



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

**MECANISMOS DE CITOTOXICIDADE DE CHALCONAS  
ISOLADAS E ENCAPSULADAS EM NANOPARTÍCULAS  
LIPÍDICAS SOBRE UMA LINHAGEM CELULAR DE  
LEUCEMIA LINFOBLÁSTICA AGUDA E IDENTIFICAÇÃO DE  
NOVOS INIBIDORES DA PROTEÍNA DE RESISTÊNCIA  
ABCG2**

**Evelyn Winter da Silva**

**Florianópolis – SC  
Dezembro de 2013**



**EVELYN WINTER DA SILVA**

**MECANISMOS DE CITOTOXICIDADE DE CHALCONAS  
ISOLADAS E ENCAPSULADAS EM NANOPARTÍCULAS  
LIPÍDICAS SOBRE UMA LINHAGEM CELULAR DE  
LEUCEMIA LINFOBLÁSTICA AGUDA E IDENTIFICAÇÃO DE  
NOVOS INIBIDORES DA PROTEÍNA DE RESISTÊNCIA  
ABCG2**

Tese apresentada ao programa de Pós-graduação em Farmácia da Universidade Federal de Santa Catarina, como requisito para obtenção do grau deDoutor em Farmácia. Área de concentração: **Fármacos e Medicamentos**. Linha de Pesquisa: **Investigação de produtos de origem natural, semi-sintética e sintética com potencial atividade biológica**

**Orientadora: Prof<sup>a</sup>. Dra. Tânia Beatriz Creczynski-Pasa**

**Florianópolis/SC  
2013**

Ficha de identificação da obra elaborada pelo autor,  
através do Programa de Geração Automática da Biblioteca Universitária da UFSC.

da Silva, Evelyn Winter  
MECANISMOS DE CITOTOXICIDADE DE CHALCONAS ISOLADAS E  
ENCAPSULADAS EM NANOPARTÍCULAS LIPÍDICAS SOBRE UMA  
LINHAGEM CELULAR DE LEUCEMIA LINFOBLÁSTICA AGUDA E  
IDENTIFICAÇÃO DE NOVOS INIBIDORES DA PROTEÍNA DE  
RESISTÊNCIA ABCG2 / Evelyn Winter da Silva ; orientadora,  
Tânia Beatriz Creczynski-Pasa - Florianópolis, SC, 2013.  
195 p.

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

Inclui referências

1. Farmácia. 2. Apoptose. 3. Leucemia. 4.  
Nanopartículas. 5. ABCG2. I. Creczynski-Pasa, Tânia Beatriz  
. II. Universidade Federal de Santa Catarina. Programa de  
Pós-Graduação em Farmácia. III. Título.

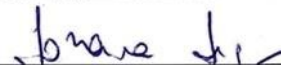
**“Mecanismos de citotoxicidade de chalconas isoladas e encapsuladas em nanopartículas lipídicas sobre uma linhagem celular de leucemia linfoblástica aguda e identificação de novos inibidores da proteína de resistência ABCG2”**

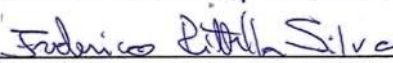
**POR**


**Evelyn Winter da Silva**

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

**Banca Examinadora:**

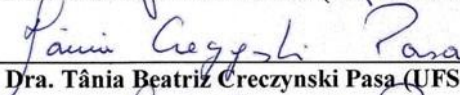
  
\_\_\_\_\_  
Prof. Dra. Ionara Rodrigues Siqueira (UFRGS – Membro Titular)

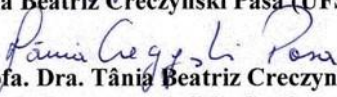
  
\_\_\_\_\_  
Prof. Dr. Frederico Pittella Silva (UFJF – Membro Titular)

  
\_\_\_\_\_  
Prof. Dra. Maíque Weber Biavatti (UFSC – Membro Titular)

  
\_\_\_\_\_  
Prof. Dr. Marcus Cesar Mandolesi Sá (UFSC – Membro Titular)

  
\_\_\_\_\_  
Prof. Dra. Andreza Fabro de Bem (UFSC – Membro Titular)

  
\_\_\_\_\_  
Prof. Dra. Tânia Beatriz Creczynski Pasa (UFSC – Orientadora)

  
Prof. Dra. Tânia Beatriz Creczynski Pasa  
Coordenadora do Programa de Pós-Graduação em Farmácia da  
UFSC

Florianópolis, 16 de dezembro de 2013.



## AGRADECIMENTOS

Uma andorinha não faz verão... uma só pessoa não é multidão... uma estrela só pode até tentar, mas não clareia o céu... Uma voz sozinha não é coral... o amor sozinho não é total... Uma nota só pode até soar, mas não é canção... Este trabalho não seria uma tese sem acolaboração de muitas pessoas.

Primeiramente minha gratidão a Deus por ser o doador e o mantenedor da minha vida.

Ao meu esposo Deiverson pelo apoio, companhia, incentivo e principalmente amor demonstrado em todos os momentos.

À minha família, em especial aos meus pais por acreditarem desde o início e investirem na minha educação. À minha irmã, vó, tios e primos que fizeram toda a diferença e estiveram presentes a 10000 Km de distância mesmo que fosse on line.

À prof.<sup>a</sup> Tânia Beatriz Creczynski Pasa por ser a minha tutora desde o início desta jornada, por todo o incentivo e confiança demonstrados a mim durante esses 7 anos de convivência. Posso dizer que me sinto praticamente uma segunda filha.

Aos colegas do laboratório (GEIMM) que já seguiram seus caminhos e aos que ainda estão presentes posso resumir meu agradecimento a vocês da seguinte forma: obrigada pela amizade de cada um individualmente. Foi com vocês que passei a maior parte dos dias e das horas nestes 4 anos.

À Prof.<sup>ta</sup> Claudriana Locatelli e ao Prof.<sup>o</sup> Celso Pilati por auxiliar no desenvolvimento dos estudos *in vivo*.

Ao Prof.<sup>o</sup> Rosendo A. Yunes, Prof.<sup>o</sup> Ricardo José Nunes e a Louise pela colaboração e síntese das chalconas utilizadas neste trabalho.

Ao Prof.<sup>o</sup> Attilio Di Pietro por me dar a maravilhosa oportunidade de morar na França e estagiar no seu laboratório durante um ano e a todos os colegas franceses que participaram da construção deste trabalho. Merci à tous!

Aos professores da banca examinadora, pela disponibilidade de fazer a avaliação desta tese.

Ao Programa de Pós Graduação em Farmácia da Universidade Federal de Santa Catarina por ter proporcionado a realização desta minha formação profissional, acadêmica e científica;

Ao CNPq, CAPES e FAPESC pelo suporte financeiro;

A todos os que de uma forma ou de outra contribuíram para que eu alcançasse este objetivo.





*“Sei que meu  
trabalho é uma gota no  
oceano mas sem ele, o  
oceano seria menor”*

Madre Teresa de Calcutá



## RESUMO

O câncer corresponde a um grupo de doenças que possuem em comum o descontrole na proliferação celular. A leucemia linfóide aguda (LLA) é uma desordem maligna causada pela proliferação de progenitores linfóides B e T e possui uma incidência maior em crianças. As chalconas são compostos intermediários essenciais para a biossíntese de flavonóides e têm demonstrado uma grande variedade de efeitos farmacológicos entre eles o efeito antitumoral. A primeira parte deste trabalho consistiu na avaliação da atividade antitumoral de três chalconas derivadas quimicamente da 2-naftilacetofenona denominadas R7, R13 e R15, em células murinas de LLA (L1210). Observou-se que as chalconas induziram apoptose nas células L1210 por diferentes mecanismos. Particularmente, as chalconas R7 e R13 induziram apoptose através das vias intrínseca e extrínseca e também como resultado de um estresse de retículo endoplasmático. A chalcona R15 induziu a apoptose através da via extrínseca e estresse de retículo endoplasmático não induzindo danos mitocondriais. Na segunda parte deste trabalho buscou-se avaliar o efeito das três chalconas encapsuladas em um sistema nanoestruturado lipídico. Um dos objetivos da encapsulação é a vetorização dos fármacos para as células tumorais melhorando a atividade antitumoral e diminuindo os efeitos adversos. Inicialmente, avaliou-se o efeito de três nanopartículas lipídicas em células não-tumorais VERO e *in vivo* utilizando camundongos, a fim de escolher o sistema mais biocompatível. A NE foi o único sistema que não induziu toxicidade *in vitro* e foi escolhida como veículo para incorporação das moléculas. As chalconas R7 e R15 encapsuladas induziram a mesma toxicidade que as moléculas livres em células de leucemia L1210. Já a encapsulação da chalcona R13 diminuiu o seu efeito antileucêmico indicando que esta molécula pode não estar sendo liberada da nanopartícula. A toxicidade das chalconas livres e encapsuladas foi avaliada em células não-tumorais (*in vitro*) e *in vivo*. Com esta avaliação, verificou-se que o encapsulamento impediu a toxicidade das chalconas em células não-tumorais VERO e *in vivo*, principalmente diminuindo a inflamação hepática induzida nos animais tratados com as chalconas livres. Os resultados portanto demonstraram que o encapsulamento não melhorou a atividade antileucêmica das chalconas, entretanto, diminuiu a respectiva toxicidade em células não tumorais. A terceira e última parte deste trabalho corresponde a avaliação de chalconas, bis-chalconas e cromonas como possíveis inibidores da proteína de resistência ABCG2. A expressão dessa proteína tanto em células de leucemia quanto em outros tumores torna essas células

resistentes aos tratamentos convencionais. Neste trabalho a cromona 4a e a bis-chalcona BC20 apresentaram alta atividade inibitória desta proteína comparando-se aos melhores inibidores já estudados e sendo potenciais compostos para ensaios clínicos.

