados com a divisão celular. Assim, o conhecimento do ciclo celular e dos seus mecanismos de regulação é fundamental para que haja compreensão da leucemogênese. De fato, as células possuem múltiplos mecanismos de checagem do ciclo celular a fim de monitorar e responder a

distúrbios celulares, impedindo a progressão de células alteradas até que os erros sejam reparados ou até a promoção da apoptose (ABBAS; DUTTA, 2009).

O ciclo celular é composto de duas fases principais, mitose e interfase (Esquema 9). A mitose é o processo de divisão celular no qual uma célula-mãe se divide em duas células-filhas com o mesmo número de cromossomos. Essa fase, por sua vez, é dividida em prófase, metáfase, anáfase e telófase. A interfase é o período entre duas mitoses e é dividida em *gap1* (G1), síntese (S) e *gap2* (G2). Na fase G1 ocorre a preparação para a divisão, com aumento do volume celular, condensação dos cromossomos e produção de proteínas que serão essenciais para a nova célula. Na fase S ocorre a replicação do DNA, de forma que a célula duplique precisamente seus cromossomos. Após a replicação, inicia-se a fase G2, durante a qual a célula sintetiza componentes necessários para a mitose como, por exemplo, o fuso mitótico. Após a divisão do material nuclear ocorre a citocinese, finalizando o ciclo de replicação. A célula que não está se replicando encontra-se no que se denomina de fase G0 ou quiescência. Nessa fase, apesar de as células estarem metabolicamente ativas, o DNA encontra-se altamente enovelado e a atividade nuclear é baixa. A célula tumoral não finaliza o ciclo de replicação celular de forma normal, ou seja, não retorna à fase G0 e passa diretamente da mitose para uma nova fase G1 (RIVORE et al., 2001; VERMEULEN; BOCKSTAELE; BERNEMAN, 2003; ALMEIDA et al., 2005).

O termo *checkpoint* ou pontos de checagem do ciclo celular refere-se aos mecanismos pelos quais a célula bloqueia de forma ativa o ciclo celular até que um processo como a replicação do DNA ou a mitose ocorra de forma completa e assertiva. Durante o ciclo celular são reconhecidos três pontos de bloqueio principais: em G1, antes de a célula entrar na fase S do ciclo; em G2, antes de a célula entrar em mitose; e durante a metáfase, impedindo a ligação dos cromossomos aos microtúbulos. Perturbações nestes pontos de checagem comprometem a integridade do genoma, podem promover o desenvolvimento de neoplasias e afetam significativamente a eficácia de terapias antitumorais (KASTAN; BARTEK, 2004).

A divisão celular normal é regulada por vias sinalizadoras, que correspondem a fatores extracelulares que atuam em cascatas de proteínas. A progressão do ciclo celular é controlada, principalmente, por uma série de enzimas chamadas cinases dependentes de ciclinas (CDKs), as quais constituem uma família de proteínas cinase do tipo serina/treonina que atua, principalmente, nas transições de fases do ciclo celular (WARD, 2002).

Até o presente momento, nove CDKs (denominadas CDK 1-9) foram identificadas, sendo que dessas, cinco estão ativas durante o ciclo celular: CDK4, CDK6 e CDK2 na fase G1, CDK2 na fase S e CDK1 na fase M. Da mesma forma, 16 ciclinas (A, B1, B2, C, D1, D2,

D3, E, F, G1, G2, H, I, K, T1 e T2) foram descritas na literatura, sendo que a interação entre ciclinas e CDKs promove a ativação das cinases, as quais, por sua vez, fosforilam uma série de substratos-chave que permitem a progressão de uma fase a outra do ciclo celular (JOHNSON; WALKER, 1999).

Diferente das CDKs, que permanecem estáveis durante a progressão do ciclo celular, a concentração de ciclina aumenta e diminui durante esse ciclo, e é dessa forma que elas ativam periodicamente as proteínas cinases. Para esta ativação, ciclinas específicas são requeridas em cada fase do ciclo celular. Os três tipos de ciclina D (D1, D2 e D3) ligam-se à CDK4 e CDK6 formando o complexo CDK-ciclina D, a qual é essencial para a entrada da célula na fase G1. A associação da ciclina E com a CDK2 regula a progressão da fase G1 para a fase S, enquanto que a associação dessa cinase com a ciclina A é necessária durante esta fase do ciclo celular. No final da fase G2, o complexo formado pela ligação da ciclina A com a CDK1 promove a entrada da célula na fase M, fosforilando substratos responsáveis por desencadear eventos celulares característicos da mitose, como a quebra da membrana nuclear, a separação e a condensação dos cromossomos e a formação do fuso mitótico. A mitose, por sua vez, é regulada pela associação entre ciclina B e CDK1 (RIVOIRE et. al., 2001; KASTAN; BARTEK, 2004).

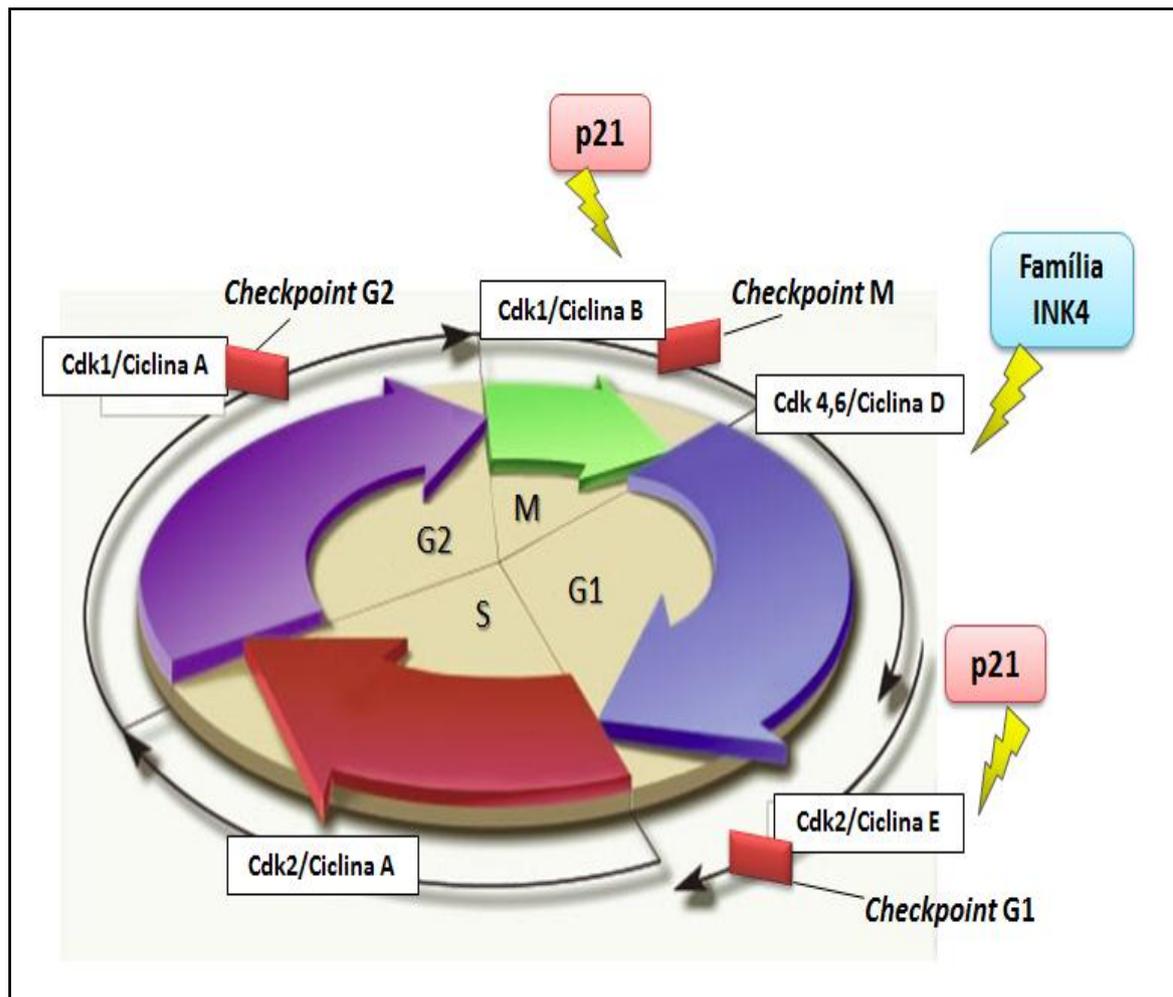
Em situações anormais, o ciclo celular pode ser inibido por um grupo de proteínas denominadas de inibidores de CDKs (CKI), as quais regulam negativamente as vias sinalizadoras de progressão da divisão celular até que o reparo do DNA esteja completo. As CKIs atuam formando complexos estáveis com as CDKs, o que impede que as mesmas se liguem às suas respectivas ciclinas. Os inibidores podem ser divididos em duas famílias de acordo com o seu mecanismo de ação. Os membros da família Cip/Kip, como o p21, interagem principalmente com a CDK2, bloqueando a fase G1 do ciclo celular, e também inibindo o complexo CDK1-ciclina B, o que resulta no bloqueio da mitose. Os membros da família INK4, como o p16, p15, p18 e p19, interagem especificamente com as CDK4 e CDK6, bloqueando a fase G1. A proteína p21 também é capaz de inibir a síntese de DNA por se ligar e inibir o antígeno nuclear de proliferação celular (PCA) (WARD, 2002; VERMEULEN; BOCKSTAELE; BERNEMAN, 2003).

Os CKIs, por sua vez, são regulados por uma série de sinais intracelulares e extracelulares. A expressão de p21, por exemplo, está sob controle transcripcional do gene supressor de tumor p53. Em situações que envolvem lesão ao DNA, ativação de oncogenes aberrantes, estresse ribossomal, perda de adesão à matriz extracelular ou hipóxia, o gene p53 é ativado e leva à transcrição da proteína p53. Essa, por sua vez, monitora a integridade do

genoma, impedindo a proliferação de células com DNA mutado por inibir o ciclo mitótico no início da fase G1. (CAVALCANTI; KLUMB; MAIA, 2002; GU;ZHU, 2012).

Além disso, a p53 ativa a transcrição de genes de reparo ao DNA com o objetivo de impedir a propagação do erro genético para as células filhas. Se o reparo ao DNA não for efetuado de forma satisfatória, a p53 dispara o mecanismo de apoptose pela ativação do gene Bax, cuja proteína inibe a ação antiapoptótica da proteína Bcl-2. Devido às suas atividades antineoplásicas e auxílio na manutenção da homeostase, a p53 é considerada a “guardiã do genoma”. Mutações no gene p53 alteram significativamente sua proteína, o que resulta na incapacidade de efetuar o bloqueio do ciclo celular e de disparar o mecanismo de apoptose. Além disso, a p53 mutada interage com a proteína selvagem de forma a inibir a supressão tumoral (KASTAN; BARTEK, 2004; GHOBRIAL et al., 2005; HUNTER; LACASSE; KORNELUK, 2007; GU; ZHU, 2012).

A proliferação celular descontrolada é considerada um dos principais mecanismos biológicos envolvidos na oncogênese. Os marcadores de proliferação celular têm sido classificados em três grupos: os marcadores de fração de crescimento, os marcadores de fases específicas do ciclo celular e os marcadores de tempo celular. A fração de crescimento pode ser identificada pela proteína nuclear KI67 (MOTTA et al.; 2009). De acordo com Brown e Gatter (2002), células que estejam em constante ciclagem expressam a proteína KI67 em concentrações variáveis no núcleo celular durante as fases G1, S e G2 do ciclo celular e também durante a mitose. Já as células quiescentes na fase G0 não expressam essa proteína. Como todas as células proliferativas (incluindo células normais e células tumorais) expressam a proteína KI67, a mesma tem sido utilizada como um importante marcador de proliferação tumoral e como ferramenta diagnóstica para diferentes tipos de neoplasias. Portanto, sua expressão está associada a variabilidades prognósticas como, por exemplo, à progressão tumoral e ao índice de diferenciação de tumor (SCHOLZEN; GERDES, 2000). Apesar de ser reconhecida como uma proteína reguladora do ciclo celular, as funções específicas da proteína KI67 permanecem inconclusivas, principalmente devido à sua falta de homologia com outras proteínas. Algumas das funções propostas incluem a organização e manutenção da arquitetura do DNA e a síntese de ribossomos durante a mitose (YANG et al.; 2006).



Esquema 9: Regulação do ciclo celular. As fases do ciclo celular são representadas por G1, S, G2 e M. Os três principais bloqueios do ciclo celular são os pontos de checagem das fases G1, G2 e M. A progressão do ciclo celular é controlada por diferentes enzimas CDKs e ciclinas, de acordo com a fase do ciclo celular. Em situações anormais, o ciclo celular pode ser inibido por CKIs como o p21, membro da família Cip/Kip, e a família INK4. Adaptado de WINSLOW; KIBIUK, 2001.

3.6 Chalconas Como Novos Alvos Terapêuticos

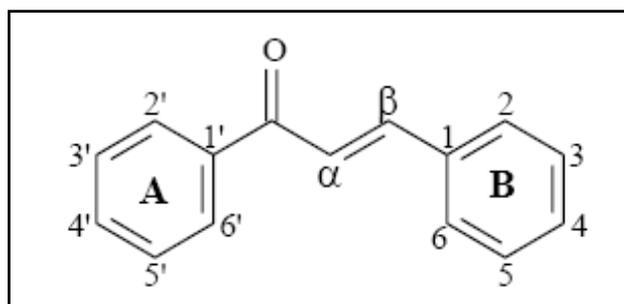
Atualmente, a busca por novos alvos terapêuticos no combate às LAs envolve o estudo de novos compostos naturais ou sintéticos que superem esses mecanismos de resistência e levem a célula tumoral ao bloqueio do seu ciclo celular e à morte por apoptose (KADOWAKI; KITAWAKI, 2011).

As plantas são fontes importantes de produtos naturais biologicamente ativos, como, por exemplo, flavonoides, isoflavonóides, ligninas, glicosídeos, alcaloides, entre outros;

muitos dos quais se tornam modelos para a síntese de novos fármacos (GUERRA; NODARI, 2000; SILVA et al., 2010). Dentre estes produtos, os flavonoides, um grupo de metabólitos secundários encontrados em plantas, têm sido estudados com afinco devido a suas propriedades antioxidante e antitumoral, as quais podem conferir proteção contra diversas doenças (ANTOIGNONI et al., 2007; SIKANDER et al., 2011). Os efeitos antiproliferativos induzidos por agentes fenólicos em várias linhagens neoplásicas, incluindo as leucemias, têm sido explicados por sua ação na regulação gênica, inibição da proliferação celular, parada do ciclo celular e indução da apoptose (HAMBLIN, 2006; STRISSEL; STRICK, 2005).

Dentro desse contexto, encontram-se as chalconas, uma subclasse de compostos isolados de diferentes partes de plantas (raízes, sementes, folhas, etc.), que são especialmente abundante em frutas (maçãs, frutas cítricas), vegetais (tomates, batatas, broto de feijão) e outras plantas e especiarias (SIKANDER et al.; 2011). Essa classe também inclui aleloquímicos de plantas e feromônios de insetos (DEWICK, 1997). As chalconas são consideradas precursoras dos flavonoides e isoflavonóides e são descritas na literatura como o primeiro composto isolado de plantas a partir da biossíntese de flavonoides (BOUMENDJEL; RONOT; BOUTONNAT, 2009; KATSORI; HADJIPAVLOU-LITINA, 2009).

Estruturalmente, as chalconas, ou 1,3-difenil-2-propen-1-ona, são flavonoides de cadeia aberta na qual dois anéis aromáticos são unidos por três carbonos, uma carbonila e dois carbonos α -, β –insaturados (Esquema 10) (RAO et al., 2004; KATSORI; HADJIPAVLOU-LITINA, 2009). Sua síntese ocorre pela condensação de arilcetonas com aldeídos aromáticos na presença de agentes de condensação adequados (VOGEL, 1989). Podem ser submetidas a uma variedade de reações químicas, e têm sido utilizadas na síntese de uma série de compostos heterocíclicos sintéticos (BOUMENDJEL; RONOT; BOUTONNAT, 2009; KATSORI; HADJIPAVLOU-LITINA, 2009; SWEETY et al.; 2010).



Esquema 10: Núcleo fundamental das chalconas. Fonte: ZUANAZZI, 2004.

As chalconas têm sido descritas na literatura principalmente por suas atividades antitumoral (AKIHISA et al., 2012), antiproliferativa e citotóxica (BOUMENDJEL et al., 2009; KATSORI; HADJIPAYLOU-LITINA, 2009), tendo sido testadas em diversos tipos de câncer, incluindo as leucemias. Estudos demonstram ainda que estes compostos alcançam concentrações plasmáticas satisfatórias e não causam toxicidade a células saudáveis (BATOVSKA; TODOROVA, 2010). Além disso, considerando que um grande número de fármacos antitumorais utilizados na clínica apresenta efeitos genotóxicos devido à sua interação com os grupos amino dos ácidos nucleicos, as chalconas apresentam a vantagem de possuírem forte afinidade pelos tióis em contraste com as aminas (GUZI et al., 2009).

Outros efeitos biológicos descritos na literatura confirmam o grande potencial farmacológico e terapêutico das chalconas. Estudos demonstram que essa classe de compostos apresenta efeito antibacteriano (CHEN et al.; 2010), anti-inflamatório (BANDGAR et al.; 2010; WU et al.; 2011), analgésico (VIANA; BANDEIRA; MATOS, 2003), antiviral (MIRANDA et al., 2000), antioxidante (CHENG et al., 2008) e pró-oxidante (GUZI et al., 2011), dentre outros (Tabela 1).

Tabela 1: Efeitos descritos na literatura para diferentes chalconas em ensaios *in vitro*.

EFEITO	REFERÊNCIA
ANALGÉSICO	VIANA, BANDEIRA e MATOS, 2003; EISSA, FARAG e SOLIMAN, 2009; MOHAMAD et al, 2010.
ANTIBACTERIANO	MOKLE, SAYYEE e CHOPDE, 2004; NIELSEN et al.; 2004; THIRUNARAYANAN e VANANGAMUDI, 2009; CHEN et al., 2010.
ANTIFÚNGICO	LACKA et al., 2011; DE CARVALHO TAVARES et al., 2011.
ANTI-INFLAMATÓRIO	VIANA, BANDEIRA e MATOS, 2003; CHENG et al., 2008; SAMZADEH-KERMANI, AZIMZADEH e ESKANDARIZADEH, 2009; BANDGAR et al.; 2010; WU et al.; 2011; BUKHARI, JANTAN e JASAMAI, 2012.
ANTILEISHMANIOSE	REICHWALD et al., 2008; HUSSAIN et al., 2009.
ANTIMALÁRICO	VALLA et al., 2006; SISODIA et al., 2012.
ANTIOXIDANTE	CHENG et al., 2008; HUSSAIN et al., 2009; THIRUNARAYANAN e VANANGAMUDI, 2009; BANDGAR et al., 2010; ISA et al., 2012.
ANTIPIRÉTICO	EISSA, FARAG e SOLIMAN, 2009.
ANTITUMORAL	NAKATANI et al., 2005; PATI et al., 2005; YUN et al., 2006; LAWRENCE et al.,

	2006; SHEN et al., 2007; BOUMENDJEL et al., 2009; KATSORI e HADJIPAYLOU-LITINA, 2009; PEDRINI et al.; 2010; LI et al., 2011; KAMAL et al., 2011; AKIHISA et al., 2012.
ANTIVIRAL	DAO et al., 2011.
CITOTÓXICO	BOUMENDJEL et al., 2009; KATSORI e HADJIPAYLOU-LITINA, 2009; DE CARVALHO TAVARES et al., 2011; AKIHISA et al., 2012; KAMAL et al., 2012.
PRÓ-OXIDANTE	GUZI et al., 2009; FESTA et al., 2011.

Diversos estudos na literatura descrevem os possíveis mecanismos da atividade antiproliferativa de chalconas e seus derivados sintéticos em diversas linhagens celulares. Kamal e colaboradores (2011) relatam que o efeito de uma nova classe de chalconas causou bloqueio na fase G1 do ciclo celular de células de câncer de mama e inibiu NFkB. Nakatani e colaboradores (2005) demonstraram que derivados de *C*-benzilato-dihidrochalconas causam bloqueio na fase G1 do ciclo celular, ativação da caspase-3 e fragmentação do DNA em células HL-60 de leucemia promielocítica aguda (LPA). O bloqueio do ciclo celular em diferentes tipos de células tumorais também foi relatado em outros trabalhos, entretanto, o efeito dos compostos ocorreu na fase G₂/M (YUN et al., 2006; SHEN et al., 2007; KATSORI; HADJIPAYLOU-LITINA, 2009).

Outros possíveis mecanismos de citotoxicidade incluem a indução das proteínas p21 e p27 (YUN et al., 2006; SHEN et al., 2007; KATSORI; HADJIPAYLOU-LITINA, 2009), a inibição da ciclina B₁, ciclina A e de Cdc₁e Cdc₂ (SHEN et al., 2007; KATSORI; HADJIPAYLOU-LITINA, 2009) e inibição das ciclinas D₁e E e das CDKs 2, 4 e 6 (YUN et al., 2006; KAMAL et al., 2011).

Alguns estudos ainda sugerem que as chalconas estão envolvidas no aumento da expressão das proteínas pró-apotóticas Bax e Bak e na diminuição das proteínas antiapoptóticas Bcl-2 e Bcl-X_L (YUN et al., 2006; SHEN et al., 2007; KAMAL et al., 2011), enquanto outros mostram apenas diminuição da Bcl-2 em células de LMA K562 (YE et al., 2005). Existem relatos ainda que relacionam a citotoxicidade de determinadas chalconas com a sua ligação com a tubulina, impedindo assim a polimerização dos microtúbulos e desestabilizando o citoesqueleto de células leucêmicas, o que levaria à inibição da mitose (LAWRENCE et al., 2006; PEDRINI et al.; 2010).

Devido a sua ampla distribuição na natureza, sua estrutura simples e a diversidade de derivados disponíveis, o interesse por essa classe de compostos tem emergido como uma importante família a ser investigada por seu promissor potencial terapêutico no tratamento antitumoral (BOUMENDJEL et al.; 2009). A literatura confirma o que é observado pelo Escritório Europeu de Patentes (ESPACENET, 2012), o qual mostra um aumento no número de patentes de novos derivados de chalconas com atividade antitumoral nos últimos anos. O grupo mostra que o número de patentes envolvendo chalconas sintéticas como agentes antitumorais passou de 3 entre os anos 2001 e 2001 para 11 entre os anos 2010 e 2011, sendo que a média a partir do ano 2000 foi de 4,2 patentes a cada dois anos. O número de casos de patentes registradas envolvendo chalconas sintéticas no tratamento de leucemias foi de duas, uma no ano de 2010 e outra no ano de 2011. Os dados foram obtidos a partir de consulta ao banco de patentes Espacenet, utilizando-se como palavras-chave: *chalcone*, e sua inserção com os termos *câncer*, *tumor* e *leukemia*. Essa informação confirma o interesse da comunidade científica na busca por novos alvos terapêuticos e novos quimioterápicos a serem utilizados no combate às LAs envolvendo derivados de chalconas.

4. MATERIAIS E MÉTODOS

4.1 Cultura Celular

Foram utilizadas, no presente trabalho, seis linhagens celulares de LAs humanas: LMA secundária a LMC (K562), LLA-T (Jurkat e CEM), leucemia monoblástica aguda (U937), LMA com t(8:21) (q22;q22) (Kasumi) e LPA com t(15;17) (q22;q21) (NB4). Foram utilizadas também células de linhagem de adenocarcinoma de cólon humano (HT-29) e fibroblastos humanos de MO (JMA).

As linhagens celulares K562, Jurkat, Kasumi e NB4 foram gentilmente cedidas pelo Prof. Dr. Alberto Orfao, do *Cientro de Investigación del Cancer* da Universidade de Salamanca. As linhagens CEM, U937 e JMA foram adquiridas comercialmente no Banco de Células do Rio de Janeiro. E a linhagem HT-29 foi gentilmente cedida pelo Prof. Dr. João Batista Calixto da Univesidade Federal de Santa Catarina.

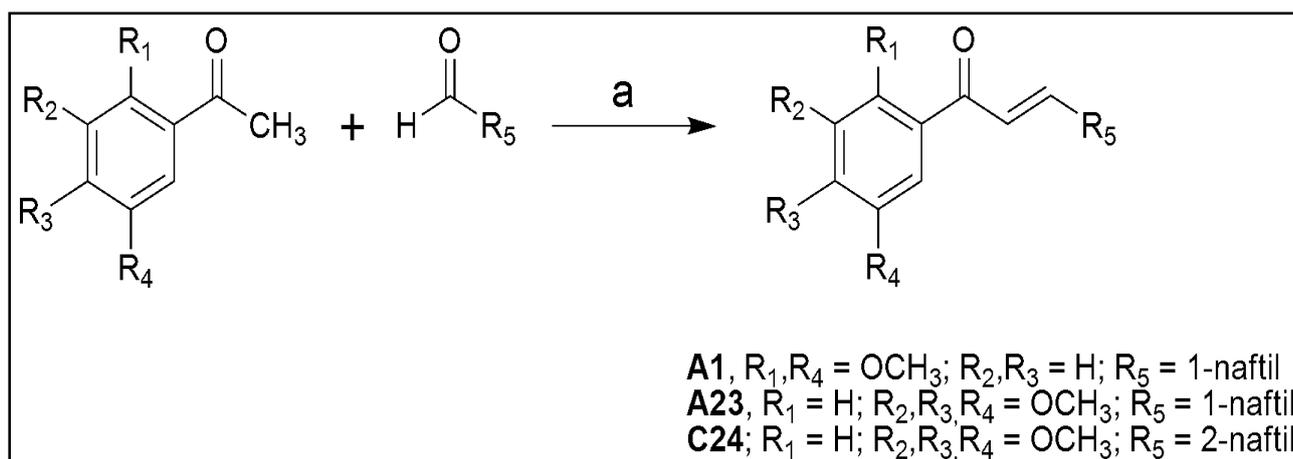
As células foram mantidas em garrafas plásticas para cultura celular contendo meio de cultura *Roswell Park Memorial Institute* (RPMI) 1640 (K562, Jurkat, U937, Kasumi, NB4 e HT-29) ou *Dulbecco Modified Eagles's Medium* (DMEM) (CEM) suplementado com 10% de soro bovino fetal (SBF) inativado, 100 U/ml de penicilina, 100 µg/ml de estreptomicina e 10 mM de tampão de ácido N-[2-hidroxietil]piperazina-N'-[2-etanosulfônico] (HEPES), pH 7.2, e mantidas em estufa úmida a 37°C, com 5% CO₂. As células JMA foram mantidas em meio *Iscove's Modified Dulbecco Medium* (IMDM) com 20% de SBF inativado nas mesmas condições descritas acima. Os meios de cultura, a penicilina, a estreptomicina, o tampão HEPES e o SBF foram adquiridos da Gibco®, *Invitrogen Corporation*, Brasil.

As células foram semeadas a uma densidade de $1,0 \times 10^6$ células/garrafa e repicadas a cada 48 a 72 h em fluxo laminar. No início de cada experimento, a suspensão celular foi centrifugada a 200 x g, por 10 minutos em temperatura ambiente (20 a 25°C). O sobrenadante foi descartado e o sedimento celular foi ressuspendido em 1,0 ml de meio de cultura RPMI, DMEM ou IMDM. O número de células viáveis foi avaliado pelo método de exclusão do corante Azul de Trypan (0,5%) e foram utilizadas para os experimentos somente as amostras com viabilidade celular superior a 95%. A quantidade de células viáveis adicionadas às placas de cultura variou conforme o protocolo experimental, mantendo a relação de 1×10^5 células/poço para o tempo de tratamento de 24 h, 5×10^4 células/poço para 48 h e $2,5 \times 10^4$ células/poço para 72 h e 200 µL de meio de cultura. Para as células aderidas HT e JMA, foram plaqueadas 5×10^4 células/poço para 24 h de tratamento, $2,5 \times 10^4$ células/poço para 48 h e $1,25 \times 10^4$ células/poço para 72 h. Todos os procedimentos de preparação das amostras foram realizados em condições estéreis.

4.2 Síntese Química

As chalconas sintéticas derivadas do 1-naftaldeído e do 2-naftaldeído foram sintetizadas pela doutoranda Alessandra Mascarello e pela Dra. Louise Domeneghini Chiaradia sob orientação do Prof. Dr. Rosendo Augusto Yunes e do Prof. Dr. Ricardo José Nunes do Laboratório Estrutura e Atividade do Departamento de Química da UFSC, conforme demonstrado no Esquema 11. Os reagentes utilizados foram obtidos comercialmente da Sigma-Aldrich® e os solventes da Vetec®. As chalconas foram preparadas por condensação aldólica utilizando como solvente sob condições básicas KOH (50% w/v) à temperatura ambiente (20 a 25°C) durante 24 h. Água destilada e 10% de ácido clorídrico foram adicionados à reação para a precipitação total dos compostos, que foram então obtidos por filtração a vácuo e posteriormente recristalizados em diclorometano e hexano. As estruturas foram identificadas pelo ponto de fusão, espectroscopia de infravermelho, espectroscopia de ressonância magnética nuclear e análise elementar, como anteriormente descrito (CHIARADIA et al., 2008).

As chalconas sintéticas estudadas no presente trabalho foram a (2*E*)-1-(3,4,5-trimetoxi-fenil)-3-(2-naftil)-2-propen-1-ona (**C24**), derivada do 2-naftaldeído, (2*E*)-1-(3,4,5-trimetoxi-fenil)-3-(1-naftil)-2-propen-1-ona (**A23**) e (2*E*)-1-(2,5-dimetoxi-fenil)-3-(1-naftil)-2-propen-1-ona (**A1**), derivadas do 1-naftaldeído.



Esquema 11: Rota de síntese utilizada para a obtenção das chalconas derivadas da 2-naftilchalcona. (a) Condições reacionais: *i.* 50% KOH p/v, MeOH, 24 h, temperatura ambiente (20 a 25°C). *ii.* 10% HCl.

4.3 Tratamento das Células com as Chalconas

As chalconas foram dissolvidas em dimetilsulfóxido (DMSO) na concentração de 10 mM e armazenadas a 4°C. Para os experimentos, foram utilizadas soluções preparadas a partir dessa solução estoque e diluídas em meio de cultura. Nos ensaios, a concentração das chalconas variou entre 1 e 100 μ M, não ultrapassando a concentração de 2% (v/v) para o veículo. O tratamento foi realizado pela adição das chalconas sintéticas às células K562, Jurkat, U937, Kasumi, NB4, CEM, HT e JMA 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 do solvente (DMSO) ao meio de cultura na maior concentração utilizada no experimento.

Inicialmente foi realizada uma triagem com células K562 e Jurkat a fim de avaliar o efeito citotóxico das três chalconas sintéticas **A1**, **A23** e **C24**. Foram realizadas curvas concentração-resposta em 24 h com concentrações crescentes dos três compostos, variando entre 1 μ M e 100 μ M. O composto que demonstrou maior redução na viabilidade celular das células K562 e Jurkat foi selecionado para a determinação das curvas concentração e tempo-resposta para as demais linhagens celulares, U937, Kasumi, NB4, CEM, HT, JMA e também para as células K562 e Jurkat. Para isso, as células foram incubadas com a chalcona selecionada (**A1**), em concentrações crescentes (1, 5, 10, 25 e 50 μ M), em estufa úmida a 37°C com 5% de CO₂. Após 24, 48 e 72 h de incubação, a viabilidade celular foi avaliada pelo método do brometo de 3-(4,5-dimetil-2-tiazolil)-2,5-difenil-2H-tetrazólio (MTT), adquirido da Sigma-Aldrich®, EUA. A CI₅₀ foi obtida a partir de uma curva concentração-resposta em 24, 48 e 72 h, utilizando-se o *software* GraphPad Prism 5.

4.4 Obtenção das Células Mononucleadas de Indivíduos Saudáveis

As amostras de SP de cinco indivíduos saudáveis e não fumantes foram coletadas com anticoagulante ácido etilenodiamino tetra-acético (EDTA) por punção venosa e processadas em até 30 minutos após a coleta. Previamente à conforme o Comitê de Ética de Pesquisa em Seres humanos da UFSC (coleta das amostras, foi obtida a assinatura do Termo de Consentimento Livre e Esclarecido (TCLE), CEPESH n°913/2010). Para a obtenção das

células mononucleadas, as amostras sanguíneas foram diluídas em tampão fosfato (PBS) numa proporção de 1 ml de amostra para 0,5 ml de PBS.

Após a diluição, cada amostra foi colocada sobre 4 ml de Ficoll-Hypaque (densidade 1.077 g/m³, Sigma-Aldrich®, EUA) e centrifugada a 300 x g por 30 minutos. A interfase contendo as células mononucleadas foi transferida para um tubo cônico de 15 ml, ressuspendidas em 10 ml de tampão PBS e centrifugada a 200 x 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 ressuspendidas em 1 ml de meio RPMI 1640, e o número de células viáveis foi avaliado pelo método do Azul de Trypan (0,5%). A cada poço da placa de cultura celular foram adicionadas 1,0 x 10⁶ células/ 200 µl de meio. Em seguida, as células foram incubadas com a chalcona **A1** na concentração de 50 µM. Após 24 h de incubação, a viabilidade celular foi avaliada pelo método do MTT. Os resultados foram comparados com Taxol® (Paclitaxel), um bem estabelecido fármaco de uso parenteral com atividade antitumoral.

4.5 Obtenção das Células Leucêmicas de Pacientes

Para os experimentos *ex vivo* foram coletadas três amostras de SP e cinco amostras de MO de oito pacientes (Pacientes 1-8) com diagnóstico de LA, antes do primeiro tratamento, atendidos pelo Serviço de Hematologia do HU da UFSC, no período de dezembro de 2011 a dezembro de 2012. Todos os pacientes ou seus responsáveis legais assinaram o TCLE conforme o CEPESH n°913/2010. As células mononucleadas foram isoladas conforme descrito no item anterior. O número de células viáveis foi avaliado pelo método do Azul de Trypan (0,5%), obtendo-se em torno de 95% de células vivas em cada amostra. As células foram plaqueadas na concentração de 1,0 x 10⁶ células/ 200 µl de meio e incubadas com a chalcona selecionada na CI₅₀ por 24h. Após o período de incubação, a viabilidade celular foi avaliada pelo método do MTT, conforme descrito no item **4.6**.

4.6 Viabilidade Celular (Método do MTT)

O efeito citotóxico das chalconas sobre as células de linhagem K562, Jurkat, U937, Kasumi, NB4, CEM, HT, JMA e sobre as células mononucleares de SP de indivíduos

saudáveis e de pacientes portadores de LAs, foi avaliado pelo método do MTT. Este método consiste em um ensaio colorimétrico que se baseia na redução do MTT ao seu derivado formazan, de cor roxa, pelo metabolismo mitocondrial (VAN DE LOOSDRECHT et al., 1991). Dessa forma, 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 adicionou-se ao meio de cultura 10 % (v/v) de 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 µL de solução de álcool isopropílico/ HCl 0,04 N e as placas foram submetidas à nova centrifugação para a remoção dos restos celulares. O sobrenadante 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 do Ciclo Celular

O princípio do ensaio de avaliação do ciclo celular consiste na coloração dos ácidos nucléicos pelo iodeto de propídio (PI), após a digestão do RNA pela ribonuclease (RNase). O PI emite diferentes intensidades de fluorescência de acordo com as variações no conteúdo de DNA, ao longo do ciclo celular. Estes sinais são captados pelo citômetro de fluxo, o qual permite a quantificação da porcentagem de células em cada fase do ciclo celular (GONG et al., 1994). Para avaliar os efeitos da chalcona **A1** nas fases do ciclo celular, as células K562, Jurkat, U937, Kasumi, NB4 e CEM ($1,0 \times 10^6$ células) foram tratadas com o composto 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 com PBS e fixadas com etanol 70 % durante 30 minutos a 4°C. Em seguida, as células foram lavadas com PBS contendo 2% de albumina bovina. Por fim, adicionou-se ao sedimento celular 500 µL do “*PI/RNASE Solution kit*” com PI e RNase (*Immunostep*®, Salamanca, Espanha) e as células foram mantidas ao abrigo da luz durante 15 minutos em temperatura ambiente (20 a 25°C), de acordo com as instruções do fabricante. As amostras foram adquiridas no citômetro de fluxo BD FACSCanto™ II (*Becton Dickinson Immunocytometry Systems*) e analisadas no *software* WinMID versão 2.8. Foram adquiridos 10.000 eventos com gate no canal PE (510-595 nm). O controle negativo foi

preparado com células sem tratamento para a caracterização dos parâmetros a serem analisados no citômetro de fluxo.