Palavras-chave: Leucemia, Chalconas, Apoptose, Nanopartículas lipídicas, ABCG2

## ABSTRACT

Cancer is a group of several diseases that have in common the uncontrolled proliferation. Acute lymphoblastic leukemia (ALL) is a malignant disorder caused by the proliferation of lymphoid progenitor cells. Chalcones are essential intermediate compounds in the flavonoids biosynthesis in plants. They have demonstrated a great variety of pharmacological effects including antitumoral. The first part of this work shows the antileukemic activity of three chalcones 2-naphthylacetofenone derivatives. The molecules were named R7, R13 and R15 and their antitumoral activities were evaluated in L1210 cells. The chalcones induced apoptosis in L1210 cells by several mechanisms. Particularly the chalcones R7 and R13 triggered the intrinsic and extrinsic apoptosis pathways as well as the endoplasmic reticulum stress. Conversely, the chalcone R15 triggered only the extrinsic apoptosis and endoplasmic reticulum stress and had no effect on mitochondria. In the second part of this work, the toxicity of these chalcones encapsulated in lipid nanoparticles was evaluated. One of the goals of drug encapsulation is to enhance the pharmacological activity and decrease the side effects. Initially, we evaluated the cytotoxicity of three empty lipid nanoparticles in non-tumoral cells and *in vivo*, in order to choose a biocompatible system. The three kinds of nanoparticles evaluated were: solid lipid nanoparticles (NLS), composed nanoparticles (NLC) and nanoemulsion (NE). NE was the only system that did not induce toxicity *in vitro* and was chosen as the vehicle to chalcones incorporation. The encapsulated R7 and R15 induced toxicity in the same level of the free molecules in leukemia cells (L1210) and the encapsulated chalcone R13 induced lower toxicity than free R13, indicating that this molecule probably is not being released from the nanoparticles. After, the antileukemic activity and the toxicity of free and encapsulated chalcones were evaluated in non-tumoral cells (VERO) and *in vivo*. The encapsulation decreased the toxicity of chalcones in VERO cells and *in vivo*, mainly by decreasing hepatic inflammation induced by the free molecules *in vivo*. The results therefore demonstrated that the encapsulation did not improve the antileukemic activity, but reduced their toxicity to non-tumoral cells. The third and last part of this study corresponds to the evaluation of chalcones, bis-chalcones and chromones as potential inhibitors of the resistance protein ABCG2. The high expression of this protein converts these tumors resistant to conventional treatments. As a result of this work the chromone 4a and bis-chalcone BC20 showed high inhibitory activity

toward this protein. This effect is comparable with the best inhibitors that have been studied, resulting in potential compounds for clinical trials.

Keywords: Leukemia, chalcones, apoptosis, lipid nanoparticles, ABCG2

## LISTA DE FIGURAS

<b>Figura 1.</b>	Representação espacial das taxas brutas de incidência por 100 mil homens e mulheres para o ano de 2012.	<b>37</b>
<b>Figura 2.</b>	Alterações genéticas encontradas nos casos de LLA.	<b>44</b>
<b>Figura 3.</b>	Inter-relação entre via intrínseca e extrínseca da apoptose.	<b>49</b>
<b>Figura 4.</b>	Vias de sinalização do estresse de retículo.	<b>51</b>
<b>Figura 5.</b>	Estrutura das chalconas R7, R13 e R15	<b>53</b>
<b>Figura 6.</b>	Análise do tipo de morte celular induzida pelas chalconas R7, R13 e R15 na linhagem de leucemia murina L1210.	<b>63</b>
<b>Figura 7.</b>	Quantificação do tipo de morte celular induzida pelas chalconas R7, R13 e R15 na linhagem de leucemia murina L1210.	<b>64</b>
<b>Figura 8.</b>	Avaliação do efeito das chalconas R7, R13 e R15 na atividade das caspases 8 e 9 e 12 em células L1210.	<b>65</b>
<b>Figura 9.</b>	Avaliação do efeito das chalconas R7, R13 e R15 na concentração de cálcio intracelular.	<b>66</b>
<b>Figura 10.</b>	Avaliação do efeito das chalconas R7, R13 e R15 na liberação de citocromo <i>c</i> .	<b>67</b>
<b>Figura 11.</b>	Efeito das chalconas R7, R13 e R15 na expressão dos genes CHOP, p53, Fas, Bcl-2, Bak, Bax, Bid e p21.	<b>68</b>
<b>Figura 12.</b>	Representação do provável mecanismo de ação das chalconas R7 e R13.	<b>71</b>
<b>Figura 13.</b>	Representação do provável mecanismo de ação da chalcona R15.	<b>73</b>
<b>Figura 14.</b>	Efeito das chalconas R7, R13 e R15 na expressão da proteína Bcl-2.	<b>74</b>
<b>Figura 15.</b>	Efeito das chalconas R7, R13 e R15 na expressão da proteína p53.	<b>75</b>
<b>Figura 16.</b>	Efeito das chalconas R7, R13 e R15 na expressão da proteína Fas.	<b>76</b>
<b>Figura 17.</b>	Efeito das chalconas R7, R13 e R15 e do Paclitaxel no ciclo celular em células L1210.	<b>77</b>

<b>Figura 18.</b>	Representação da encapsulação de um fármaco em um sistema nanolipídico sólido (A) e um sistema nanolipídico composto (B).	<b>86</b>
<b>Figura 19.</b>	Toxicidade das nanopartículas lipídicas brancas em células não tumorais.	<b>97</b>
<b>Figura 20.</b>	Porcentagem de hemólise induzida pelas nanopartículas brancas em eritrócitos humanos.	<b>98</b>
<b>Figura 21.</b>	Avaliação histopatológica do rim, pulmão, fígado, cérebro e baço dos animais inoculados com as nanopartículas lipídicas.	<b>103</b>
<b>Figura 22.</b>	Avaliação do efeito da chalcona R7 livre e encapsulada na NLS, NLC e NE em células L1210 após 24 h de incubação.	<b>104</b>
<b>Figura 23.</b>	Avaliação do efeito da chalcona R13 livre e encapsulada na NLS, NLC e NE em células L1210 após 24 h de incubação.	<b>105</b>
<b>Figura 24.</b>	Avaliação do efeito da chalcona R13 livre e encapsulada na NE em células L1210 após 48 h de incubação.	<b>106</b>
<b>Figura 25.</b>	Avaliação do efeito da chalcona R15 livre e encapsulada na NLS, NLC e NE em células L1210 após 24 h de incubação.	<b>106</b>
<b>Figura 26.</b>	Porcentagem de hemólise causada por 10 $\mu$ M das chalconas livres, encapsuladas em eritrócitos humanos.	<b>110</b>
<b>Figura 27.</b>	Porcentagem de hemólise causada por 50 $\mu$ M das chalconas livres e encapsuladas em eritrócitos humanos.	<b>111</b>
<b>Figura 28.</b>	Avaliação histopatológica do fígado dos animais inoculados com as chalconas R7 e R15 livres e encapsuladas.	<b>118</b>
<b>Figura 29.</b>	Microscopia eletrônica de varredura de alta resolução (FEG-SEM) das A) nanopartículas lipídicas sólidas (NLS), B) compostas (NLC) e C) nanoemulsão	<b>123</b>
<b>Figura 30.</b>	Cromatograma obtido por CLAE das chalconas R7, R13 e R15	<b>125</b>
<b>Figura 31.</b>	Curvas de calibração das chalconas obtidas por CLAE e suas respectivas equações de reta.	<b>127</b>



<b>Figura 32.</b>	Cromatograma obtido por CLAE das chalconas R7, R13 e R15	<b>128</b>
<b>Figura 33.</b>	Estrutura das proteínas de resistência MRP1, ABCG2 e P-gp.	<b>132</b>
<b>Figura 34.</b>	Mecanismo de ação dos transportadores ABC.	<b>135</b>
<b>Figura 35.</b>	Estrutura do Ko143	<b>136</b>
<b>Figura 36.</b>	Estruturas das chalconas da série L e R.	<b>142</b>
<b>Figura 37.</b>	Estrutura da cromona 6g	<b>150</b>
<b>Figura 38.</b>	Estruturas das cromonas de Classe I	<b>150</b>
<b>Figura 39.</b>	Estruturas das cromonas de Classe II	<b>150</b>
<b>Figura 40.</b>	Estruturas das cromonas de Classe III	<b>151</b>
<b>Figura 41.</b>	Efeito das cromonas na atividade ATPásica.	<b>153</b>
<b>Figura 42.</b>	Mecanismo de ação dos Inibidores Bloqueadores, Inibidores como Substratos e do Inibidores Intermediários.	<b>157</b>
<b>Figura 43.</b>	Estrutura das bis-chalconas da série PM e BC.	<b>161</b>
<b>Figura 44.</b>	Efeito das bis-chalconas na atividade ATPásica.	<b>167</b>
<b>Figura 45.</b>	Efeito sobre a atividade ATPásica de BC20 associada a cromona 6g.	<b>169</b>



## LISTA DE TABELAS

<b>Tabela 1.</b>	Oligonucleotídeos utilizados na reação de qPCR	<b>59</b>
<b>Tabela 2.</b>	Composição das nanopartículas lipídicas	<b>88</b>
<b>Tabela 3.</b>	Grupos de animais tratados com as chalconas livres e encapsuladas e com as nanopartículas brancas	<b>91</b>
<b>Tabela 4.</b>	Avaliação do peso dos animais durante o tratamento com as nanopartículas lipídicas	<b>99</b>
<b>Tabela 5.</b>	Avaliação do peso dos órgãos após 14 dias de tratamento com as nanopartículas lipídicas	<b>99</b>
<b>Tabela 6.</b>	Avaliação dos parâmetros bioquímicos após 14 dias de tratamento com as nanopartículas lipídicas	<b>100</b>
<b>Tabela 7.</b>	Avaliação dos parâmetros hematológicos após 14 dias de tratamento com as nanopartículas lipídicas	<b>101</b>
<b>Tabela 8.</b>	Avaliação do estresse oxidativo hepático após 14 dias de tratamento com as nanopartículas lipídicas	<b>102</b>
<b>Tabela 9.</b>	Valores de ASC da citotoxicidade induzida pelas chalconas R7, R13 e R15 livres ou encapsuladas em células de leucemia L1210 e de epitélio renal VERO.	<b>109</b>
<b>Tabela 10.</b>	Avaliação do peso dos animais durante o tratamento com as chalconas livres	<b>112</b>
<b>Tabela 11.</b>	Avaliação do peso dos animais durante o tratamento com as chalconas encapsuladas	<b>112</b>
<b>Tabela 12.</b>	Avaliação do peso dos órgãos após 14 dias de tratamento com as chalconas livres	<b>113</b>
<b>Tabela 13.</b>	Avaliação do peso dos órgãos após 14 dias de tratamento com as chalconas encapsuladas	<b>113</b>
<b>Tabela 14.</b>	Avaliação dos parâmetros bioquímicos após 14 dias de tratamento com as chalconas livres.	<b>114</b>
<b>Tabela 15.</b>	Avaliação dos parâmetros bioquímicos após 14 dias de tratamento com as chalconas encapsuladas	<b>115</b>
<b>Tabela 16.</b>	Avaliação dos parâmetros hematológicos após 14 dias de tratamento com as chalconas livres	<b>116</b>
<b>Tabela 17.</b>	Avaliação dos parâmetros hematológicos após 14 dias de tratamento com as chalconas encapsuladas	<b>116</b>
<b>Tabela 18.</b>	Avaliação do estresse oxidativo hepático após 14 dias de tratamento com as chalconas livres	<b>117</b>
<b>Tabela 19.</b>	Avaliação do estresse oxidativo hepático após 14 dias de tratamento com as chalconas encapsuladas	<b>117</b>

<b>Tabela 20.</b>	Tamanho de partícula, índice de polidispersão e valores de potencial zeta dos 3 sistemas nanoestruturados lipídicos com/sem chalcona encapsulada.	<b>122</b>
<b>Tabela 21.</b>	Teor total (TT) das chalconas encapsuladas e eficiência de encapsulação (EE).	<b>121</b>
<b>Tabela 22.</b>	Fármacos transportados pelas proteínas de resitência ABCB1, ABCC1 e ABCG2.	<b>133</b>
<b>Tabela 23.</b>	Efeito de chalconas (5µM) pertencentes a série L e R sobre a inibição da proteína ABCG2 em células HEK293/ABCG2.	<b>143</b>
<b>Tabela 24.</b>	Efeito das chalconas (5µM) das séries N, C e P sobre a inibição da proteína ABCG2 em células HEK293/ABCG2.	<b>145</b>
<b>Tabela 25.</b>	Efeito de duas séries de chalconas (5µM) sobre a inibição da proteína ABCG2 em células HEK293/ABCG2.	<b>147</b>
<b>Tabela 26.</b>	Comparação do efeito de chalconas (5µM) contendo metoxilas no anel B (série L e R) e chalconas contendo metoxilas no anel A (série P e C) sobre a inibição da proteína ABCG2 em células HEK293/ABCG2.	<b>148</b>
<b>Tabela 27.</b>	Efeito de cromonas sobre a inibição da proteína ABCG2 em células HEK293 transfectadas e H460 selecionadas à mitoxantrona.	<b>152</b>
<b>Tabela 28.</b>	Porcentagem de ligação do anticorpo anti-ABCG2 (5D3) após incubação com 2 e 5µM das cromonas	<b>155</b>
<b>Tabela 29.</b>	Efeito das cromonas 6g e 4a sobre a inibição da proteína ABCG2 em células tumorais resistentes.	<b>158</b>
<b>Tabela 30.</b>	Efeito das cromonas sobre a inibição das proteínas MRP1 e MDR1 em células tumorais resistentes.	<b>159</b>
<b>Tabela 31.</b>	Citotoxicidade e Índice Terapêutico (IT) das cromonas em células HEK293/ <i>pcDNA3.1</i>	<b>160</b>
<b>Tabela 32.</b>	Efeito das bis-chalconas da série PM e BC na inibição de ABCG2	<b>162</b>
<b>Tabela 33.</b>	Valores de CC <sub>50</sub> de citotoxicidade e índice terapêutico (IT) induzidos pelas bis-chalconas BC20 e PM9	<b>164</b>
<b>Tabela 34.</b>	Citotoxicidade da mitoxantrona isolada e associada as bis-chalconas BC20 e PM9 em células HEK293/ABCG2	<b>165</b>

<b>Tabela 35.</b>	Efeito das bis-chalconas BC20 e PM9 sobre a inibição da proteína ABCG2 em células tumorais resistentes.	<b>166</b>
<b>Tabela 36.</b>	Porcentagem de ligação do anticorpo anti-ABCG2 (5D3) após incubação com 2 $\mu$ M de BC20 e PM9	<b>168</b>



## LISTA DE ABREVIATURAS

ABCG2	ATP-binding cassette, subfamily-G, member 2
ABCP	Placenta-specific ATP-binding cassette
Ac-DEVD-AMC	Acetil-asp-glu-val-asp-amino metil cumarina
Ac- LEHD-AFC	N-acetil-Leu-His-Asp 7- amido-4- trifluorometilcumarina
Ac-IETD-AMC	N-acetil-Ile-Glu-Thr-Asp-7-amino-4- metil cumarina
APAF-1	Fator ativador de proteases – 1
ALT	Alanina aminotransferase
AST	Aspartato aminotransferase
AMC	Amino metil cumarina
ATP	Adenosina trifosfato
ANOVA	Análise de Variância
ASC	Área sobre a Curva
ATCC	American Type Culture Cell
BCL-2	B-cell lymphoma 2
BCRP	Breast câncer resistance protein
BSA	Albumina Sérica Bovina
CDKs	Quinases Dependentes de Ciclinas
CKIs	Inibidoras de Quinases Dependentes de Ciclina
cDNA	DNA complementar
CLAE	Cromatografia Líquida de Alta Eficiência
CDB	Convenção da Diversidade Biológica
CDNB	1-cloro-2,4-dinitrobenzeno
CHAPS	3-[(3-cholamidopropyl)-dimethyl-ammonio]-1propanesulfonate
CHCM	Concentração da hemoglobina corpuscular média
CO <sub>2</sub>	Dióxido de carbono
CC <sub>50</sub>	Concentração citotóxica para 50% das células
DCF	Diclorofluoresceína oxidada
DCFH	Diclorofluoresceína reduzida
DCFH-DA	Diacetato de Diclorofluoresceína
DEPC	Dietilpirocarbonato
DNA	Ácido desoxirribonucléico
DMEM	Meio de Cultura Eagle's Modificado
DMSO	Dimetilsulfóxido
DP	Desvio Padrão
DPTA	Ácido dietilenotriaminopentacético
DTNB	Ácido 5,5-ditiobis 2-nitrobenzóico
DTT	Ditiotreitol
DPR	Desvio Padrão Relativo
EC <sub>50</sub>	Concentração necessária para gerar 50% de um efeito máximo
EROs	Espécies reativas de oxigênio
EDTA	Ácido etilenodiaminotetracético
EGTA	Ácido etilenoglicoltetracético
EE	Eficiência de Encapsulação
EPM	Erro Padrão da Média
EROS	Espécies reativas de oxigênio

FAAD	Proteína adaptadora associada à proteína Fas
FITC	Isotiocianato de Fluoresceína
FTC	Fumitremorgina C
GAPDH	Gliceraldeído-3-fosfato desidrogenase
GPx	Glutaciona peroxidase
GF120918	Elacridar
GSH	Glutaciona reduzida
GR	Glutaciona redutase
GST	Glutaciona S-transferase
HCM	Hemoglobina corpuscular média
H23	Linhagem celular de adenocarcinoma de pulmão de células não-pequenas
HEK293	Linhagem de células embrionárias de rim humano
H460	Linhagem celular de carcinoma de pulmão de células grandes
HEPES	Ácido 2-[4-(2-hidroxietil)1-piperazinil]-etanosulfônico
HBSS	Hank's Buffered Salt Solution
IAPs	Proteínas inibidoras de apoptose
IP	Iodeto de Propídio
IT	Índice terapêutico
Ko143	Inibidor da proteína ABCG2
L1210	Linhagem de leucemia linfóide aguda murina
LLA	Leucemia linfóide aguda
LDL	Lipoproteína de Baixa Densidade
MEG	Monoestearato de Glicerila
MDR	Multidrur resistance
MDR1	Proteína de resistência
MRP1	Proteína de resistência
MTT	3-(4,5-dimethyl-2-thiazolyl)-2,5-diphenyl-2H-tetrazolium bromide
MX	Mitoxantrone
NADPH	Dinucleotídeo de nicotinamida e adenine fosfato reduzido
NBD	Sítio de ligação de nucleotídeos
NIH-3T3	Linhagem celular de fibroblasto murino
NLS	Nanopartícula Lipídica Sólida
NLC	Nanopartícula Lipídica Composta
NE	Nanoemulsão
OMS	Organização Mundial da Saúde
PANC-1	Células de carcinoma de pâncreas
PBS	Tampão Fosfato Salino
PDI	Índice de Polidispersão
P-gp	Glicoproteína P
PZ	Potencial Zeta
PCR	Reação em Cadeia da Polimerase
qPCR	Reação em Cadeia da Polimerase Quantitativa
SNC	Sistema Nervoso Central
SMAC	Ativador secundário de caspases derivado da mitocôndria
SF295	Linhagem celular de glioma humano



SBF	Soro bovino fetal
RNA	Ácido Ribonucléico
mRNA	Ácido Ribonucléico Mensageiro
TNF	Fator de necrose tumoral
TA	Temperatura Ambiente
TBARS	Substâncias que reagem com o ácido tiobarbitúrico
TNB	Ânion tiolato
TWEEN 80	Polissorbato 80
UV	Ultravioleta
VERO	Linhagem Celular de Epitélio Renal de Macaco
VCM	Volume corpuscular médio
5D3	Anticorpo anti-ABCG2 humano



## SUMÁRIO

<b>INTRODUÇÃO GERAL</b>	<b>37</b>
<b>CAPÍTULO 1 – AVALIAÇÃO DA CITOTOXICIDADE DE CHALCONAS NA LINHAGEM DE LEUCEMIA L1210.</b>	<b>39</b>
<b>1. INTRODUÇÃO</b>	<b>41</b>
1.1. Aspectos gerais do câncer	41
1.2. Leucemias	42
1.3. Leucemia linfóide aguda	42
1.4. Morte celular	45
1.4.1. Via intrínseca da apoptose	47
1.4.2. Via extrínseca da apoptose	48
1.4.3. Apoptose induzida pelo retículo endoplasmático	50
1.5 Produtos naturais e desenvolvimento de novos fármacos	52
<b>2. MATERIAIS E MÉTODOS</b>	<b>54</b>
2.1. Reagentes	54
2.2. Síntese das chalconas	54
2.3. Cultura celular	55
2.4. Tratamento celular	55

2.5. Análise da apoptose e/ou necrose pelo método da anexina-v/ iodeto de propídio	55
2.6. Avaliação da atividade das caspases	56
2.7. Determinação da concentração de cálcio intracelular	57
2.8. Determinação da liberação de citocromo <i>c</i> no citosol	57
2.9. Extração de RNA	58
2.10. Síntese de cDNA	58
2.11. Curva de eficiência da reação de PCR	59
2.12. Reação em cadeia da polimerase em tempo real (qPCR)	59
2.13. Análise da expressão de proteínas por citometria de fluxo	60
2.14. Avaliação do ciclo celular	60
2.15. Análise estatística	61
<b>3. RESULTADOS E DISCUSSÃO</b>	<b>62</b>
3.1. Morte celular induzida pelas chalconas em células de leucemia murina (L1210)	62
3.2. Avaliação da atividade das caspases 3, 8, 9 e 12	64
3.3. Avaliação da concentração de cálcio intracelular	66
3.4. Avaliação da liberação de citocromo <i>c</i> no citosol	67
3.5. Avaliação da expressão gênica por pcr quantitativo	67