4.8 Avaliação da Apoptose

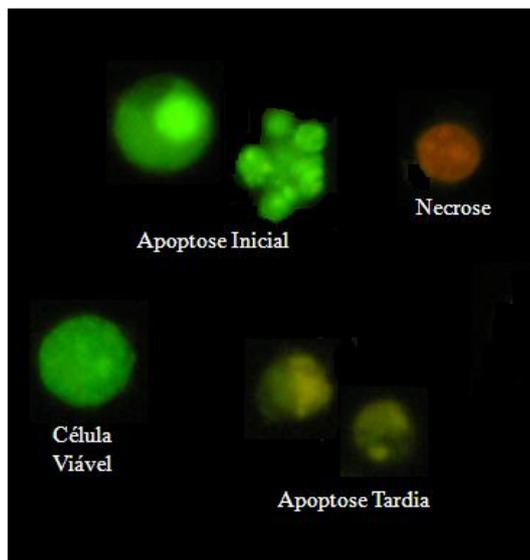
Para avaliar a indução de morte celular por apoptose causada pela chalcona **A1**, foram utilizados os seguintes métodos: microscopia de fluorescência com brometo de etídio e laranja de acridina (BE/LA), marcação com Anexina V conjugada ao isotiocianato de fluoresceína (FITC) por citometria de fluxo e o ensaio de fragmentação do DNA.

4.8.1 Avaliação da Apoptose por Microscopia de Fluorescência com Brometo de Etídio e Laranja de Acridina

O ensaio baseia-se na diferença de permeabilidade da membrana plasmática das células aos corantes BE/LA. 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 laranja ao núcleo das células ao se intercalar ao DNA. Assim, é possível diferenciar células viáveis, células em apoptose inicial e tardia e células necróticas pela observação do aspecto morfológico do núcleo e pela condensação e fragmentação da cromatina, conforme indicado no Esquema 12. Brevemente, as células viáveis apresentam fluorescência verde com núcleo uniforme. As células em apoptose inicial ainda apresentam membranas intactas e, conseqüentemente, fluorescência verde, com cromatina condensada e fragmentação nuclear. As células em apoptose tardia apresentam fluorescência laranja devido à perda da integridade da membrana plasmática, cromatina condensada ou fragmentada e presença de corpos apoptóticos. E células necróticas apresentam fluorescência laranja uniforme (RENVOIZÉ et al., 1998; TAKAHASHI et al., 2004; KOSMIDER et al., 2004).

Para os ensaios, as células K562, Jurkat, U937, Kasumi, NB4 e CEM ($1,0 \times 10^6$ células/poço) foram tratadas com a chalcona **A1** nas CI_{50} de 24 h. Após 12 h, as células foram lavadas em PBS e o sedimento celular foi ressuscitado em 40 μ l de uma solução de brometo de etídio (5 μ g/ml) e laranja de acridina (10 μ g/ml) na proporção 1:1. Em seguida, 25 μ l da suspensão celular foram transferidos para uma lâmina de vidro e recobertos com lamínula. As

lâminas foram observadas em microscópio de fluorescência (Olympus BX-FLA), usando objetiva de 40 x. Campos representativos foram fotografados com câmera fotográfica (Olympus BX40, Japão).



ESQUEMA 12: Esquema representativo de células K562 tratadas com o composto A1 após coloração com BE/LA. Células viáveis apresentam coloração verde brilhante com estrutura preservada devido à permeabilidade do laranja de acridina à membrana intacta. Células em necrose têm coloração alaranjada a avermelhada e estrutura organizada. E células em apoptose apresentam coloração verde com cromatina altamente condensada e/ou núcleo fragmentado (apoptose inicial), ou coloração alaranjada devido à presença de poros na membrana (apoptose tardia).

4.8.2 Avaliação da Apoptose pelo Método da Anexina V - FITC

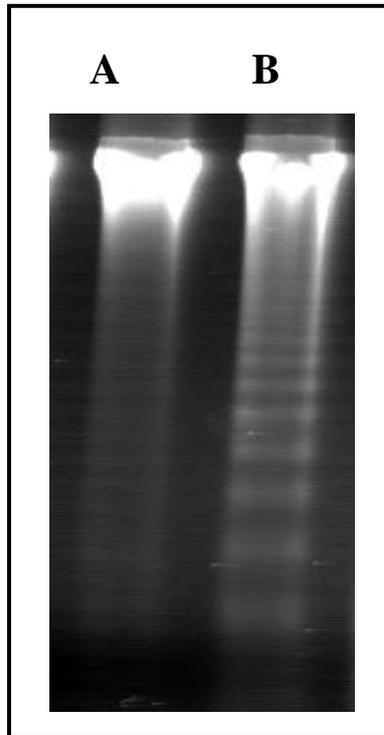
O princípio deste ensaio baseia-se na ligação da Anexina V à proteína de membrana fosfatidilserina, normalmente encontrada na parte interna da membrana plasmática. Durante o estágio inicial de apoptose ocorre a perda da assimetria da membrana citoplasmática, com a consequente externalização dos resíduos de fosfatidilserina. A Anexina V se liga especificamente a estes resíduos e, quando conjugada ao FITC, permite identificar as células em apoptose por citometria de fluxo (ENGELAND et al., 1998). Assim, a morte celular por apoptose foi confirmada após o tratamento das células K562, Jurkat, U937, Kasumi, NB4 e CEM com a chalcona A1, na sua CI_{50} de 24h, através do *Annexin V- FITC Apoptosis Detection kit* (Immunostep®, Salamanca, Espanha), após 12 h de incubação com o composto. Após esse período, as células foram lavadas em PBS e adicionou-se ao sobrenadante 100 μ L

de tampão de Anexina V na diluição 1:10 e 5 µL de Anexina V-FITC conforme recomendado pelo fabricante. O controle negativo foi preparado com as células sem tratamento, a fim de definir uma quantificação basal de marcação com Anexina V. As análises foram realizadas no citômetro de fluxo BD FACSCanto™ II (*Becton Dickinson Immunocytometry Systems*) e avaliadas no *software* WinMID versão 2.8. Foram adquiridos 10.000 eventos e os dupletes foram retirados utilizando-se as características de FSC High e SSC Área.

4.8.3 Avaliação da Apoptose pelo Método de Fragmentação do DNA

Uma das principais características da morte celular por apoptose é a degradação do DNA nuclear em unidades nucleossomais (NAGATA, 2000). Com o objetivo de confirmar a morte por apoptose causada pela chalcona **A1**, foi realizado o ensaio de fragmentação do DNA em células K562, Jurkat e Kasumi. A extração de DNA foi realizada utilizando-se o método do isotiocianato de guanidina 5 M não baseado em fenol, devido às suas propriedades lisante, desnaturadora de proteínas e inativadora de nucleases (LIEPKE et al., 1987). As células ($3,0 \times 10^6$ células) foram tratadas com a chalcona **A1** e incubadas durante 24 h em estufa úmida a 37°C com 5 % de CO₂. Como controle de apoptose, as células foram tratadas com Taxol 10 µM nas mesmas condições anteriores. Após as 24 h de incubação, as células foram lavadas duas vezes com tampão PBS, o sobrenadante foi removido e ao sedimento celular foi adicionado 1 ml de solução de guanidina 5 M (isotiocianato de guanidina 5 M: Tris-Cl pH 6.4 0.1M: EDTA pH 8,0 0,2M: Triton X-100 13%) para a extração de DNA. Os tubos foram submetidos à agitação contínua em mesa agitadora orbital por 72 h em temperatura ambiente (20 a 25°C) para que ocorresse a lise das membranas celulares. Após esse período, foram adicionados 50 µL de solução de dióxido de sílica acidificada. A mistura foi homogeneizada por inversão durante 5 minutos e submetida à centrifugação a 1.600 x g/ minuto. O sedimento foi lavado duas vezes com 500 µL de solução de lavagem de guanidina 5 M (isotiocianato de guanidina 5 M: Tris pH 6.4 0,1M), duas vezes com 500 µL de etanol 70 % (p/p) e uma vez com 500 µL de acetona PA. Entre cada lavagem, foi realizada uma centrifugação a 1.600 x g/ minuto. O sedimento foi submetido à secagem a 56°C/ 10 minutos em termo bloco e reidratado com 35 µL de tampão Tris-EDTA pH 7.4 (Tris pH 6.4 0,1M: EDTA pH 8,0 0,2M) a 56°C/ 10 minutos. Após uma centrifugação a 10.000 x g/ 5 minutos, o sobrenadante foi transferido para um microtubo livre de RNase e DNase e o DNA das amostras foram separados por eletroforese em gel de agarose 2% e corados com brometo de

etídio (1 µg/ml). Por fim, as amostras foram visualizadas e fotografadas sob iluminação ultravioleta de fotodocumentação de géis (DOC-PRINT® Biosystems). O padrão em escada, característico de morte celular por apoptose, pode ser observado no Esquema 13.



Esquema 13: Imagem representativa do gel de agarose de células Jurkat após tratamento com Taxol. As células (3×10^6 células/ml) foram incubadas com Taxol 10 µM por 24 h. A extração de DNA foi realizada com solução de guanidina 5 M. Os fragmentos de DNA foram separados por eletroforese em gel de agarose 2% e corados com brometo de etídio (1 µg/ml). **Linha A:** Amostra controle (células sem tratamento). **Linha B:** Amostra tratada com Taxol 10 µM mostrando o DNA fragmentado no típico “padrão em escada” da morte celular por apoptose.

4.9 Avaliação do Potencial Mitocondrial

Para avaliar os efeitos da chalcona **A1** no potencial mitocondrial das células leucêmicas, foi utilizado o kit MitoView 633 da *Biotium*®, EUA. Segundo o fabricante, o MitoView 633 é um corante mitocondrial fluorescente de coloração vermelha que se difunde através da membrana plasmática e se acumula na mitocôndria em concentrações nanomolares. As mitocôndrias com potencial fisiológico são coradas com o MitoView 633 e fluorescem após o acúmulo do corante no ambiente de lipídios das mitocôndrias. Quando há diminuição

no potencial mitocondrial, as mitocôndrias perdem essa fluorescência. As linhagens K562, Jurkat e Kasumi foram selecionadas para a investigação das vias de apoptose envolvidas na morte celular causada pela chalcona **A1**. As células ($1,0 \times 10^6$ células) foram tratadas com a chalcona nas suas CI_{50} de 24h e incubadas durante 12 h em estufa úmida a 37°C com 5% de CO_2 . Após esse período, as células foram lavadas com PBS, submetidas à centrifugação a 200 x g por 10 minutos e o sobrenadante foi descartado. Em seguida, foram adicionados sobre o sedimento celular 100 μ l da solução de Mito View 633 diluído 1:10.000 de acordo com as instruções do fabricante. As células foram incubadas por 30 minutos à temperatura ambiente (20 a 25°C) no escuro. Após esse período, as células foram novamente centrifugadas, o sobrenadante foi descartado e o sedimento foi ressuspensionado em 1 ml de PBS. As análises foram realizadas no citômetro de fluxo BD FACSCanto™ II (*Becton Dickinson Immunocytometry Systems*) e avaliadas no *software* WinMID versão 2.8. Foram adquiridos 10.000 eventos e os dupletes foram retirados utilizando-se as características de FSC High e SSC Área.

4.10 Avaliação da Expressão das Proteínas Bax, Bcl-2, FasR, AIF e Caspase 3 por Citometria de Fluxo

As células K562 e Jurkat ($1,0 \times 10^6$ células) foram tratadas com a chalcona **A1** nas suas CI_{50} de 24 h, e incubadas durante 4, 8, 12 ou 24 h em estufa úmida a 37°C com 5 % de CO_2 . Após os períodos de incubação, as células foram lavadas com PBS, submetidas à centrifugação a 200 x g por 10 minutos e, ao sedimento celular, foram adicionados 200 μ l do reagente *BD Fix/Perm* para permeabilização das células (exceto para o FasR). Após 20 minutos de incubação a 8°C, as amostras foram submetidas a novas centrifugações, o sobrenadante foi descartado e o sedimento celular foi ressuspensionado com 100 μ l de tampão de lavagem *Fix/Perm*. Foram adicionados então, 5 μ L do anticorpo monoclonal anti-Bcl-2 conjugado ao FITC da *Invitrogen*®, EUA, 5 μ l do anticorpo monoclonal anti-caspase-3 ativa, conjugado a FITC da *BD Biosciences*®, EUA, 5 μ l do anticorpo monoclonal anti-Bax conjugado ao PerCP, 5 μ l do anticorpo monoclonal anti-FasR conjugado a PE e 5 μ l do anticorpo monoclonal anti-AIF conjugado a FITC, estes três da *Santa Cruz Biotechnology*®, EUA, nas seguintes combinações (FITC/PE/PerCP), (FITC/--/PerCP), (FITC/PE/--) e (FITC/--/--). Após 15 minutos de incubação a 8°C, foram adicionados 500 μ l do tampão de lavagem e as amostras foram centrifugadas duas vezes nas mesmas condições descritas acima. Por fim,

adicionou-se 500 µl de PBS ao sedimento celular. As amostras foram analisadas no citômetro de fluxo BD FACSCanto™ II (Becton Dickinson Immunocytometry Systems) e avaliadas no *software Infinicyt* versão 1.6. O controle negativo foi preparado com células sem tratamento. Foram adquiridos 10.000 eventos e os dupletes foram retirados utilizando-se as características de FSC High e SSC Área.

4.11 Avaliação da Expressão das Proteínas Survivina e KI-67 por Imunocitoquímica

A expressão das proteínas survivina e KI-67 foi avaliada pela técnica de imunocitoquímica, utilizando o método estreptoavidina-biotina-peroxidase (*labelled streptavidin biotin* - LSAB). As células K562, Jurkat e Kasumi ($1,0 \times 10^5$ células) foram tratadas com a chalcona A1 nas suas CI_{50} de 24 h e incubadas durante 24 h em estufa úmida a 37°C com 5 % de CO₂. Após o período de incubação, as células foram centrifugadas em citocentrífuga (CYTOPRO™ – 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 à temperatura ambiente (20 a 25°C). Após a fixação, as lâminas foram lavadas duas vezes com PBS por 5 minutos e realizou-se o bloqueio da peroxidase endógena com solução de peróxido de hidrogênio a 3 % em metanol absoluto por 20 minutos, a fim de evitar reações inespecíficas falso-positivas. 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 anti-survivina (Santa Cruz Biotechnology®, EUA), diluído a 1:50, e o anticorpo monoclonal anti-KI-67 (Biocare Medical®, EUA), 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 este período, as lâminas foram lavadas duas vezes com tampão PBS e incubadas com anticorpo secundário biotilado do *kit LSAB + System-HRP* (Dako®, USA) 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 o kit de solução cromógena DAB (3,3'-diaminobenzidina, Biocare Medical®, EUA), 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 KI-67), 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 400 X e as fotografias foram realizadas no microscópio citado, com a câmera NIKON DIGITAL SIGHTDS-5M e o programa NIS ELEMENTS F, VERSION 2.10.

4.12 Análise Estatística

Os resultados obtidos foram expressos por média \pm erro padrão da média (EPM). Cada experimento foi repetido pelo menos três vezes. Para a avaliação do efeito da chalcona **A1** em células saudáveis, para a avaliação da exposição da fosfatidilserina e da alteração do potencial mitocondrial, foi utilizado o teste *t* de Student, comparando cada ponto com o grupo controle.

Os testes de citotoxicidade foram avaliados utilizando-se a análise de variância (ANOVA) *one way* e *two way*, complementada pelo teste *post-hoc* de Bonferroni. A análise estatística do ciclo celular e a avaliação da expressão das proteínas pró e antiapoptóticas em diferentes tempos foram realizadas por ANOVA *one-way* seguida de Bonferroni. Em todas as análises foi adotado um nível de significância mínimo de 5%. A realização do tratamento estatístico foi utilizado o *software* GraphPad Prism 5.

5. RESULTADOS

5.1 Avaliação da Citotoxicidade do Veículo e Definição do Grupo Controle

As chalconas sintéticas **A1**, **A23** e **C24** foram previamente dissolvidas em DMSO antes de sua utilização nos experimentos. A fim de excluir a participação do veículo na possível citotoxicidade observada nos ensaios, este foi testado nas células K562 e Jurkat pelo método do MTT. Foram avaliadas as mesmas concentrações utilizadas na dissolução das chalconas sintéticas (1, 5, 10, 25, 50 e 100 μM) e comparadas com as células sem tratamento, às quais foi atribuída a viabilidade celular de 100 %. Como pode ser observado na Figura 1, não houve diferença significativa entre a viabilidade celular das células não tratadas e das células tratadas com DMSO. Dessa forma, optou-se por utilizar como grupo controle as células não tratadas.

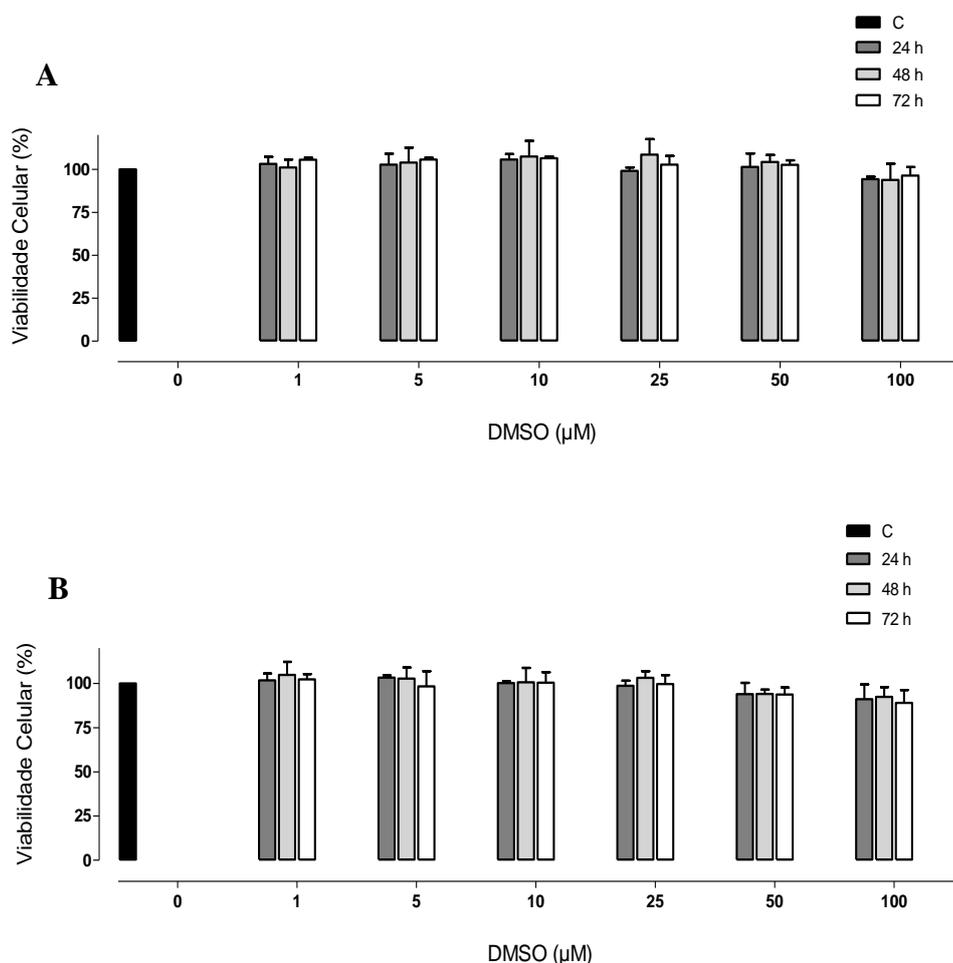


Figura 1. Avaliação da citotoxicidade do DMSO em células K562 (Painel A) e Jurkat (Painel B). As células K562 e Jurkat (1×10^5 células/poço - 24 h, 5×10^4 células/poço - 48 h e $2,5 \times 10^4$ células/poço - 72 h) foram incubadas com o veículo DMSO por 24, 48 e 72 h. A viabilidade celular foi avaliada pelo método do MTT. A densidade óptica do grupo controle

(células sem tratamento) foi definida como 100% de viabilidade celular. ANOVA *two-way* seguida de teste *post-hoc* de Bonferroni.

5.2 Triagem das Chalconas Sintéticas A1, A23 e C24 sobre Células de LMA K562 e sobre Células de LLA Jurkat

O efeito citotóxico das chalconas **A1**, **A23** e **C24** foi avaliado primeiramente sobre as células K562 e Jurkat pelo método do MTT. Conforme mostrado na Figura 2, os três compostos apresentaram efeito citotóxico, pois reduziram significativamente a viabilidade celular de forma dependente do tempo e da concentração quando comparados às células não tratadas. Os valores de CI_{50} estão demonstrados na Tabela 2.

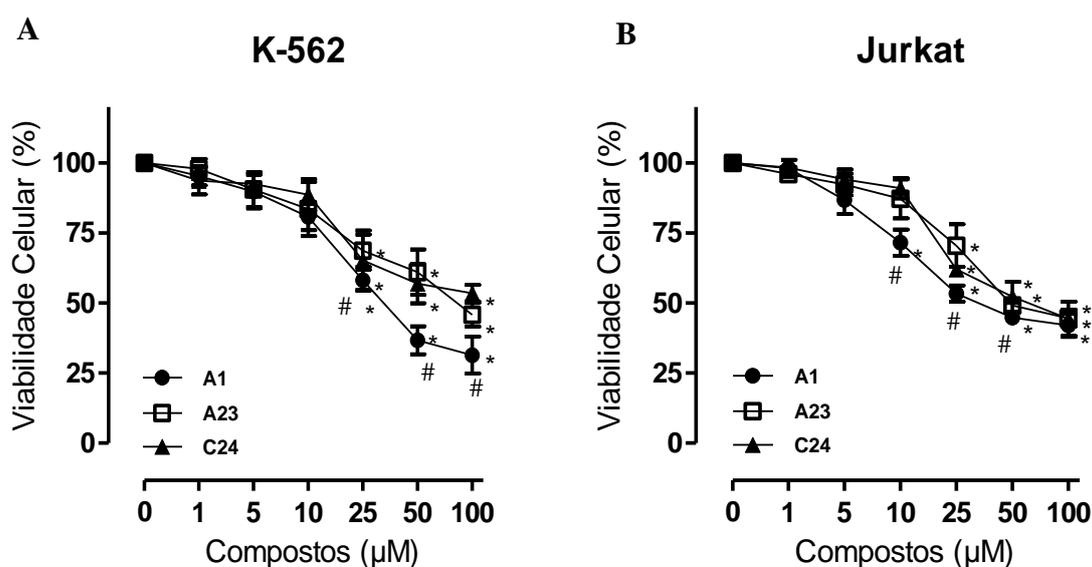


Figura 2. Triagem das chalconas A1, A23 e C24 nas células K562 (Painel A) e Jurkat (Painel B). As células K562 e Jurkat (1×10^5 células/poço - 24 h, 5×10^4 células/poço - 48 h e $2,5 \times 10^4$ células/poço - 72 h) foram incubadas com as chalconas **A1**, **A23** ou **C24** por 24 h. Cada ponto representa média \pm EPM de quatro experimentos independentes. * Diferença significativa em relação ao grupo controle (células sem tratamento). # Diferença significativa em relação aos demais compostos, $p < 0,05$, ANOVA *two-way* seguida de teste *post-hoc* de Bonferroni.

Tabela 2. Valores de CI_{50} observados nas células K562 e Jurkat após 24 h de incubação com as chalconas A1, A23 e C24.

Compostos	Valores de IC_{50}	
	K562	Jurkat
A1	40,13 ± 1,04 *	20,98 ± 2,39 *
A23	67,63 ± 1,68	61,69 ± 1,20
C24	71,74 ± 2,09	59,46 ± 1,28

* Diferença significativa em relação às demais chalconas avaliadas $p < 0.05$, ANOVA *one-way* seguida de teste *post-hoc* de Bonferroni.

Como pode ser observado na Figura 2, a comparação entre os três compostos em cada uma das concentrações testadas mostrou que a chalcona **A1** foi significativamente mais citotóxica do que as chalconas **C24** e **A23** nas concentrações de 25, 50 e 100 μM para as células K562, e nas concentrações de 10, 25 e 50 μM para as células Jurkat. Além disso, de acordo com a Tabela 2, a chalcona **A1** apresentou menor CI_{50} entre os três compostos avaliados, de 40,13 ± 1,04 μM e 20,98 ± 2,39 μM para as células K562 e Jurkat, respectivamente. A diferença entre os outros dois compostos não foi significativa. Assim, a chalcona **A1** foi selecionada para os próximos estudos.

5.3 Investigação do Efeito Citotóxico da Chalcona A1 Sobre Diferentes Linhagens de Células de LA

Como pode ser observado na Figura 3, a chalcona **A1** reduziu significativamente a viabilidade celular de maneira dependente da concentração e do tempo de incubação nas linhagens K562, Jurkat, U937, Kasumi, NB4 e CEM quando comparado com as células não tratadas. A redução significativa do número de células viáveis em 24 h foi observada a partir de 1 μM nas células NB4, 5 μM nas células CEM e Kasumi, 10 μM nas células U937 e 25 μM nas células K562 e Jurkat. Após 72 h de incubação, todas as linhagens apresentaram redução significativa na viabilidade celular a partir de 1 μM , com exceção das células U937 que foi a partir de 5 μM .

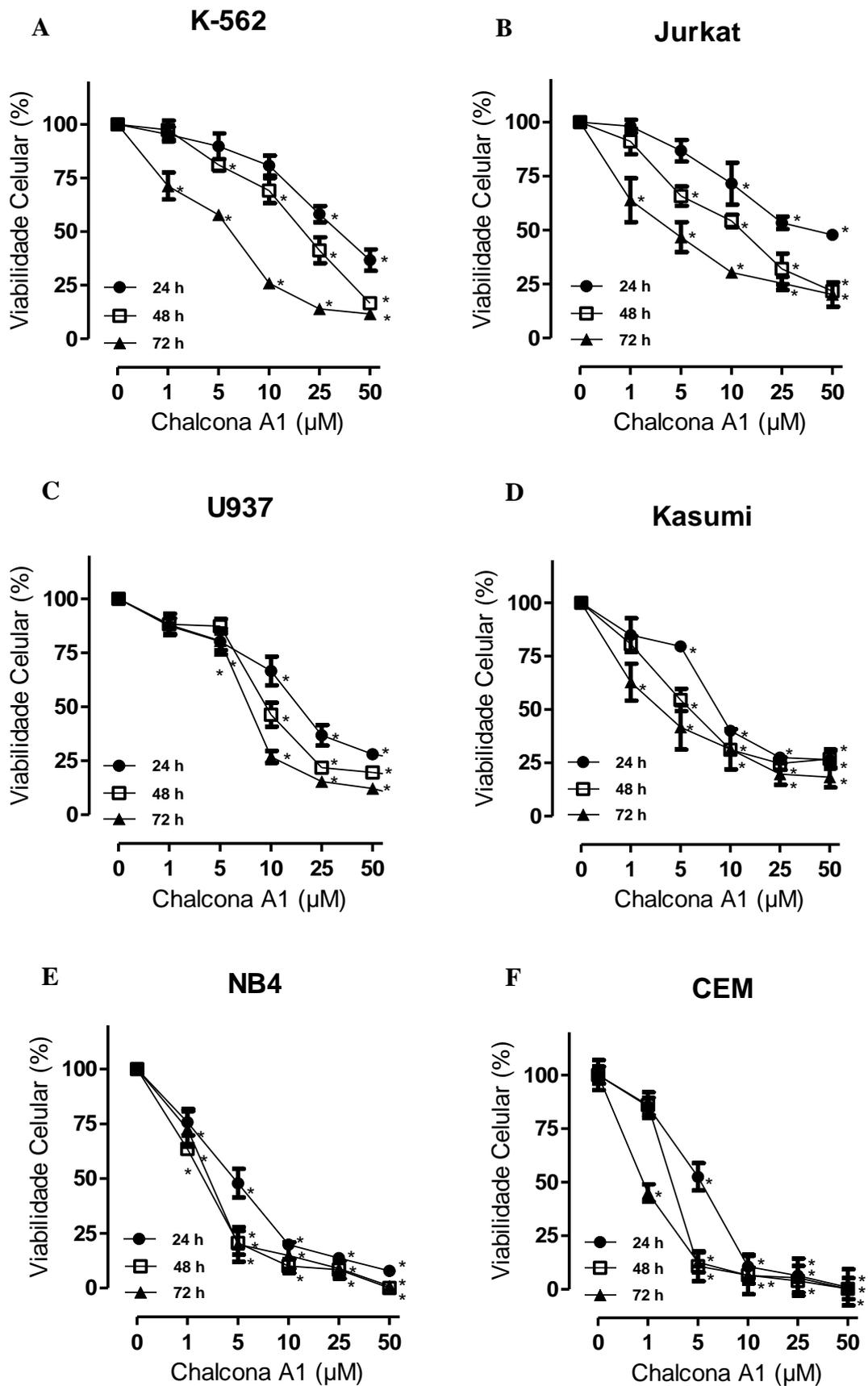


Figura 3. Efeito citotóxico da chalcona A1 em células de linhagens de LAs. As células K562 (Painel A), Jurkat (Painel B), U937 (Painel C), Kasumi (Painel D), NB4 (Painel E) e

CEM (Painel F) (1×10^5 células/poço - 24 h, 5×10^4 células/poço - 48 h e $2,5 \times 10^4$ células/poço - 72 h) foram incubadas com a chalcona **A1**. A viabilidade celular foi avaliada pelo método do MTT. A densidade óptica do grupo controle (células não tratadas) foi definida como 100% de viabilidade celular. Cada ponto do gráfico representa média \pm EPM de quatro experimentos independentes. * Diferença significativa em relação ao grupo controle, $p < 0.05$, ANOVA *two-way* seguida de teste *post-hoc* de Bonferroni.

A Tabela 3 mostra os valores de CI_{50} obtidos nas seis linhagens de LA após 24, 48 e 72 h de tratamento com a chalcona **A1**. Confirmando os resultados observados nas curvas de viabilidade celular da Figura 3, os valores de CI_{50} diminuíram com o aumento do tempo de incubação. Após 24 h, os valores de CI_{50} variaram entre $3,58 \pm 0,31 \mu\text{M}$ e $40,13 \pm 1,04 \mu\text{M}$; após 48 h, os valores variaram entre $1,48 \pm 0,44 \mu\text{M}$ e $17,87 \pm 0,66 \mu\text{M}$ e após 72, variaram entre $1,85 \pm 0,49 \mu\text{M}$ e $6,28 \pm 0,65 \mu\text{M}$. Os resultados mais altos foram obtidos na linhagem K562, enquanto que os resultados mais baixos foram obtidos na linhagem NB4.

Tabela 3. Valores de CI_{50} encontrados nas linhagens K562, Jurkat, U937, Kasumi, NB4 e CEM após incubação com a chalcona A1.

Tempo/Célula	K562	Jurkat	U937	Kasumi	NB4	CEM
24 h	$40,13 \pm 1,04$	$20,98 \pm 2,39$	$17,62 \pm 0,70$	$7,72 \pm 0,60$	$3,58 \pm 0,31$	$5,33 \pm 0,81$
48 h	$17,87 \pm 0,66$	$5,49 \pm 1,75$	$10,33 \pm 0,68$	$4,67 \pm 0,34$	$1,48 \pm 0,44$	$2,82 \pm 0,68$
72 h	$4,55 \pm 0,35$	$2,86 \pm 0,58$	$6,28 \pm 0,65$	$2,53 \pm 0,42$	$1,90 \pm 0,46$	$1,85 \pm 0,49$

5.4 Efeito citotóxico da chalcona A1 sobre células de Adenocarcinoma de Cólon Humano

A chalcona **A1** foi testada em células de adenocarcinoma de cólon humano HT-29, a fim de verificar se o composto seria efetivo contra tumores não hematológicos. Como pode ser observado na Figura 4, Painel A, a chalcona **A1** diminuiu a viabilidade celular das células HT-29 de forma dependente do tempo e da concentração, com redução significativa da viabilidade celular a partir de $25 \mu\text{M}$ nos três tempos avaliados. No entanto, os valores de CI_{50} encontrados para essa célula foram mais altos do que os valores obtidos nas linhagens leucêmicas (Figura 4, Painel B).

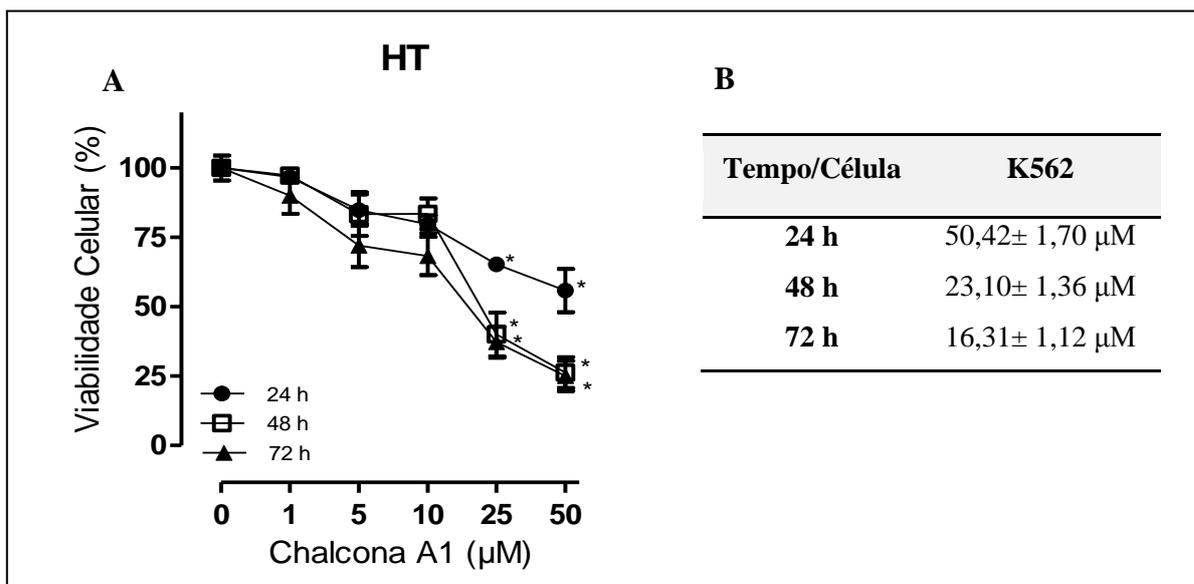


Figura 4. Efeito citotóxico da chalcona A1 em células HT-29. As células HT-29 (5×10^4 células/poço - 24 h, $2,5 \times 10^4$ células/poço - 48 h e $12,5 \times 10^3$ células/poço - 72 h) foram incubadas com a chalcona A1 por 24, 48 e 72 h. A viabilidade celular foi avaliada pelo método do MTT (Painel A). A densidade óptica do grupo controle (células não tratadas) foi definida como 100% de viabilidade celular. A CI_{50} da chalcona A1 foi calculada com o *software* GraphPad Prism 5 (Painel B). * Diferença significativa em relação ao grupo controle, $p < 0,05$, ANOVA *two-way* seguida de teste *post-hoc* de Bonferroni.

5.5 Efeito citotóxico da Chalcona A1 sobre Células de Fibroblastos Humanos de MO

A citotoxicidade da chalcona A1 foi avaliada na linhagem JMA de fibroblastos humanos normais de MO a fim de testar o efeito do composto em células saudáveis. De acordo com a Figura 5, não houve diferença significativa na viabilidade celular das células JMA tratadas com a chalcona A1 em nenhuma das concentrações avaliadas após 24 e 48 h de tratamento.

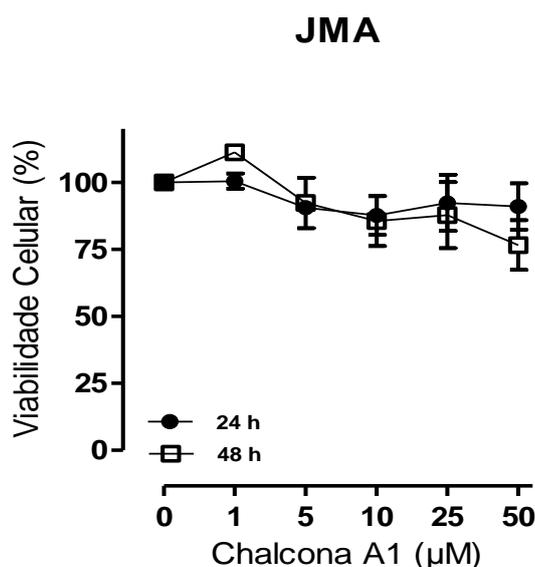


Figura 5. Efeito citotóxico da chalcona A1 em células JMA. As células JMA (5×10^4 células/poço - 24 h e $2,5 \times 10^4$ células/poço - 48 h) foram incubadas com a chalcona A1 por 24 e 48 h. A viabilidade celular foi avaliada pelo método do MTT. A densidade óptica do grupo controle (células não tratadas) foi definida como 100% de viabilidade celular. Cada ponto do gráfico representa media \pm EPM de três experimentos independentes. ANOVA *two-way* seguida de teste *post-hoc* de Bonferroni.