3.5.1. Curvas de eficiência	67
3.5.2. Quantificação relativa dos genes estudados	68
3.6. Análise da expressão das proteínas Bcl-2, p53 e Fas por citometria de fluxo	73
3.7. Efeito das chalconas no ciclo celular	76
<b>4. CONCLUSÕES</b>	<b>78</b>
<b>5. PERSPECTIVAS</b>	<b>78</b>
<b>ANEXO A - ARTIGO SUBMETIDO</b>	<b>79</b>
<b>APÊNDICE A – Gráficos das Curvas de Eficiência dos Oligonucleotídeos</b>	<b>80</b>
<b>APÊNDICE B – Eficiência dos oligonucleotídeos (%).</b>	<b>81</b>
<b>APÊNDICE C – Histogramas dos experimentos de ciclo celular após 12 h de incubação</b>	<b>82</b>
<b>CAPÍTULO 2 – ENCAPSULAÇÃO DAS CHALCONAS EM SISTEMAS NANOESTRUTURADOS LIPÍDICOS E AVALIAÇÃO DA EFICÁCIA ANTITUMORAL E DA TOXICIDADE DAS CHALCONAS LIVRES E ENCAPSULADAS</b>	<b>83</b>
<b>1. INTRODUÇÃO</b>	<b>84</b>
<b>2. MATERIAIS E MÉTODOS</b>	<b>88</b>
2.1. Reagentes	88

2.2. Formulação das nanopartículas lipídicas	88
2.3. Cultura celular	89
2.4. Tratamento celular das linhagens celulares com as chalconas livres, encapsuladas e com os sistemas nanosestruturados brancos	89
2.5. Ensaio de viabilidade celular	90
2.6. Determinação da hemólise	90
2.7. Estudos <i>in vivo</i>	90
2.8. Animais	91
2.9. Tratamentos	91
2.10. Parâmetros de toxicidade	92
2.11. Determinação de espécies reativas de oxigênio	93
2.12. Lipoperoxidação	93
2.13. Determinação de glutatona	94
2.14. Atividades enzimáticas	94
2.15. Avaliação histopatológica	94
2.16. Análise estatística	95
<b>3. RESULTADOS E DISCUSSÃO</b>	<b>96</b>
3.1. AVALIAÇÃO DA CITOTOXICIDADE DAS NANOPARTÍCULAS BRANCAS <i>IN VITRO</i> E <i>IN VIVO</i>	96

3.1.1. Testes <i>in vitro</i>	96
3.1.1.1. Citotoxicidade das nanopartículas lipídicas brancas em células não tumorais de epitélio renal (vero)	96
3.1.1.2. Avaliação da hemólise induzida pelas nanopartículas lipídicas brancas	97
3.1.2. Testes <i>in vivo</i>	98
3.1.2.1 Avaliação de peso	98
3.1.2.2. Avaliação do peso dos órgãos	99
3.1.2.3. Avaliação dos parâmetros bioquímicos séricos	100
3.1.2.4. Avaliação dos parâmetros hematológicos	100
3.1.2.5. Avaliação do estresse oxidativo hepático	101
3.1.2.6. Análises histopatológicas	102
3.2. AVALIAÇÃO DO EFEITO ANTITUMORAL DAS CHALCONAS LIVRES E ENCAPSULADAS <i>IN VITRO</i>	103
3.3. AVALIAÇÃO DO EFEITO CITOTÓXICO DAS CHALCONAS LIVRES E ENCAPSULADAS <i>IN VITRO</i> E <i>IN VIVO</i>	108
3.3.1. Testes <i>in vitro</i>	108
3.3.1.1. Hemólise	110
3.3.2. Testes <i>in vivo</i>	111
3.3.2.1. Avaliação do peso	112

3.3.2.2. Avaliação do peso dos órgãos	113
3.3.2.3. Avaliação dos parâmetros bioquímicos séricos	114
3.3.2.4. Avaliação dos parâmetros hematológicos	115
3.3.2.5. Avaliação do estresse oxidativo hepático	116
3.3.2.6. Análises histopatológicas	117
<b>4. CONCLUSÕES</b>	<b>119</b>
<b>5. PERSPECTIVAS</b>	<b>119</b>
<b>ANEXO A - ARTIGO A SER SUBMETIDO</b>	<b>120</b>
<b>APÊNDICE A – SÍNTESE E CARACTERIZAÇÃO DAS NANOPARTÍCULAS LIPÍDICAS</b>	<b>121</b>
<b>CAPÍTULO 3 – IDENTIFICAÇÃO DE NOVOS INIBIDORES DA PROTEÍNA DE RESISTÊNCIA ABCG2</b>	<b>130</b>
<b>1. INTRODUÇÃO</b>	<b>131</b>
<b>2. MATERIAIS E MÉTODOS</b>	<b>138</b>
2.1. Reagentes	138
2.2. Compostos	138
2.3. Células	138
2.4. Avaliação da atividade inibitória de ABCG2	139



2.5. Viabilidade celular	140
2.6. Avaliação da atividade atpásica de ABCG2	140
2.7. Avaliação da ligação do anticorpo anti-ABCG2 (5D3)	140
2.8. Análise estatística	141
<b>3. RESULTADOS E DISCUSSÃO</b>	<b>142</b>
3.1 Chalconas	142
3.1.1. Efeito de chalconas como inibidores da proteína ABCG2	142
3.2. Cromonas	149
3.2.1. Efeito de cromonas como inibidores da proteína ABCG2	149
3.2.2. Efeito de cromonas na atividade ATPásica	153
3.2.3. Efeito de cromonas na ligação do anticorpo anti-ABCG2 clone 5D3	155
3.2.4. Efeito das cromonas 6g e 4a em linhagens tumorais resistentes a mitoxantrona	158
3.2.5. Efeito de cromonas como inibidores da proteína P-gp e MRP1	158
3.2.6. Citotoxicidade das cromonas	160
3.3. Bis-chalconas	161
3.3.1. Efeito de bis-chalconas como inibidores da proteína ABCG2	161
3.3.2. Citotoxicidade das bis-chalconas BC20 e PM9 em células normais	164

3.3.3. Efeito das bis-chalconas na sensibilização de células HEK293 resistentes a mitoxantrona	165
3.3.4. Efeito das bis-chalconas BC20 e PM9 em linhagens tumorais resistente a mitoxantrona	165
3.3.5. Efeito das bis-chalconas BC20 e PM9 na atividade ATPásica	166
3.3.6. Efeito das bis-chalconas BC20 e PM9 na ligação do anticorpo anti-ABCG2 clone 5D3	167
3.3.7. Efeito da bis-chalcona BC20 em associação com a cromona 6g	168
<b>4. CONCLUSÕES</b>	<b>170</b>
<b>5. PERSPECTIVAS</b>	<b>170</b>
<b>ANEXO A</b> -Artigo publicado na “Drug Design, Development And Therapy” como co-primeira autora.	<b>171</b>
<b>ANEXO B</b> - Revisão publicada na “Future Medicinal Chemistry” como co-autora.	<b>172</b>
<b>ANEXO C</b> – Artigo publicado na revista Journal of Medicinal Chemistry	<b>173</b>
<b>ANEXO D</b> – Artigo submetido para a revista: Drug Design, Development And Therapy	<b>174</b>
<b>ANEXO E</b> – Artigo a ser submetido para a revista: Journal of Medicinal Chemistry	<b>175</b>
<b>REFERÊNCIAS</b>	<b>176</b>

## **OBJETIVOS GERAIS**

- Estudar os mecanismos de citotoxicidade de três chalconas sintéticas (R7, R13 e R15) livres e nanoencapsuladas sobre a linhagem celular de leucemia linfoblástica aguda murina (L1210).
- Estudar novos inibidores da proteína de resistência ABCG2.

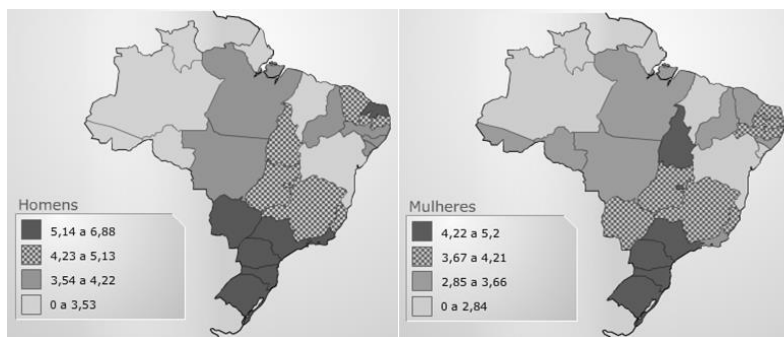
## **OBJETIVOS ESPECÍFICOS**

- Avaliar o tipo de morte celular induzida pelas chalconas R7, R13 e R15 livres e o respectivo mecanismo de morte através da análise de fatores anti e pró-apoptóticos, da atividade das caspases e ciclo celular;
- Avaliar a toxicidade em células não tumorais e *in vivo* de três sistemas nanoestruturados lipídicos;
- Avaliar a toxicidade das chalconas encapsuladas no melhor sistema nanoestruturado lipídico em células de leucemia L1210, bem como a toxicidade em células não tumorais e *in vivo*;
- Testar o efeito de chalconas, cromonas e bis-chalconas quanto a inibição da atividade da ABCG2;



## INTRODUÇÃO GERAL

Câncer é um termo genérico para um grupo de doenças que podem afetar uma ou mais partes do corpo. É caracterizado pelo rápido crescimento e por poder invadir órgãos ou partes do corpo adjacentes ao foco inicial (WHO, 2011). As leucemias são neoplasias malignas de origem mesenquimal que se caracterizam pela proliferação descontrolada de células na medula óssea e a leucemia linfóide aguda é o tipo mais comum em crianças (BURKE; STARTZELL, 2008). Entre 1979 e 2008, Santa Catarina foi o quarto estado com mais casos de leucemia do sexo feminino e o quinto com mais casos do sexo masculino (BRASIL, 2011b). Como característica geral, nota-se que as taxas de mortalidade para todos os tipos de câncer são mais altas nas regiões Sul e Sudeste (WÜNSCH-FILHO; MONCAU, 2002). Para o Brasil estimativas do ano de 2012, válidas também para o ano de 2013, indicaram cerca de 4570 novos casos de leucemia em homens e 3940 em mulheres (BRASIL, 2011a) (Figura 1).



**Figura 1: Representação espacial das taxas brutas de incidência por 100 mil homens e mulheres para o ano de 2012.**

**Fonte: BRASIL, 2011a**

As taxas de recidivas relacionadas a leucemia linfóide aguda são de 25% e 50% para crianças e para adultos respectivamente e muitos pacientes desenvolvem sérias complicações agudas e tardias, em consequência dos efeitos colaterais dos tratamentos (ONCIU, 2009; DILLER, 2011). Os produtos naturais têm sido fonte de muitos compostos ativos na medicina. Mais de 80% dos fármacos hoje utilizados são produtos naturais ou foram inspirados nos mesmos principalmente na área oncológica (HARVEY, 2008). Diante deste cenário, neste trabalho

de doutorado avaliou-se o potencial citotóxico de três chalconas em uma linhagem de leucemia linfoblástica aguda (L1210). No primeiro capítulo foi apresentado o mecanismo de morte celular induzido por estas chalconas.