5.6 Efeito Citotóxico da Chalcona A1 em Células Mononucleadas de Indivíduos Saudáveis

Com o objetivo de confirmar a ausência de efeito citotóxico da chalcona A1 sobre células normais, o composto foi incubado com células mononucleadas de SP de cinco indivíduos saudáveis. A concentração de 50 μM foi escolhida por ser um valor mais alto do que a maior CI_{50} encontrada em 24 h nas células de linhagem ($40,13 \pm 1,04 \mu\text{M}$). Como pode ser observado na Figura 6, a chalcona A1 não provocou redução significativa na viabilidade das células mononucleadas, as quais apresentaram $94,29 \pm 3,13 \%$ de células vivas após 24 h de tratamento. O Taxol (10 μM) foi utilizado como controle positivo e reduziu significativamente a viabilidade celular para $41,54 \pm 3,96\%$ após o tratamento. O veículo DMSO apresentou viabilidade de $99,89 \pm 7,25 \%$.

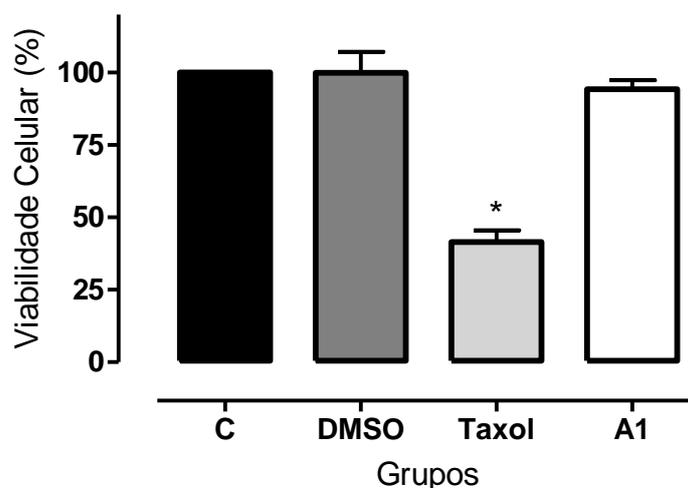


Figura 6. Efeito citotóxico da chalcona A1 sobre células mononucleadas de indivíduos saudáveis. As células mononucleadas ($1,0 \times 10^6$ células/poço) foram incubadas com a chalcona **A1** na concentração de $50 \mu\text{M}$ por 24 h. A viabilidade celular foi avaliada pelo método do MTT. A densidade óptica do grupo controle (células sem tratamento) foi definida como 100% de viabilidade celular. Foi utilizado como controle um grupo tratado com Taxol na concentração de $10 \mu\text{M}$, e um grupo tratado com DMSO na concentração utilizada para dissolver o composto.* Diferença significativa em relação ao grupo controle, $p < 0,05$, teste t de Student.

5.7. Efeito da Chalcona A1 sobre as Fases do Ciclo Celular das Linhagens de LA Humana

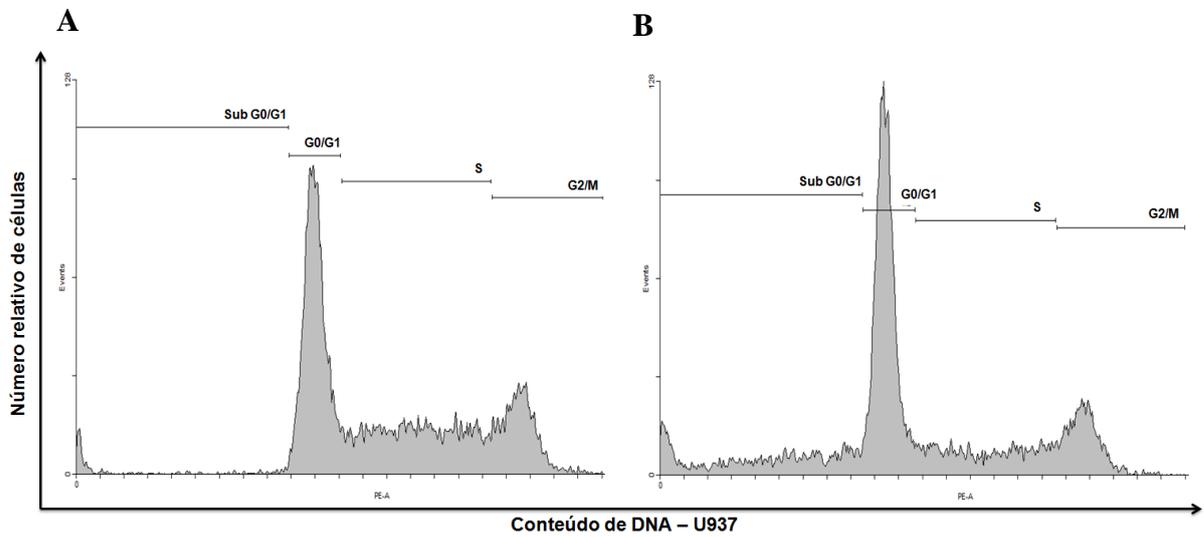
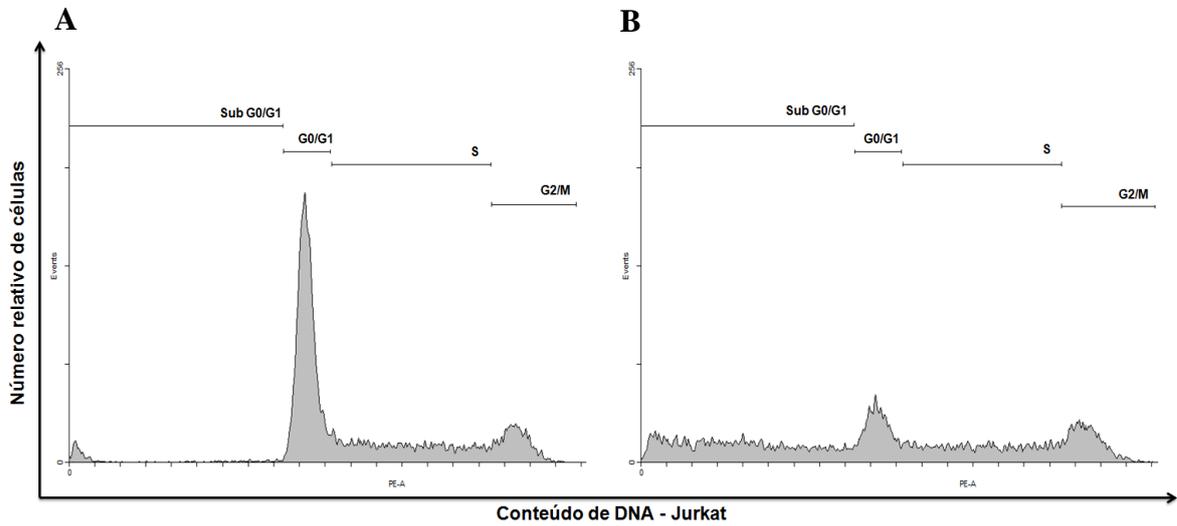
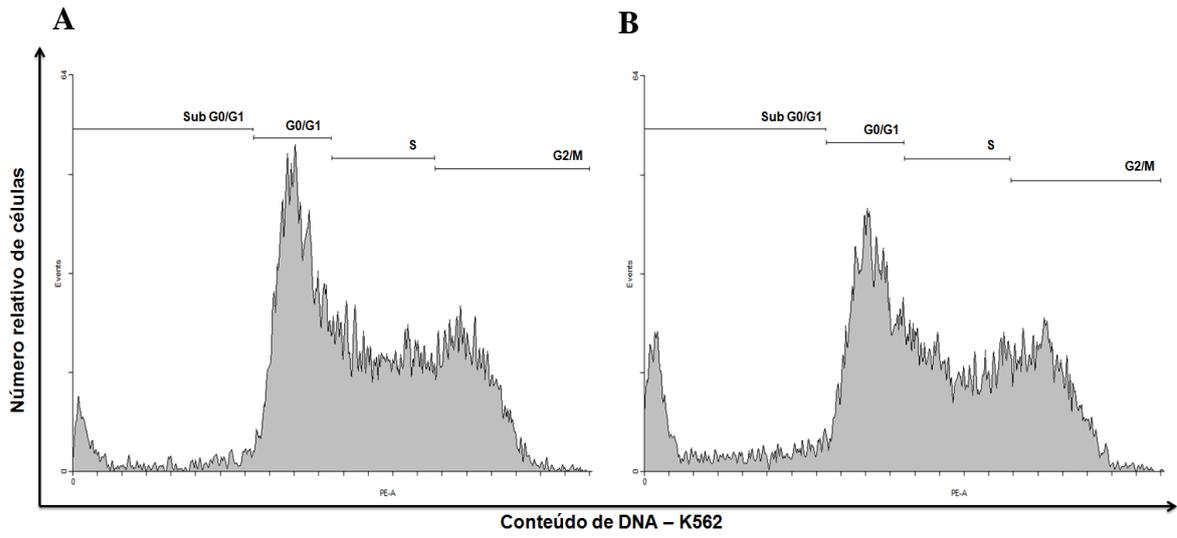
O efeito da chalcona **A1** na progressão do ciclo celular das células K562, Jurkat, U937, Kasumi, NB4 e CEM foi avaliado após 12 h de incubação nas suas respectivas CI_{50} de 24 h. Em comparação com o grupo controle (células sem tratamento), cinco das seis linhagens tratadas com a chalcona **A1** (K562, Jurkat, U937, Kasumi e NB4), apresentaram aumento significativo da proporção de células na fase sub G0/G1, o que sugere um aumento da morte celular sugestivo de apoptose. Além disso, o composto causou bloqueio do ciclo celular nas seis linhagens avaliadas, o que é indicado pelo aumento significativo da porcentagem de células na fase bloqueada. Assim, a chalcona **A1** bloqueou a fase G2/M nas células K562, Kasumi e NB4. As porcentagens obtidas no grupo controle e no grupo tratado com o composto passaram, respectivamente, de $24,49 \pm 1,70 \%$ para $32,83 \pm 1,17 \%$ (K562), de $10,52 \pm 0,41 \%$ para $18,10 \pm 0,47 \%$ (Kasumi) e de $17,95 \pm 0,58 \%$ para $39,94 \pm 1,87 \%$ (NB4). As células Jurkat foram bloqueadas na fase S, com porcentagem de $27,96 \pm 1,72 \%$ no

grupo tratado, em comparação com $14,46 \pm 0,78$ % do grupo controle. Já as células U937 e CEM apresentaram bloqueio na fase G0/G1, com porcentagem de $60,94 \pm 0,35$ % (U937) e $44,12 \pm 2,91$ % (CEM) após o tratamento com a chalcona **A1**, enquanto que os grupos controle apresentaram valores de $45,66 \pm 1,46$ % (U937) e $34,82 \pm 2,02$ % (CEM). (Tabela 4 e Figura 7).

Tabela 4. Efeito da chalcona A1 (CI₅₀) nas fases do ciclo celular das linhagens de LA humana.

Célula		G0/G1 (%)	S (%)	G2/M (%)	Sub G0/G1 % (Apoptose %)
K562	<i>Controle</i>	$39,32 \pm 0,01$	$36,19 \pm 1,68$	$24,49 \pm 1,70$	$6,32 \pm 0,49$
	<i>A1</i>	$30,66 \pm 2,95^*$	$36,52 \pm 1,79$	$32,83 \pm 1,17^*$	$12,04 \pm 0,05^*$
Jurkat	<i>Controle</i>	$55,46 \pm 3,91$	$27,96 \pm 1,72$	$14,46 \pm 0,78$	$3,98 \pm 0,33$
	<i>A1</i>	$33,52 \pm 6,29^*$	$43,88 \pm 0,30^*$	$22,50 \pm 5,98$	$44,06 \pm 7,45^*$
U937	<i>Controle</i>	$45,66 \pm 1,46$	$33,47 \pm 1,26$	$20,86 \pm 0,20$	$2,77 \pm 0,24$
	<i>A1</i>	$60,94 \pm 0,35^*$	$22,10 \pm 2,26^*$	$16,96 \pm 2,61$	$18,98 \pm 0,60^*$
Kasumi	<i>Controle</i>	$71,65 \pm 2,16$	$18,33 \pm 1,05$	$10,52 \pm 0,41$	$9,34 \pm 0,33$
	<i>A1</i>	$60,62 \pm 1,54^*$	$20,80 \pm 1,73$	$18,10 \pm 0,47^*$	$16,19 \pm 1,06^*$
NB4	<i>Controle</i>	$56,66 \pm 0,42$	$25,39 \pm 1,00$	$17,95 \pm 0,58$	$16,99 \pm 1,28$
	<i>A1</i>	$31,68 \pm 0,30^*$	$28,38 \pm 2,17$	$39,94 \pm 1,87^*$	$24,02 \pm 2,77^*$
CEM	<i>Controle</i>	$34,82 \pm 2,02$	$40,37 \pm 1,46$	$24,82 \pm 3,48$	$13,63 \pm 0,47$
	<i>A1</i>	$44,12 \pm 2,91^*$	$33,85 \pm 0,98^*$	$21,54 \pm 1,22$	$15,60 \pm 0,54$

* Diferença significativa em relação ao grupo controle, $p < 0,05$, ANOVA *one-way* seguida de teste *post-hoc* de Bonferroni.



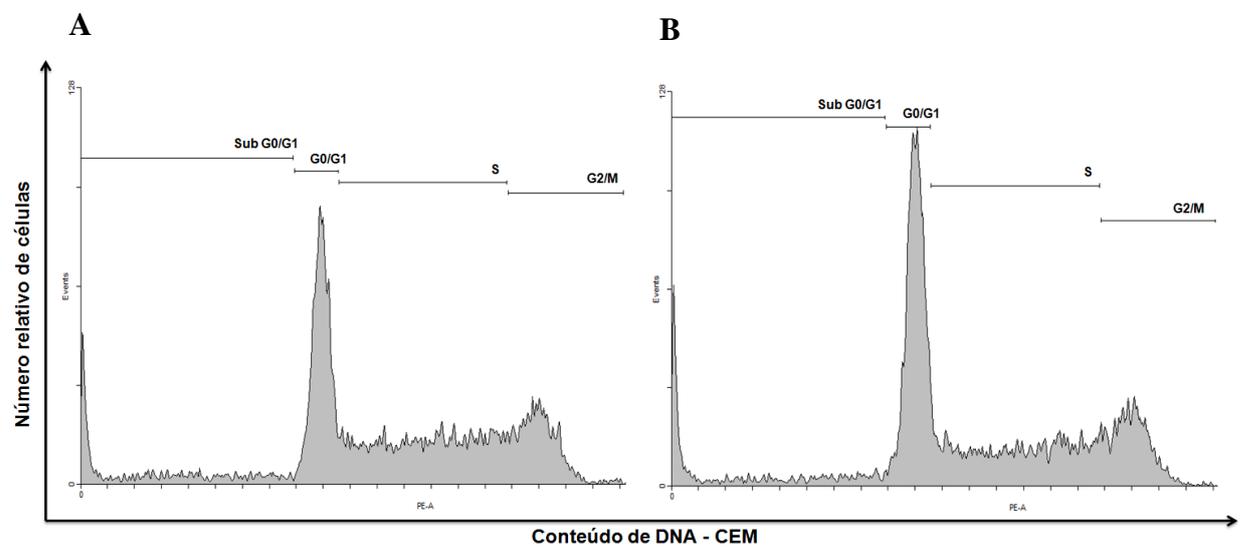
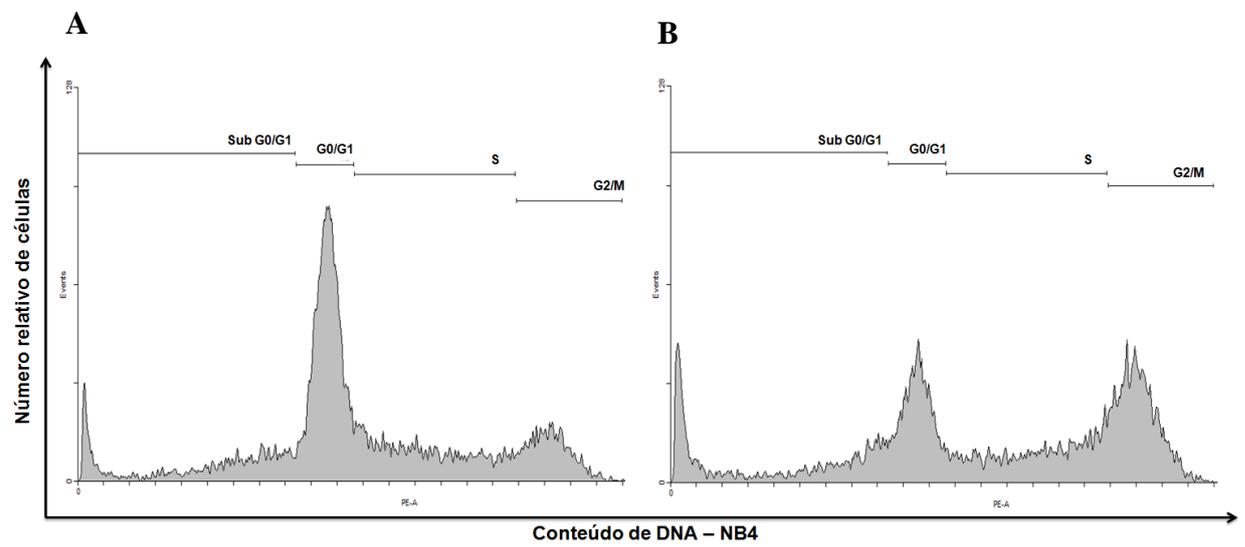
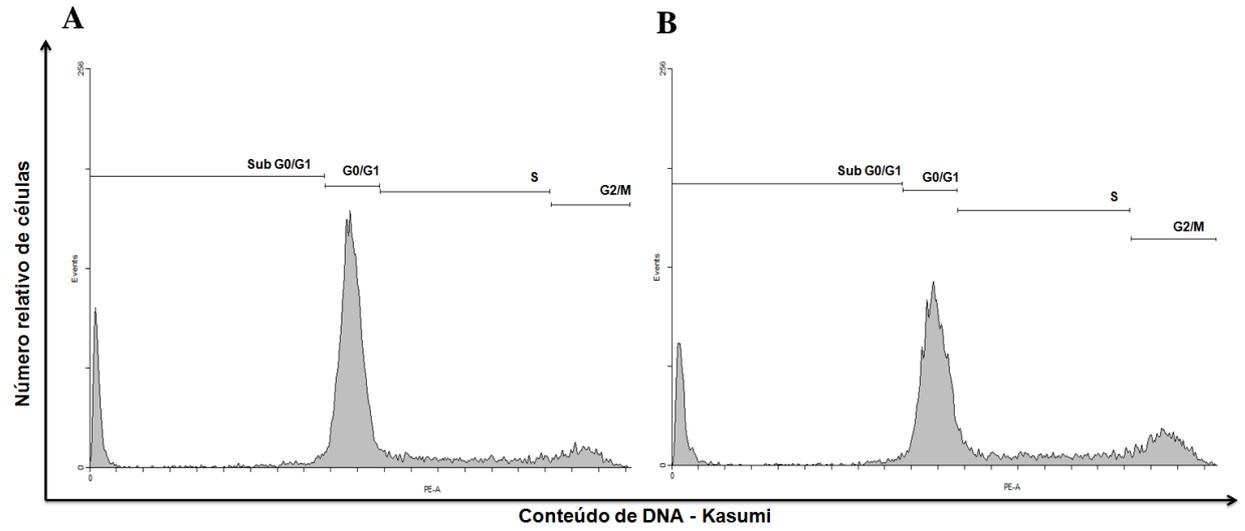


Figura 7. Efeito da Chalcona A1 sobre o ciclo celular das linhagens de LA K562, Jurkat, U937, Kasumi, NB4 e CEM. As células (1×10^6 células/poço – 12 h) foram incubadas por 12h na ausência, grupo controle (Painel A), e na presença da chalcona **A1** (Painel B). As fases do ciclo celular estão representadas por G0/G1, S e G2/M, e também a fase sub G0/G1. Os histogramas são representativos de, pelo menos, três experimentos independentes. As análises foram realizadas no citômetro de fluxo BD FACSCanto™ II (Becton Dickinson Immunocytometry Systems) e avaliadas pelo *software WinMID* versão 2.8.

5.8 Efeito da Chalcona A1 na Indução da Apoptose em Células de Linhagem de LA Humana

Para avaliar se chalcona **A1** induziu as linhagens K562, Jurkat, U937, Kasumi, NB4 e CEM à morte celular por apoptose, as alterações morfológicas foram observadas por microscopia de fluorescência após coloração com BE/LA. Após 12 h de incubação com o composto nas suas respectivas CI_{50} , as seis linhagens celulares demonstraram características morfológicas típicas de células em apoptose tardia, como formação de corpos apoptóticos e perda de integridade da membrana plasmática (indicada pela fluorescência alaranjada). As células K562 e U937 apresentaram ainda algumas células em apoptose inicial, caracterizadas pela membrana íntegra (indicada pela fluorescência verde) com condensação da cromatina. As células em apoptose estão indicadas na Figura 8 pelas setas brancas.

Não foram encontradas características morfológicas sugestivas de morte celular por autofagia.

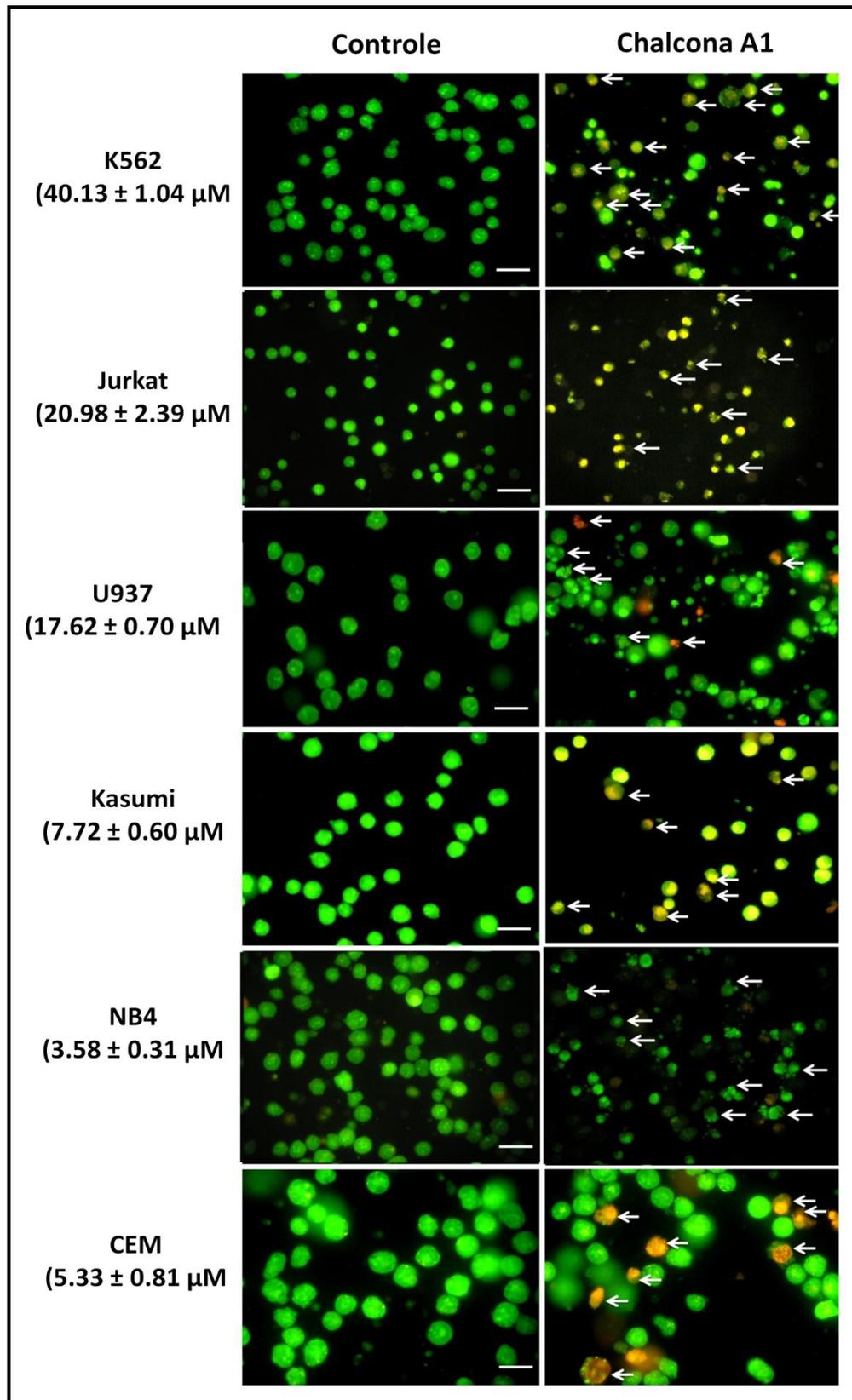
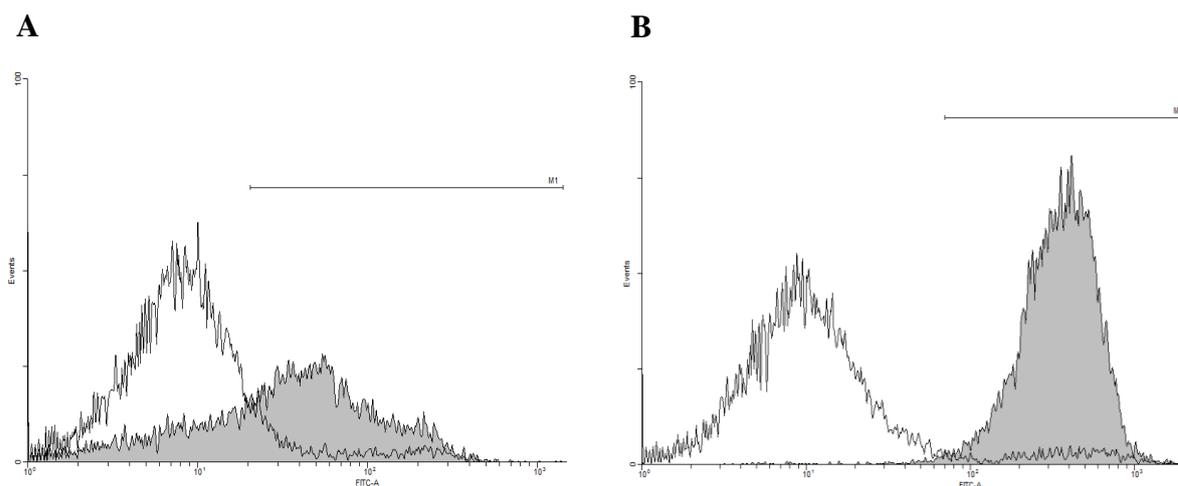


Figura 8. Alterações morfológicas induzidas pela chalcona A1 em células K562, Jurkat, U937, Kasumi, NB4 e CEM. As células (1×10^6 células/poço) foram incubadas com a chalcona A1 nas suas respectivas CI_{50} de 2 h por 12 h e então coradas com uma solução 1:1 de

BE/LA. Os grupos controle representam as células sem tratamento. As células foram observadas em microscópio de fluorescência (Olympus BX41) na magnitude de 400 x e campos representativos foram fotografados com câmera digital (Olympus BX40, Japão). Barras correspondem a 10 μ M. Setas indicam células em apoptose. Os resultados foram obtidos de, pelo menos, dois experimentos independentes.

A apoptose induzida pela chalcona **A1** também foi avaliada pela externalização da fosfatidilserina, a qual foi detectada pelo método da Anexina V conjugada a FITC. Conforme pode ser observado na Figura 9 e na Tabela 5, a chalcona **A1** aumentou de forma significativa a porcentagem de células positivas para Anexina V nas seis linhagens estudadas, indicando que houve externalização da fosfatidilserina e, conseqüentemente, morte celular por apoptose.

As células K562 passaram de $9,90 \pm 1,44$ % de células positivas para Anexina V no grupo controle, para $62,64 \pm 4,12$ % após o tratamento com a chalcona **A1** (Painel A). As células Jurkat passaram de $9,24 \pm 1,08$ % para $92,96 \pm 2,58$ % (Painel B); as células U937 passaram de $16,60 \pm 0,71$ % para $69,70 \pm 1,04$ % (Painel C), as células Kasumi, de $17,78 \pm 0,07$ % para $73,21 \pm 1,29$ % (Painel D), as células NB4, de $27,70 \pm 1,99$ % para $60,62 \pm 5,24$ % (Painel E) e as células CEM passaram de $13,39 \pm 0,93$ % para $86,84 \pm 1,67$ % (Painel F) na ausência (grupo controle) e na presença da chalcona **A1**, respectivamente.



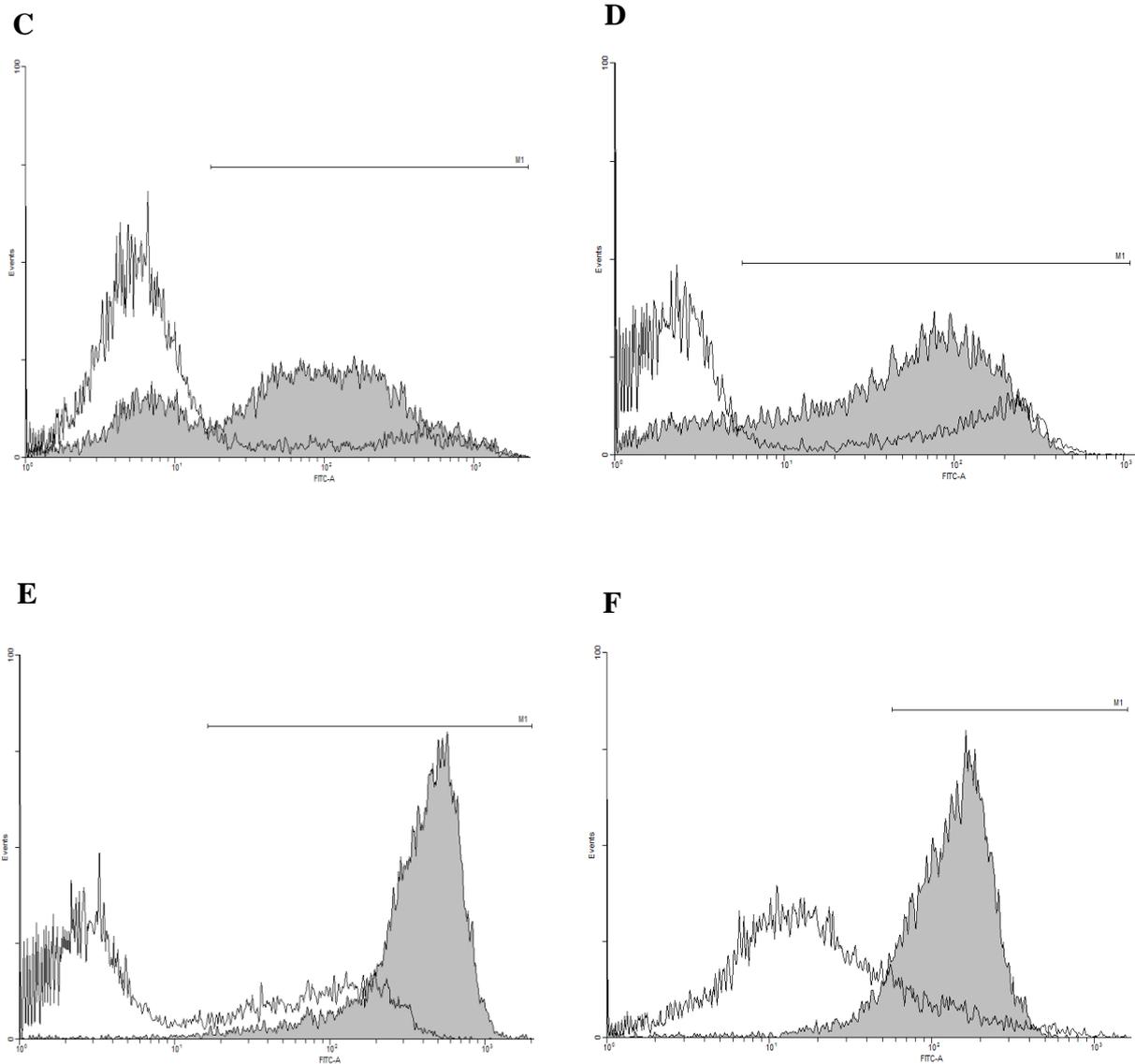


Figura 9. Efeito da Chalcona A1 na exposição dos resíduos de fosfatidilserina nas seis linhagens de LA pelo método da Anexina V conjugada a FITC. As células K562 (Painel A), Jurkat (Painel B), U937 (Painel C), Kasumi (Painel D), NB4 (Painel E) e CEM (Painel F) (1×10^6 células/poço), foram incubadas por 12 h na ausência, grupo controle, e na presença da chalcona A1 nas suas respectivas CI_{50} de 24h. A apoptose foi determinada pela marcação com Anexina V-FITC. O grupo controle está representado em branco e o grupo tratado com o composto está representado em cinza. As análises foram realizadas no citômetro de fluxo BD FACSCantoTM II (Becton Dickinson Immunocytometry Systems) e avaliadas pelo *software* WinMID versão 2.8. As figuras são representativas de, pelo menos, três experimentos independentes.

Tabela 5. Porcentagem de células positivas para Anexina V após o tratamento com a Chalcona A1 e os respectivos grupos controle.

CÉLULAS	% CÉLULAS ANEXINA V +	
	CONTROLE	A1
K562	9,90 ± 1,44	62,64 ± 4,12*
Jurkat	9,24 ± 1,08	92,96 ± 2,58*
U937	16,60 ± 0,71	69,70 ± 1,04*
Kasumi	17,78 ± 0,07	73,21 ± 1,29*
NB4	27,70 ± 1,99	60,62 ± 5,24*
CEM	13,39 ± 0,93	86,84 ± 1,67*

* Diferença significativa em relação ao grupo controle, $p < 0.05$, teste t de Student.

As células Jurkat, K562 e Kasumi foram selecionadas para os próximos ensaios de investigação dos mecanismos de ação. Optou-se por um modelo de células de linhagem de LLA (Jurkat) e um modelo de LMA (Kasumi). A linhagem K562 também foi escolhida, sendo inclusive utilizada em alguns experimentos preferencialmente à linhagem Kasumi, pois, além de ser considerada, na literatura, como um modelo de LMA, foi a linhagem que apresentou maior CI_{50} . Assim, acredita-se que bons resultados obtidos com essas células seriam ainda mais promissores nas outras linhagens menos resistentes.

A fim de confirmar a morte celular por apoptose por meio de uma terceira metodologia, as três células foram submetidas ao ensaio de fragmentação do DNA. Como pode ser observado na Figura 10, a chalcona **A1** induziu claramente o padrão de fragmentação “em escada” característico das células mortas por apoptose, o qual foi semelhante ao controle positivo Taxol.

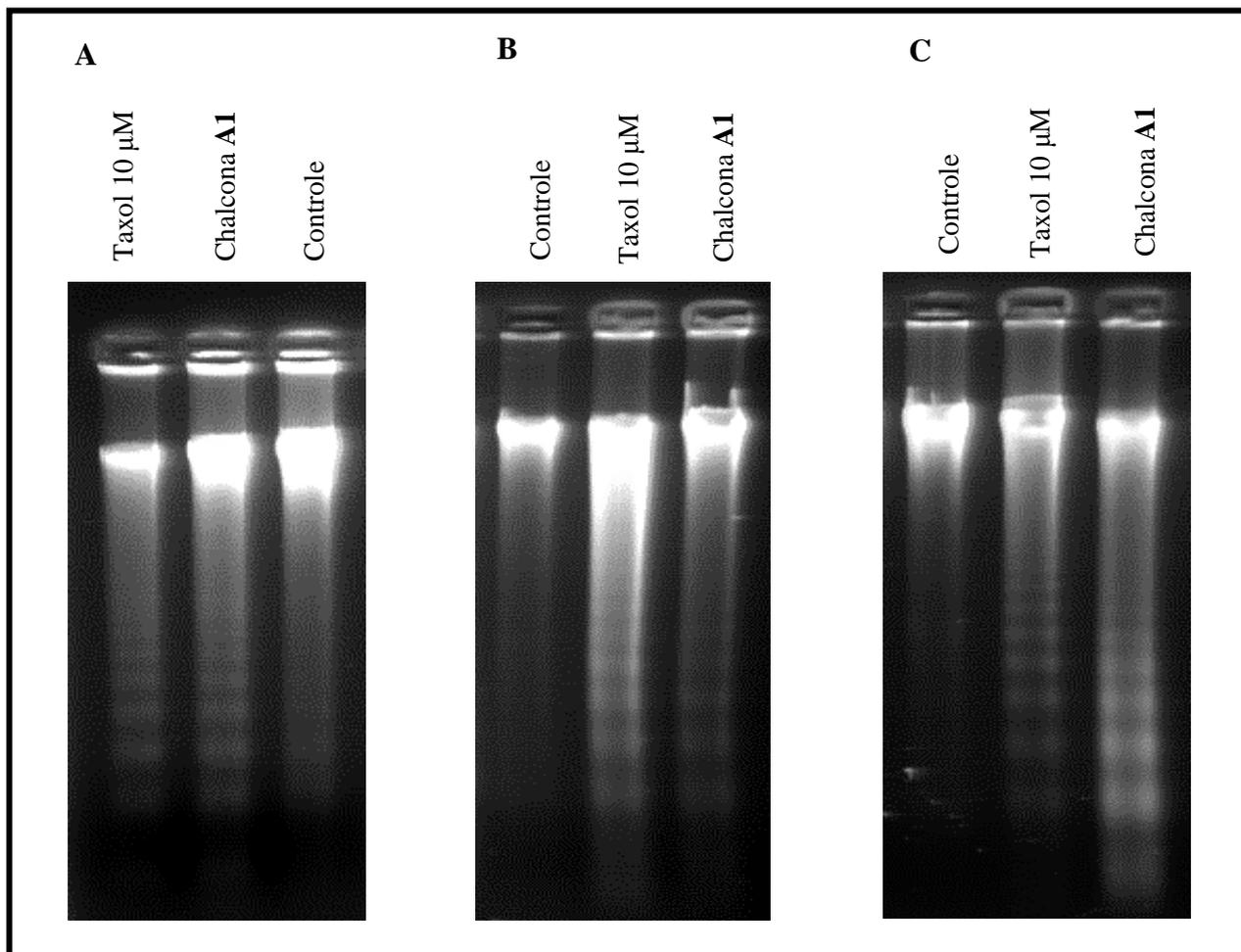


Figura 10. Avaliação da indução da fragmentação do DNA nas células **K562** (Painel **A**), **Jurkat** (Painel **B**) e **Kasumi** (Painel **C**) pela **chalcona A1**. As células (3×10^6 células/poço) foram incubadas com a **chalcona A1** nas suas respectivas CI_{50} de 24 h ou com **Taxol 10 µM** (controle positivo) por 24 h. Os grupos controle representam as células sem tratamento. Após a incubação, a extração do DNA foi realizada com solução de guanidina 5 M. O DNA das amostras foi separado por eletroforese em gel de agarose 2% e corados com brometo de etídio (1 µg/ml). Os géis foram visualizados e fotografados sob iluminação ultravioleta de fotodocumentação de géis (DOC-PRINT® Biosystems).

5.9 Investigação do Efeito da Chalcona A1 Sobre o Potencial Mitocondrial das Células K562, Jurkat e Kasumi

Com o objetivo de avaliar se a morte celular por apoptose causada pela **chalcona A1** envolveu a via mitocondrial, o potencial mitocondrial das células **K562**, **Jurkat** e **Kasumi** foi analisado após 12 h de incubação com o composto selecionado nas respectivas CI_{50} de 24 h. A intensidade de fluorescência média (IFM) do grupo controle foi considerada como 100% das

células com potencial mitocondrial intacto. Como pode ser observado na Figura 11, o tratamento com o composto reduziu o número de células com potencial mitocondrial intacto para $36,25 \pm 1,55$ % na linhagem K562, $28,00 \pm 3,51$ % na linhagem Jurkat e $24,50 \pm 3,66$ % na linhagem Kasumi, mostrando que o composto alterou o potencial mitocondrial das células analisadas.

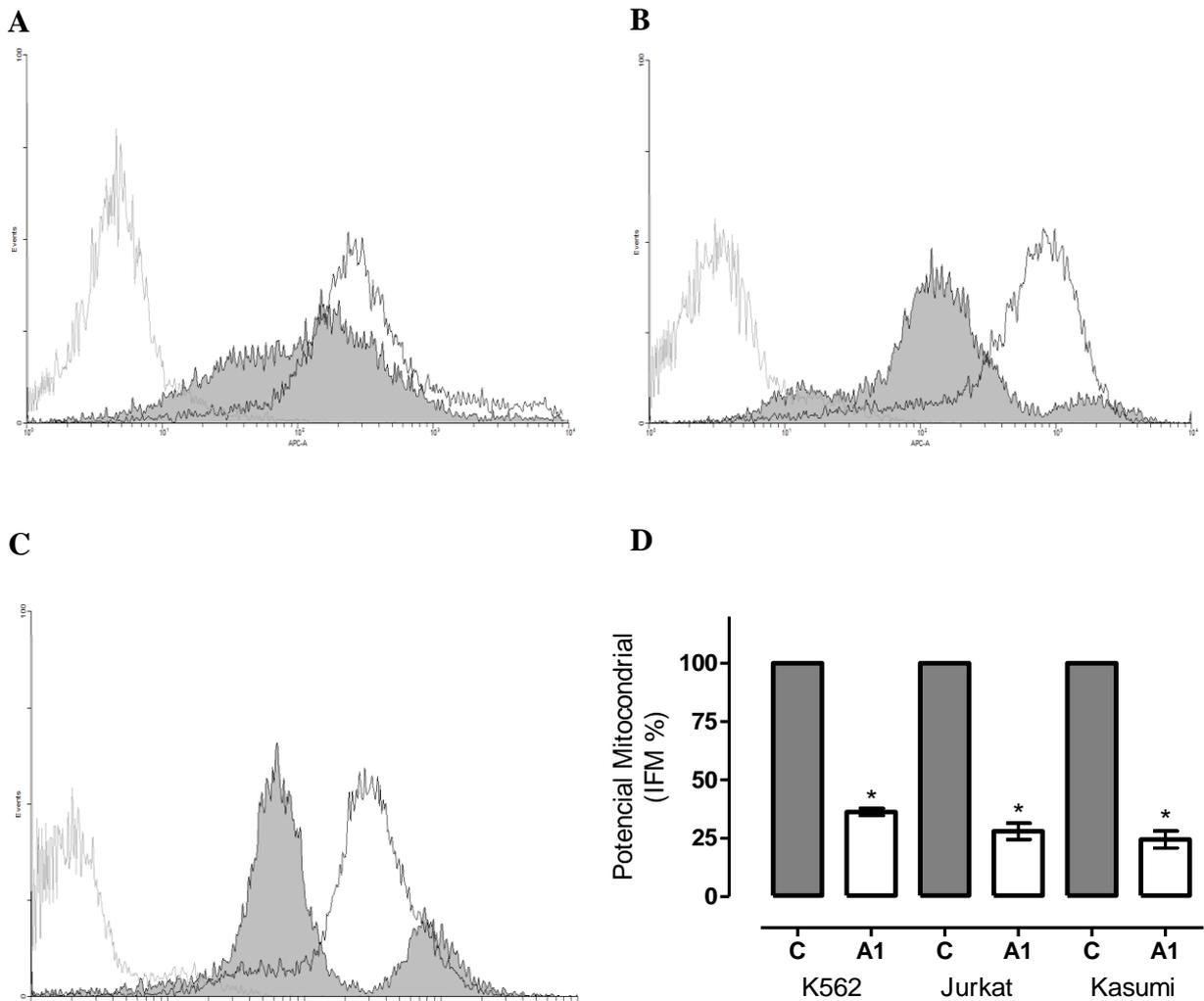


Figura 11. Efeito da Chalcona A1 sobre o potencial mitocondrial das células K562 (Painel A), Jurkat (Painel B) e Kasumi (Painel C). As células K562, Jurkat e Kasumi (1×10^6 células/poço), foram incubadas por 12 h na ausência, grupo controle (gráfico branco), e na presença da chalcona A1 (gráfico cinza) nas suas respectivas CI_{50} de 24 h. A IFM foi determinada por citometria de fluxo após a utilização do *kit* MitoView 633. As análises foram realizadas no citômetro de fluxo BD FACSCanto™ II (Becton Dickinson Immunocytometry Systems) e avaliadas pelo *software* WinMID versão 2.8. As figuras são representativas de, pelo menos, três experimentos realizados independentemente. Painel D: * Diferença significativa em relação ao grupo controle, $p < 0,05$, teste *t* de Student.

5.10 Efeito da Chalcona A1 sobre a Proteína KI-67

Como pode ser observado na Figura 12, o grupo controle (células sem tratamento), apresentou forte coloração castanha no núcleo, o que indica intensa expressão da proteína KI-67. Após o tratamento com a chalcona A1, houve um visível aumento da morte celular nas células K562, Jurkat e Kasumi, com diminuição da coloração castanha nas três linhagens avaliadas.

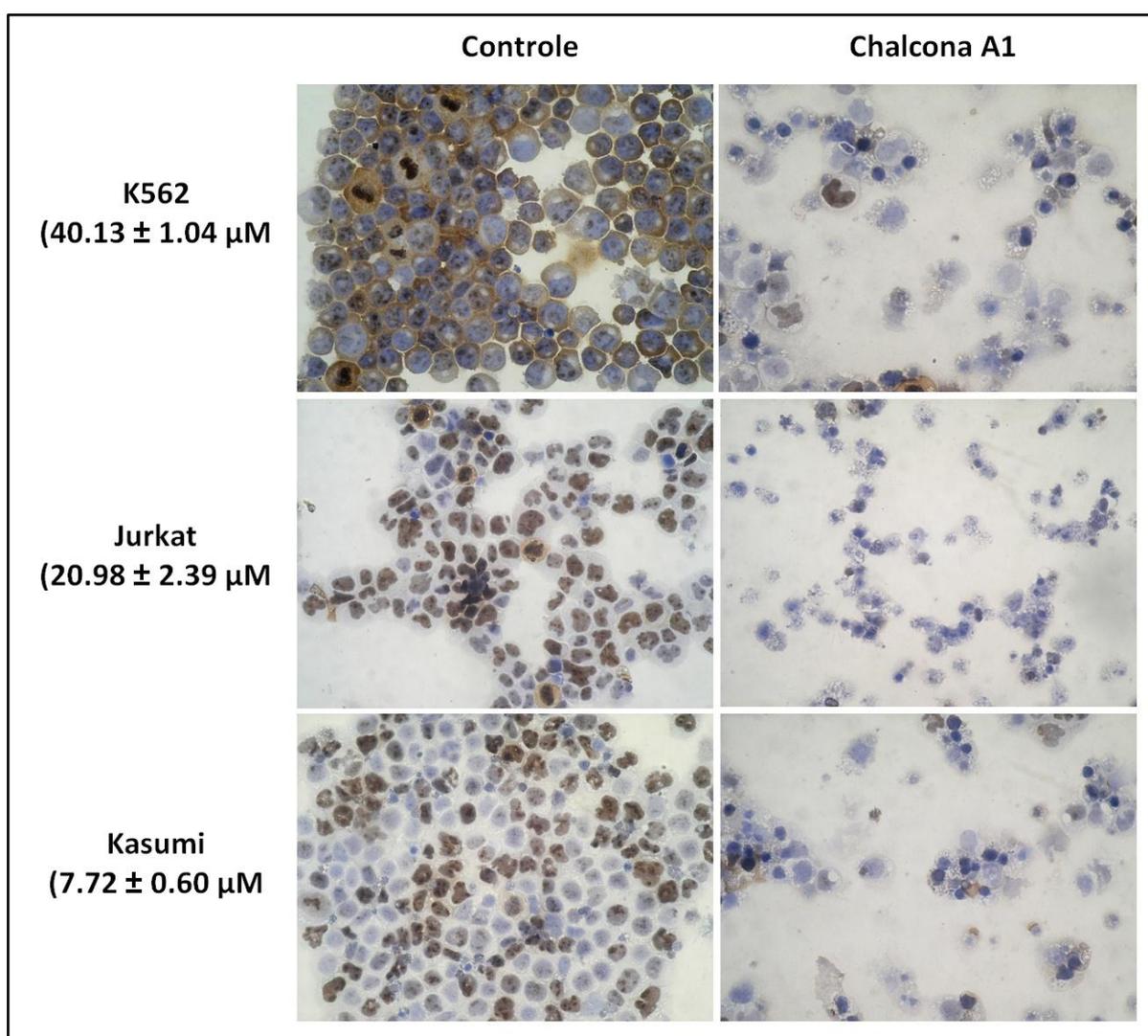


Figura 12. Expressão da proteína KI-67 nas células K562, Jurkat e Kasumi após o tratamento com a chalcona A1. As células ($1,0 \times 10^5$ células/poço) foram incubadas por 12 h com a chalcona A1 nas suas respectivas CI_{50} de 24 h. Os grupos controle representam as células sem tratamento. A expressão da proteína KI-67 foi realizada por imunocitoquímica, utilizando o método estreptoavidina-biotina-peroxidase. As células que expressam KI-67 são caracterizadas pela coloração castanha nuclear no local da marcação pelo anticorpo anti-KI-67.

As células foram observadas em microscópio ótico (Olympus BX41), em aumento de 400X, e os campos representativos foram fotografados com câmera digital (Olympus BX40, Japão).

5.11 Efeito da Chalcona A1 sobre a Proteína Antiapoptótica Survivina

Como pode ser observado na Figura 13, o grupo controle (células sem tratamento) apresentou forte coloração castanha no citoplasma, o que demonstra intensa expressão da proteína survivina. Após o tratamento com a chalcona A1, houve um visível aumento da morte celular nas três linhagens celulares, com diminuição evidente da coloração castanha nas células K562 e Jurkat e diminuição discreta nas células Kasumi.

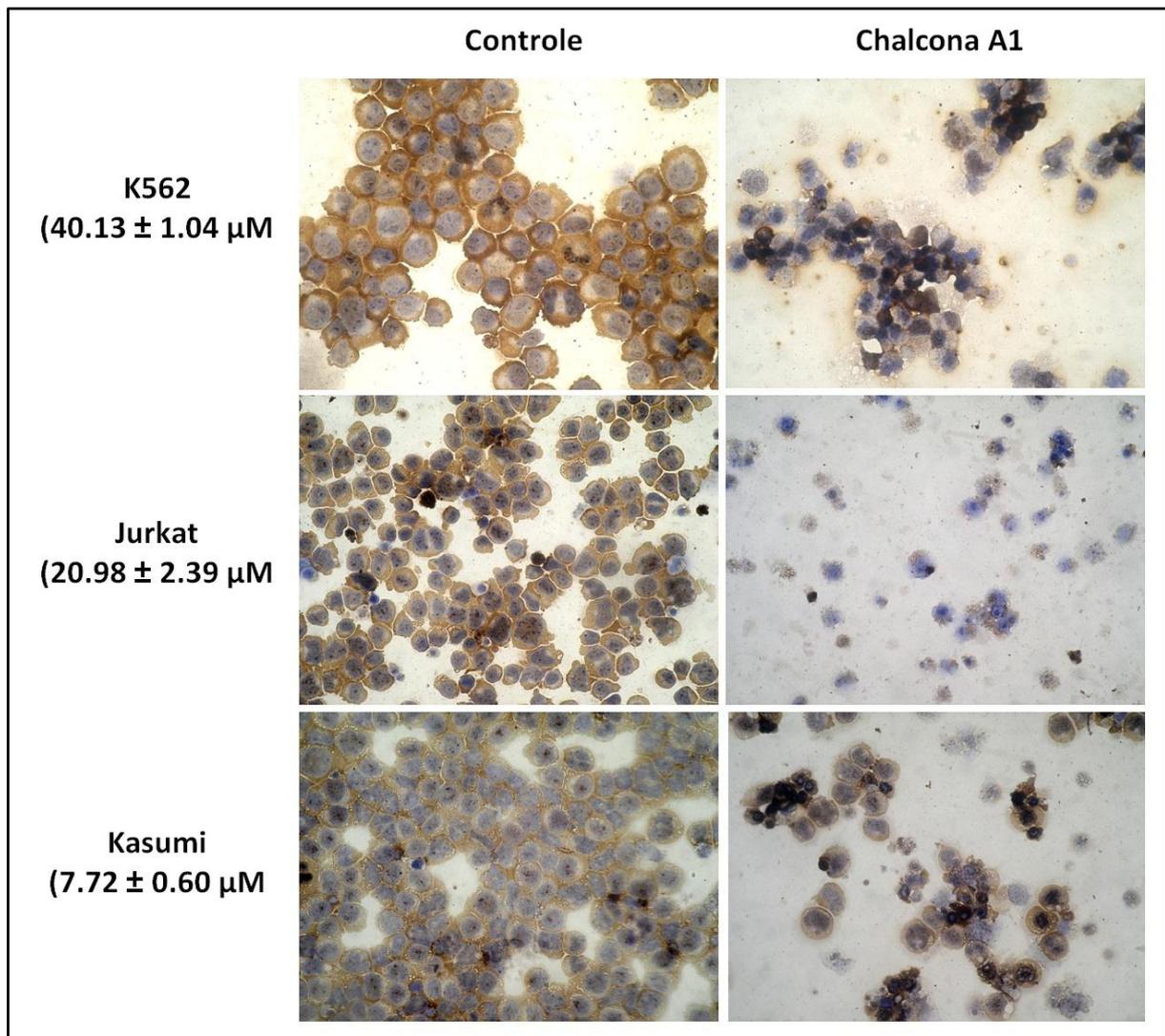


Figura 13. Expressão da proteína antiapoptótica survivina nas células K562, Jurkat e Kasumi após o tratamento com a chalcona A1. As células (1×10^5 células/ml) foram

incubadas por 12 h com a chalcona **A1** nas suas respectivas CI_{50} de 24 h. Os grupos controle representam as células sem tratamento. A expressão da proteína survivina foi realizada por imunocitoquímica, utilizando o método estreptoavidina-biotina-peroxidase. As células que expressam survivina são caracterizadas pela coloração castanha citoplasmática no local da marcação pelo anticorpo monoclonal anti-survivina. As células foram observadas em microscópio ótico (Olympus BX41), em aumento de 400X, e os campos representativos foram fotografados com câmera digital (Olympus BX40, Japão).

5.12 Investigação do Efeito da Chalcona A1 Sobre a Proteína Antiapoptótica Bcl-2 e Sobre a Proteína Pró-Apoptótica Bax

As células K562 e Jurkat foram incubadas por 4, 8 e 12 h com a chalcona **A1** nas suas respectivas CI_{50} de 24 h com o objetivo de avaliar se a apoptose provocada pelo composto envolve a expressão das proteínas Bcl-2 e Bax. Como pode ser observado na Figura 14, Painei A, a chalcona **A1** causou diminuição da expressão da proteína antiapoptótica Bcl-2 nas células K562 de forma significativa após 8 e 12 h de tratamento. A IFM encontrada foi de $37,00 \pm 16,27$ % em 8 h e $35,38 \pm 2,12$ % em 12 h, o que representa uma diminuição de, aproximadamente, 63 % e 65 % para os respectivos tempos. Nas células Jurkat (Figura 14, Painei B) houve diferença significativa somente após 12 h de tratamento com a chalcona **A1**. A IFM encontrada neste tempo foi de $50,60 \pm 4,71$ %, o que representa uma diminuição na expressão da proteína Bcl-2 de aproximadamente 50%.

A Figura 14, Painei C mostra que a chalcona **A1** também aumentou a expressão da proteína pró-apoptótica Bax nas células K562 de maneira significativa após 8 h e 12 h de tratamento, com IFM de $173,740 \pm 16,55$ % e $207,21 \pm 12,43$ %, respectivamente. Já nas células Jurkat (Figura 14, Painei D), foi observado um aumento significativo somente após 12 h de tratamento, com IFM de $138,45 \pm 6,56$ %. Este resultado demonstra que, após 12 h de incubação, o composto aumentou a expressão da proteína Bax na célula K562 em mais de duas vezes, enquanto que o aumento na célula Jurkat foi de aproximadamente 39%.

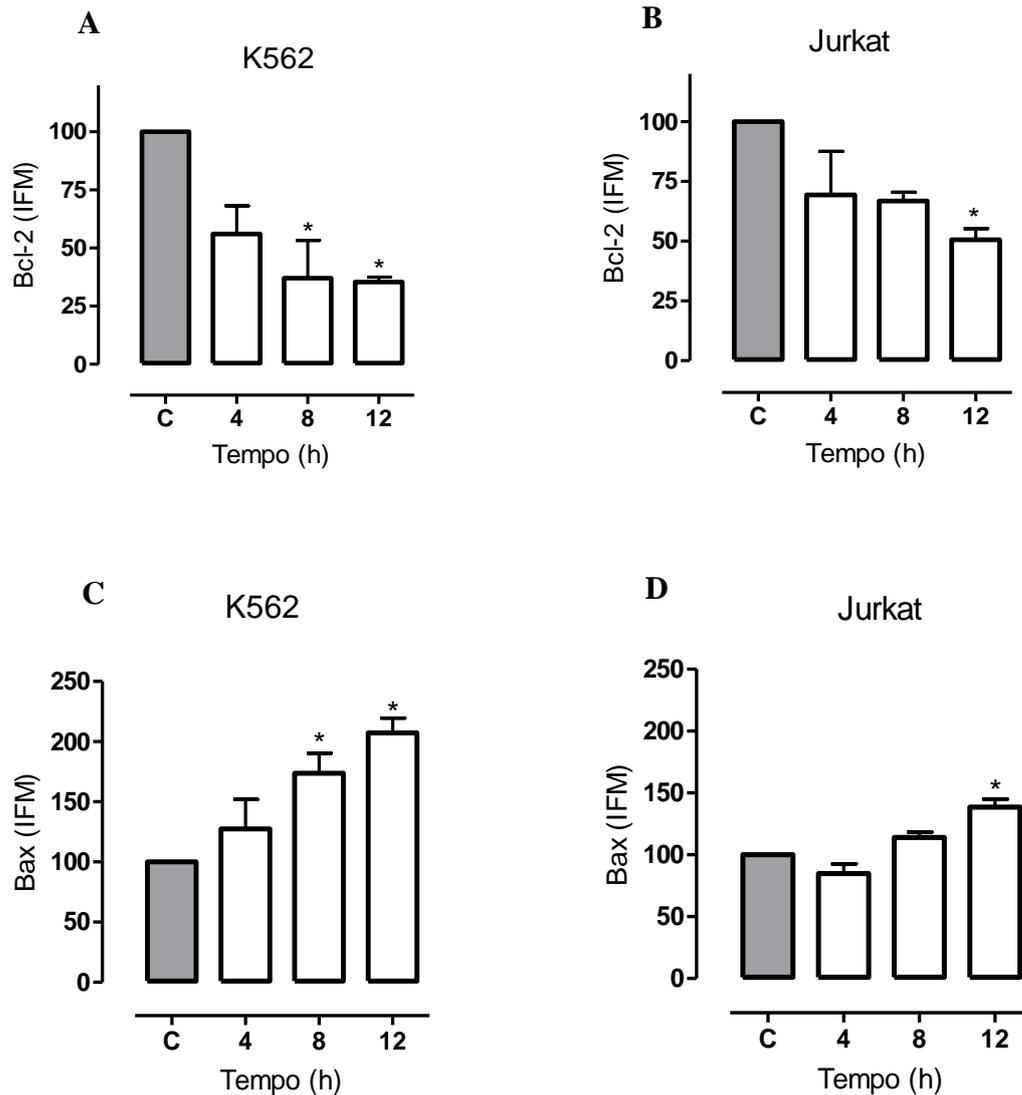


Figura 14. Efeito da chalcona A1 na expressão das proteínas Bcl-2 (Painéis A e B) e Bax (Painéis C e D) em células K562 e Jurkat. As células K562 e Jurkat (1×10^6 células/ml), foram incubadas por 4, 8 e 12 h na ausência, grupo controle (C), e na presença da chalcona A1 em suas respectivas CI_{50} de 24 h. A IFM foi determinada por citometria de fluxo após a marcação com o anticorpo anti-Bcl-2 e/ou com o anticorpo anti-Bax. Os resultados representam a média \pm EPM de, pelo menos, três experimentos independentes. As análises foram realizadas no citômetro de fluxo BD FACSCanto™ II (Becton Dickinson Immunocytometry Systems) e avaliadas pelo *software Infinicyt* versão 1.3. * Diferença significativa em relação ao grupo controle, $p < 0.05$, ANOVA *one-way* seguida de teste *post-hoc* de Bonferroni.

5.13 Efeito da Chalcona A1 sobre FasR

As células K562 e Jurkat foram incubadas por 12 h com a chalcona **A1** nas suas respectivas CI_{50} de 24 h com o objetivo de testar a expressão do receptor FasR (CD95) por citometria de fluxo. A IFM do grupo controle foi considerada como 100 %. Como pode ser observado na Figura 15, a chalcona **A1** aumentou a expressão de FasR na linhagem Jurkat de forma significativa após 12 h de tratamento, com IFM de $125,67 \pm 4,38$ %, representando um aumento de aproximadamente 26%. No entanto, o composto não alterou a expressão de FasR na linhagem K562.

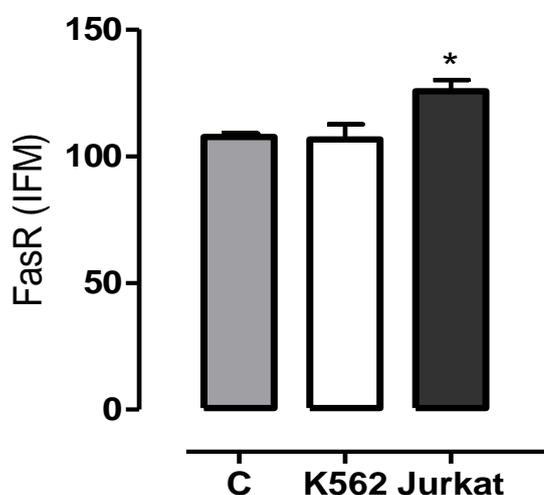


Figura 15. Efeito da chalcona A1 na expressão da proteína FasR (CD95) em células K562 e Jurkat. As células K562 e Jurkat (1×10^6 células/poço) foram incubadas por 12 h na ausência, grupo controle (C), e na presença da chalcona **A1** nas suas respectivas CI_{50} de 24 h. A IFM foi obtida por citometria de fluxo após a marcação com o anticorpo anti-CD95. Os resultados representam a média \pm EPM de, pelo menos, três experimentos independentes. As análises foram realizadas no citômetro de fluxo BD FACSCanto™ II (Becton Dickinson Immunocytometry Systems) e avaliadas pelo *software* *Infinicyt* versão 1.3. * Diferença significativa em relação ao grupo controle, $p < 0.05$, teste *t* de Student.

5.14 Efeito da Chalcona A1 sobre o Fator Indutor de Apoptose

As células K562 e Jurkat foram incubadas por 4, 8, 12 e 24 h com a chalcona **A1** nas suas respectivas CI_{50} de 24 h com o objetivo de investigar se a apoptose causada pelo composto envolve a expressão da proteína AIF. A IFM do grupo controle foi considerada

como 100 %. Como pode ser observado na Figura 16, não houve alteração significativa na expressão da proteína AIF nas duas linhagens analisadas.

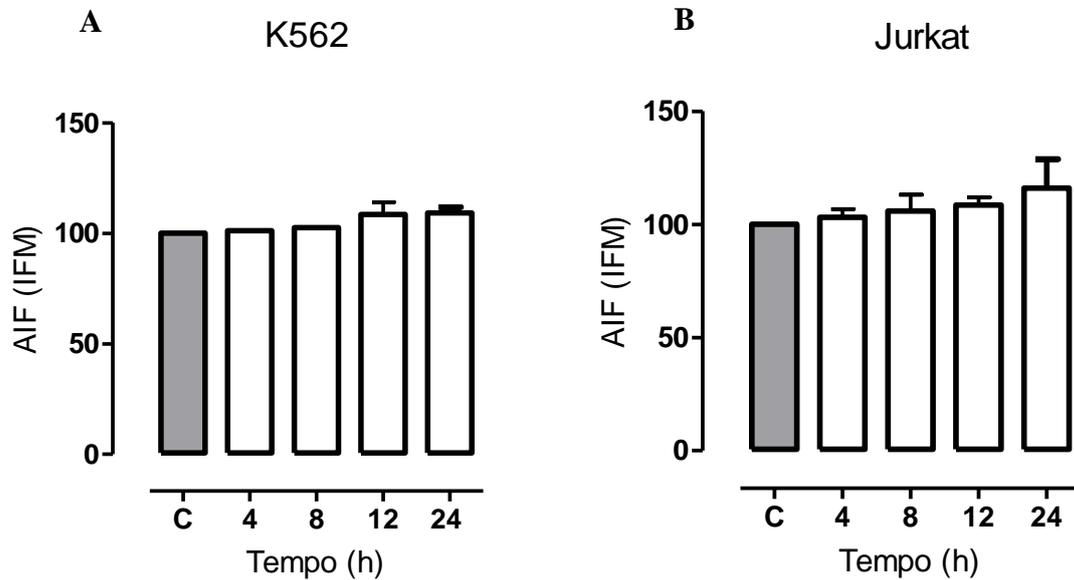


Figura 16. Efeito da chalcona A1 na expressão da proteína AIF em células K562 (Painel A) e Jurkat (Painel B). As células K562 e Jurkat (1×10^6 células/poço), foram incubadas na ausência, grupo controle (C), e na presença da chalcona **A1** nas suas respectivas CI_{50} de 24 h. A IFM foi determinada por citometria de fluxo após a marcação com o anticorpo anti-AIF. Os resultados representam a média \pm EPM de, pelo menos, três experimentos independentes. As análises foram realizadas no citômetro de fluxo BD FACSCanto™ II (Becton Dickinson Immunocytometry Systems) e avaliadas pelo *software* *Infinicyt* versão 1.3. ANOVA *one-way* seguida de teste *post-hoc* de Bonferroni.

5.15 Efeito da Chalcona A1 sobre a Ativação da Caspase-3

As células K562 e Jurkat foram incubadas por 24 h com a chalcona **A1** nas suas respectivas CI_{50} de 24 h com o objetivo de testar a expressão da proteína Caspase-3. A IFM do grupo controle foi considerada como 100 %. Como pode ser observado na Figura 17, a chalcona **A1** aumentou de forma significativa a expressão da Caspase-3 nas células K562 e Jurkat, com IFM de $124,41 \pm 3,19$ % e $130,50 \pm 3,09$ % respectivamente.

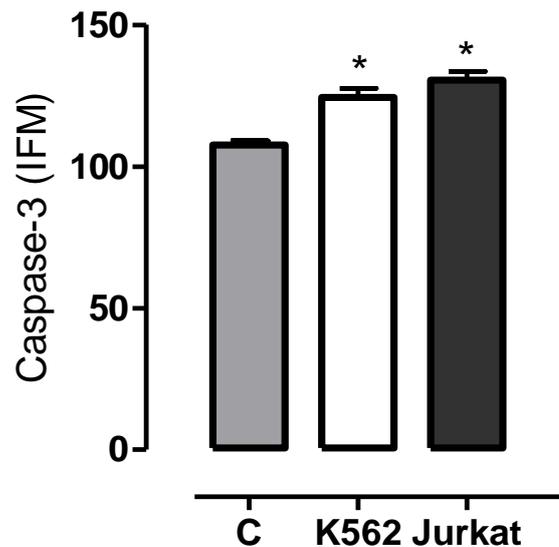


Figura 17. Efeito da chalcona A1 na expressão da proteína caspase-3 em células K562 e Jurkat. As células K562 e Jurkat (1×10^6 células/poço), foram incubadas por 24 h na ausência, grupo controle (C), e na presença da chalcona A1 nas suas respectivas CI_{50} de 24h. A IFM foi determinada por citometria de fluxo após a marcação com o anticorpo anti-Caspase-3. Os resultados representam a média \pm EPM de, pelo menos, três experimentos independentes. As análises foram realizadas no citômetro de fluxo BD FACSCanto™ II (Becton Dickinson Immunocytometry Systems) e avaliadas pelo *software* *Infinicyt* versão 1.3. * Diferença significativa em relação ao grupo controle, $p < 0.05$, teste *t* de Student.

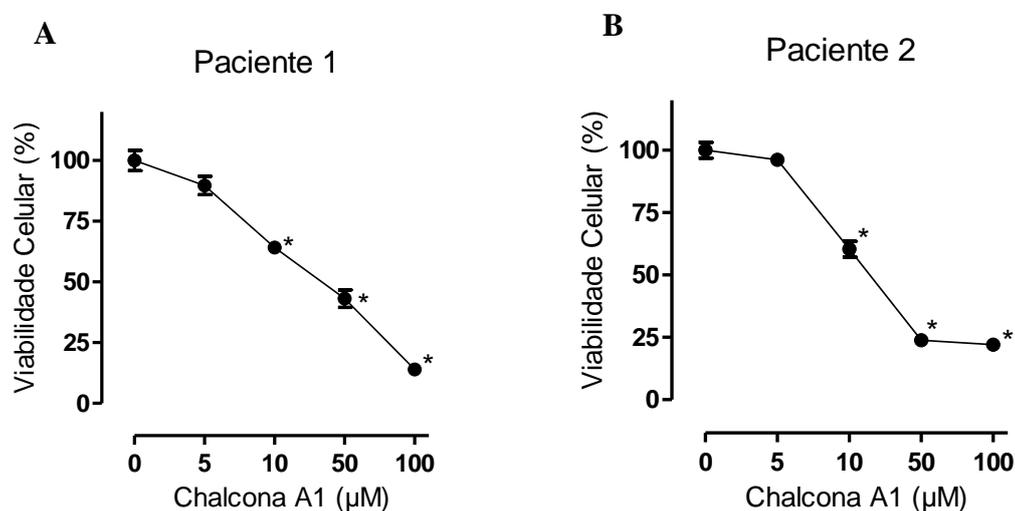
5.16 Investigação do Efeito Citotóxico da Chalcona A1 sobre Células de Pacientes Portadores de LA

O efeito da chalcona A1 sobre células mononucleadas de SP e MO de oito pacientes com diagnóstico de LA atendidos no HU/UFSC foi investigado a fim de se determinar a citotoxicidade do composto em ensaios *ex vivo*. De acordo com a Tabela 6, dos oito pacientes avaliados, três eram do gênero feminino e cinco do gênero masculino, e a mediana de idade foi de 46 anos. A porcentagem de blastos em cada amostra variou entre 24,6 % e 89,9 %, com mediana de 45,10 %. Segundo os critérios da OMS (2008), os Pacientes 1 e 2 receberam o diagnóstico de LLA-B comum; os Pacientes 3 e 6 de LPA, o Paciente 4 de leucemia mielomonocítica aguda, os Pacientes 5 e 8 de LA de linhagem mista e o Paciente 7 de LMA sem maturação. Três dos oito pacientes foram a óbito e os demais continuam em tratamento e em remissão até o presente momento.

Tabela 6: Características clínicas e laboratoriais dos pacientes com diagnóstico de LA no momento do diagnóstico incluídos no estudo.

PACIENTE	GÊNERO	IDADE (anos)	AMOSTRA	DIAGNÓSTICO	LEUCÓCITOS /mm ³	BLASTOS (%)	PROGRESSÃO
1	M	48	SP	LLA-B comum	142,340	89,9	Óbito
2	F	17	SP	LLA-B comum	61,580	84,5	Remissão
3	F	87	SP	LPA	20,690	24,6	Óbito
4	M	76	MO	Leucemia mielomonocítica aguda	35,500	31,8	Óbito
5	F	44	MO	LA de linhagem mista	14,890	30,0	Remissão
6	M	18	MO	LPA	25,680	62,0	Remissão
7	M	38	MO	LMA sem maturação	25,370	59,0	Remissão
8	M	67	MO	LA de linhagem mista	5,680	27,0	Remissão

Como pode ser observado na Figura 18, (Painéis A-H) a chalcona **A1**, após 24 h de incubação com as células mononucleadas, reduziu a viabilidade celular de forma dependente da concentração nas amostras dos oito pacientes portadores de LA incluídos no estudo. Foi encontrada uma redução significativa da viabilidade celular a partir de 10 μM , sendo que para um paciente a redução foi observada a partir de 5 μM . A CI_{50} encontrada para as 8 amostras pode ser observada na Tabela 7.