Além da busca de novos fármacos para o tratamento do câncer, tem buscado-se novas tecnologias que possam diminuir os efeitos indesejáveis da quimioterapia. Desta forma a nanotecnologia tem propiciado estratégias que melhoram a utilização de fármacos pouco solúveis, tem sido utilizada para vetorizar os fármacos para as células de interesse entre outros benefícios (KAWASAKI; PLAYER, 2005; YEZHELYEV et al., 2006). No segundo capítulo apresenta-se o efeito das três chalconas, agora encapsuladas em um sistema nanoestruturado lipídico. Inicialmente avaliou-se o efeito de três nanopartículas lipídicas brancas e determinou-se o sistema mais biocompatível para o encapsulamento. As chalconas foram encapsuladas no sistema biocompatível e as respectivas atividades antileucêmicas foram comparadas às ações das moléculas livres em células L1210, assim como a toxicidade em células não tumorais e *in vivo*.

Além dos diversos efeitos colaterais encontrados na quimioterápica atual, um dos maiores obstáculos para os tratamentos não só das leucemias mas de um grande número de tumores é o fenômeno conhecido como “multidrug resistance” ou MDR (GOTTESMAN, 2002; GOTTESMAN et al., 2009). Uma das estratégias para diminuir a resistência tumoral é o bloqueio de proteínas localizadas nas membranas celulares que funcionam como bombas de efluxo de drogas. No terceiro capítulo deste trabalho, apresenta-se a avaliação de três classes de compostos derivados de produtos naturais: chalconas, bis-chalconas e cromonas quanto as respectivas capacidades inibitórias da proteína de resistência, ou da bomba de efluxo, ABCG2.

Sendo assim, este trabalho de doutorado esta dividido em três capítulos abordando os temas acima mencionados. Cada capítulo está subdividido em introdução contendo a revisão bibliográfica, materias e métodos assim como resultados, discussão e conclusão.

CAPÍTULO 1 – AVALIAÇÃO  
DA CITOTOXICIDADE DE  
CHALCONAS NA  
LINHAGEM DE LEUCEMIA  
L1210.





## 1. INTRODUÇÃO

### 1.1. Aspectos gerais do câncer

O câncer é a principal causa de morte em muitos países, sendo que cerca de 7,6 milhões de pessoas morreram de câncer em 2008 e estimativas prevêem 13 milhões de mortes em 2030 (WHO, 2011).

Apesar de muitos tumores resultarem de alterações celulares hereditárias, a maioria dos casos (cerca de 80%) está relacionada ao meio ambiente, onde encontra-se um grande número de fatores de risco (ALMEIDA et al., 2005). Os principais fatores externos envolvidos são: radiação ultravioleta e ionizante, produtos químicos como asbesto, aflatoxinas, arsênio, componentes do tabaco, alguns vírus, bactérias e parasitas (WHO, 2011).

De acordo com um estudo realizado por Danaei (2005) cerca de 40% dos casos de câncer poderiam ser prevenidos. Os principais fatores de risco envolvidos no desenvolvimento do câncer são: uso do tabaco (21%), álcool (5%), obesidade (2%), sedentarismo (2%), poluição do ar (1%), sexo não seguro (3%) e dieta (5%). Para os casos de leucemia em pacientes acima de 30 anos o principal fator de risco envolvido é o uso do tabaco.

O desenvolvimento do câncer envolve múltiplos estágios que levam a transformação de uma célula normal em uma célula maligna. No **estágio de iniciação**, as células normais sofrem o efeito de um agente carcinogênico levando a uma alteração em algum de seus genes. As células geneticamente alteradas podem sofrer a ação de agentes oncopromotores que irão lentamente transformar as células normais em malignas, caracterizando o **estágio de promoção**. No último estágio (**progressão**) ocorre a multiplicação descontrolada das células malignas (ALMEIDA et al., 2005).

Segundo Hanahan e Weinberg (2011) os tumores apresentam basicamente dez alterações fisiológicas: auto-suficiência para sinais de proliferação, insensibilidade a sinais inibitórios de proliferação, evasão da morte celular programada, potencial de replicação ilimitado, angiogênese sustentada, invasão de tecidos ou metástase, evasão da destruição pelo sistema imune, instabilidade genômica, desregulação do metabolismo energético celular e ativação da inflamação pelo sistema imune inato.

## **1.2. Leucemias**

As leucemias são neoplasias malignas de origem mesenquimal que se caracterizam pela proliferação anormal de células na medula óssea. Todas as células sanguíneas se desenvolvem a partir de uma célula tronco pluripotente que pode se diferenciar em um precursor mielóide ou linfóide. As células mielóides que são formadas na medula óssea são os eritrócitos, basófilos, eosinófilos, plaquetas, polimorfonucleares e macrófagos. Já as células linfóides (linfócitos B e T e células NK) são formadas nos tecidos linfáticos (BURKE; STARTZELL, 2008).

As leucemias são classificadas segundo o tipo celular envolvido e o estado de maturação das células leucêmicas. As leucemias agudas caracterizam-se pela presença de células imaturas (linfoblastos ou mieloblastos) as quais são incapazes de se diferenciar nos diversos tipos celulares presentes no sangue. É também caracterizada por uma evolução rápida e fatal em pacientes não tratados. A incidência da leucemia linfóide aguda é maior em crianças e aumenta com a idade na leucemia mielóide aguda. As leucemias crônicas estão associadas a uma proliferação excessiva de células linfóides ou mielóides diferenciadas que podem apresentar uma morfologia anormal. As leucemias crônicas atingem mais pacientes adultos e idosos e apresentam uma evolução lenta (BURKE; STARTZEK, 2008; FADERL; JEHA; KANTARJIAN 2003; ROBAK; WIERZBOWSKA, 2009).

### **1.3. Leucemia linfóide aguda**

A LLA é uma desordem maligna causada pela proliferação de progenitores de linfócitos B e T (linfoblastos) derivados da medula óssea. O acúmulo de alterações genéticas nos progenitores tem como consequência o bloqueio da diferenciação e o aumento da proliferação celular. Os linfoblastos substituem os elementos normais da medula óssea gerando uma diminuição da celularidade normal (GRAUX, 2011). Os linfoblastos podem também se infiltrar no fígado, baço, linfonodos, timo, meninges, gônadas e o SNC (ONCIU, 2009).

Os fatores de risco associados ao desenvolvimento de LLA incluem radiação ionizante, agentes quimioterápicos, pesticidas e mais recentemente foram encontradas evidências da relação entre o desenvolvimento de LLA e infecções adquiridas (RICHARDSON, 2011; GREAVES, 2006).

A LLA tem um pico de incidência entre crianças de até cinco anos representando a desordem maligna mais comum na infância e cerca de

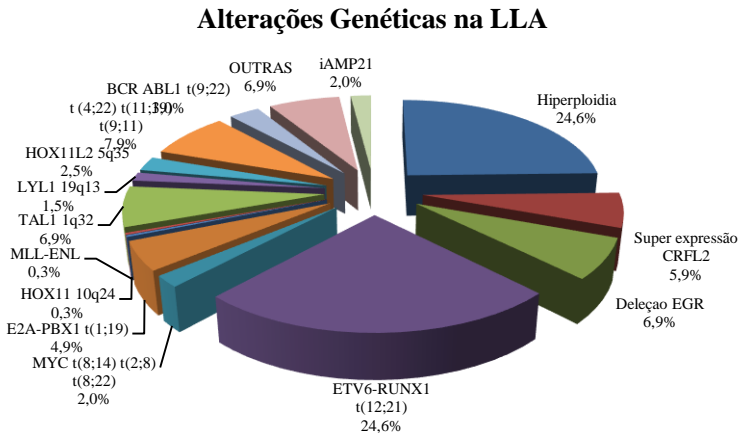
20% dos casos de leucemia em adultos (FADERL; JEHA; KANTARJAM 2003; ROBak; WIERZBOWSKA, 2009).

A idade é o principal fator de prognóstico em pacientes com LLA. Em crianças abaixo de 5 anos, as taxas de sobrevida a longo prazo, são de aproximadamente 80%, enquanto em adolescentes e adultos essa taxa cai para 50-60% e 30%, respectivamente (HOELZER;GOKBUGET, 2000; PUI; EVANS, 2006). Estas diferenças podem estar relacionadas ao tipo de célula progenitora acometida, a qual é diferente na infância e no paciente adulto. Na infância, a LLA acomete células progenitoras linfóides que possuem uma capacidade de renovação limitada, enquanto que na idade adulta acomete células-tronco hematopoéticas multipotentes que possuem uma capacidade maior de auto-renovação e são mais resistentes a quimioterapia (GREAVES, 1993; GREAVES, 1999).

A imunofenotipagem dos linfoblastos leucêmicos é essencial para estabelecer o correto diagnóstico e definir qual é a linhagem comprometida, uma vez que o prognóstico ao tratamento também está relacionado ao subtipo de LLA (PUI; CAMPANA; EVANS, 2001, PUI; EVANS, 1998). A Organização Mundial de Saúde (OMS), em conjunto com a Sociedade de Hematologia Americana e a Associação Européia de Hematologia, classifica a LLA segundo sua marcação imunofenotípica em linhagem B (Pró-B, Comum, Pré-B e LLA-B) e linhagem T (Pré-T e LLA-T) (JAFFE et al., 2001), sendo que 80-85% das LLA são do tipo B e 15-20% são do tipo T (GRAUX, 2011). Outros fatores que conferem um pior prognóstico no tratamento é a contagem elevada de células brancas, infiltração de células leucêmicas no SNC e a presença de translocações cromossômicas (ROWE, 2010).

Alterações genéticas podem ser encontradas em mais de 75% dos casos de LLA (Figura 2) (PUI et al., 2011) e as alterações numéricas dos cromossomos estão entre as principais causas. As alterações numéricas podem ser classificadas em hiperdiploidia (mais de 50 cromossomos) e pseudoploidia (46 cromossomos, mas com rearranjos). A hiperploídia é encontrada em 25 a 30% de todas as LLA da infância (COTRAN; KUMAR; ROBBINS, 1996). Translocações cromossômicas, que ativam principalmente genes de fatores de transcrição, estão diretamente relacionados com a LLA. A ativação destes genes induz a célula a um descontrole na proliferação (ARMSTRONG; LOOK; 2005). A translocação Filadélfia t(9;22) é a alteração citogenética mais frequente em adultos com LLA. A frequência do cromossomo Filadélfia (Ph) é de 5% em pacientes com menos de 20 anos, 33% em pacientes com até 40 anos e 49% em pacientes acima de 40 anos. Pacientes com cromossomo

Ph<sup>+</sup> possuem um pior prognóstico e as taxas de sobrevivência em longo prazo consistem em aproximadamente 10% (LEE, 2011). Além disso, a quimioterapia convencional precisa ser combinada ao mesilato de imatinibe, que consiste em um inibidor de ABL quinases (DRUKER, 2004). A translocação t(4;11) foi observada em 70% a 80% dos casos em crianças até o primeiro ano de vida (RUBNITZ et al., 1994; PUI; 1995). A translocação t(12;21) está presente em cerca de 25% dos casos de LLA de linhagem de célula B e é a alteração genética mais comum observada em crianças (ARMSTRONG; LOOK, 2005).