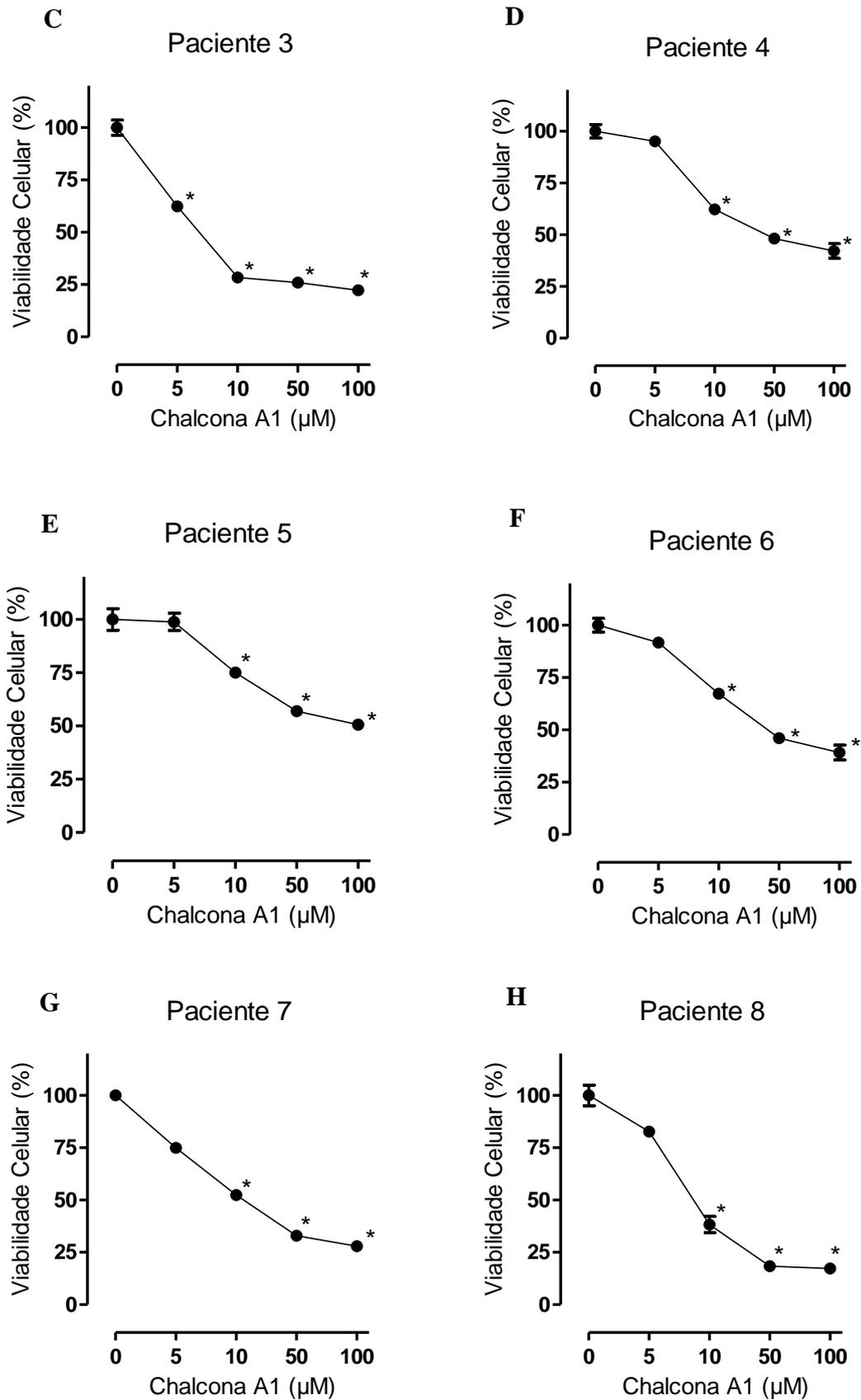


Figura 18. Efeito citotóxico *ex vivo* da chalcona A1 sobre células mononucleadas de pacientes portadores de LA (Painéis A-H). As células separadas por Ficoll-Hypaque ($1,0 \times 10^6$ células/poço) foram incubadas com a chalcona A1 por 24 h. A viabilidade celular foi

avaliada pelo método do MTT. A densidade óptica do grupo controle (células sem tratamento) foi definida como 100% de viabilidade celular. * Diferença estatisticamente significativa em relação ao grupo controle, $p < 0.05$, ANOVA *one-way* seguida de teste *post-hoc* de Bonferroni.

Tabela 7. Valores de CI_{50} observados nas amostras de pacientes portadores de LA após tratamento com a chalcona A1

PACIENTE	CI_{50} (μM)
1	$26,18 \pm 1,42$
2	$21,38 \pm 1,33$
3	$7,19 \pm 0,86$
4	$42,27 \pm 2,04$
5	$76,51 \pm 1,88$
6	$18,45 \pm 1,73$
7	$16,04 \pm 1,20$
8	$11,15 \pm 1,01$

6. DISCUSSÃO

Segundo dados da OMS, em 2012, o câncer foi a sétima causa de morte no mundo, sendo considerada a terceira em países desenvolvidos. Nas últimas décadas, o câncer tem se tornado um importante problema de saúde pública mundial (WHO, 2012) e, por essa razão, inúmeras pesquisas têm sido realizadas com o objetivo de desenvolver diferentes tratamentos com novos fármacos antineoplásicos e elucidar os seus mecanismos de ação (KOSIOR; LEWANDOWSKA-GRYGIEL; GIANNOPOULOS, 2011).

Os tumores hematológicos se diferenciam dos tumores sólidos por apresentarem diferenças em suas origens histológicas, nas características patogênicas e no comportamento clínico e, por isso, são abordados de forma diferente das demais neoplasias. Dentre os tumores hematológicos destacam-se as LAs, as quais se caracterizam por ser um grupo de doenças heterogêneas cujos tratamentos estão associados a altas taxas de morbidade, mortalidade e recidiva (KRUG et al., 2011) e que estão entre as principais causas de morte por câncer no Brasil, em 2012 (INCA, 2011). Assim, considerando as diversas propriedades farmacológicas atribuídas na literatura às chalconas (KATSORI; HADJIPAYLOU-LITINA, 2009; AKIHISA et al., 2012), a síntese de compostos derivados de sua estrutura básica pode ser uma estratégia importante na busca por novas terapias antileucêmicas.

Nessa perspectiva, baseado em um estudo prévio realizado no LOEH que relatou os efeitos de chalconas sintéticas derivadas do 2-naftaldeído em células L-1210 (PEDRINI et al., 2010), foram sintetizadas, para o presente estudo, três chalconas estruturalmente modificadas (**A1**, **A23** e **C24**) com o objetivo de otimizar o potencial citotóxico já relatado. Em comparação com as estruturas químicas analisadas no estudo anterior, foram propostas substituições 3,4,5-trimetóxi no anel A da 2-naftilchalcona a fim de se obter o composto **C24**, tendo como base estudos prévios que relataram a atividade antileucêmica de derivados metoxilados (DUCKI et al., 1998; YE et al., 2005; DUCKI et al., 2009; ECHEVERRIA et al., 2009; SINGH et al., 2012). De acordo com estes estudos, a atividade antitumoral das chalconas e seus derivados sintéticos está altamente relacionada ao padrão da substituição aromática, sendo que as chalconas metoxiladas normalmente apresentam maior atividade. A fim de comparar o potencial citotóxico e avaliar a influência do anel B na atividade antileucêmica, também foi realizada a substituição do radical 2-naftil pelo radical 1-naftil e, dessa forma, obtiveram-se as chalconas **A23** e **A1**.

A triagem realizada com os três compostos em células de linhagem de LA K562 e Jurkat, selecionadas por serem modelos clássicos de LMA e LLA respectivamente, mostrou que as três chalconas sintéticas apresentaram efeito citotóxico significativo. As chalconas reduziram a viabilidade celular das duas linhagens de forma dependente da concentração

quando comparadas ao grupo controle (células sem tratamento). Além disso, dentre as chalconas analisadas, o composto **A1** apresentou maior citotoxicidade (Tabela 2: CI_{50} células K562: $40,13 \pm 1,04 \mu\text{M}$; CI_{50} células Jurkat: $20,98 \pm 2,39 \mu\text{M}$) e, por esse motivo, foi selecionado para os demais ensaios biológicos.

O presente estudo teve por objetivo encontrar um novo composto com atividade citotóxica em concentrações baixas para que este pudesse vir a ser utilizado futuramente como fármaco antileucêmico ou como protótipo para a síntese de novos compostos. Segundo Cos e colaboradores (2002), concentrações acima de $50\mu\text{M}$ podem ser citotóxicas também para células normais, o que aumentaria a probabilidade de provocar efeitos adversos para o paciente. Dessa forma, a concentração máxima testada nos ensaios de citotoxicidade foi de $50 \mu\text{M}$. Além disso, considerando-se que as leucemias constituem um grupo heterogêneo de doenças e, por isso, diferem quanto à etiologia, patogênese, prognóstico e resposta ao tratamento, neste trabalho optou-se por realizar estudos *in vitro* com diferentes linhagens de LAs. Assim, foram escolhidas, além das células K562 (LMA secundária a LMC) e Jurkat (LLA-T), as células U937 (leucemia monocítica aguda), Kasumi (LMA com t(8;21) (q21;q22)), NB4 (LPA com t(15;17) (q22;q21)) e CEM (LLA-T).

A chalcona **A1** demonstrou citotoxicidade de maneira dependente do tempo e da concentração nas seis linhagens de LAs avaliadas (Tabela 3 - CI_{50} 24 h: $3,58 \pm 0,31 \mu\text{M}$ a $40,13 \pm 1,04 \mu\text{M}$; CI_{50} 48 h: $1,48 \pm 0,44 \mu\text{M}$ a $17,87 \pm 0,66 \mu\text{M}$; CI_{50} 72h: $1,85 \pm 0,49 \mu\text{M}$ a $6,28 \pm 0,65 \mu\text{M}$). O efeito citotóxico das chalconas e seus derivados vêm sendo investigado em diferentes estudos. Piotrowska e colaboradores (2011) testaram uma série de isoxazolidinas sintéticas derivadas de chalconas em células K562 (5×10^3 células/ poço) e encontraram valores de CI_{50} entre $90,0$ e $150,0 \mu\text{M}$, após 24 h de incubação e entre $80,0$ e $90,0 \mu\text{M}$ após 48 h de incubação. Os valores obtidos são significativamente mais elevados do que os encontrados para a chalcona **A1**, principalmente se for levada em consideração a quantidade de células plaqueadas por poço (5×10^3 células contra 1×10^5 no presente trabalho). Já Aryapour e colaboradores (2012), em um estudo envolvendo cromanonas e células K562, obteve uma CI_{50} de $38,80 \mu\text{M}$ após 24 h de incubação com o composto mais efetivo (1×10^4 células/ poço). Esse valor foi bastante semelhante ao obtido com a chalcona **A1** na mesma linhagem ($40,13 \pm 1,04 \mu\text{M}$), no entanto, deve-se observar que a quantidade de células incubadas com o composto **A1** foi 10 vezes maior, o que sugere uma maior efetividade do mesmo em relação ao composto descrito na literatura. Outros estudos como os de Reddy e colaboradores (2010) e Ducki e colaboradores (2009) encontraram valores bastante baixos de CI_{50} em células K562 tratadas com chalconas sintéticas, entre $0,30$ e $0,90 \mu\text{M}$ e entre $0,43 \times 10^2$

μM e $30,00 \mu\text{M}$, respectivamente. Um deles (YE et al., 2005), envolvendo chalconas metoxiladas, obteve CI_{50} de $14.2 \pm 0.45 \mu\text{M}$. No entanto, nesses trabalhos os tempos de incubação foram superiores ao realizado no presente estudo: 96 h (REDDY et al, 2010), 120 h (DUCKI et al., 2009) e 48 h (YE et al., 2005). Além disso, o número de células K562 plaqueadas foi inferior à quantidade utilizada no presente trabalho, 1×10^4 células/poço (REDDY et al, 2010; YE et al., 2005) e 2×10^3 células/ml (DUCKI et al., 2009).

Apesar de a literatura relatar valores mais baixos de CI_{50} , muitos desses estudos utilizam concentrações menores de células ou maiores tempos de incubação. Quanto menor a densidade de células por poço e quanto mais tempo o composto ficar em contato com as células, aumentando o tempo de exposição, maior será sua eficiência em induzir a morte celular, o que justificaria os menores valores encontrados na literatura. Dessa forma, é possível sugerir que a chalcona **A1**, principalmente se levarmos em consideração a CI_{50} de 72 h ($4,55 \pm 0,35 \mu\text{M}$), apresenta valores semelhantes e, muitas vezes, melhores do que os valores descritos na literatura para as células K562.

Achados semelhantes foram obtidos nas demais linhagens leucêmicas utilizadas no presente trabalho. Tavares e colaboradores (2011) avaliaram uma série de nove quinolinil chalconas e quinolinil-N-óxido chalconas em células Jurkat (1×10^5 células/ poço) após 48 h de incubação e encontram valores de CI_{50} que variaram entre $4,90 \pm 0,40 \mu\text{M}$ e $71,90 \pm 18,00 \mu\text{M}$. Gul e colaboradores (2009), em um estudo realizado em células Jurkat com cinco derivados de 4'-hidroxichalcona testados nas mesmas condições acima, obteve CI_{50} entre 9,30 e $14,00 \mu\text{M}$. O resultado obtido para o composto **A1** em 48 h ($5,49 \pm 1,75 \mu\text{M}$) foi semelhante ao melhor resultado obtido pelo grupo de Tavares e colaboradores (2011), e mesmo o valor encontrado em 24 h ($20,98 \pm 2,39 \mu\text{M}$) foi superior a muitos dos compostos avaliados na literatura (PATI et al., 2007; GUL et al., 2009; TAVARES et al., 2011).

De maneira semelhante, Dimmock e colaboradores (2003) testaram derivados de 4'-aminochalconas em células CEM e, dentre os compostos analisados, 40% apresentaram CI_{50} abaixo de $10,00 \mu\text{M}$. Como as condições de ambos os experimentos não foram relatadas, a comparação com a chalcona **A1** ficou prejudicada, porém os baixos valores de CI_{50} encontrados para essa linhagem ($5,33 \pm 0,81 \mu\text{M}$ em 24h, $2,82 \pm 0,68 \mu\text{M}$ em 48h e $1,85 \pm 0,49 \mu\text{M}$ em 72 h) corroboram o resultado encontrado na literatura. Apenas um único trabalho envolvendo ensaios de citotoxicidade de chalconas em células U937 foi encontrado na literatura consultada. Nesse artigo, 1×10^4 células/ poço foram incubadas por 44 h na presença de uma chalcona prenilada isolada de *Sophora flavescens*. (LEE et al., 2007). No entanto, apesar de o composto apresentar potente citotoxicidade de forma concentração dependente,

sua IC_{50} não foi calculada. Até o presente momento, não há trabalhos científicos relatando a atividade antitumoral de chalconas e seus derivados frente às linhagens celulares NB4 ou Kasumi.

A diferença encontrada entre os valores de CI_{50} para as diferentes linhagens celulares pode ser explicada pelas particularidades de cada subtipo de leucemia aguda. Por exemplo, os valores mais elevados foram observados na célula K562, conhecida por ser uma LMA secundária a uma LMC. Esse tipo de leucemia tende a ser mais agressivo e menos responsivo ao tratamento do que os demais subtipos de LA (LARSON, 2007; SEKERES et al., 2009). A fim de comparação, o tratamento de pacientes com LMC em fase crônica com Imatinib atinge resposta citogenética completa em 70-90% dos casos, com sobrevida de 5 anos entre 80-95 % (WHO, 2008). Já o tratamento de pacientes com LMC em crise blástica com o mesmo fármaco, atinge resposta citogenética completa em apenas 15 % dos casos, com sobrevida de 1 ano entre 25–30% (HEHLMANN; SAUSSELE, 2008).

Entretanto, a linhagem Kasumi, de LMA com t(8:21) (q21;q22), a qual apresenta bom prognóstico e responde bem ao tratamento quimioterápico (SWERDLOW et al., 2008), apresentou valores de CI_{50} menores quando comparados à linhagem K562. Os valores mais baixos de CI_{50} encontrados no presente estudo foram para a linhagem NB4, a qual é uma linhagem de LPA. As LPAs são LAs de melhor prognóstico devido às características intrínsecas do tipo celular envolvido, os promielócitos, os quais são células mais diferenciadas do que os blastos, e, dessa forma, apresentam melhor resposta ao tratamento. Além disso, a terapia atual para este tipo de LA com o ácido holo-transretinóico (ATRA) envolve a diferenciação dos promielócitos leucêmicos em células maduras normais (SWERDLOW et al., 2008). Estudos futuros com essa linhagem celular são necessários para investigar se a chalcona **A1**, além de levar as células NB4 à morte celular por apoptose, seria capaz de estimular a diferenciação dos promielócitos em células maduras.

A fim de verificar se o composto **A1** é seletivo para tumores hematológicos ou se também apresenta atividade citotóxica contra tumores sólidos, o seu efeito também foi avaliado sobre células de adenocarcinoma de cólon humano HT-29. De acordo com a Figura 4, embora a chalcona **A1** tenha diminuído a viabilidade celular das células HT-29 de forma dependente do tempo e da concentração, os resultados demonstram que o seu efeito para essas células é menor do que para as células de LA. A chalcona **A1** diminuiu a viabilidade celular de forma significativa nas concentrações de 25 e 50 μM e com CI_{50} de $50,42 \pm 1,70 \mu\text{M}$, $23,10 \pm 1,36 \mu\text{M}$ e $16,31 \pm 1,12 \mu\text{M}$ para 24, 48 e 72 h respectivamente. No estudo de Vasconcelos e colaboradores (2012), quatro chalconas derivadas da 3-fenil-1-(tiofen-2-il)-

prop-2-en-1-ona foram testadas em células HT-29 (2×10^4 células/ poço) e apresentaram valores de CI_{50} entre 13,40 μM e 29,60 μM para 24 h, 11,50 μM e 29,10 μM para 48 h e 12,50 μM e 21,60 μM para 72 h de incubação. Já Kamal e colaboradores (2012), utilizando 1×10^4 células/poço incubadas por 48 h com 28 derivados de 4 β -alquilamidochalconas, obteve CI_{50} entre 0,37 μM e 21,60 μM . Considerando que os valores encontrados no presente trabalho após 48 e 72 h de incubação encontram-se dentro das faixas citadas e que a diferença nos valores de 24 h poderia ser explicada pelo maior número de células plaqueadas (5×10^4 células poço no presente estudo), não é possível desconsiderar o efeito citotóxico da chalcona **A1** nessa linhagem celular. Pesquisas envolvendo chalconas metoxiladas em outras linhagens de tumores sólidos obtiveram CI_{50} entre $< 1 \mu\text{M}$ e $> 100 \mu\text{M}$ (ECHEVERRIA et al., 2009; SINGH et al., 2011). Assim, sugere-se que novos estudos sejam realizados em outras linhagens de tumores sólidos a fim de confirmar o efeito citotóxico da chalcona **A1** em diferentes tipos de neoplasias humanas além das hematológicas.

Além de células neoplásicas, a atividade citotóxica da chalcona **A1** também foi avaliada em células normais. Apesar de diversos estudos utilizarem a avaliação da citotoxicidade em células mononucleadas de indivíduos saudáveis como uma metodologia válida para analisar a especificidade de novos compostos para células tumorais, acredita-se que o mais adequado seria analisar o efeito dos mesmos em células que mimetizem o ambiente medular. Por esta razão, o efeito da chalcona **A1** também foi avaliado sobre células de linhagem de fibroblastos humanos normais de MO (JMA). A Figura 5 demonstra que a chalcona **A1** não foi significativamente citotóxica para as células JMA em 24 e 48 h de incubação, com $CI_{50} > 100 \mu\text{M}$ em ambos os tempos. Estes resultados estão de acordo com os encontrados sobre células mononucleadas (Figura 6). Além disso, sugerem uma possível seletividade do composto **A1** para as células tumorais, a qual é importante na diminuição dos efeitos adversos relacionados à aplasia medular causada pela citotoxicidade inespecífica dos quimioterápicos utilizados no tratamento de LAs. A maioria dos quimioterápicos disponíveis atualmente, ao destruírem células tumorais, também causam lesões às células saudáveis vizinhas. Esse mecanismo é responsável pela maioria dos processos inflamatórios e autoimunes envolvidos nos tratamentos antileucêmicos, como, por exemplo, supressão da MO, toxicidades gastrointestinais e perda de cabelo. Assim, uma maior seletividade do composto implica diretamente na diminuição da morbidade e mortalidade sofrida pelos pacientes portadores de LAs (MILLIGAN et al., 2005; CHAGAS et al., 2010).

A citotoxicidade provocada pela chalcona **A1** sobre células mononucleadas de indivíduos saudáveis foi comparada com a do quimioterápico Taxol. Enquanto a viabilidade

celular observada após 24 h de tratamento com a chalcona **A1** (50 μM) foi de $94,29 \pm 3,13 \%$, as células tratadas com Taxol (10 μM), nas mesmas condições, apresentaram viabilidade de $41,54 \pm 3,96 \%$, significativamente menor em relação ao grupo controle. O veículo DMSO, na mesma concentração utilizada para a chalcona, apresentou viabilidade de $99,89 \pm 7,25\%$, o que confirma os resultados encontrados na Figura 1 que mostram que o mesmo não é responsável pela morte celular observada no tratamento com as chalconas.

A capacidade da chalcona **A1** de reduzir a viabilidade celular em linhagens tumorais sem apresentar citotoxicidade significativa em células saudáveis é, indiscutivelmente, um ponto positivo e permite sugerir que o composto poderia ser utilizado como protótipo para a síntese de novos fármacos. Para isso, novas alterações estruturais eletrônicas e/ou estéricas poderiam ser propostas com o objetivo de se obter menores valores de CI_{50} . Uma das modificações que poderia ser realizada no composto **A1** é a substituição do anel naftil pelo anel antraceno, o que aumentaria ainda mais a lipofilicidade da molécula. Moléculas mais lipofílicas, em geral, são mais ativas em comparação às mais hidrofílicas devido à constituição lipoproteica das membranas biológicas. Assim, substâncias lipossolúveis apresentam uma maior capacidade de transpor as membranas celulares pelo processo de difusão passiva, tornando-se mais ativas em menor quantidade. Outra alternativa seria a ampliação da ponte de três carbonos entre os anéis aromáticos, incluindo também a troca de alguns átomos de carbono por heteroátomos (PEREIRA-MAIA et al., 2010).

As respostas celulares para os danos ao DNA aos quais as células estão constantemente sujeitas envolvem diferentes mecanismos de reparo relacionados à interrupção da progressão do ciclo celular ou à indução da morte celular programada (RING et al., 2012). Apesar de não estar claro na literatura como o bloqueio do ciclo celular ou a indução à apoptose se relacionam ao processo de reparo ao DNA, estes dois fatores são altamente desejados na investigação de novos compostos (KASTAN e BARTEK, 2004; ABBAS, DUTTA, 2009). Diante dessa perspectiva, como a chalcona **A1** apresentou citotoxicidade para as seis linhagens de LA avaliadas e para a linhagem de tumor sólido HT-29, e não é citotóxica para células normais, o composto pode ser considerado uma molécula bioativa promissora e, por este motivo, deu-se continuidade aos estudos de investigação.

Conforme mencionado anteriormente, a célula possui mecanismos de checagem pelos quais a célula ativamente interrompe a progressão do ciclo celular diante de danos ao DNA e outros estresses (KASTAN e BARTEK, 2004). De acordo com a literatura, chalconas sintéticas bloqueiam o ciclo celular de células leucêmicas em diferentes fases do ciclo celular. Em geral, as chalconas interferem na dinâmica dos microtúbulos, impedindo a formação do

fuso mitótico na fase G2/M devido à sua capacidade de se ligar à tubulina. Essa atividade antimitótica das chalconas está altamente relacionada a substituintes metóxi (BOUMENDJEL et al., 2010; GO, WU e LIU, 2005; SHEN et al., 2007). No presente trabalho avaliou-se o efeito da chalcona **A1** no ciclo celular das linhagens K562, Jurkat, U937, NB4, Kasumi e CEM, após 12 h de incubação. Optou-se por utilizar o tempo de incubação de 12 h, apesar de a ciclagem das células avaliadas ser em torno de 24 h, porque a exposição prolongada ao composto (24 h) aumentou a proporção de células na fase sub G0/G1 (células mortas) em mais de 50 % (chegando a mais de 80 % em algumas linhagens). Este fato reduziu o número de células dentro do ciclo celular e inviabilizou a análise. Assim, de acordo com a Tabela 4, a chalcona **A1** aumentou de forma significativa a proporção de células na fase sub G0/G1, o que mostra um aumento significativo de morte celular. Além disso, o composto causou bloqueio do ciclo celular em todas as seis linhagens avaliadas, refletido pelo aumento significativo da porcentagem de células na fase bloqueada. Semelhante aos resultados encontrados na literatura para as chalconas metoxiladas, o composto **A1** causou bloqueio na fase G2/M nas células K562, Kasumi e NB4, o que sugere uma ação antibiótica nos microtúbulos (RAO, FANG e TZENG, 2005; DUCKI et al., 2009).

Diferentemente dos resultados descritos na literatura que relatam que chalconas causam bloqueio na fase G2/M (ROZMER, BERKI e PERJÉSI, 2006; PILATOVA et al., 2010), a chalcona **A1** causou bloqueio na fase S das células Jurkat. Os mecanismos envolvendo o bloqueio celular na fase S não são conclusivos até o presente momento, mas estudos indicam que ocorre devido à supressão das fases de iniciação e alongação da replicação do DNA, o que impede a replicação do material nuclear (VERMEULEN, BOCKSTAELE e BERNEMAN, 2003). Outro estudo indica que diversos fármacos antineoplásicos bloqueiam a fase S pela modulação da expressão da ciclina A e da atividade da CDK2 (SIDDIQUI et al., 2003). A hidroxiureia e a afidicolina são dois exemplos de fármacos com diferentes mecanismos de ação que atuam na fase S impedindo a replicação do DNA pela inibição da migração da forquilha de replicação (BOREL, LACROIX e MARGOLIS, 2002). Conforme apresentado anteriormente, a indução de dano ao DNA tem se tornado uma importante estratégia terapêutica no combate às LAs, pois bloqueia a divisão celular da população de blastos leucêmicos que estão em rápida divisão durante a fase S. Essa ativação do ponto de checagem pode ocorrer tanto pelo bloqueio do desenovelamento das cadeias de DNA quanto pela incorporação de nucleosídeos análogos durante a replicação (SCHNERCH et al., 2012). Assim, o bloqueio da fase S do ciclo celular parece ser um evento desejado para potenciais novos fármacos antileucêmicos.

As células U937 e CEM apresentaram bloqueio na fase G0/G1. Este resultado foi semelhante aos de Rao, Fang e Tzeng (2004) com chalconas sintéticas em células U937, que mostrou um aumento da proporção celular na fase G0/G1 e diminuição na fase S. No entanto, os mecanismos envolvidos no bloqueio nessa fase do ciclo celular não estão claros. Uma limitação, do presente trabalho, foi a ausência da investigação das ciclinas envolvidas nas diferentes fases do ciclo celular. Esse estudo permitiria uma melhor compreensão dos mecanismos moleculares envolvidos nos diferentes bloqueios, ficando como sugestão para estudos posteriores.

A proliferação celular descontrolada é considerada um dos principais mecanismos biológicos envolvidos na oncogênese. Atualmente, a proliferação descontrolada de células tumorais tem sido avaliada pela expressão da proteína nuclear KI-67 utilizando anticorpos monoclonais específicos por imunocitoquímica. A proteína KI-67 é expressa em células que estejam em constante ciclagem, sejam elas células saudáveis ou células tumorais, em todas as fases do ciclo celular (G1, S, G2 e M). Por outro lado, células senescentes na fase G0 não expressam essa proteína (FOLTYN et al., 2012). A proteína KI-67 foi identificada em células tumorais malignas e benignas em constante replicação, sendo mais ativamente expressa em lesões mais agressivas e em metástases. As células começam a expressar a proteína no final da fase G1 e início da fase S, com valores aumentados durante a fase G2 e pico de expressão durante a mitose. Assim, de acordo com a literatura, a expressão de KI-67 é um marcador importante de proliferação celular e, por isso, a porcentagem de células marcadas positivamente para a proteína tem sido utilizada como fator diagnóstico e prognóstico em diversos tipos de neoplasias (LO et al., 2011).

Nessa perspectiva, considerando-se a importância da proteína KI-67 na proliferação celular, foi avaliado o efeito da chalcona **A1** sobre a expressão dessa proteína nas células K562, Jurkat e Kasumi. De acordo com a Figura 12, mesmo apresentando um menor número de células devido à morte celular causada pela chalcona **A1**, as células tratadas com o composto por 12 h apresentaram uma diminuição clara da expressão da proteína nuclear KI-67. Até o presente momento, não foram encontrados estudos relacionando o efeito de chalconas na expressão dessa proteína. No entanto, diversos trabalhos recentes na literatura relacionam a superexpressão desse marcador à presença de neoplasias malignas incluindo linfomas e leucemias, e relatam a diminuição da sua expressão como um efeito desejado por fármacos utilizados no tratamento desses tumores (MONTI et al., 2012; SAUNDERS et al., 2012; CANIS et al., 2012; ETHUN et al., 2012). Assim, por ser uma proteína relacionada ao ciclo celular e implicada na progressão tumoral, a diminuição da expressão da proteína KI-67

pela chalcona **A1** sugere que um dos mecanismos de ação do composto inclua a diminuição da proliferação celular pela diminuição da sua expressão.

Conforme citado anteriormente, o bloqueio do ciclo celular tem a finalidade de reparar o DNA frente a situações de estresse, impedindo a progressão de mutações que possam gerar um processo neoplásico. Se o reparo não ocorre de forma apropriada, diversas proteínas induzem a célula à morte programada, principalmente a apoptose ou a necrose (RING et al., 2012). A forma pela qual a célula vai morrer é determinada pela ativação de vias específicas, como a via das caspases, e também pela quantidade de ATP disponível no momento da morte (POKORNÝ et al., 2012). A busca por compostos antineoplásicos que causem morte celular por apoptose é altamente desejada, pois este tipo de morte programada não gera a reação inflamatória observada na necrose, a qual normalmente é associada à potencialização dos efeitos adversos. Assim, o presente trabalho buscou investigar se a chalcona **A1** causou morte celular por apoptose nas linhagens K562, Jurkat, U937, Kasumi, NB4 e CEM.

A primeira metodologia utilizada para avaliar a apoptose, foi a observação da morfologia celular pela dupla coloração com BE/LA. Este método é utilizado em diversos trabalhos na literatura (BASKIC et al., 2006; HUANG et al., 2011; WANG et al., 2011; MILITÃO et al., 2012) e permite diferenciar células viáveis, células em apoptose inicial, células em apoptose tardia e células em necrose. De acordo com a Figura 8, as células viáveis do grupo controle apresentam fluorescência verde e morfologia normal. Após o tratamento com a chalcona **A1**, as células passaram a apresentar características típicas de apoptose como depósitos de grânulos no citoplasma, condensação da cromatina, perda de integridade da membrana plasmática e formação de corpos apoptóticos. As células apoptóticas no seu estágio inicial apresentam condensação nuclear com condensação perinuclear da cromatina, visível na forma de arcos verdes no núcleo, ainda apresentando fluorescência verde. Células em apoptose tardia podem apresentar fragmentação nuclear, coloração alaranjada devido à formação de poros na membrana plasmática, os quais permitem a entrada do brometo de etídio e sua intercalação ao DNA, e formação de corpos apoptóticos. Após o tratamento com o composto, a maioria das células apresentaram características morfológicas tanto de apoptose tardia quanto de apoptose inicial.

A morte por apoptose causada pela chalcona **A1** também foi avaliada pela externalização da proteína fosfatidilserina, detectada pela Anexina V conjugada a FITC. Essa proteína normalmente está localizada na parte interna da membrana plasmática, e é externalizada ao primeiro sinal de apoptose, transferindo-se para a superfície da célula, promovendo a perda da assimetria da membrana e identificando a célula para ser fagocitada.

Por isso, a marcação com Anexina V é considerada um marcador inicial de apoptose. De acordo com a Figura 9 e a Tabela 5, a chalcona **A1** aumentou de forma significativa a porcentagem de células positivas para Anexina V nas seis linhagens avaliadas, o que indica que esse composto causa morte celular por apoptose.

Como visto anteriormente, o resultado final da indução da apoptose é a quebra do DNA da célula, o qual pode ser avaliado pela fragmentação nuclear e pela formação do núcleo picnótico (NAGATA, 2000). Assim, o efeito da chalcona **A1** sobre as fitas de DNA das linhagens K562, Jurkat e Kasumi foi avaliado pelo método de fragmentação do DNA. Como pode se observado na Figura 10, a chalcona **A1** provocou o “padrão em escada” característico de apoptose nas três linhagens de células avaliadas. Diversos estudos relatam a capacidade de indução da apoptose de chalconas em células de LA, incluindo K562, Jurkat e U937, as quais também foram utilizadas no presente trabalho (HARIKUMAR et al., 2009; YANG et al., 2009; WINTER et al., 2010; PEDRINI et al., 2010; AKIHISA et al., 2011).

Recentemente, outros tipos de morte, como a autofagia, vêm sendo estudados na literatura (WATSON; MORTENSEN; SIMON, 2011). A investigação da capacidade da chalcona **A1** de induzir morte celular por autofagia foi avaliada por microscopia de fluorescência, porém não foram observadas alterações morfológicas condizentes com esse tipo de morte celular nas linhagens estudadas.

A apoptose pode ser iniciada por duas vias principais que levam a ativação da cascata de caspases: a via extrínseca ou via dos receptores de morte e a via intrínseca, ou mitocondrial (NDOZANGUE-TOURIGUINE, et al., 2008; HEDRICK, CH’EM e ALVES, 2010). A via intrínseca, regulada por membros da família Bcl-2, inicia-se na mitocôndria a partir de estímulos de morte que ocasionam a perda do potencial transmembrana. A perda do potencial provoca alterações na permeabilidade da membrana mitocondrial e, conseqüentemente, leva a liberação de proteínas pró-apoptóticas. (LO et al.; 2011; ALLAN; CLARKE, 2011). Com o objetivo de investigar se a apoptose causada pela chalcona **A1** envolvia a via intrínseca, avaliou-se o efeito do composto sobre o potencial mitocondrial e sobre a expressão das proteínas Bcl-2, Bax.

De acordo com a Figura 11, a chalcona **A1** reduziu o potencial mitocondrial transmembrana das células K562, Jurkat e Kasumi de forma significativa. Mais de 60% das células tiveram seu potencial reduzido nas três linhagens celulares. Na Figura 14, pode-se observar que houve redução significativa na expressão da proteína antiapoptótica Bcl-2 nas linhagens K562 e Jurkat após 12 h de tratamento com a chalcona **A1**. Além disso, também foi observado um aumento significativo da expressão da proteína pró-apoptótica Bax nas duas

linhagens no mesmo tempo de incubação (Figura 14). Estes resultados demonstram uma inversão na proporção de fatores pró-apoptóticos e antiapoptóticos, o que, segundo a literatura, pode ser o responsável pela indução da célula a apoptose (YE et al., 2005; VIVEK et al., 2011). Além disso, o aumento da expressão de membros pró-apoptóticos da família Bcl-2 ou a diminuição da expressão de membros antiapoptóticos está associado à diminuição do potencial oncogênico e a maiores taxas de resposta à quimioterapia (SHEN et al., 2007). Assim, a inversão da proporção Bcl-2/Bax somado à redução do potencial transmembrana indicam que a morte celular provocada pela chalcona **A1** nas células de LA envolvem a via intrínseca da apoptose. A literatura relata estudos que mostram o envolvimento da via mitocondrial no tratamento de células leucêmicas com chalconas sintéticas corroborando os resultados encontrados no presente trabalho. Enquanto a maioria dos estudos relatam a regulação tanto da proteína Bcl-2 quanto da Bax e inversão da proporção Bcl-2/Bax (YE et al., 2005; FURUSAWA et al., 2009; PEDRINI et al., 2010), outros relatam apenas o aumento da expressão de Bax (PARK et al., 2009; JING et al., 2010) ou a diminuição da expressão de Bcl-2 (ZHU et al., 2005).

A outra via envolvida na apoptose é a via extrínseca, desencadeada pela ativação de receptores pró-apoptóticos encontrados na superfície celular, como DR4, DR5 e FasR. A ativação dessa via leva à agregação dos receptores e a iniciação do recrutamento e da ativação da caspase iniciadora caspase-8 (RÖDER; TRAUZOLD; KALTHOFF, 2011; LEE et al., 2012). A literatura relata que os efeitos apoptóticos de alguns agentes quimioterápicos estão relacionados à regulação positiva da expressão de FasR, (HSU; KUO; LIN, 2005). Assim, com o intuito de investigar o efeito da chalconas **A1** nessa via de apoptose, a expressão do receptor FasR foi avaliada nas células K562 e Jurkat após 12 h de incubação com o composto. De acordo com a Figura 15, houve um aumento significativo na expressão de FasR na linhagem Jurkat, porém não houve diferença significativa na linhagem K562. Essa diferença pode explicar o menor valor de IC₅₀ encontrado para as células Jurkat quando comparado às células K562: na linhagem de LLA (Jurkat) houve o envolvimento das duas vias apoptóticas, enquanto que na linhagem de LMA, houve o envolvimento apenas da via intrínseca.

Como visto anteriormente, a via intrínseca e a via extrínseca convergem para a ativação das caspases efetoras, caspases-3, -6 e -7, as quais, por sua vez, ativam desoxirribonucleases ativadas por caspases que levam a célula à apoptose (ECHEVERRIA et al., 2009). A literatura relata que a caspase-3, em particular, é essencial para a propagação do sinal apoptótico após a exposição da célula a fármacos antineoplásicos (ROMAGNOLI et al., 2009). Assim, foi avaliado se a ativação das vias apoptóticas provocada pela chalcona **A1**

levou ao aumento de expressão da caspase-3 ativa. Os resultados indicados na Figura 17 mostram que a chalcona **A1** aumentou a expressão da caspase-3 ativa nas células K562 e Jurkat de forma significativa. O aumento foi ligeiramente superior nas células Jurkat, corroborando a hipótese de que o composto é mais citotóxico para esta linhagem devido à ativação de membros da via intrínseca e da via extrínseca. Foi encontrado na literatura apenas um trabalho recente em células K562 (ROMAGNOLI et al., 2009) e um trabalho em células Jurkat envolvendo a ativação da caspase-3 (TABATA et al., 2005) após o tratamento com chalconas sintéticas.

Outras proteínas também estão envolvidas na cascata de apoptose, dentre elas o AIF. Este fator é liberado após a despolarização da membrana mitocondrial e está envolvido na ativação da caspase-3. Os resultados apresentados na Figura 16 demonstram que a chalcona **A1** não alterou de forma significativa a expressão de AIF nas linhagens K562 e Jurkat, o que sugere que a ativação da caspase efetora envolva a liberação de outras proteínas da via intrínseca, como, por exemplo, o citocromo *c* (FRANKLIN, 2011). A apoptose também pode estar relacionada à diminuição da expressão de proteínas que inibam a cascata das caspases, como, por exemplo, as IAPs. O principal membro dessa família é a survivina, cuja expressão costuma estar aumentada em células tumorais. De acordo com a literatura, a diminuição da expressão dessa proteína está relacionada à indução da célula tumoral à apoptose e à uma melhor resposta ao tratamento (HARIKUMAR et al., 2009). Como pode ser observado na Figura 13, a chalcona **A1** diminuiu a expressão da proteína survivina nas células K562, Jurkat e Kasumi, o que indica que essa proteína também está envolvida no mecanismo de resistência celular dessas linhagens.

Considerando-se os resultados promissores da citotoxicidade *in vitro* da chalcona **A1** sobre as linhagens de LA, em uma segunda etapa, avaliou-se o seu efeito *ex vivo* em células mononucleadas de SP e MO de pacientes portadores de LA atendidos no HU/UFSC.

De acordo com a Tabela 6, o Paciente 1 e o Paciente 2 foram diagnosticados com LLA-B comum. A LLA-B é uma neoplasia de células precursoras comprometidas com a linhagem de células B. Aproximadamente 64 % dos casos dessa leucemia ocorrem antes dos 18 anos de idade, sendo que nessa faixa etária mais de 95 % dos pacientes atingem remissão completa após a quimioterapia. Em adultos, o prognóstico é menos favorável, com taxa de remissão completa entre 60-85 % (SWERDLOW et al., 2008). As CI_{50} encontradas para os dois pacientes (Tabela 7: Paciente 1 - $26,18 \pm 1,42 \mu\text{M}$ e Paciente 2 - $21,38 \pm 1,33 \mu\text{M}$) foram semelhantes entre si. O maior valor encontrado para o Paciente 1 pode ser explicado pela presença de piores critérios de prognóstico, como, por exemplo, a elevada leucometria

(142,340 leucócitos/mm³), a qual significa maior massa tumoral e, possivelmente, maior agressividade do tumor. Apesar de nenhuma linhagem de LLA-B ter sido incluída no presente estudo, a chalcona **A1** reduziu a viabilidade celular das células mononucleadas dos dois pacientes de forma dependente da concentração, o que permite sugerir que o composto também seja efetivo contra esse tipo de leucemia.

O Paciente 3 e o Paciente 6 foram diagnosticados com LPA com t(15;17)(q22;q21). Esta leucemia é uma LMA com predomínio de promielócitos anormais, corresponde a 5-8 % dos casos de LA nos EUA e 15 % no Brasil e é mais comum em indivíduos de meia idade. Na maioria dos pacientes portadores de LPA é observada a presença a translocação entre os cromossomos 15 e 17, t(15;17)(q22;q11-21), provocada pela quebra do gene PML no cromossomo 15 e a interrupção do gene da cadeia do receptor de ácido retinóico (RAR α) no cromossomo 17 (ANTUÑA et al; 2000; KOOGAN et al; 2001). Como resultado da translocação, ocorre a síntese da proteína híbrida PML-RAR α , a qual apresenta um papel importante na patogênese da LPA. Esta proteína anômala interfere no processo normal de apoptose, resultando em um aumento da sobrevivência da célula, de forma a promover o processo leucemogênico (KOOGAN et al; 2001). A LPA é considerada uma variedade de prognóstico favorável, com taxas de remissão completa chegando a 95%, devido à sua boa resposta ao tratamento quimioterápico com antraciclinas associado à administração de ATRA, o qual induz a diferenciação das células leucêmicas à granulócitos maduros (ANTUÑA et al; 2000; TALLMAN et al; 2002). No presente trabalho, foi avaliado o efeito da chalcona **A1** em células NB4 de LPA com t(15;17) (q22;q21) e obteve-se CI₅₀ de 3.58 \pm 0.31 μ M, tornando-se a linhagem mais sensível aos efeitos citotóxicos do composto. A CI₅₀ encontrada para as células mononucleadas do Paciente 3 (7,19 \pm 0,86 μ M) também foi a mais baixa entre os oito pacientes avaliados. Em relação ao Paciente 6 esse efeito não foi tão bem evidenciado, provavelmente devido as características individuais do portador, como a positividade para o marcador de células imaturas CD34. Em geral, as LPAs com expressão de CD34 são de prognóstico desfavorável e apresentam recidivas mais frequentes.

O Paciente 4 foi diagnosticado com leucemia mielomonocítica aguda, a qual é caracteriza tanto pela proliferação de precursores da linhagem neutrofílica quanto da linhagem monocítica. Essa leucemia corresponde a 5-10 % dos casos de LMA e, em geral, apresenta prognóstico desfavorável. Após o tratamento das células com a Chalcona **A1**, foi encontrada uma CI₅₀ de 42,27 \pm 2,04 μ M. Diversos fatores contribuem para o mau prognóstico desse paciente, como a idade elevada (76 anos), a alta leucometria (35,500 leucócitos/mm³) e a

positividade de CD34, o que poderia explicar porque o valor de CI_{50} foi o segundo mais alto entre os oito pacientes avaliados.

Em relação a amostra do Paciente 7, portador de LMA sem maturação, o efeito da chalcona **A1** sobre a viabilidade celular ($16,04 \pm 1,20$) foi muito semelhante à CI_{50} encontrada para a linhagem Kasumi ($17,62 \pm 0,70 \mu\text{M}$), a qual é uma linhagem de células de LMA com $t(8:21)(q22;q22)$, considerada de bom prognóstico. Apesar de o Paciente 7 não ser positivo para esta translocação, seu prognóstico foi considerado indeterminado, uma vez que também não houve positividade para marcadores de mal prognóstico como CD34 e CD56.

O Paciente 5, diagnosticado com LA de linhagem mista, apresentou a maior CI_{50} dentre os oito pacientes do estudo. Essa leucemia não apresenta evidência clara de diferenciação para uma única linhagem celular. O SP ou a MO desses pacientes podem conter duas ou mais populações de blastos, cada uma de uma linhagem diferente; ou uma única população de blastos expressando antígenos de diferentes linhagens; ou uma combinação de ambas (WHO, 2008). As LA de linhagem mista, em geral, apresentam pior prognóstico, o que justificaria a grande resistência das células do Paciente 5 à chalcona **A1**. O Paciente 8, apesar de também ter sido diagnosticado com LA de linhagem mista, apresentou uma CI_{50} baixa ($11,15 \pm 1,01 \mu\text{M}$). Essa diferença pode ser explicada pela presença de diversos fatores de bom prognóstico, como a baixa leucometria ($5,680$ leucócitos/ mm^3) e a negatividade para $t(9:22)(q34;q11)$ e para o gene FLT3, o que sugere uma doença mais branda.

No conjunto, embora a amostragem tenha sido pequena, os resultados *ex vivo* confirmam aqueles observados para as diversas células de linhagem de LA e sugerem o uso da chalcona **A1** como um potencial novo fármaco com atividade antileucêmica.

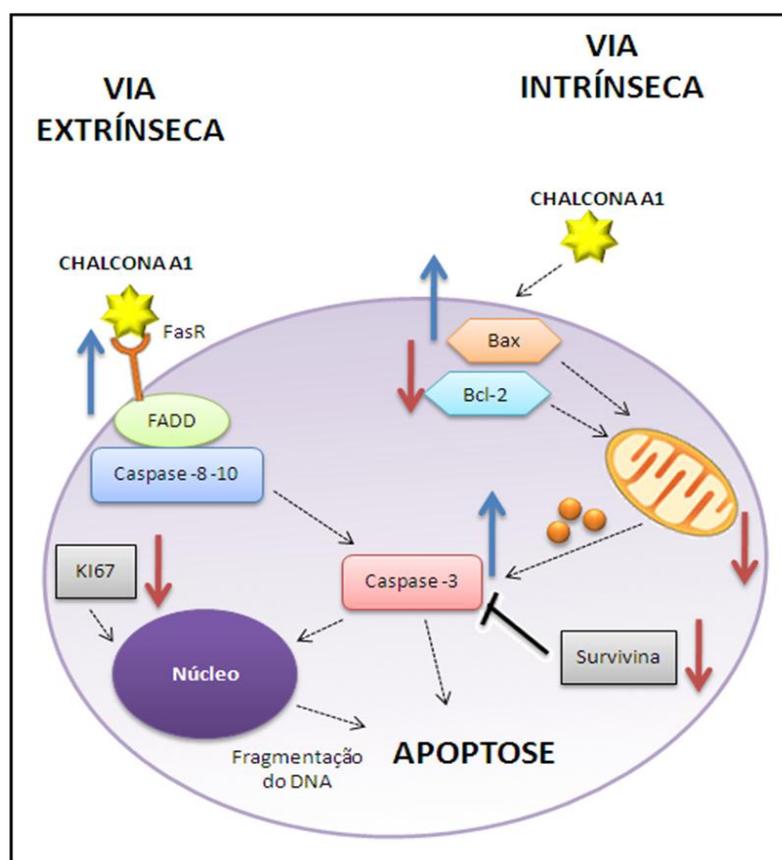
7. CONCLUSÕES

Os resultados do presente estudo permitem concluir que:

- As chalconas sintéticas (2*E*)-1-(3,4,5-trimetoxi-fenil)-3-(1-naftil)-2-propen-1-ona (**A23**) e (2*E*)-1-(2,5-dimetoxi-fenil)-3-(1-naftil)-2-propen-1-ona (**A1**), derivadas do 1-naftaldeído, e (2*E*)-1-(3,4,5-trimetoxi-fenil)-3-(2-naftil)-2-propen-1-ona (**C24**), derivada do 2-naftaldeído, apresentaram efeito citotóxico significativo sobre as células de LMA K562 e sobre as células de LLA Jurkat após 24 h de tratamento. Dentre os compostos avaliados, a chalcona **A1** apresentou maior redução da viabilidade celular (menor CI₅₀).
- A chalcona **A1** causou redução da viabilidade celular das células K562, Jurkat, U937, NB4, Kasumi e CEM de forma dependente da concentração e do tempo de incubação.
- A chalcona **A1** reduziu a viabilidade celular das células de adenocarcinoma de cólon HT-29 de forma dependente da concentração e do tempo de incubação, mostrando que o composto não apresenta citotoxicidade exclusiva para tumores hematológicos.
- A chalcona **A1** não causou efeito citotóxico significativo em células de fibroblastos humanos normais de MO (JMA) e em células mononucleadas de indivíduos saudáveis voluntários no HU/UFSC.
- A chalcona **A1** provocou bloqueio do ciclo celular na fase G0/G1 nas células U937 e CEM, na fase S nas células Jurkat e na fase G2/M2 nas células K562, Kasumi e NB4, além de aumentar a proporção de células na fase sub G0/G1.
- A chalcona **A1** diminuiu a expressão da proteína de proliferação celular KI-67 nas células K562, Jurkat e Kasumi.
- A chalcona **A1** provocou morte celular por apoptose nas células K562, Jurkat, U937, NB4, Kasumi e CEM.
- A apoptose induzida pela chalcona **A1** envolve a diminuição do potencial de membrana mitocondrial nas células K562, Jurkat, U937, NB4, Kasumi e CEM, o que sugere o envolvimento da via intrínseca.
- O envolvimento da via intrínseca foi evidenciado nas células K562 e Jurkat pela diminuição da expressão da proteína antiapoptótica Bcl-2 e pelo aumento da expressão da proteína pró-apoptótica Bax.
- A apoptose induzida pela chalcona **A1** em células Jurkat também envolve a via extrínseca, evidenciada pelo aumento da expressão de FasR.
- A apoptose induzida pela chalcona **A1** envolve ainda o aumento da expressão da caspase-3 ativa e diminuição da proteína antiapoptótica survivina.

- Assim como ocorreu com as linhagem de LA K562, Jurkat, U937, NB4 e CEM, a chalcona **A1** foi citotóxica para células mononucleadas de pacientes portadores de LA, apresentando diminuição da viabilidade celular a partir de 10 μM inclusive em subtipos que não haviam sido avaliados *in vitro*.

A compilação de evidências obtidas no presente estudo nos permite sugerir um dos prováveis múltiplos mecanismos de citotoxicidade da chalcona **A1** em células leucêmicas. Como pode ser observado no esquema a seguir (Esquema 14), os resultados demonstram que o composto aumenta a expressão da proteína pró-apoptótica Bax, diminui a expressão da proteína antiapoptótica Bcl-2 e diminui o potencial mitocondrial nas linhagens de LMA (K562) e de LLA (Jurkat), indicando que houve envolvimento da via intrínseca. Além disso, a chalcona **A1** aumentou a expressão de FasR nas células Jurkat, mostrando que, nesta linhagem, também houve ativação da via intrínseca. Foi observado, ainda, aumento da expressão da caspase efetora caspase-3, diminuição da IAP survivina e diminuição do marcador de proliferação celular KI-67, resultados que confirmam a morte celular por apoptose.



Esquema 14: Esquema ilustrativo do mecanismo de ação da chalcona A1 em células Jurkat.

8. PERSPECTIVAS

As perspectivas do presente trabalho são:

- Avaliar o efeito da chalcona **A1** nas espécies reativas de oxigênio.
- Investigar a capacidade da chalcona **A1** de provocar diferenciação das células NB4 para as linhagens monocítica e/ou granulocítica.
- Investigar o efeito da chalcona **A1** na expressão do genótipo e do fenótipo das proteínas de resistência a múltiplos fármacos ABCB1, ABCC1 e LRP nas células de linhagem de LMA (K562) e de LLA (Jurkat).
- Avaliar o efeito da chalcona **A1** na atividade das proteínas de resistência a múltiplos fármacos ABCB1, ABCC1 e LRP nas células K562 e Jurkat.
- Comparar os resultados encontrados *in vitro* nas células K562 e Jurkat para as proteínas ABCB1, ABCC1 e LRP com resultados obtidos em SP e MO de pacientes portadores de LA.
- Testar o efeito da chalcona **A1** em modelo *in vivo*.
- Avaliar a citotoxicidade do composto **A23** em células K562 e Jurkat.

REFERÊNCIAS

ABBAS, T.; DUTTA, A. p21 in cancer: intricate networks and multiple activities. **Nature Reviews Cancer**. v. 9, n. 6, p. 400-414, 2009.

ABDEL-WAHAB, O.; LEVINE, R.L. Recent advances in the treatment of acute myeloid leukemia. **Medical Reports**, v. 2, n. 55, p. 1-5, 2010.

ADAMS, J.M.; CORY, S. The Bcl-2-regulated apoptosis switch: mechanism and therapeutic potential. **Current Opinion in Immunology**. v. 19, n. 5, p. 488-496, 2007.

AKIHISA, T.; MOTOI, T.; SEKI, A.; KIKUCHI, T.; FUKATSU, M.; TOKUDA, H.; SUZUKI, N.; KIMURA, Y. Cytotoxic activities and anti-tumor-promoting effects of microbial transformation products of prenylated chalcones from *Angelica keiskei*. **Chemistry & Biodiversity**, v. 9, n. 2, p. 318-330, 2012.

ALLAN, L.A.; CLARKE, P.R. Apoptosis and autophagy: Regulation of *caspase-9* by phosphorylation. **The FEBS Journal**, n. 276, p. 6063-73, 2009.

ALMEIDA, V. L.; LEITÃO, A.; REINA, L. C. B.; MONTANARI, C. A.; DONNIC, C. L. Câncer e agentes antineoplásicos ciclo-celular específicos e ciclo-celular não específicos que interagem com o DNA: uma introdução. **Química Nova**, v. 28, n. 1, p. 118-129, 2005.

ALTMAN, J. K.; SASSANO, A.; PLATANIAS, L. Targeting mTOR for the treatment of AML agents and new directions. **Oncotarget**. v. 12 n. 6., p. 510-517, 2011.

ANTOIGNONI, F.; ZHENG, S.; PAGNUCCO, C.; BARALDI, R.; POLI, F.; BIONDI, S. Induction of flavonoid production by UV-B radiation in *Passiflora quadrangularis* callus cultures. **Fitoterapia**, v. 78, n. 5, p. 345-352, 2007.

ANTUÑA, M. G.; GUTIÉRREZ, N. C.; FERNÁNDEZ, A. M.; MARTÍNEZ, E. E.; BALEA, E. D.; OTERO, A. G.; URÍA, J. C.; RAMOS, O. F.; RAMÍREZ, P. H. Diagnóstico molecular de la leucemia aguda promielocítica: Resultados preliminares. **Revista Cubana de Hematología, Inmunología e Hemoterapia**, v.16, n. 2, p.125-131, 2000.

ARYAPOUR, H.; RIAZI, G. H.; AHMADIAN, S.; FOROUMADI, A.; MAHDAVI, M.; EMAMI, S. Induction of apoptosis through tubulin inhibition in human cancer cells by new chromene-based chalcones. **Pharmaceutical Biology**, 2012.[Epub ahead of print]

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.; KHOBRADE, C. N. Synthesis and biological evaluation of simple methoxylated chalcones as anticancer, anti-inflammatory and antioxidant agents. **Bioorganic Medical Chemistry**, v. 18, n. 3, p. 1364-1370, 2010.

BARNHART, B. C.; LEGEMBRE, P.; PIETRAS, E.; BUBICI, C.; FRANZOSO, G.; PETER, M. E. CD95 ligand induces motility and invasiveness of apoptosis resistant tumor cells. **The EMBO Journal**, v. 23, n. 15, p. 3175-3185, 2004.

BASKIC, D.; POPOVIC, S.; RISTIC, P.; ARSENIJEVIC, N. N. Analysis of cycloheximide-induced apoptosis in human leukocytes: Fluorescence microscopy using annexin V/propidium

iodide versus acridin orange/ethidium bromide. **Cell Biology International**, v. 30, n. 11, p. 924-932, 2006.

BASSAN, R.; GATTA, G.; TONDINI, C.; WILLEMZE, R. Adult acute lymphoblastic leukaemia. **Critical Reviews in Oncology/Hematology**, v.50, n.3, p.223- 261, 2004.

BATOVSKA, D.I.; TODOROVA, I. T. Trends in utilization of the pharmacological potential of chalcones. **Current Clinical Pharmacology**, v.5, n.1, p.1-29, 2010.

BERRIDGE, M. V.; HERST, P. M.; TAN, A. S. Metabolic flexibility and cell hierarchy in metastatic cancer. **Mitochondrion**, v. 10, n. 6, p. 584-588, 2010.

BJELAKOVIC, G.; NAGOMI, A.; BJELAKOVIC, M.; STAMENKOVIC, I.; ARSIC, R.; KATIC, V. Apoptosis: Programmed Cell Death and its Clinical Implications. **Medicine and Biology**, v. 12, n. 1, p. 6-11, 2005.

BOREL, F.; LACROIX, F. B.; MAROLIS, R. L. Prolonged arrest of mammalian cells at the G1/S boundary results in permanent S phase stasis. *Journal of Cell Science*. v. 115, p. 2829-2838, 2002.

BOUMENDJEL, A.; RONOT, X.; BOUTONNAT, J. Chalcones Derivatives Acting as Cell Cycle Blockers: Potential Anti-Cancer Drugs? **Current Drug Targets**, v. 10, p. 363-371, 2009.

BRASILEIRO FILHO, G. Bagliolo Patologia. Rio de Janeiro: Ed. Guanabara Koogan. 7ª Ed., 2006.

BRÖKER, L. E.; KRUYT, F. A. E.; GIACCONE, G. Cell Death Independent of Caspases: A Review. **Clinical Cancer Research**, v. 11, n. 9, p. 3155-3162, 2005.

BROWN, D. C.; GATTER, K. C. Ki67 protein: the immaculate deception?. **Histopathology**, v.40, n. 1, p. 2-11, 2002.

BUCHHEIT, C. L.; RAYAVARAPU, R. R.; SCHAFER, Z. T. The regulation of cancer cell death and metabolism by extracellular matrix attachment. **Seminars in Cell & Developmental Biology**, v. 24, n. 4, p. 402-411, 2012.

BUKHARI, S. N.; JANTAN, I.; JASAMAI, M. Anti-inflammatory trends of 1, 3-Diphenyl-2-propen-1-one derivatives. **Mini Reviews in Medicinal Chemistry**, 2012: In press.

BURKE, V.P.; STARTZEKK, J.M. The Leukemias, **Oral and Maxillofacial Surgery Clinics of North America**, v. 20, p. 597-608, 2008.

CANIS, M.; LECHNER, A.; MACK, B.; ZENGEL, P.; LAUBENDER, R. P.; KOEHLER, U.; HEISSMEYER, V.; GIRES, O. CD133 induces tumor-initiating properties in HEK293 cells. **Tumour Biology**, 2012 [Epub ahead of print]

CAVALCANTI JUNIOR, G.B.; KLUMB, C.E.; MAIA, R.C. p53 e as hemopatias malignas. **Revista Brasileira de Cancerologia**, v. 48, n. 3, p. 419-427, 2002.

CHAGAS, A. P.; MÜLLER, A. H.; SOARES, M.; GARCEZ, L. M. Potencial anti-*Leishmania* e imunomodulador dos extratos de *Campsiandra laurifolia* Benth. (Fabaceae). **Revista Pan-Amazônica de Saúde**. v. 1, n. 1, p. 117-124, 2010.

CHEN, Y.; KANTARJIAN, H.; WANG, H.; CORTES, J.; RAVANDI, F. Acute promyelocytic leukemia: A population-based study on incidence and survival in the United States, 1975-2008. **Cancer**, 2012.[Epub ahead of print].

CHEN, Z. H.; ZHENG, C. J.; SUN, L. P.; PIAO, H. R. Synthesis of new chalcone derivatives containing a rhodamine-3-acetic acid moiety with potential anti-bacterial activity. **European Journal of Medical Chemistry**, 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. **Bioorganic Medical Chemistry**, v. 16, n. 15, p. 7270-7276, 2008.

CHEUNG, Z. H.; IP, N. Y. The emerging role of autophagy in Parkinson's disease. **Molecular Brain**, v. 2., n. 29, p.1-6, 2009.

CHIARADIA, L. D.; MASCARELLO, A.; PURIFICAÇÃO, M.; VERNAL, J.; CORDEIRO, M. N. S.; ZENTENO, M. E.; VILLARINO, A.; NUNES, R. J.; YUNES, R. A.; TERENCEZI, H. Synthetic chalcones as efficient inhibitors of Mycobacterium tuberculosis protein tyrosine phosphatase PtpA, **Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters**, v. 18, p. 6227-6230, 2008.

CORY, S.; ADAMS, J.M. The Bcl2 family: regulators of the cellular life-or-death switch. **Nature Reviews**. v. 2, p. 647-656, 2002

COS, P.; RAJAN, P.; VEDERNIKOVA, I.; CALOMME, M.; PIETERS, L.; VLIETINCK, A. J.; AUGUSTYNS, K.; HAEMERS, A.; VANDEN-BERGHE, D. In Vitro Antioxidant Profile of Phenolic Acid Derivatives, **Free Radical Research**, v. 36, p. 711-716, 2002.

COTRAN, R.S.; KUMAR, V.; COLLINS, T. Robbins: patologia estrutural e funcional. 8ª ed. Rio de Janeiro: **Guanabara Koogan**, 2010.

CRUZ, C. H.; VALIENTE, D. P.; URIA, J. C.; ARENAS, R. C.; PERURENA, J. M.; FÉRNANDEZ, C. A. M.; ROMÁN, G. P. Tratamiento con quimioterapia de la leucemia mieloide aguda en el Hospital "Hermanos Ameijeiras." Experiencia de 20 años de trabajo. *Revista Cubana de Medicina*. v. 45, n. 1, 2006.

DAO, T.T.; NGUYEN, P.H.; LEE, H.S.; KIM, E.; PARK, J.; LIM, S.I.; OH, W.K. Chalcones as novel influenza A (H1N1) neuraminidase inhibitors from *Glycyrrhiza inflata*. **Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters**, v.21, n.1, p. 294-298, 2010.

DE CARVALHO TAVARES, L.; JOHANN, S.; MARIA DE ALMEIDA ALVES, T.; GUERRA, J.C.; MARIA DE SOUZA-FAGUNDES, E.; CISALPINO, P.S.; BORTOLUZZI, A.J.; CARAMORI, G.F.; DE MATTOS PICCOLI, R.; BRAIBANTE, H.T.; BRAIBANTE, M.E.; PIZZOLATTI, M.G. Quinolinylnyl and quinolinylnyl N-oxide chalcones: synthesis, antifungal and cytotoxic activities. **European Journal of Medicinal Chemistry**, v.46, p. 4448-4456, 2011.

DE FARIA, J.L. Patologia geral: fundamentos das doenças, com aplicações clínicas. 4. ed.. Rio de Janeiro: **Guanabara Koogan**, 2008.

DEBATIN, K.M. Apoptosis pathways in cancer and cancer therapy. **Cancer Immunology, Immunotherapy**, v. 53, p. 153 – 159, 2004.

DEBATIN, K.M.; FULDA, S. Extrinsic versus intrinsic apoptosis pathways in anticancer chemotherapy. **Oncogene**, v. 25, p. 4798 – 4811, 2006.

DEL POETA, G.; BRUNO, A.; DEL PRINCIPE, M. I.; VENDITTI, A. MAURILLO, L.; BUCCISANO, F.; STASI, R.; NERI, B.; LUCIANO, F.; SINISCALCHI, A.; FABRITTIS, P.; AMADORI, S. Deregulation of the Mitochondrial Apoptotic Machinery and Development of Molecular Targeted Drug in Acute Myeloid Leukemia. **Current Cancer Drug Targets**, v. 8, p. 207-222, 2008.

DEWICK, P. M.; Medicinal Natural Products: a biosynthetic approach, second ed. John Wiley & Sons, Chichester, 1997.

DIMMOCK, J. R.; JHA, A.; ZELLO, G. A.; ALLEN, T. M.; SANTOS, C. L.; BALZARINI, J.; DE CLERCQ, E.; MANAVATHU, E. K.; STABLES, J. P. Cytotoxic 4'-aminochalcones and related compounds. **Pharmazie**, v. 58, n. 4, p. 227-232, 2003.

DONNAN, F.; COTTER, T. G. Detection of DNA Fragmentation in Retinal Apoptosis by TUNEL. **Methods in Molecular Biology**, 2013 [Epub ahead of print]

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. **Bioorganic Medicinal Chemistry Letters**, 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 antivasculature activity, **Bioorganic Medicinal Chemistry Letters**, v. 17, p. 7698-7710, 2009.

ECHEVERRIA, C.; SANTIBAÑEZ, J. F.; DONOSO-TAUDA, O.; ESCOBAR, C. A.; RAMIREZ-TAGLE, R. Structural Antitumor Activity Relationships of Synthetic Chalcones **International Journal of Molecular Sciences**, v. 10, n. 1, p. 221-231, 2009.

EISSA, A. A.; FARAG, N. A.; SOLIMAN, G. A. Synthesis, biological evaluation and docking studies of novel benzopyranone congeners for their expected activity as anti-inflammatory, analgesic and antipyretic agents. **Bioorganic & Medicinal Chemistry**, v. 17, n. 14, p. 5059-5070, 2009.

ELMORE, S. Apoptosis: A Review of Programmed Cell Death. **Toxicologic Pathology**, v. 35, n. 4, p. 495-516, 2007.

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.

ETHUN, K. F.; WOOD, C. E.; REGISTER, T. C.; CLINE, J. M.; APPT, S. E.; CLARKSON, T. B. Effects of bazedoxifene acetate with and without conjugated equine estrogens on the breast of postmenopausal monkeys. **Menopause**. v. 19, n. 11, p. 1242-1252, 2012.

FESIK, S.W. Promoting apoptosis as a strategy for cancer drug discovery. **Nature Cancer Review**, v. 5, p. 876-885, 2005.

FESTA, M.; CAPASSO, A.; D'ACUNTO, C. W.; MASULO, M.; ROSSI, A. G.; PIZZA, C.; PIACENTE, S. Xanthohumol induces apoptosis in human malignant glioblastoma cells by increasing reactive oxygen species and activating MAPK pathways. **Journal Natural Products**. v. 74, n. 12, p. 2505 – 2513, 2011.

FOLTYN, W.; ZAJECKI, W.; MAREK, B.; KAJDANIUK, D.; SIEMINSKA, L.; ZEMCZAK, A.; KOS-KUDTA, B. The value of the KI-67 proliferation markers as a prognostic factor in gastroenteropancreatic neuroendocrine tumours. **Endokrynologia Polska**. v. 63, n. 5, p. 362-366, 2012.

FRANKLIN, J.L. Redox regulation of the intrinsic pathway in neuronal apoptosis. **Antioxidant & redox signaling**, v.15, p. 1437-1448, 2011.

FULDA, S. Cell death in hematological tumors. **Apoptosis**, v.14, n.4, Apr, p.409-23. 2009.

FURUSAWA, J.; FUNAKOSHI-TAGO, M.; TAGO, K.; MASHINO, T.; INOUE, H.; SONODA, Y. Licochalcone A significantly suppresses LPS signaling pathway through the inhibition of NF-kappa B p65 phosphorylation at serine 276. **Cell Signal**, v. 21, p. 778-785, 2009.

GUERRA, M.R.; GALLO, C.V.M.; AZEVEDO, G.; MENDONÇA, S. Risco de câncer no Brasil: tendências e estudos /miológicos mais recentes. **Revista Brasileira de Cancerologia**, v. 51, n. 3, p. 227-234, 2005.

GHOBRAL, I.M.; WITZIG, T.E.; ADJEI, A.A. Targeting apoptosis pathways in cancer therapy. **CA: A Cancer journal for clinicians**, v. 55, n. 3, p. 178 – 194, 2005.

GLICK, D.; BARTH, S.; MACLEOD, K. F. Autophagy: cellular and molecular mechanisms. **Journal of Pathology**, v. 221, n.1, p. 3-12, 2010.

GO, M. L.; WU, X.; LIU, X. L. Chalcones: An Update on Cytotoxic and Chemoprotective Properties. **Current Medicinal Chemistry**, v. 12, n. 4, p. 483-499, 2005.

GOLSTEIN, P.; KROEMER, G. Cell death by necrosis: towards a muscular definition. **Trends in Biochemical Sciences**, v. 32, n. 1, p. 37-43, 2007.

GÓMEZ-GUIJOSA, M. A.; GUTIÉRREZ-AGUIRRE, C. H.; CANTÚ-RODRÍGUEZ, O. G.; HEREDIA-SALAZAR, A. C.; GÓMEZ-ALMAGUER, D. Leucemia promielocítica aguda. Resultados del tratamiento en el Hospital Universitario de la UANL, Monterrey, México. **Medicina Universitaria**, v. 11, n. 44, p. 165-169, 2009.

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.

GRIMWADE, D.; HILLS, R.K. Independent prognostic factors for AML outcome. **Hematology American Society of Hematology Education Program**, p. 385-395, 2009

GRIVICICH, I.; REGNER, A.; DA ROCHA, A. B. Morte Celular por Apoptose. **Revista Brasileira de Cancerologia**, v. 53, n. 3, p. 335-342, 2007.

GU, B.; ZHU, W.G. Surf the post translational modification network of p53 regulation. **International journal of biological science**, v. 8, n.5, p. 672 – 684, 2012.

GUERRA, M. P.; NODARI, R. O. Biodiversidade: aspectos biológicos, geográficos, legais e éticos. In: SIMÕES, C. M.O. SCHENKEL, E.P. GOSMANN, G. PALLAZO-DE MELLO J.C. MENTZ, L.A. PETROVICK, P. R. **Farmacognosia: da planta ao medicamento**. Porto Alegre/Florianópolis: Ed. Universidade-UFRGS, Ed. UFSC. 2000.

GUERRA, M. R.; GALLO, C.V.M.; AZEVEDO, G.; MENDONÇA, S. Risco de câncer no Brasil: tendências e estudos epidemiológicos mais recentes. **Revista Brasileira de Cancerologia**, v. 51, n. 3, p. 227-234, 2005.

GUL, H. I.; CIZMECIOGLU, M.; ZENCIR, S.; GUL, M.; CANTURK, P.; ATALAY, M.; TOPCU, Z. Cytotoxic activity of 4'-Hydroxychalcone derivatives against Jurkat cells and their effects on mammalian DNA topoisomerase I. **Journal of Enzyme Inhibition and Medicinal Chemistry**. v. 24, n. 3, p. 804-807, 2009.

GUZI, T. J., PARUCH, K.; DWYER, M. P.; LABROLI, M.; SHANAHAN, F.; DAVIS, N.; TARICANI, L.; WISWELL, D.; SEGHEZZI, W.; PENAFLO, E.; BHAGWAT, B.; WANG, W.; GU, D.; HSIEH, Y.; LEE, S.; LIU, M.; PARRY, D. sscreening. **Molecular Cancer Therapy**, v. 10, n. 4, p. 591-602, 2011.

HAMBLIN, T. Natural products and the treatment of leukemia. **Leukemia research**, v. 30, n. 6, p. 649-650, 2006.

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

HARIKUMAR, K. B.; KUNNUMAKKARA, A. B.; AHN, K. S.; ANAND, P.; KRISHNAN, S.; GUHA, S.; AGGARWAL, B. B. cells. *Blood*, v. 113, n. 9, p. 2003-2013, 2009.
HEDRICK, S. M.; CH'EN, I. L.; ALVES, B. N. Intertwined pathways of programmed cell death in immunity. **Immunology Research**, v. 236, p. 41-53, 2010.

HEHLMANN, R.; SAUSSELE, S. Treatment of chronic myeloid leukemia in blast crisis. **Haematologica**, v. 98, n. 12, p. 1765-1769, 2008.