**Figura 2: Alterações genéticas encontradas nos casos de LLA.**

**Fonte:** Adaptado de PUI et al., 2011

O tratamento da LLA consiste em quimioterapia de indução, seguida da terapia de consolidação e finalmente, terapia de manutenção (BURKE; STARTZEK, 2008). O objetivo da fase de indução é erradicar mais de 99% das células leucêmicas e restaurar a hematopoiese normal, assim como a saúde do paciente. A terapêutica desta fase geralmente inclui a administração de corticóides via oral, vincristina e daunorrubicina via intravenosa e asparaginase via intramuscular (TALPAZ et al., 2006; STOCK, 2010). Com a restauração da hematopoiese, na fase de consolidação o objetivo é erradicar células leucêmicas residuais e reduzir a doença residual mínima. Nesta fase são utilizadas principalmente mercaptopurina e também metotrexato, corticóides, vincristina e asparaginase (PUI; EVANS, 2006; STOCK, 2010). Após a terapia de consolidação é necessário introduzir a terapia de manutenção que consiste em baixas doses de quimioterápicos por 2 a 3

anos. O objetivo desta fase é evitar recidivas e induzir a remissão completa da doença. Os fármacos mais utilizados nesta fase são a mercaptopurina e o metotrexato (PUI; EVANS, 2006; STOCK, 2010).

A infiltração de células leucêmicas no SNC ocorre em torno de 6% dos pacientes com LLA. O tratamento profilático envolvendo o SNC consiste na administração intratecal de metotrexato isoladamente ou em associação com citarabina ou prednisona (BASSAN; HOELZER, 2011). Já em pacientes com alto risco de infiltração no SNC, a irradiação cranial pode ser utilizada, mas em somente 5 a 20% dos pacientes, devido às complicações envolvidas com esta terapia (PUI, 2003).

As taxas de recidivas relacionadas a LLA são de 25% e 50% para crianças e para adultos respectivamente, sendo estas taxas diretamente relacionadas ao imunofenótipo e o subtipo genético envolvido (ONCIU, 2009). Apesar da taxa de cura da LLA na infância ser favorável, muitos pacientes ainda desenvolvem sérias complicações agudas e tardias, em consequência dos efeitos colaterais dos tratamentos (DILLER, 2011). Adicionalmente, pacientes com LLA após o tratamento quimioterápico apresentam alta probabilidade de desenvolver doenças cardíacas. Estudos mostraram que o risco de morrer de doença cardíaca é maior entre crianças que passaram por tratamento quimioterápico do que na população saudável. Neste sentido, foi observado que a exposição às antraciclinas durante a infância pode causar falência cardíaca no indivíduo quando adulto (MERTENS et al., 2008; REULEN, 2010; DILLER, 2011). Além disso, a exposição na infância a altas doses de corticóides foi relacionada a maior incidência de osteopenia precoce devido a menor densidade mineral óssea induzida (THOMAS, 2008; KASTE et al., 2006).

Diante deste cenário, diversos estudos vêm sendo realizados com o objetivo de avaliar novos alvos terapêuticos para as leucemias que induzam as células tumorais a morte celular programada, que apresentem melhor eficácia e menos efeitos colaterais (ZHANG et al., 2008; NICHOLSON, 2000; DEBATIN, 2004).

#### **1.4. Morte celular**

Os processos de morte celular podem ser classificados em apoptose, autofagia, necrose, mitose catastrófica e senescência (OKADA; MAK, 2004; DIMRI, 2005; CASTEDO et al., 2004). A mitose catastrófica geralmente não é considerada uma forma de morte e sim uma sinalização irreversível para a mesma. É resultado de uma segregação cromossômica aberrante ou fusão de células (WEAVER; CLEVELAND;

2005; BROWN; ATTARDI, 2005). A senescência por sua vez, consiste em um processo essencial para o envelhecimento. Ocorre por meio de uma programação genética que envolve deterioração dos telômeros e ativação de genes supressores de tumor (MOOI; PEEPER, 2006). As células senescentes apresentam telômeros curtos e citoplasma achatado com a presença de muitos grânulos (OKADA; MAK, 2004). A necrose acontece em situações de estresse violento, envolve um processo de destruição desregulada, resultado de uma catástrofe bioenergética, incompatível com a sobrevivência celular. É caracterizada pela presença de vacúolos no citoplasma, pela perda da integridade da membrana plasmática e das organelas, pelo aumento do volume celular e por indução de inflamação nos tecidos vizinhos, em decorrência da liberação do conteúdo celular e de moléculas inflamatórias (EDINGER; THOMPSON, 2004; OKADA; MAK, 2004). A autofagia consiste em um processo adaptativo, controlado geneticamente e ocorre em resposta a um estresse metabólico que resulta na degradação de componentes celulares (DANIAL; KORSMEYER, 2004; LUM; DEBERARDINIS; THOMPSON, 2005). A morte celular por autofagia é induzida pela depleção de organelas essenciais à sobrevivência da célula, como mitocôndrias e retículo endoplasmático; a diminuição da sinalização de sobrevivência celular; desregulação das enzimas lisossomais e ativação de sinais para apoptose (TORMO et al., 2009).

Particularmente, os organismos multicelulares mantêm a homeostase através de um processo de eliminação celular controlado, conhecido como apoptose (SAYERS, 2011). O processo de apoptose envolve a diminuição no volume celular e a perda da aderência com a matriz extracelular. As organelas celulares mantêm a morfologia, com exceção das mitocôndrias, que podem apresentar poros na membrana externa, a cromatina sofre condensação, o DNA fragmenta-se em produtos múltiplos de ~200 pares de base e por fim ocorre a formação de prolongamentos da membrana celular, originando estruturas que mantêm o conteúdo celular, chamadas de corpos apoptóticos, os quais são rapidamente fagocitados por macrófagos e removidos. Este processo todo ocorre sem causar um processo inflamatório (ZIEGLER; GROSCURTH, 2004; SARASTE; PULKKI, 2000). Uma falha na regulação da apoptose consiste em um importante fator patológico, presente em várias doenças, sendo uma das causas relacionadas ao desenvolvimento e progressão do câncer, já que muitos tumores são resistentes à sinalização da apoptose (SAYERS, 2011).

A apoptose é regulada por diversos fatores, entre eles estão as caspases, proteínas da família Bcl-2 e a proteína p-53. As caspases são

enzimas aspartato-específicas, presentes entre as membranas mitocondriais e na matriz nuclear, na forma de zimogênios. Estão divididas em duas classes diferentes: as iniciadoras (caspases-2, -8, -9 e -10) e as efetoras (caspases-3, -6 e -7), as quais clivam substratos específicos e são responsáveis pelas características típicas deste tipo de morte celular (KIECHLE; ZHANG, 2002; AMARANTE-MENDES, 2003; RIEDL; SHI, 2004).

Fisiologicamente, a proteína p53 é acionada com o objetivo de reparar possíveis danos que por ventura venham a ocorrer no DNA. Quando os danos excedem os mecanismos de reparo, essa proteína induz a célula a apoptose (BROWN; ATTARDI, 2005). A proteína p53 também pode induzir a parada do ciclo celular, através da ativação da proteína p21, proteína inibidora da ciclina quinase, que tem como consequência a parada na fase G1 do ciclo celular (TAYLOR; STARK, 2001). O fator de transcrição p53 que suprime a carcinogênese, está mutado em cerca de 50% dos tumores (RUFINI; MELINO, 2011). Em decorrência disto, a terapia gênica baseada na restauração da p53 torna-se uma estratégia atrativa. Em modelos animais, a reativação da p53 resultou em regressão tumoral (VENTURA et al., 2007; XUE, et al., 2007).

A apoptose pode ocorrer por 2 vias distintas, a intrínseca e a extrínseca. A via intrínseca ou mitocondrial é ativada por eventos intracelulares e depende da liberação de fatores pró-apoptóticos da mitocôndria. As quimioterapias padrões e a radioterapia induzem a apoptose pela via intrínseca o que pode levar a uma seleção positiva das células tumorais que são resistentes a morte por esta via. Em contraste, a via extrínseca da apoptose é iniciada com o recebimento de sinais em receptores pró-apoptóticos da membrana plasmática. Ambas as vias levam a ativação de caspases iniciadoras específicas culminando na ativação da caspase 3. A ativação das caspases desencadeia a ativação de uma cascata de sinalização de morte celular que resulta em condensação da cromatina e fragmentação do DNA (SAYERS, 2011).

#### **1.4.1. Via intrínseca da apoptose**

A via intrínseca da apoptose é iniciada pela liberação de fatores apoptogênicos como o citocromo c e o SMAC/DIABLO da mitocôndria para o citoplasma seguido da permeabilização da membrana externa da mitocôndria que leva a ativação de proteínas pró-apoptóticas e a inativação de proteínas anti-apoptóticas pertencentes à família Bcl-2 (SAYERS, 2011).

O gene da família Bcl-2 codifica um grupo heterogêneo de proteínas que regulam a morte celular programada o qual é dividido em 2 subgrupos considerando as respectivas ações: proteínas anti e pró-apoptóticas. Os membros desta família podem ainda ser sub-divididos em grupos de acordo com o número e estrutura dos domínios homólogos presentes nas respectivas estruturas (designados BH1-4). As proteínas anti-apoptóticas (Bcl-2, Bcl-XL, Bcl-W, Mcl-1, A1, Boo/Diva/Bcl-2-L10, Bcl-B) contêm 3 ou 4 regiões características de homologia (BH3-4). Os membros da família das proteínas pró-apoptóticas são divididos em dois: Bax, Bak, Bcl-XS, Bok/Mtd e Bcl-GL contêm dois ou três domínios BH, enquanto Bad, Bik/Nbk, Blk, Bid, HrK/DP5, Bim/Bod, Bmf, Noxa, Puma/Bbc-3 contêm 3 domínios BH e são conhecidas como proteínas *BH3-only* (BOUILLET; STRASSER, 2002; COULTRAS; STRASSER, 2003).

No citosol o citocromo c une-se ao APAF-1 e a pró-caspase-9 formando o complexo chamado apoptossoma que resulta na ativação da caspase 9, a qual ativa a caspase efetora 3. Além disso, o SMAC/DIABLO liberado para o citosol inibe a proteína XIAP (proteína inibidora da apoptose relacionada ao cromossomo X) ocasionando a ativação das caspases que normalmente são inibidas pela XIAP (SALVESEN, 2002).

Muitas mutações associadas ao câncer como a perda do fator pró-apoptótico p53 e Bax ou a super-expressão de fatores antiapoptóticos como o BCL-2 induzem a proliferação das células tumorais transformadas (SAYERS, 2011).

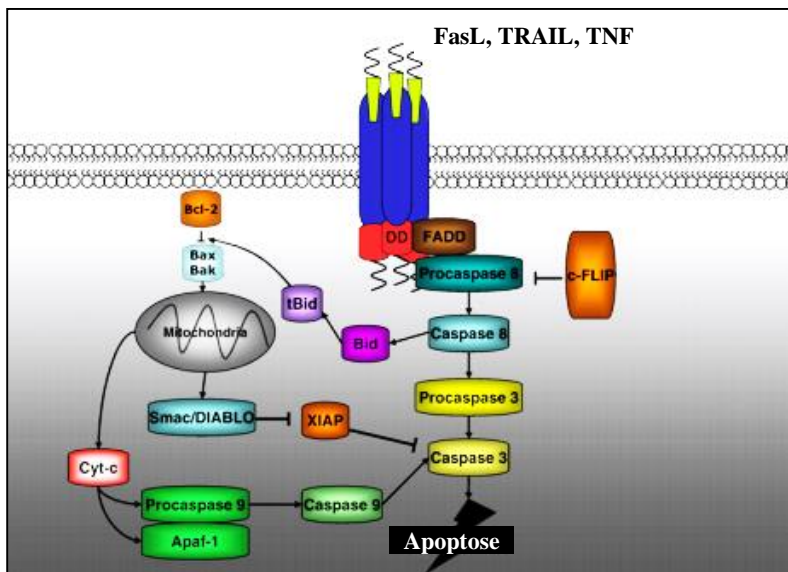
#### **1.4.2. Via extrínseca da apoptose**

A via extrínseca da apoptose inicia com a transmissão de sinais de fatores extracelulares, os quais interagem com os receptores de morte localizados na membrana plasmática, para o interior da célula. Os receptores mais conhecidos são os pertencentes a família TNF. Entre estes receptores inclui-se TNF, FasL e TRAIL os quais são produzidos predominantemente pelas células do sistema imune (SAYERS, 2011). Tais receptores, quando estimulados, associam-se, através de proteínas adaptadoras como a FADD, à pró-caspase-8 formando o complexo DISC que ativa a caspase iniciadora 8 que pode ativar as caspases efetoras 3 e 7 ou clivar a proteína pró-apoptótica Bid (KIECHLE; ZHANG, 2002; AMARANTE-MENDES, 2003; RIEDL; SHI, 2004).

A Bid é a proteína que conecta a via extrínseca com a via intrínseca da apoptose. Quando clivada, a Bid migra para a mitocôndria e induz a permeabilização da membrana mitocondrial dependente das proteínas



Bax e Bak levando a liberação de fatores pró-apoptóticos (LI et al., 1998; BILLEN; SHAMAS-DIN; ANDREWS, 2009) (Figura 3).



**Figura 3. Inter-relação entre via intrínseca e extrínseca da apoptose.**

**Fonte:** Adaptado de SAYERS, 2011

O avanço do conhecimento de componentes específicos das vias da apoptose tem sido importante no desenvolvimento de agentes mais específicos para a terapêutica de doenças. Várias estratégias têm sido desenvolvidas para antagonizar proteínas anti-apoptóticas com promissores resultados. Entre estes resultados incluem-se os obtidos com a ABT-737, uma pequena molécula que antagoniza as ações das proteínas anti-apoptóticas Bcl2, Bcl-XL e Bcl-W, aumentando a citotoxicidade mediada pelo receptor de morte TRAIL (HUANG; SINICROPE, 2008). Ainda, o Obatoclastax é uma molécula que vem sendo estudada, tendo sido descrito como inibidor da ligação da proteína anti-apoptótica Mcl-1 na proteína pró-apoptótica Bax induzindo a apoptose (NGUYEN et al., 2007).

Atualmente, várias doenças estão associadas com a inibição da apoptose incluindo câncer, doenças autoimunes e infecções virais (AGOSTINI; TUCCI; MELINO, 2011). Em contraste, a desregulação do controle da apoptose tem sido associada com desordens

neurodegenerativas como Parkinson, Alzheimer, Huntington (SASSONE et al., 2010) e glaucoma (CALANDRELLA, 2010).

Heidari e colaboradores (2010) estudaram o efeito do Obatoclax em pacientes com LLA e mostraram que houve indução da apoptose dependente de Bak por inibir proteínas anti-apoptóticas, principalmente a Mcl-1.

### **1.4.3. Apoptose induzida pelo retículo endoplasmático**

O retículo endoplasmático (RE) é uma organela essencial e em conjunto com o íon cálcio participa de processos celulares importantes como a síntese, a secreção e a modificação de proteínas e lipídios, a motilidade celular, a contração e o relaxamento das células musculares, o metabolismo mitocondrial, o ciclo celular, a apoptose entre outros. O lúmen do RE contém uma grande quantidade de proteínas que estão envolvidas nestes processos. Entre elas estão as chaperonas, que controlam a produção de cerca de 30% das proteínas e o enovelamento das mesmas. O RE também tem um papel importante na manutenção da homeostase do cálcio, já que o mesmo liga-se nas chaperonas e indiretamente influencia o enovelamento e a produção das proteínas. Nos casos em que ocorre a superprodução de proteínas, o excesso de proteínas não enoveladas ou alterações nas concentrações de cálcio provoca o início de um processo chamado de estresse de retículo. A resposta celular a este estímulo pode ser a apoptose (GROENENDYK; MICHALAK, 2005; SITIA; BRAAKMA, 2003; BERRIDGE, 2002).

A apoptose induzida por estresse de retículo pode ocorrer por duas vias: a via mitocondrial ou por uma via independente da mitocôndria. A via da apoptose independente da mitocôndria inicia com a ativação da caspase 12 que está localizada na membrana do RE. Camundongos deficientes em caspase 12 são resistentes a apoptose induzida por estresse de retículo mas não por outros sinais de apoptose. A caspase 12 induz a ativação da caspase 9 que ativa a caspase 3 independente da formação do apoptossoma (GROENENDYK; MICHALAK, 2005; NAKAGAWA et al., 2000).

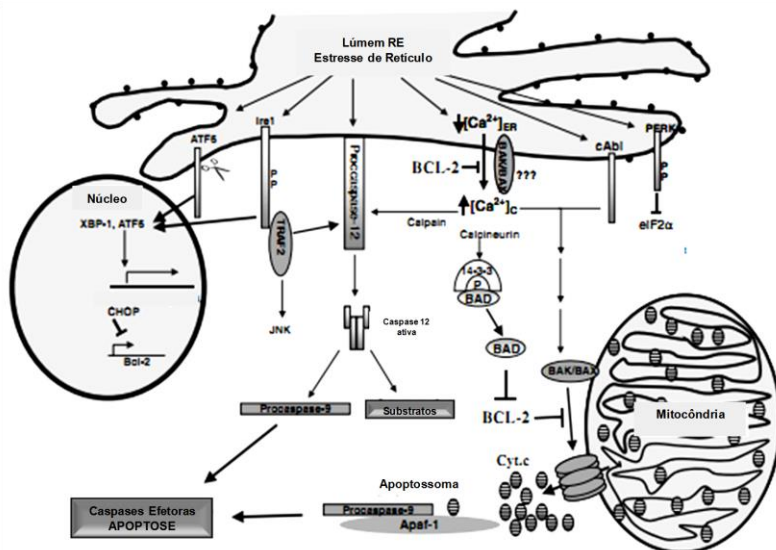
A apoptose via mitocondrial é deflagrada quando há liberação de cálcio do RE e ativação de proteínas citoplasmáticas semelhantes as caspase conhecidas como calpaínas. Estas proteínas podem ativar a caspase 12 e outras proteínas pró-apoptóticas como Bax, Bak e Bid (NAKAGAWA; YUAN, 2000).

A membrana plasmática tem um importante papel na homeostase do cálcio, pois possui transportadores que são responsáveis pelo efluxo

de cálcio para fora da célula. O aumento das concentrações de cálcio no citoplasma pode levar a um acúmulo no núcleo, onde o cálcio pode agir como um modulador de transcrição para vários genes que estão envolvidos na apoptose (ZAIDI et al., 2004; BRINI et al., 2000).

A liberação de cálcio do RE pode acarretar um acúmulo do mesmo na mitocôndria o que leva a uma disfunção da cadeia respiratória e consequentemente na síntese de ATP e a liberação de citocromo c que pode ativar uma via de apoptose (DUCHEN, 2000).

A figura 4 representa as diferentes respostas celulares envolvidas no estresse de retículo.



**Figura 4:** Vias de sinalização do estresse de retículo.

Fonte: BRECKENRIDGE et al., 2003

As proteínas pró-apoptóticas Bax e Bak assim como a proteína anti-apoptótica Bcl-2 além da mitocôndria, também localizam-se no RE e podem participar da apoptose induzida pela liberação de cálcio. A superexpressão de Bcl-2 diminui a liberação de cálcio do RE e a superexpressão de Bax e Bak induz a liberação de cálcio do RE para o citosol (OAKES et al., 2003; ZONG et al., 2003; NUTT et al., 2002).

### 1.5. Produtos naturais e desenvolvimento de novos fármacos

Atualmente, a oncologia é a especialidade que mais tem buscado fármacos derivados de produtos naturais (HARVEY, 2008). Cerca de 60% dos fármacos aprovados entre 1989-1995 como antimicrobianos e quimioterápicos são de origem natural (CRAGG; NEWMAN; SNADER, 1997; CRAGG; NEWMAN, 2013).

Conforme estimativas da Convenção da Diversidade Biológica (CDB), o Brasil detém entre 15 e 20% de toda a biodiversidade mundial. Este patrimônio tem um valor inestimável para vários setores da indústria, especialmente para a indústria farmacêutica (LEWINSONHN; PRADO, 2002 apud BARREIRO; BOLZANI, 2009). Moléculas como a vincristina, o irinotecan, o paclitaxel e o etoposídeo são exemplos de materiais derivados de plantas e a citarabina é um exemplo de derivados de origem marinha que são amplamente utilizados na terapêutica do câncer (ROCHA; LOPES; SCHWARTSMANN, 2001).