HOTCHKISS, R. S.; NICHOLSON, D. W. Apoptosis and caspases regulate cell death and inflammation in sepsis. **Nature Reviews Immunology**, v. 6, n. 11, p. 813-822, 2006.

HUANG, H.; ZHAO, X.; CHEN, Y.; LU, R.; WU, Y. Apoptosis induced by ZnPcHI-based photodynamic therapy in Jurkat cells and HELA cells. **International Journal of Hematology**, v. 94, n. 6, p. 539-544, 2011.

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

HUSSAIN, T.; SIDDIQUI, H.L.; ZIA-UR-REHMAN, M.; MASOOM YASINZAI, M.; PARVEZ, M. Anti-oxidant, anti-fungal and anti-leishmanial activities of novel 3-[4-(1H-imidazol-1-yl) phenyl]prop-2-en-1-ones. **European Journal of medicinal chemistry**, v.44, n.11, p. 4654 – 4660, 2009.

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

ISA, N. M.; ABDELWAHAB, S. I.; MOHAN, S.; ABDUL, A. B.; SUKARI, M. A.; TAHA, M. M.; SYAM, S.; NARRIMA, P.; CHEAH, S. C.; AHMAD, S.; MUSTAFA M. R. In vitro anti-inflammatory, cytotoxic and antioxidant activities of boesenbergin A, a chalcone isolated from *Boesenbergia rotunda* (L.) (finger root). **Brazilian Journal of Medical and Biological research**, v.45, n.6, p. 524-530, 2012.

JING, H.; ZHOU, X.; DONG, X.; CAO, J.; ZHU, H.; LOU, J. Abrogation of Akt signaling by Isobavachalcone contributes to its anti-proliferative effects towards human cancer cells. **Cancer Letters**, v. 294, p. 167-177, 2010.

JOHNSON, D.G.; WALKER, C.L. Cyclins and cell cycle checkpoints. **Annual review of pharmacology and toxicology**, v. 39, p. 295-312, 1999.

KADOWAKI, N.; KITAWAKI, T.; Recent advance in antigen-specific immunotherapy for acute myeloid leukemia. *Clinical Developmental Immunology*, 2011. Disponível em: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC3199067>.

KAMAL, A.; MALLAREDDY, A.; SURESH, P.; NAYAK, V. L.; SHETTI, R.V.R.N.C.; RAO, N. S.; TAMBOLI, J. R.; SHAIK, T. B.; VISHNUVARDHAN, M.V.P.S.; RAMAKRISHNA, S. Synthesis and anticancer activity of 4 β -alkylamidochalcone and 4 β -cinnamido linked podophyllotoxins as apoptotic inducing agents. **European Journal of Medicinal Chemistry**, v. 47, p. 530-545, 2012.

KAMAL, A.; PRABHAKAR, S.; JANAKI RAMAIAH, M.; VENKAT REDDY, P.; RATNA REDDY, C.H.; MALLAREDDY, A.; SHANKARAIAH, N.; LAKSHMI NARAYAN REDDY, T.; PUSHPAVALLI, S.N.; PAL-BHADRA, M. Synthesis and anticancer activity of chalcone-pyrrolbenzodiazepine conjugates linked via 1,2,3-triazole ring side-armed with alkane spacers. **European Journal of medicinal chemistry**, v. 46, n.9, p. 3820 – 3831, 2011.

KASTAN, M.B.; BARTEK, J. Cell-cycle checkpoints and cancer. **Nature**, v.18, n. 432, p. 316– 323, 2004.

KATSORI, A. M.; HADJIPAYLOU-LITINA, D. Chalcones in Cancer: Understanding their Role in Terms of QSAR., **Current Medical Chemistry**, v. 16, p. 1062-1081, 2009.

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

KIM, W. H.; SONG, H. O.; CHOI, H. J.; BANG, H. I.; CHOI, D. Y.; PARK, H. Ethyl Gallate Induces Apoptosis of HL-60 Cells by Promoting the Expression of Caspases-8, -9, -3, Apoptosis-Inducing Factor and Endonuclease G. **International Journal of Molecular Science**, v. 13, n. 9, p. 11912-11922, 2012.

KOOGAN, S. C.; BROWN, D. E.; SHULTZ, D. B.; TRUONG, B. T. H.; LALLEMAND-BREITENBACH, V.; GUILLEMIN, M. C.; LAGASSE, E.; WEISSMAN, I. L.; BISHOP, J. M. Cooperates with promyelocytic leukemia retinoic acid receptor α chimeric protein (Pmlrara) to block neutrophil differentiation and initiate acute leukemia. **The Journal of Experimental Medicine**, v. 193, n. 4., p. 531-544, 2011.

KOH, Y.; PARK, J.; AHN, K.; KIM, I.; BANG, S.; LEE, J.; YOON, S.; LEE, D.S.; LEE, Y.Y.; PARK, S.; KIM, B. Different clinical importance of FLT3 internal tandem duplications in AML according to FAB classification: possible existence of distinct leukemogenesis involving monocyte differentiation pathway. **Annals of Hematology**, v. 88, n. 11, p. 1089-1097, 2009.

KOSIOR, K.; LEWANDOWSKA-GRYGIEL, M.; GIANNOPOULOS, K. Tyrosine kinase inhibitors in hematological malignancies. **Postepy Higieny I Medycyny Doswiadczalnej**. v. 65, p. 819-828, 2011.

KOSMIDER, B.; ZYNER, E.; OSIECKA, R.; OCHOCKI, J. Induction of apoptosis and necrosis in A549 cells by the cis-Pt (II) complex of 3-aminoflavone in comparison with cis-DDP. **Mutation Research**, v. 563, p. 61-70; 2004.

KOURI, F. M.; JENSEN, S. A.; STEGH, A. H. The Role of Bcl-2 Family Proteins in Therapy Responses of Malignant Astrocytic Gliomas: Bcl2L12 and Beyond. **Scientific World Journal**. v. 2012, p. 100-108, 2012.

KRAKSTAD, C.; CHEKENYA, M. Survival signaling and apoptosis resistance in glioblastomas: opportunities for targeted therapeutics. **Molecular Cancer**, v.9, p. 1- 14, 2010.

KREUZALER, P.; WATSON, C. J. Killing a cancer: what are the alternatives? **Nature Reviews Cancer**, v. 12, p. 411-424, 2012.

KROMER, G.; GALLUZZI, L.; VANDENABEELE, P.; ABRAMS, J.; ALNEMRI, E.S.; BAEHRECKE, E.H.; BLAGOSKLONNY, M.V.; EL-DEIRY, W.S.; GOLSTEIN, P.; et al. Classification of cell death recommendations of the Nomenclature Committee on Cell Death. **Cell Death and Differentiation**, v. 16, n. 1, p. 3-11, 2009.

KRUG, U.; BÜCHNER, T.; BERDEL, W. E.; MÜLLER-TIDOW, C. The Treatment of Elderly Patients with acute myeloid Leukemia. **Deutsches Ärzteblatt International**, v. 108, p. 863-870, 2011.

- LACKA, I.; KONIECZNY, M.T.; BUŁAKOWSKA, A.; RZYMOWSKI, T.; MILEWSKI, S. Antifungal action of the oxathiolone-fused chalcone derivative. **Mycoses**, v. 5, p. 407 – 414, 2011.
- LACOBUCCI, I.; PAPAYANNIDIS, C.; LONETTI, A.; FERRARI, A.; BACCARANI, M.; MARTINELLI, G. Cytogenetic and Molecular Predictors of Outcome in Acute Lymphocytic Leukemia: Recent Developments. **Current hematologic malignancy reports**, v. 7, n. 2, p. 133-143, 2012.
- LANCET, J. E.; KARP, J. E. Novel postremission strategies in adults with acute myeloid leukemia. **Current Opinion in Hematology**, v. 16, n. 2, p. 105-111, 2010.
- LANDMAN-PARKER, J.; PAGÈS, P.; PETIT, A.; FASOLA, S.; LEVERGER, G. New insights into acute lymphoblastic leukemia. **Bulletin de l'Académie Nationale de Médecine**, v. 193, n. 7, p. 1501-1507, 2009.
- LARSON, R. A. Is secondary leukemia an independent poor prognostic factor in acute myeloid leukemia? **Best Practice & Research Clinical Haematology**, v. 20, n. 1, p. 29-37, 2007.
- 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, **Bioorganic & Medical chemical Letters**, n.16, p. 5844-5848, 2006.
- LEE, J. H.; BAEK, N. I.; KIM, S. H.; PARK, H. W.; YANG, J. H.; LEE, J. J.; KIM, S. J.; JEONG, S.; OH, C. H.; LEE, K. H.; KIM, D. K. A New Cytotoxic Prenylated Chalcone from *Sophora flavescens*. **Archives of Pharmaceutical Research**, v. 30, n. 4, p. 408-411, 2007.
- LEE, J.S.; LEE, S.K.; YOUN, H.D.; YOO, S.J. C-terminal binding protein-mediated transcriptional repression is regulated by X-linked inhibitor of apoptosis protein. **Biochemical. Biophysical Research Communications**, v. 417, n. 1, p. 175-181, 2012.
- LI, L.; ZHAO, X.T.; LUO, Y.P.; ZHAO, J.F.; YANG, X.D.; ZHANG, H.B. Novel cytotoxic chalcones from *Litsea rebeszens* and *Litsea pedunculata*. **Bioorganic & Medical chemical Letters**, v. 21, n. 24, p. 7431-7433, 2011.
- LICHTMAN, M. A.; BEUTLER, E.; KIPPS, T. J.; SELIGSOHN, U.; KAUSHANSKY, K.; PACHAL, J. **Williams Hematology**. New York: McGraw-Hill Medical, 7^a ed. 2006.
- LIEPPKE, J. A.; STRZEMPKO, M. N.; RAIA, F. F.; SIMON, S.L. Isolation of intact high-molecular-weight DNA by using guanidine isothiocyanate. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 53, p. 2588-2589, 1987.
- LINDSAY, J.; ESPOSTI, M. D.; GILMORE, A. P. Bcl-2 proteins and mitochondria--specificity in membrane targeting for death. **Biochimica et Biophysica Acta**, v. 1813, n. 4, p. 532-539, 2011.
- LO, A.C.; WOO, T.T.; WONG, R.L.; WONG, D. Apoptosis and other cell death mechanisms after retinal detachment: implications for photoreceptor rescue. **Ophthalmologica**, 226 Suppl. 1:10-7, 2011.

LO, J.; MCNAUGHTAN, J.; RANI, V.; MARIC, D.; SMITH, A.; MCCULLOUGH, M.; CHANDU, A. An Immunohistochemical Analysis of Cell Cycle Markers in Oral Mucosal Dysplastic Lesions Treated by Laser Therapy. A Pilot Study. **Journal of Maxillofacial and Oral Surgery**, v. 10, n. 3, p. 190-194, 2011.

LONG, J. S.; RYAN, K. M. New frontiers in promoting tumour cell death: targeting apoptosis, necroptosis and autophagy. **Oncogene**, [Epub ahead of print], 2012.

LUSIS, M.K.P. Classificação FAB das leucemias mieloides agudas. **Revista Brasileira de Hematologia e Hemoterapia**, v. 22, n. 2, p. 175-178, 2000.

LY, J.D.; GRUBB, D.R.; LAWEN, A. The mitochondrial membrane potential ($\Delta\psi_m$) in apoptosis; an update. **Apoptosis**, v. 8, p. 115 – 128, 2003.

MARTINVALET, D.; ZHU, P.; LIEBERMAN, J. Granzyme A Induces Caspase-Independent Mitochondrial Damage, a Required First Step for Apoptosis. **Immunity**, v. 22, p. 355-370, 2005.

MELÉNDEZ, A.; LEVINE, B. Autophagy in *C. elegans*. **WormBook: the online review of C. elegans biology**, p. 1-26, 2009.

MILITÃO, D. C.; DANTAS, I. N.; FERREIRA, P. M.; ALVES, A. P.; CHAVES, D. C.; MONTE, F. J.; PESSOA, C.; DE MORAES, M. O.; COSTA-LOTUFO, L. V. In vitro and in vivo anticancer properties of cucurbitacin isolated from *Cayaponia racemosa*. **Pharmaceutical Biology**, 2012 [Epub ahead of print].

MILLIGAN, D.; GRIMWADE, D.; CULLIS, J.; SWIRSKY, D.; CRADDOCK, C.; KELL, J. **Guidelines on the management of acute myeloid leukaemia in adults**. London: British Society of Haematology, 2005.

MONTI, S.; CHAPUY, B.; TAKEYAMA, K.; RODIG, S. J.; HAO, Y.; YEDA, K. T.; INQUILIZIAN, H.; MERMEL, C.; CURRIE, T.; DOGAN, A.; KUTOK, J. L.; BEROUKHIM, R.; NEUBERG, D.; HABERMANN, T. M.; GETZ, G.; KUNG, A. L.; GOLUB, T. R.; SHIPP, M. A. Integrative analysis reveals an outcome-associated and targetable pattern of p53 and cell cyclederegulation in diffuse large B cell lymphoma. **Cancer Cell**, v. 22, n. 3, p. 359-372, 2012.

MIRANDA, C. L.; STEVENS, J. F.; IVANOV, V.; MCCALL, M.; FREI, B.; DEINZER, M.L.; BUHLER, D. R. Antioxidant and prooxidant actions of prenylated and nonprenyated chalcones and flavanones *in vitro*, **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 48, p. 876-884, 2000.

MITCHELL, C.; MALLET, V.; GUIDOTTI, J. E.; MIGNON, A.; COUTON, D.; KAHN, A.; GILGENKRANTZ, H. Experimental modulation of apoptosis: physiopathological and therapeutical targets, v. 199, n. 2, p. 243-246, 2005.

- MOHAMAD, A. S.; AKHTAR, M. N.; ZAKARIA, Z. A.; PERIMAL, E. K.; KHALID, S.; MOHD, P. A.; KHALID, M. H.; ISRAF, D. A.; LAJIS, N. H.; SULAIMAN, M. R. Antinociceptive activity of a synthetic **chalcone**, flavokawin B on chemical and thermal models of nociception in mice. *European Journal of Pharmacology*, v. 647, p. 103-109, 2010.
- MOKLE, S.S.; SAYYEE, M.A.; CHOPDE, K. Studies on synthesis and antimicrobial activity of some new iodochalcones, flavones and flavonols. *International Journal of Chemical Sciences*, v.2, p. 96-100, 2004.
- MOTTA, R. R.; ZETTLER, C. G.; CAMBRUZZI, E.; JOTZ, G. P.; BERNI, R. B. Valor prognóstico da correlação do Ki-67 e p53 em carcinomas epidermoides da cavidade oral e língua. *Brazilian Journal of Otorhinolaryngology*, v. 75, n. 4, p.544-459, 2009.
- MULLIGHAN, C.G.; Genetic variation and the risk of acute lymphoblastic leukemia. *Leukemia Research*, v. 34, n. 10, p. 1269-1270, 2010.
- NAGATA, S. Apoptosis by Death Factor: Review. *Cell*, v. 88, p. 355–365, 1997.
- 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. *Biological and Pharmaceutical Bulletin*, v.28, P. 83-86, 2005.
- NDOZANGUE-TOURIGUINE, O.; HAMELIN, J.; BRÉARD, J. Cytoskeleton and apoptosis. *Biochemical Pharmacology*, v. 76, n. 1, p. 11-18, 2008.
- NIELSEN, S. F.; BOESEN, T.; LARSEN, M.; SCHONNING, K.; KROMANN, H. Antibacterial chalcones-bioisosteric replacement of the 4'-hydroxy group. *Bioorganic and Medicinal Chemistry*, v. 12, n. 11, p. 3047-3054, 2004.
- PATI, H. N.; HOLT JR., H. L.; LEBLANC, R.; DICKSON, J.; STEWART, M.; BROWN, T.; LEE, M. Synthesis and cytotoxic properties of nitro and aminochalcones, *Medicinal Chemistry Research*. v. 14, p. 19-25, 2005.
- PARK, I.; PARK, K. K.; PARK, J. K.; CHUNG, W. Y. Isoliquiritigenin induces G2 and M phase arrest by inducing DNA damage and by inhibiting the metaphase/anaphase transition. *Cancer Letters*, v. 277, p. 174-181, 2009.
- 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. *Journal of Pharmacy and Pharmacology*, v. 62, n. 9, p. 1128-1136, 2010.
- PETER; M. E.; LEGEMBRE, P.; BARNHART, B. C. Does CD95 have tumor promoting activities? *Biochimica et Biophysica Acta*, v. 1755, n. 1, p. 25-36, 2005.
- PILATOVA, M.; VARINSKA, L.; PERJESI, P.; SARISSKY, M.; MIROSSAY, L.; SOLAR, P.; OSTRO, A.; MOIZIS, J. In vitro antiproliferative and antiangiogenic effects of synthetic **chalcone** analogues. *Toxicology In Vitro*, v. 24, n. 5, p. 1347-1355, 2010.

PIOTROWSKA, D. G.; CIESLAK, M.; KRÓLEWSKA, K.; WRÓBLEWSKI, A. E. Design, Synthesis and cytotoxicity of a new series of isoxazolidines derived from substituted chalcones. **European Journal of Medicinal Chemistry**, v. 46, n. 4, p. 1382-1389, 2011.

POKORNÝ, J.; JANDOVÁ, A.; NEDBALOVÁ, M.; JELÍNEK, F.; CIFRA, M.; KUCERA, O.; HAYELKA, D.; VRBA, J.; VRBA, J. JR.; COCEK, A.; KOBILKOVÁ, J. Mitochondrial Metabolism – Neglected Link of Cancer Transformation and Treatment. **Prague Medical Report**, v. 113, p. 81-94, 2012.

PUI, C. H. Acute lymphoblastic leukemia: introduction. **Seminars in Hematology**, v.46, n.1, p.1-2, 2009.

RAM, R.; GAFTER-GVILI, A.; VIDAL, L.; PAUL, M.; BEN-BASSAT, I.; SHPILBERG, O.; RAANANI, P. Management of Adult Patients With Acute Lymphoblastic Leukemia in First Complete Remission: Systematic Review and Meta-Analysis. **Cancer**, v. 116, n. 14, p. 3447-3457, 2010.

REMIJSEN, Q.; KUIJPERS, T. W.; WIRAWAN, E.; LIPPENS, S.; VANDENABEELE, P.; VANDEN BERGHE, T. Dying for a cause: Netosis, mechanisms behind an antimicrobial cell death modality. **Cell Death and Differentiation**, v. 18, p. 581-588, 2011.

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

REDDY, M. V. R.; PALLELA, V. R.; COSENZA, S. C.; MALLIREDDIGARI, M. R.; PATTI, R.; BONAGURA, M.; TRUONGCAO, M.; AKULA, B.; JATIANI, S. S.; REDDY, E. P. Design, synthesis and evaluation of (*E*)- α -benzylthio chalcones as novel inhibitors of BCR-ABL kinase. **Bioorganic & Medicinal Chemistry**, v. 18, n. 6, p. 2317-2326, 2010.

REICHWALD, C.; SHIMONY, O.; SACERDOTI-SIERRA, N.; JAFFE, C.L.; KUNICK, C. A new Heck reaction modification using ketone Mannich bases as enone precursors: parallel synthesis of anti-leishmanial chalcones. **Bioorganic & Medical chemical Letters**, v. 18, n. 6, p. 1985 – 1989, 2008.

REIMERTZ, C.; KÖGEL, D.; RAMI, A.; CHITTENDEN, T.; PREHN, J.H. Gene expression during ER stress-induced apoptosis in neurons: induction of the BH3-only protein Bbc3/PUMA and activation of the mitochondrial apoptosis pathway. **The journal of cell biology**, v. 18, p. 587 – 597, 2003.

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

RING, J.; SOMMER, C.; CARMONA-GUTIERREZ, D.; RUCKENSTUHL, C.; EISENBERG, T.; MADEO, F. The metabolism beyond programmed cell death in yeast. **Experimental Cell Research** v. 318, n. 11, p. 1193-1200, 2012.

RIVOIRE, W.A.; CAPP, E.; VON, E.Y.E.; CORLETA, H.; SILVA, I.S.B. Base biomoleculares da oncogênese cervical. **Revista Brasileira de Cancerologia**, v. 47, p. 179 – 184, 2001.

RÖDER, A.; TRAUZOLD, A.; KALTHOFF, A. Impact of death receptor signaling on the malignancy of pancreatic ductal adenocarcinoma. **European Journal of Cell Biology**, v. 90, n. 6-7, p. 450-455, 2011.

ROMAGNOLI, R.; BARALDI, P. G.; CARRION, M. D.; CRUZ-LOPEZ, O.; CARA, C. L.; BALZARINI, J.; HAMEL, E.; CANELLA, A.; FABBRI, E.; GAMBARI, R.; BASSO, G.; VIOLA, G. Hybrid α -bromoacryloylamido chalcones. Design, synthesis and biological evaluation. **Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters**, v. 19, n. 7, p. 2022-2028, 2009.

ROZMER, Z.; BERKI, T.; PERJÉSI, P. Different effects of two cyclic chalcone analogues on cell cycle of Jurkat T cells. **Toxicology in Vitro**, v. 20, n. 8, p. 1354-1362, 2006.

RUBIN, E.; GORSTEIN, F.; RUBIN, R.; SCHWARTING, R.; STRAYER, D. **Patologia: Bases Clinicopatológicas da Medicina**. 4a ed. Guanabara Koogan: Rio de Janeiro, 2010.

RUBNITZ, J. E. Childhood acute myeloid leukemia. **Current Treatment Options in Oncology**, v.9, n.1, p.95-105, 2008.

SAMZADEH-KERMANI, A.; AZIMZADEH, B. S.; ESKANDARIZADEH, A. Evaluation of anti-inflammatory and analgesic activity of a novel rigid 3, 4-dihydroxy chalcone in mice. **Annals of New York Academy of Sciences**, v. 1171, p. 399-406, 2009.

SAUNDERS, P. O.; WEISS, J.; WELSCHINGER, R.; BARAZ, R.; BRADSTOCK, K. F.; BENDALL, L. J. RAD001 (everolimus) induces dose-dependent changes to cell cycle regulation and modifies the cell cycle response to vincristine. **Oncogene**, 2012 [Epub ahead of print].

SCHNERCH, D.; YALCINTEPE, J.; SCHMIDTS, A.; BECJER, H.; FOLLO, M.; ENGELHARDT, M.; WÄSCH, R. Cell cycle control in acute myeloid leukemia. **American Journal of Cancer Research**, n. 2, v. 5, p. 508-529, 2012.

SEKERES, M. A.; ELSON, P.; KALAYCIO, M. E.; ADYANI, A. S.; COPELAN, E. A.; FADERL, S.; KANTARJIAN, H. M.; ESTEY, E. Time from diagnosis to treatment initiation predicts survival in younger, but not older, acute myeloid leukemia patients. **Blood**, v. 113, p. 28-36, 2009.

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 Signaling in Human Bladder Cancer Cells. **Basic & Clinical Pharmacology & Toxicology**, v. 101, n. 4, p. 254-261, 2007.

SCHOLZEN, T.; GERDES, J.; The Ki-67 protein: From the known and the unknown. **Journal of Cellular Physiology**, v. 182, n. 3, p. 311-322, 2000.

SCHULZE-BERGKAMEN, H.; KRAMMER, P. H. Apoptosis in cancer--implications for therapy. **Seminars in Oncology**, v.31, n.1, p.90-119, 2004.

SHAH, M.; AGARWAL, B. Recent advances in management of acute myeloid leukemia (AML). **Indian Journal of Pediatrics**, v.75, n.8, p.831-7, 2008.

SHEN, K.H.; CHANG, J.K.; HSU, Y.L.; KUO, P.L. Chalcone arrest cell cycle progression and induces apoptosis through induction of mitochondrial pathway and inhibition of nuclear factor Kappa B signaling in human bladder Cancer cells. **Basic & Clinical Pharmacology and Toxicology**, v. 101, p. 254 – 261, 2007.

SIDDIQUI, R. A.; JENSKI, L. J.; HARVEY, K. A.; WIESEHAN, J. D.; STILLWELL, W.; ZALOGA, G. P. Cell-cycle arrest in Jurkat leukaemic cells: a possible role for docosahexaenoic acid. **The Biochemical Journal**, v. 371, p. 621-629, 2003.

SIKANDER, M.; MALIK, S.; YADAV, D.; BISWAS, S.; KATARE, D. P.; JAIN, S.K. Cytoprotective Activity of a Trans-chalcone Against Hydrogen Peroxide Induced Toxicity in Hepatocellular Carcinoma (HepG2) Cells. **Asian Pacific Journal of Cancer Prevention**, v. 12, p. 2513-2516, 2011.

SILVA, G.C.; PILGER, D.A.; CASTRO, S.M.; WAGNER, S.C. Diagnóstico laboratorial das leucemias mieloides agudas. **Jornal Brasileiro de Patologia e Medicina Laboratorial**, v.42, n.2, p.77-84, 2006.

SILVA, L. T.; COSTA, G.M.; STOCO, P.H.; SCHENKEL, E.P.; REGINATTO, F.H.; SIMÕES, C.M.O. In vitro antiherpes effects of a C-glycosylflavonoid-enriched fraction of *Cecropia glaziovii* Sneth. **Letters in Applied Microbiology**, v. 51, n. 2, p. 143-148, 2010.

SINGH, P.; RAJ, R.; VIPAN, K.; MAHAJAN, M. BEDI, P. M. S.; KAUR, T. SAXENA, A. K. 1,2,3-Triazole tethered b-lactam-Chalcone bifunctional hybrids: Synthesis and anticancer evaluation. **European Journal of Medicinal Chemistry**. v. 47, p. 594-600, 2012.

SISODIA, B.S.; NEGI, A.S.; DAROKAR, M.P.; DWIVEDI, U.N.; KHANUJA, S.P. Antiplasmodial activity of steroidalchalcones: evaluation of their effect on hemozoin synthesis and the new permeation pathway of *Plasmodium falciparum*-infected erythrocyte membrane. **Chemical biology & Drug Design**, v. 79, n. 4, p. 610 – 615, 2012.

STRISSEL, P. M.; STRICK, R. Multiple effects of bioflavonoids on gene regulation, cell proliferation and apoptosis: natural compounds move into the lime light of cancer research, **Leukemia research**, v. 29, p. 859–861, 2005.

SWEETY, S.; KUMAR, K.; NEPALI, S.; SAPRA, O. P.; SURI, K. L.; DHAR, G.S. SARMA, A. K.; SAXENA, A. K. Synthesis and biological evaluation of chalcones having heterosubstituent(s), Indian. **Journal of Pharmaceutical Sciences**, v. 72, p. 801-806, 2010.

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^a ed. Genebra: **WHO Press**, 2008.

TABATA, K.; MOTANI, K.; TAKAYANAGI, N.; NISHIMURA, R.; ASAMI, S.; KIMURA, Y.; UKIYA, M.; HASEGAWA, D.; AKIHISA, T.; SUZUKI, T. Xanthoangelol, a major chalcone constituent of *Angelica keiskei*, induces apoptosis in neuroblastoma and leukemia cells. **Biological & Pharmaceutical Bulletin**, v. 28, n. 8, p. 1404-1407, 2005.

TABONE, M.D.; LEVERGER, G. Outcome of children cured of acute lymphoblastic leukemia. **Bulletin de l'Académie Nationale de Médecine**, v. 193, n. 7, p. 1519-1528, 2009.

TAKAHASHI, A.; MATSUMOTO, H.; YUKI, K.; YASUMOTO, J.; KAJIWARA, A.; AOKI, M.; FURUSAWA, Y.; OHNISHI, K.; OHNISHI, T. High-LET radiation enhanced apoptosis but not necrosis regardless of status. **International Journal of Radiation Oncology Biology Physics**, v. 60, n. 2, p. 591-597, 2004.

TALLMAN, M. S.; ANDERSEN, J. W.; SCHIFFER, C. A.; APPELBAUM, F. R.; FEUSNER, J. H.; WOODS, W. G. All-trans retinoic acid in acute promyelocytic leukemia: long-term outcome and prognostic factor analysis from the North American Intergroup protocol. **Blood**, v. 100, n. 13, p. 4298-42302, 2002.

TAVARES, L. C.; JOHANN, S.; ALVES, T. M. A.; GUERRA, J. C.; SOUZA-FAGUNDES, E. M.; CISALPINO, P. S.; BORTOLUZZI, A. J.; CARAMORI, F.; PICCOLI, R. M.; BRAIBANTE, H. T. S.; BRAIBANTE, M. E. F.; PIZZOLATTI, M. G. Quinolinylnyl and quinolinylnyl N-oxide chalcones: Synthesis, antifungal and cytotoxic activities. **European Journal of Medicinal Chemistry**, v. 46, n. 9, p. 4448-4456, 2011.

TESTA, U.; RICCIONI, R. Deregulation of apoptosis in acute myeloid leukemia. **Haematologica**, v. 92, n.1, p.81-94, 2007.

THIRUNARAYANAN, G.; VANANGAMUD, G. Synthesis, spectral studies, antimicrobial, antioxidant and insect antifeedant activities of some 9H-fluorene-2-yl keto-oxiranes. **Spectrochimica Acta Part A, Molecular and Biomolecular Spectroscopy**, v. 81, n. 1, p. 390-396, 2011.

THOMAS, X. Chemotherapy of acute leukemia in adults. **Expert Opinion in Pharmacotherapy**, v.10, n.2, p. 221-237, 2009.

VALLA, A.; VALLA, B.; CARTIER, D.; LE GUILLOU, R.; LABIA, R.; FLORENT, L.; CHARNEAU, S.; SCHREVEL, J.; POTIER, P. New syntheses and potential antimalarial activities of new retinoic-like chalcones. **European Journal of medicinal chemistry**, v. 41, n.1, p. 142 – 146, 2005.

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 Colorimetric MTT Assay. **Journal of Immunological Methods**, v. 141, p. 15-22, 1991.

VARDIMAN, J.W. The World Health Organization (WHO) classification of tumors of *the* hematopoietic *and* lymphoid tissues: An overview with emphasis on the myeloidneoplasms. **Chemico-Biological Interactions**, v. 184, n. 1, p.16-20, 2010.

VARDIMAN, J. W.; THIELE, J.; ARBER, D. A.; BRUNNING, R. D.; BOROWITZ, M. J.; PORWIT, A.; HARRIS, N. L.; LE BEAU, M. M.; HELLSTRÖM-LINDBERG, E.; TEFFERI, A.; BLOOMFIELD, C. D. The 2008 revision of the World Health Organization (WHO) classification of myeloid neoplasms and acute leukemia: rationale and important changes. **Blood**, v. 114, n. 5, p. 937-951, 2009.

VASCONCELOS, A.; CAMPOS, V. F.; NEDEL, F.; SEIXAS, F. K.; DELLAGOSTIN, O. A.; SMITH, K. R.; PEREIRA, C. M. P.; STEFANELLO, F. M.; COLLARES, T.; BARSCHAK, A. G. Cytotoxic and apoptotic effects of chalcone derivatives of 2-acetyl

thiophene on human colon adenocarcinoma cells. **Cell Biochemistry and Function**, 2012, [Epub ahead of print].

VERMEULEN, K.; BERNEMAN, Z.N.; VAN BOCKSTAELE, D.R. Cell cycle and apoptosis. **Cell Proliferation**, v. 36, n. 3, p. 165 – 175, 2003.

VIANA, G. S.; BANDEIRA, M. A.; MATOS, F. J.; Analgesic and anti-inflammatory effects of chalcones isolated from *Myracrodruon urundeuva* allemao. **Phytomedicine**, v. 10, p. 189-195, 2003.

YADAV, V. R.; PRASAD, S.; SUNG, B.; AGGARWAL, B. B. The role of chalcones in suppression of NF- κ B-mediated inflammation and cancer. **International Immunopharmacology**, v. 11, n. 3, p. 295-309, 2011.

WALSH, C.M.; EDINGER, A.L. The complex interplay between autophagy, apoptosis and necrotic signals promotes T-cell homeostasis. **Immunology Review**, v. 236, p. 95-109, 2010.

WANG, G.; HUANG, W.; HE, H.; FU, X.; WANG, J.; ZOU, K.; CHEN, J. Growth inhibition and apoptosis-inducing effect on human cancer cells by RCE-4, a spirostanol saponin derivative from natural medicines. **International Journal of Molecular Medicine**, 2012 [Epub ahead of print].

WARD, L. S. Entendendo o Processo Molecular da Tumorigênese. **Arquivos Brasileiros de Endocrinologia e metabolismo**, v. 46, p. 351 – 360, 2002.

WATSON, A. S.; MORTENSEN, M.; SIMON, A. K. Autophagy in the pathogenesis of myelodysplastic syndrome and acute myeloid leukemia. **Cell Cycle**, v. 10, n. 11, p. 1719-1725, 2011.

WEINBERG, O.K.; SEETHARAM, M.; REN, L.; SEO, K.; MA, L.; MERKER, J.D.; GOTLIB, J.; ZEHNDER, J.L., ARBER, D.A. Clinical characterization of acute myeloid leukemia with myelodysplasia-related changes as defined by the 2008 WHO classification system. **Blood**, v. 113, n. 9, p. 1906-1908, 2009.

WICKMAN, G.; JULIAN, L.; OLSON, M. F. How apoptotic cells aid in the removal of their own cold dead bodies. **Cell Death & Differentiation**, v. 19, n. 5, p. 735-742, 2012.

WILLIAMS, W. **Hematologic Diseases**. 7^a Ed: Marshall A. Lichtman, 2006.

WINTER, S. S. Pediatric Acute Leukemia Therapies Informed by Molecular Analysis of High-Risk Disease. **Hematology**, v. 2011, n. 1, p. 366-373, 2011.

WHO - World Health Organization. Disponível em: <<http://www.who.int/cancer>>, Acesso em 15 set. 2012.

WICKMAN, G.; JULIAN, L.; OLSON, M. F. How apoptotic cells aid in the removal of their own cold dead bodies. **Cell Death & Differentiation**. v. 19, n. 5, p. 735-742, 2012.

WINSOW, T.; KIBIUK, L. Stem Cell Information. Disponível em: <http://stemcells.nih.gov/info/scireport/appendixa.asp#figure1>. Acesso em: Agosto, 2012.

WINTER, E.; CHIARADIA, L. D.; DE CORDOVA, C. A.; 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. **Bioorganic Medicinal Chemistry Letters**, v. 18, n. 22, p. 8026-8034, 2010.

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. **Journal of Medicinal Chemistry**, v.54, n. 23, p. 8110 – 8123, 2011.

WYLLIE, A.H. "Where, O Death, Is Thy Sting?" A Brief Review of Apoptosis Biology. **Molecular Neurobiology**, v. 42, n. 1, p. 4-9, 2010.

YANG, J.; RAMNATH, N.; MOYSICH, K. B.; ASCH, H. L.; SWEDE, H.; ALRAWI, S. J.; HUBERMAN, J.; GERADTS, J.; BROOKS, J. S. J.; TAN, D. Prognostic significance of MCM2, Ki-67 and gelsolin in non-small cell lung cancer. **BMC Cancer**, v. 6, n. 203, p. 1-10, 2006.

YANG, X.; WANG, W.; TAN, J.; SONG, D.; LI, M.; LIU, D.; JING, Y.; ZHAO, L. cells. **Bioorganic Medicinal Chemistry Letters**, v. 19, n. 15, p. 4385-4388, 2009.

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. **Leukemia Research**, n. 29, p. 887-892, 2005.

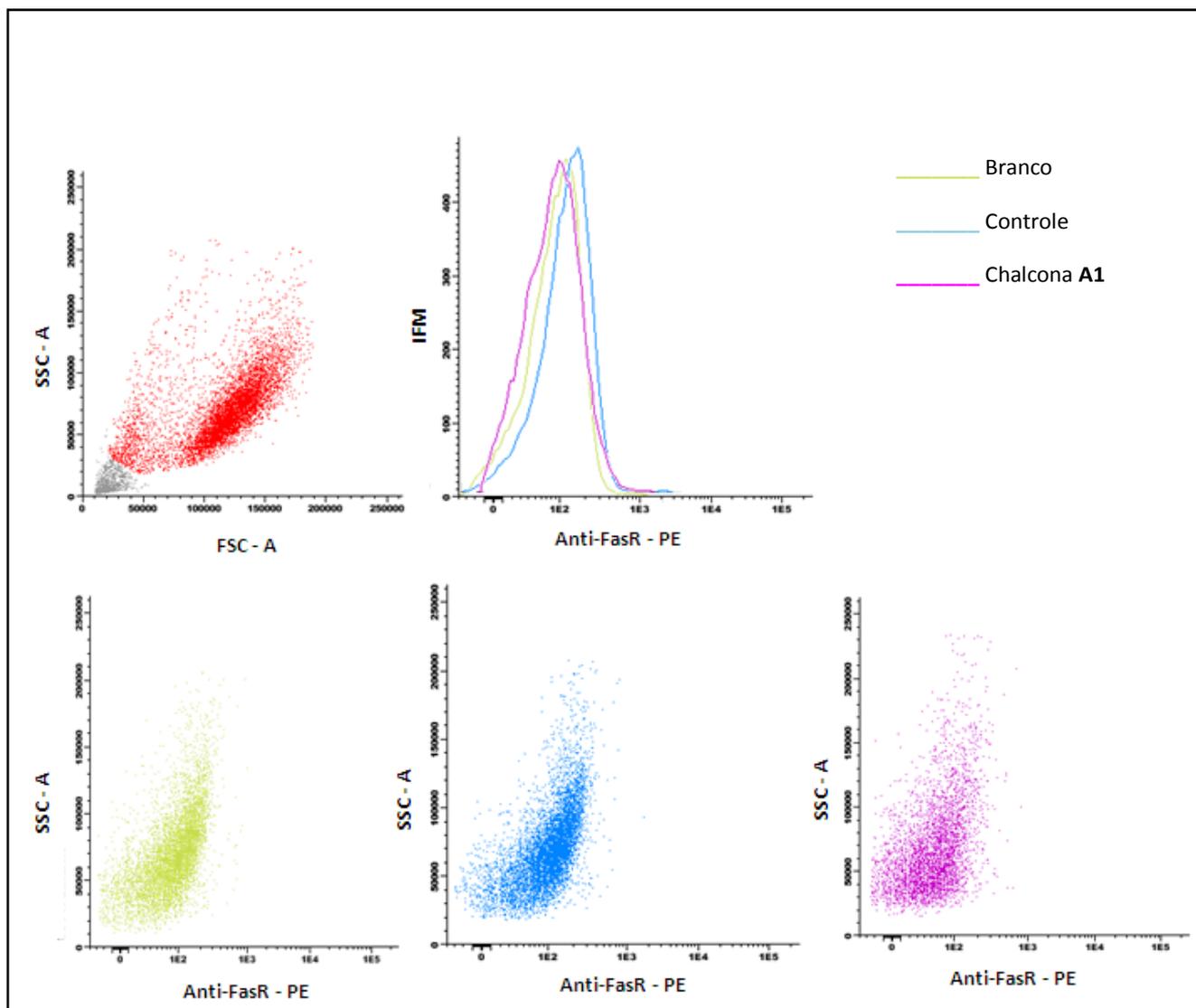
YUN, J.M.; KWEON, M.H.; KWON, H.; HWANG, J.K.; MUKHTAR, H. Induction of apoptosis and cell cycle arrest by a chalcone panduratin A isolated from *Kaempferia pandurata* in androgen-independent human prostate cancer cells *PC3* and *DU14*. **Carcinogenesis**, v.27, 1454-1464, 2006.

ZAFFARONI, N.; PENNATI, M.; DAIDONE, M. G. Survivin as a Target for New Anticancer Interventions. **Journal of Cellular and Molecular Medicine**, v. 9, n. 2, p. 360-372, 2005.

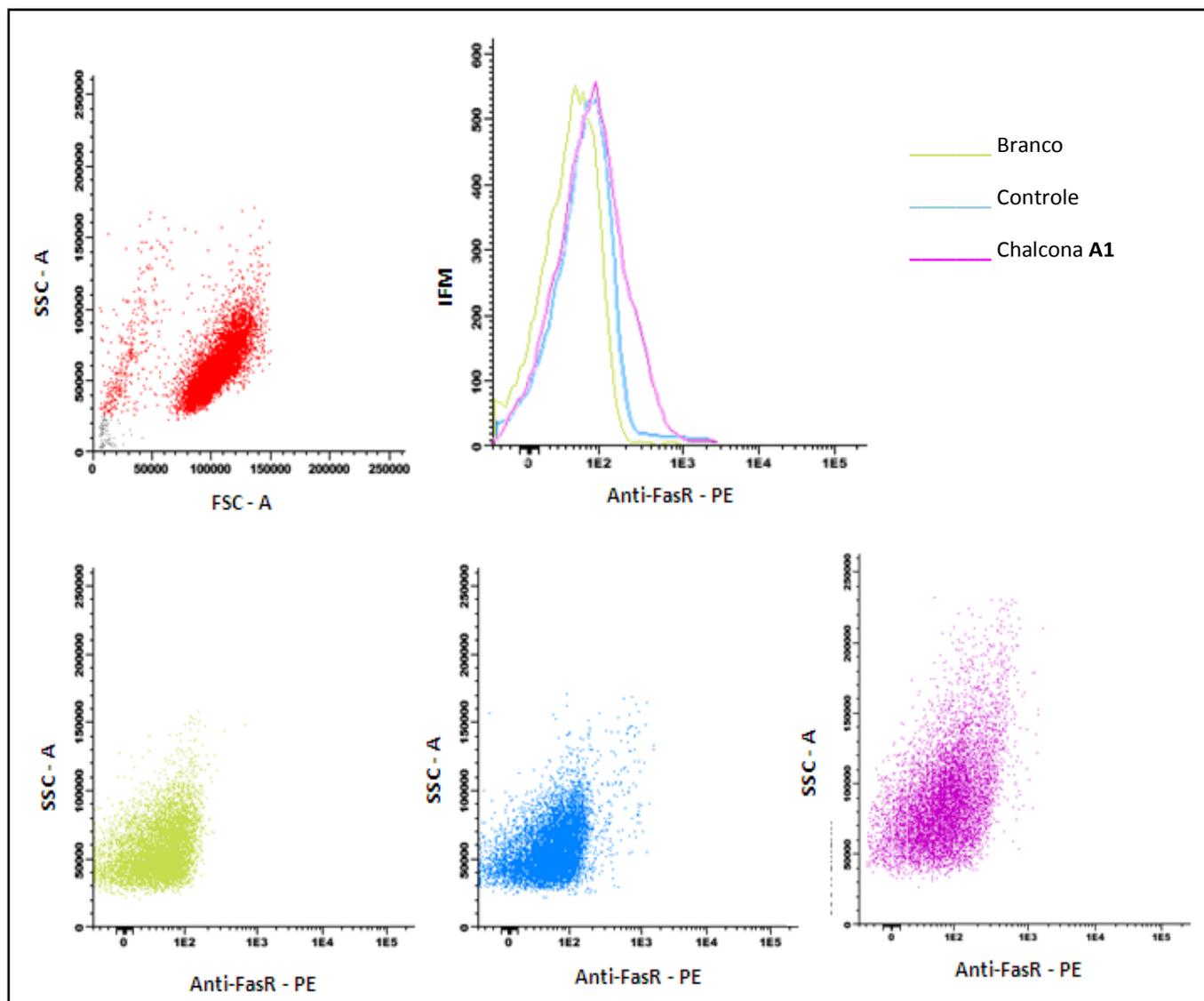
ZHU, X. F.; XIE, B. F.; ZHOU, J. M.; FENG, G. K.; LIU, Z. C.; WEI, X. Y. Blockade of vascular endothelial growth factor receptor signal pathway and antitumor activity of ON-III (2', 4'-dihydroxy-6'-methoxy-3', 5'-dimethylchalcone), a component from Chinese herbal medicine. **Molecular Pharmacology**, v. 67, p. 1444-1450, 2005.

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.

APÊNDICE 1 – Gráficos de Citometria

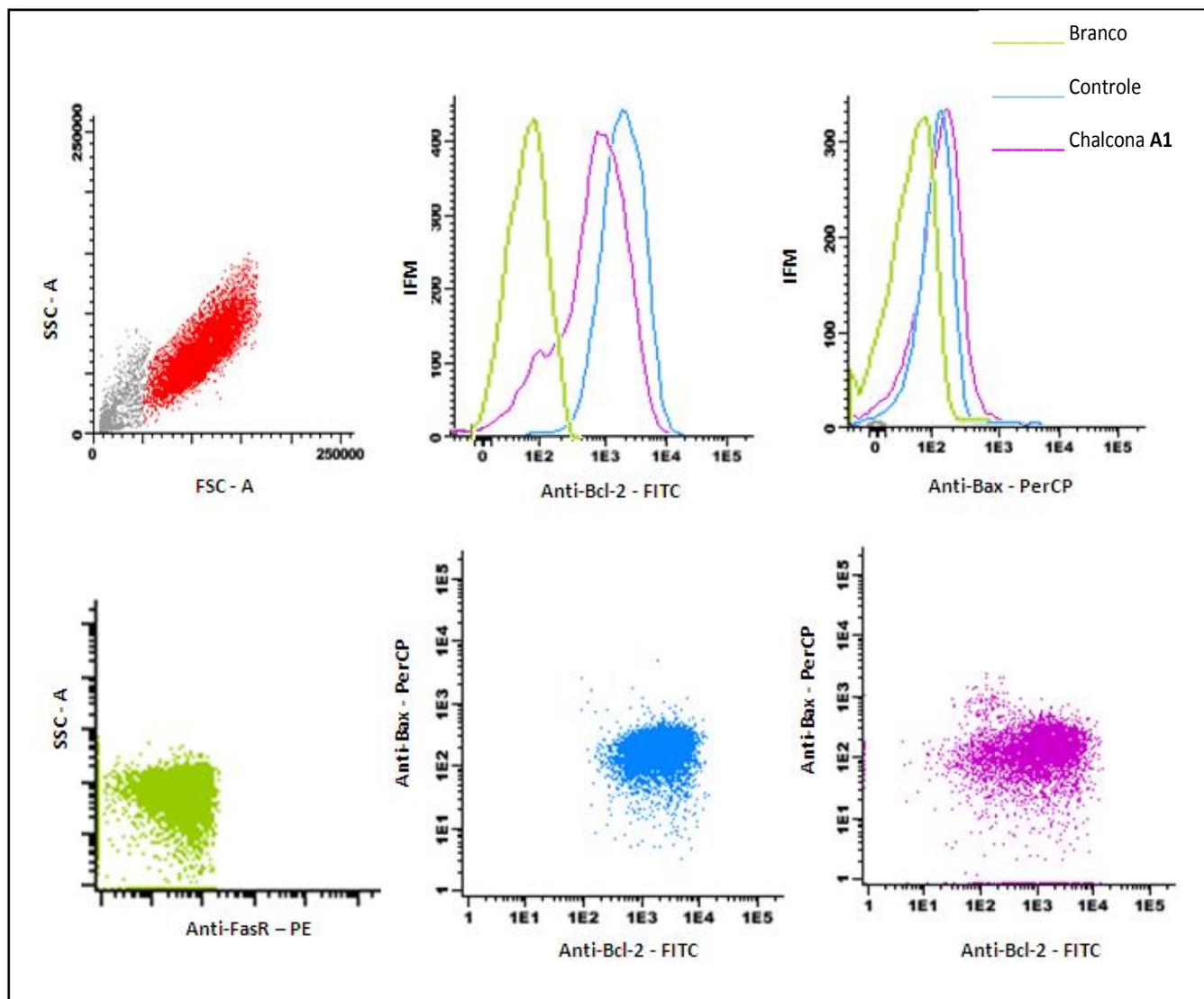


APÊNDICE A: Efeito da chalcona A1 na expressão do receptor FasR em células K562. As células K562 (1×10^6 células/poço) foram incubadas com a chalcona A1 na CI_{50} de 24 h. O grupo controle representa as células sem tratamento. A IFM foi determinada por citometria de fluxo após a marcação com o anticorpo anti-FasR. Os gráficos representam o resultado de um experimento de 12 h, dentre os três experimentos independentes realizados. As análises foram realizadas no citômetro de fluxo BD FACSCanto™ II (Becton Dickinson Immunocytometry Systems) e avaliadas pelo *software* *Infinicyt* versão 1.3.

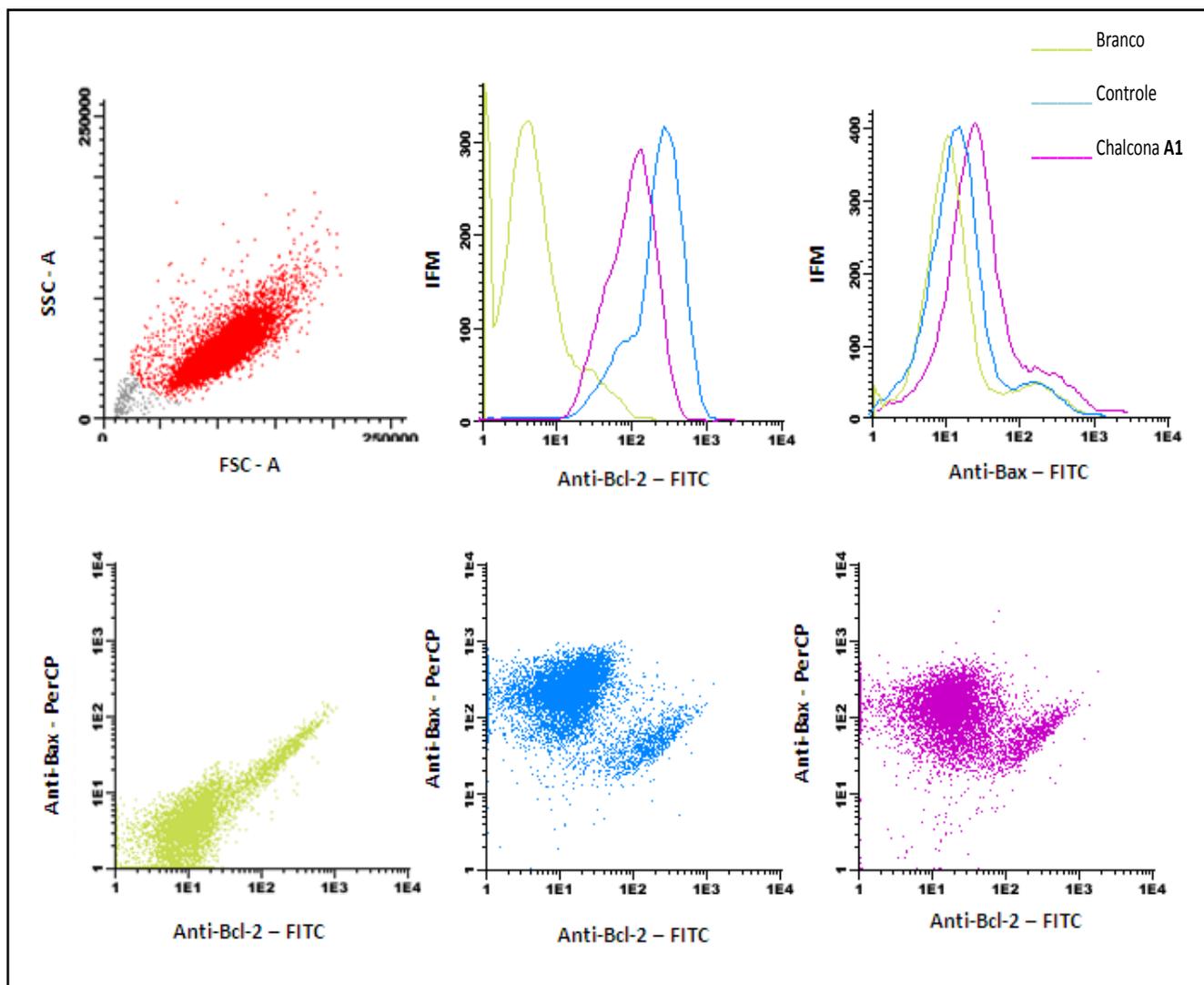


APÊNDICE B: Efeito da chalcona A1 na expressão do receptor FasR em células Jurkat.

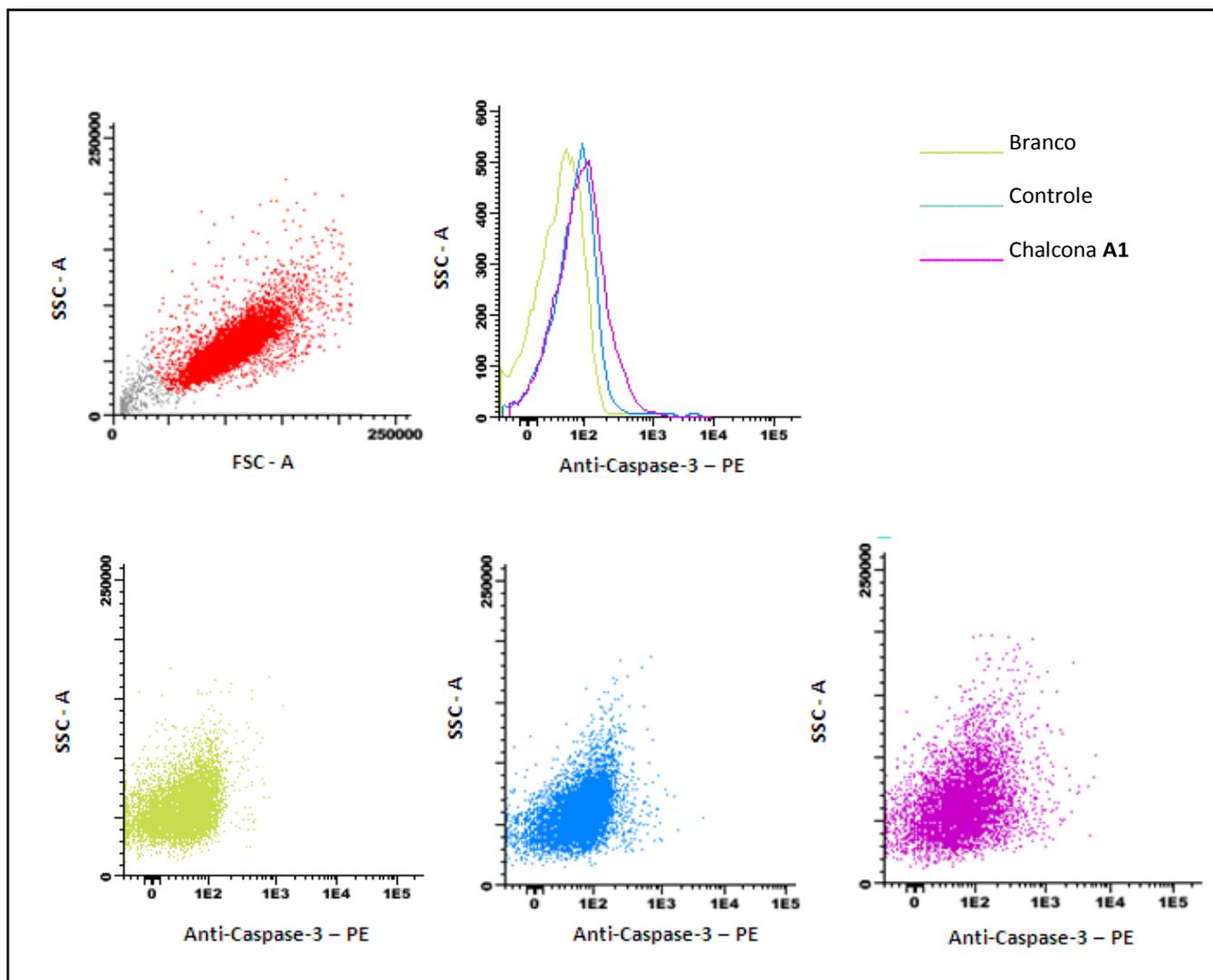
As células Jurkat (1×10^6 células/poço) foram incubadas com a chalcona A1 na CI_{50} de 24 h. O grupo controle representa as células sem tratamento. A IFM foi determinada por citometria de fluxo após a marcação com o anticorpo anti-FasR. Os gráficos representam o resultado de um experimento de 12 h, dentre os três experimentos independentes realizados. As análises foram realizadas no citômetro de fluxo BD FACSCanto™ II (Becton Dickinson Immunocytometry Systems) e avaliadas pelo *software* *Infinicyt* versão 1.3.



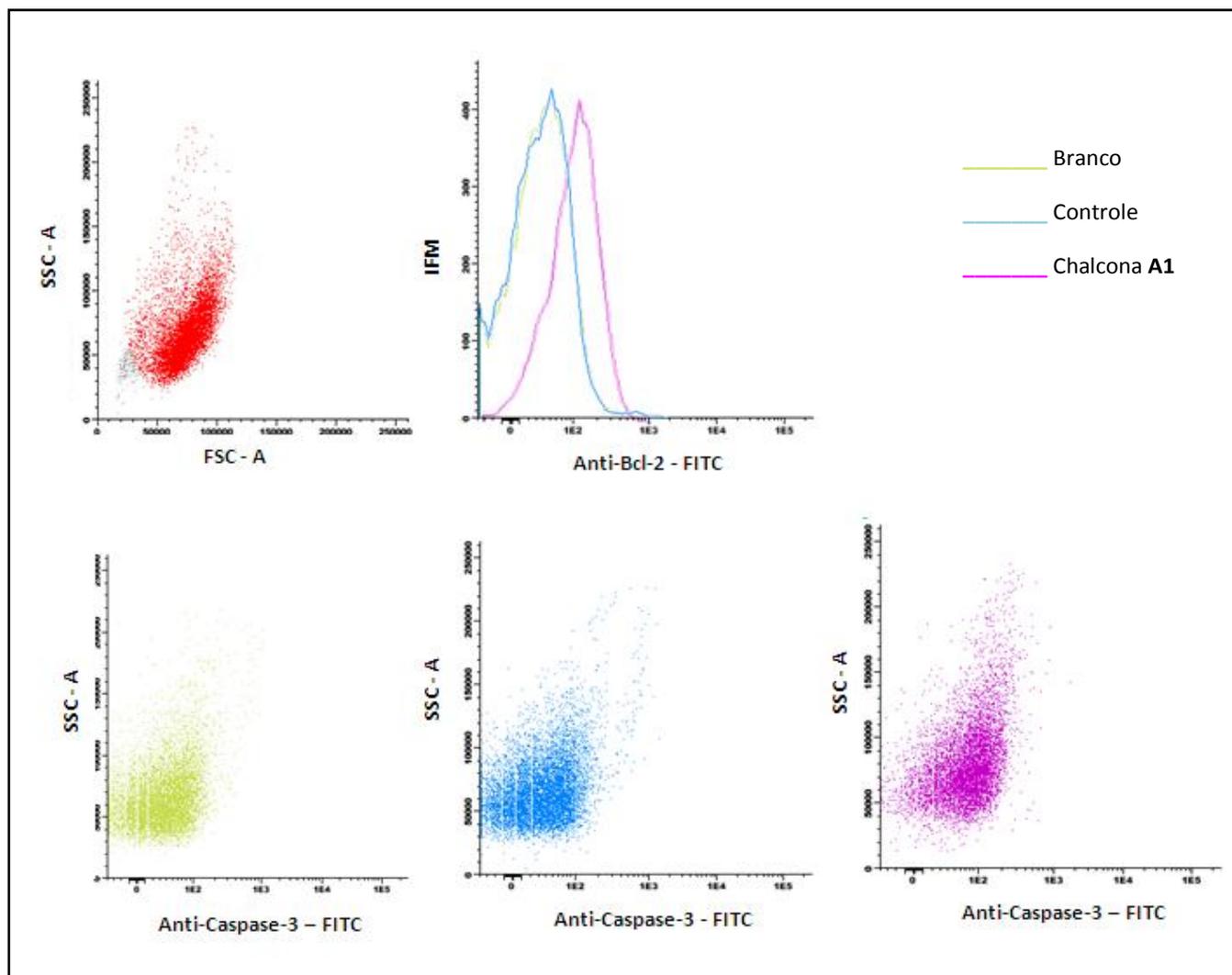
APÊNDICE C: Efeito da chalcona A1 na expressão das proteínas Bcl-2 e Bax em células K562. As células K562 (1×10^6 células/poço) foram incubadas com a chalcona A1 na CI_{50} de 24 h. O grupo controle representa as células sem tratamento. A IFM foi determinada por citometria de fluxo após a marcação com os anticorpos anti-Bcl-2 e anti-Bax. Os gráficos representam o resultado de um experimento de 12 h, dentre os três experimentos independentes realizados para cada tempo. As análises foram realizadas no citômetro de fluxo BD FACSCanto™ II (Becton Dickinson Immunocytometry Systems) e avaliadas pelo *software* *Infinicyt* versão 1.3.



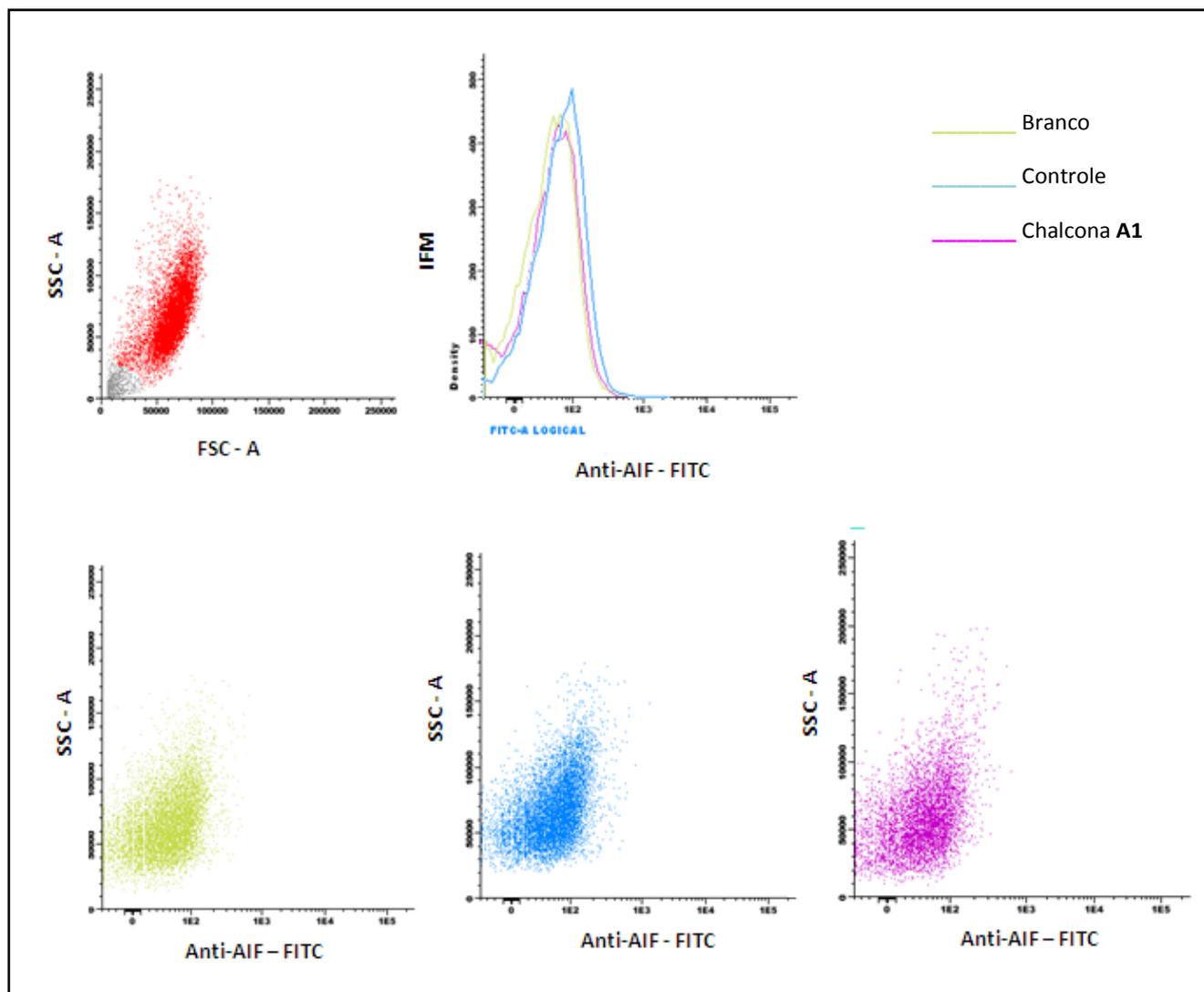
APÊNDICE D: Efeito da chalcona A1 na expressão das proteínas Bcl-2 e Bax em células Jurkat. As células Jurkat (1×10^6 células/poço) foram incubadas com a chalcona A1 na CI_{50} de 24 h. O grupo controle representa as células sem tratamento. A IFM foi determinada por citometria de fluxo após a marcação com os anticorpos anti-Bcl-2 e anti-Bax. Os gráficos representam o resultado de um experimento de 12 h, dentre os três experimentos independentes realizados para cada tempo. As análises foram realizadas no citômetro de fluxo BD FACSCanto™ II (Becton Dickinson Immunocytometry Systems) e avaliadas pelo *software* *Infinicyt* versão 1.3.



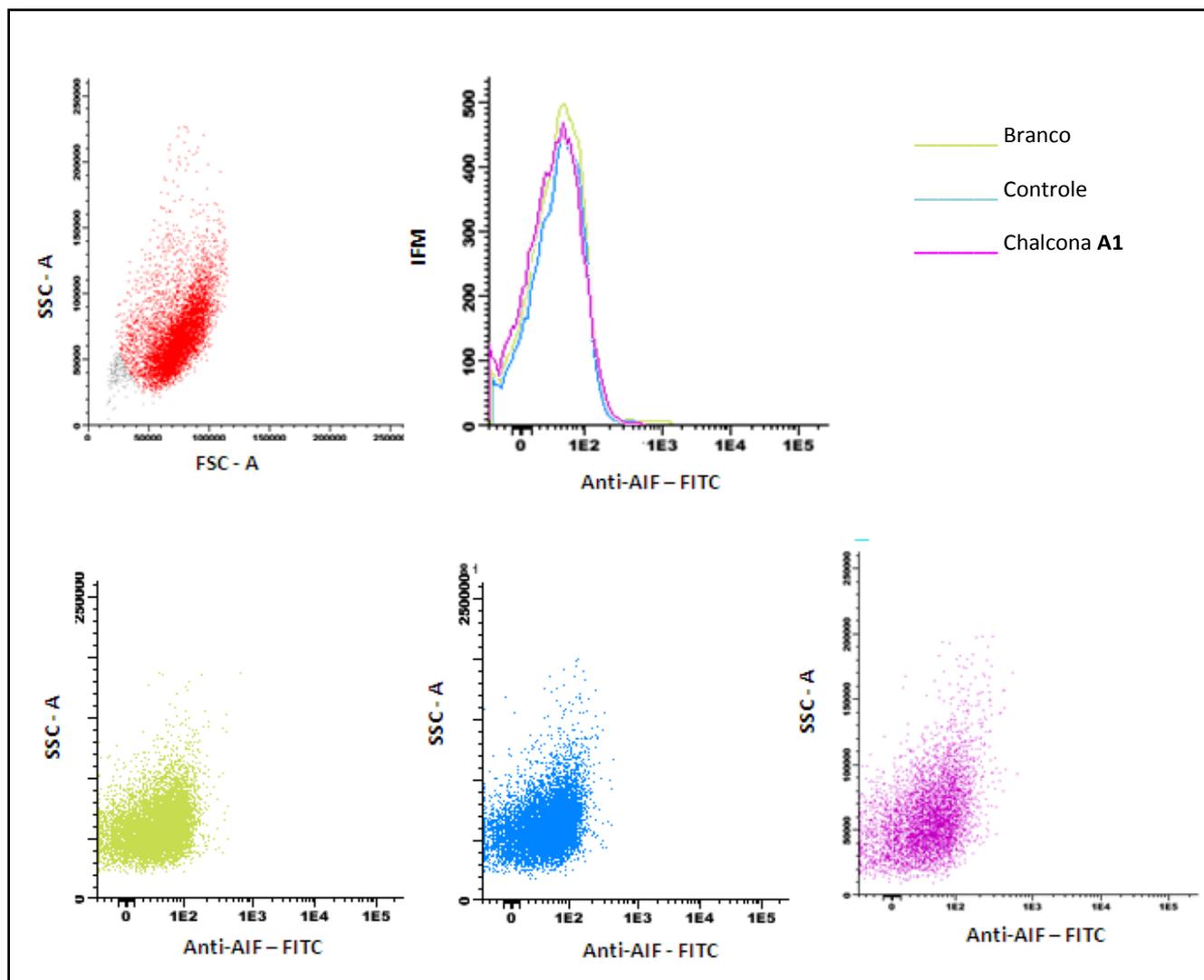
APÊNDICE E: Efeito da chalcona A1 na expressão da proteína Caspase-3 em células K562. As células K562 (1×10^6 células/poço) foram incubadas com a chalcona A1 na CI_{50} de 24 h. O grupo controle representa as células sem tratamento. A IFM foi determinada por citometria de fluxo após a marcação com o anticorpo anti-Caspase-3. Os gráficos representam o resultado de um experimento de 24 h dentre os três experimentos independentes realizados. As análises foram realizadas no citômetro de fluxo BD FACSCanto™ II (Becton Dickinson Immunocytometry Systems) e avaliadas pelo *software Infinicyt* versão 1.3.



APÊNDICE F: Efeito da chalcona A1 na expressão da proteína Caspase-3 em células Jurkat. As células Jurkat (1×10^6 células/poço) foram incubadas com a chalcona A1 na CI_{50} de 24 h. O grupo controle representa as células sem tratamento. A IFM foi determinada por citometria de fluxo após a marcação com o anticorpo anti-Caspase-3. Os gráficos representam o resultado de um experimento de 24 h dentre os três experimentos independentes realizados. As análises foram realizadas no citômetro de fluxo BD FACSCanto™ II (Becton Dickinson Immunocytometry Systems) e avaliadas pelo *software Infinicyt* versão 1.3.



APÊNDICE G: Efeito da chalcona A1 na expressão da proteína AIF em células K562. As células K562 (1×10^6 células/poço) foram incubadas com a chalcona A1 na CI_{50} de 24 h. O grupo controle representa as células sem tratamento. A IFM foi determinada por citometria de fluxo após a marcação com o anticorpo anti-AIF. Os gráficos representam o resultado de um experimento de 12 h, dentre os três experimentos independentes realizados para cada tempo. As análises foram realizadas no citômetro de fluxo BD FACSCanto™ II (Becton Dickinson Immunocytometry Systems) e avaliadas pelo *software Infinicyt* versão 1.3.



APÊNDICE H: Efeito da chalcona A1 na expressão da proteína AIF em células Jurkat.

As células Jurkat (1×10^6 células/poço) foram incubadas com a chalcona A1 na CI_{50} de 24 h. O grupo controle representa as células sem tratamento. A IFM foi determinada por citometria de fluxo após a marcação com o anticorpo anti-AIF. Os gráficos representam o resultado de um experimento de 12 h, dentre os três experimentos independentes realizados para cada tempo. As análises foram realizadas no citômetro de fluxo BD FACSCanto™ II (Becton Dickinson Immunocytometry Systems) e avaliadas pelo *software Infinicyt* versão 1.3.

APÊNDICE 2 – Trabalhos apresentados em congressos



HEMO 2011

CONGRESSO BRASILEIRO
de HEMATOLOGIA e HEMOTERAPIA

10 a 13 de novembro
SÃO PAULO - SP - BRASIL

CERTIFICADO

Certificamos que o trabalho intitulado **“Investigação da citotoxicidade de chalco-
nas sintéticas em células de leucemias agudas humanas”** de autoria de **Maioral
MF, Souza GRR, Chiaradia LD, Santos-Silva MC** foi apresentado no Congresso
Brasileiro de Hematologia e Hemoterapia, realizado no período de 10 a 13 de novembro de
2011, no Centro de Convenções Sheraton WTC, em São Paulo/SP na categoria pôster.

São Paulo, 13 de novembro de 2011.

CÁRMINO ANTONIO DE SOUZA
PRESIDENTE DA ABHH

JOSÉ ORLANDO BORDIN
PRESIDENTE DO HEMO 2011

ABHH
ASSOCIAÇÃO BRASILEIRA
de Hematologia e Hemoterapia



FeSBE 2012

Certificamos que

o trabalho 21.010 - APOPTOTIC EVENTS INDUCED BY SYNTHETIC NAPHTHYLCHALCONE ON HUMAN ACUTE LYMPHOBLASTIC LEUKEMIA CELL LINE JURKAT de autoria MAJORAL, M. F. , SOUZA, G. R. R. , CHIARADIA, L. D. , MASCARELLO, A. SANTOS-SILVA, M. C. - Universidade Federal de Santa Catarina - UFSC foi apresentado sob a forma de painel na

XXVII Reunião Anual da Federação de Sociedades de Biologia Experimental – FeSBE, realizada na cidade de Águas de Lindóia – SP, de 22 a 25 de agosto de 2012.



Comissão Organizadora



APÊNDICE 3 - Artigo Publicado