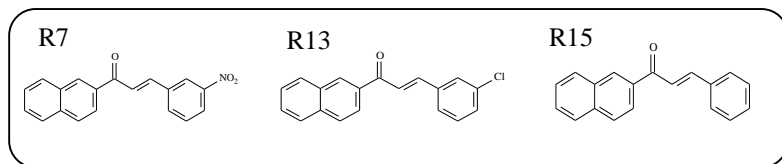
Os flavonóides fazem parte de um grupo diverso de metabólitos secundários encontrados nas plantas e contribuem para as propriedades antioxidantes dos vegetais, frutas, óleos, vinhos, chocolates e chás (REN et al., 2003). Trabalhos recentes têm mostrado a atividade antitumoral de alguns flavonóides na leucemia (PEDRINI et al., 2010; CHEN et al., 2005; MERTENS-TALCOTT; PERCIVAL, 2005), no neuroblastoma (CHEN et al., 2012), câncer de mama (YE et al., 2012), câncer de estômago (LEE et al., 2012), câncer de pulmão (NGUYEN et al., 2004), câncer colo-retal (WOO et al., 2011) entre outros.

As chalconas são precursoras das flavanonas (FOWLER; KOFFAS, 2009) e também podem ser consideradas uma classe específica de flavonóides (CROZIER; JAGANATH; CLIFFORD, 2009). Quimicamente, formam um grupo de flavonóides de cadeia aberta, em que dois anéis aromáticos são ligados por três carbonos, sendo uma carbonila e dois carbonos  $\alpha,\beta$ -insaturados. As chalconas são classificadas de acordo com as substituições no anel A e B. A presença de ligação  $\alpha,\beta$ -insaturada e a ausência de um anel-C são duas características específicas das chalconas que caracterizam esses compostos como quimicamente diferentes de outros flavonóides (KOZLOWSKI et al., 2007).

Muitas atividades biológicas já foram descritas para as chalconas entre elas antileucêmica (NAKATANI, et al., 2005; KACHADOURIAM; DAY, 2006). Em busca de novas chalconas com atividade antileucêmica, foi realizada, em um trabalho anterior, uma triagem com uma série de chalconas derivadas da 2-naftilacetofenona (série R) em células de leucemia murina L1210. Dentre todas as chalconas avaliadas, três

induziram a morte celular por apoptose e foram selecionadas para estudos mecanísticos (WINTER, et al. 2010). Na figura 5 estão representadas as estruturas das três chalconas utilizadas neste estudo. Os valores de  $CC_{50}$  obtidos após 24 horas de incubação em células L1210 são 27  $\mu\text{M}$ , 38  $\mu\text{M}$  e 37  $\mu\text{M}$  e os valores de  $CC_{50}$  obtidos após 48 horas de incubação são 13  $\mu\text{M}$ , 24  $\mu\text{M}$  e 20  $\mu\text{M}$  para as chalconas R7, R13 e R15 respectivamente.

Neste trabalho, a morte celular induzida pelas chalconas R7, R13 e R15 foi avaliada a fim de elucidar o mecanismo de ação destes compostos. Sendo assim, neste capítulo o tipo de morte celular induzida pelas chalconas foi quantificada, fatores envolvidos nas vias intrínseca e extrínseca da apoptose foram avaliados, assim como alterações no metabolismo do cálcio possivelmente envolvido em um estresse de retículo endoplasmático.



**Figura 5. Estrutura das chalconas R7, R13 e R15**

## 2. MATERIAIS E MÉTODOS

### 2.1. Reagentes

Os meios de cultura DMEM e RPMI e o soro fetal bovino (SFB) foram adquiridos da Cultilab (São Paulo, Brasil); a penicilina e a estreptomicina foram compradas da Gibco® (Grand Island, NY, EUA); o dimetil sulfoxido (DMSO) e o metanol foram adquiridos da Vetec; o clorofórmio, o ácido etilenodiaminotetra acético (EDTA), o EGTA, MgCl<sub>2</sub> e o cloreto de potássio (KCl) foram adquiridos da Reagen (Rio de Janeiro, Brasil); o álcool isopropílico e o bicarbonato de sódio foram adquiridos da Nuclear; a DNase, os oligonucleotídeos, a albumina sérica bovina, a RNase e o TRIZOL foram adquiridos da Invitrogen (Alemanha); o ácido N-[2-Hidroxiethyl]piperazina-N'-[2-etanosulfônico] (HEPES) foi adquirido da Ludwig Biotech; o brometo de dimetiazol difeniltetrazólio (MTT), a pepstatina, a leupeptina, a aprotitina, o fluoreto de fenilmetilsulfonil (PMSF), o triton-X100, o ditiotreitól (DTT), o sulfonato de 3-[(3-cloroamidopropil)-dimetilamônio]-1- propano (CHAPS), o acetil-Asp-Glu-Val-Asp-amino metil cumarina (Ac-DEVD-AMC), o N-acetil-Leu-His-Asp 7- amido-4- trifluorometilcumarina (Ac-LEHD-AFC), oN-acetil-Ile-Glu-Thr-Asp-7-amino-4- metil cumarina (Ac-IETD-AMC), o ionóforo de cálcio A23187, o Pluronic F127®, o citocromo c e o Azul de Tripán foram adquiridos da Sigma; o Kit ApopNexin FITC foi adquirido da Millipore; o kit High-Capacity cDNA Reverse Transcription e o Power SYBR-Green PCR Master Mix foram adquiridos da Applied Biosystems; o N-acetil-Ala-Thr-Ala- Asp- 7-amido-4- trifluorometilcumarina(Ac-ATAD-AFC) foi adquirido da Biovision; o Fluo3-AM foi adquirido da Biotium. Os anticorpos PE Mouse Anti-p53 Set, PE Hamster Anti-mouse CD95, PE Hamster Anti-mouse Bcl2 Set e Armenian Hamster IgG2 foram adquiridos da BD Biosciences.

### 2.2. Síntese das chalconas

A síntese das chalconas derivadas da 2-naftilacetofenona foi realizada pelo grupo de pesquisa do Prof.º Rosendo Augusto Yunes, do Departamento de Química da Universidade Federal de Santa Catarina. Resumidamente, a metodologia de síntese consistiu nas seguintes etapas: i) em um balão de reação de 100 mL, de uma boca, foi adicionado a 2-naftilacetofenona (0,34g; 2 mmol), o aldeído (2 mmol) e metanol (20 mL); ii) os reagentes foram dissolvidos sob agitação magnética; iii)

lentamente foi adicionado KOH 50% v/v (60 gotas); iv) a reação foi resfriada até à temperatura ambiente sob agitação magnética, por 24 h; v) passado o período de incubação, água destilada foi adicionada à reação, o que provocou a precipitação dos compostos, e acidificou-se a mesma com ácido clorídrico 10%, para neutralização do meio; vi) filtrou-se em funil de Büchner; vii) verificou-se a pureza por CCD e, quando necessário, as chalconas foram recristalizadas em diclorometano e precipitadas em hexano (CHIARADIA, 2010).

### **2.3. Cultura celular**

A linhagem de célula leucêmica linfoblástica de origem murina (L1210) obtida da American Type Culture Cell (ATCC) foi utilizada neste trabalho como modelo de leucemia. As células leucêmicas foram mantidas em garrafas plásticas de cultura, contendo meio RPMI 1640 suplementado com 10% de soro fetal bovino, 100 U/mL de penicilina, 100 µg/mL de estreptomicina, 10 mM HEPES, pH 7.4, em estufa umidificada, a 37°C e com 5% CO<sub>2</sub>. Antes da realização de todos os experimentos, o número de células viáveis foi avaliado pelo método de Azul de Trypan (FRESHNEY, 1987), e a contagem realizada em câmara de Neubauer.

### **2.4. Tratamento celular**

Os compostos foram dissolvidos em uma solução de DMSO e armazenados a 4°C. Essas soluções estoques foram diluídas em meio de cultura para atingir as concentrações desejadas nos experimentos. As células L1210 foram incubadas com as chalconas em placas de 6, 12, 24 ou 96 poços, dependendo do procedimento experimental e por diferentes tempos. Foram utilizados controles de células sem tratamento e com tratamento com DMSO, diluído em meio de cultura, na mesma proporção utilizada para dissolver os compostos. A concentração máxima de DMSO adicionada às células foi de 0,2%.

### **2.5. Análise da apoptose e/ou necrose pelo método da anexina-V/ iodeto de propídio**

Para avaliar as células em apoptose e/ou necrose foi utilizado o kit ApopNexin™ FITC® (Millipore). Neste teste, células apoptóticas são marcadas com Anexina V-FITC que se liga na fosfatidilserina externalizada destas células enquanto células com rompimento de

membrana coram com o iodeto de propídeo (IP). Desta forma podemos identificar e quantificar as células em apoptose (Anexina V positivas), as células em necrose (IP positivas), as células em apoptose tardia (Anexina V e IP positivas) e as células viáveis (Anexina V e IP negativas).

5 x 10<sup>5</sup> células L1210 foram tratadas por 12 horas com as chalconas (R7-30 µM, R13-40µM, R15- 40µM). Após os tratamentos as células foram lavadas 2 vezes com PBS à 4°C e ressuspensas em 200 µL de tampão de ligação. As células foram marcadas com anexina por 15 minutos à 4°C no escuro e posteriormente foi adicionado o iodeto de propídeo. 20.000 células foram utilizadas para análise da morte celular em citômetro de fluxo (FACSCanto II, BD Biosciences). Controles não corados foram utilizados para avaliar a autofluorescência das células e controles de células não tratadas foram marcadas com anexina e iodeto de propídeo para avaliar a morte celular das células sem tratamento. A população de células em cada quadrante foi determinada usando o software WinMDI 2.9.

## 2.6. Avaliação da atividade das caspases

Para avaliação da atividade das caspases, 0,1 - 3 x 10<sup>6</sup> células foram tratadas com as chalconas nas concentrações respectivas de CC<sub>50</sub> (R7-30 µM, R13-40µM, R15-40 µM) por 4 horas já que neste tempo é possível observar as células em uma fase inicial da apoptose. A atividade das caspases foi realizada segundo Zuse e colaboradores (2007) com modificações segundo o fabricante de cada substrato. Após os tratamentos, as células foram lavadas com PBS e lisadas por 10 minutos (4 e 8°C) com tampão de lise contendo HEPES 10 mM (pH 7.4), KCl 42 mM, MgCl<sub>2</sub> 5 mM, PMSF 1 mM, EDTA 100 µM, EGTA 100 µM, pepstatina A 1 µg/mL, leupeptina 1 µg/mL, aprotinina 5 µg/mL, CHAPS 0,5% e DTT 1 mM. Posteriormente, ao lisado celular foram adicionados meio de reação contendo HEPES 25 mM (pH 7.4), CHAPS 1%, EDTA 1 mM, sacarose 10% e DTT 3 mM. A esta mistura foram adicionados 10 µM do substrato fluorogênico para caspase-3 Ac-DEVD-AMC (*N*-acetil-Asp-Glu-Val-Asp-amino metil cumarina), 25 µM do substrato fluorogênico para caspase-8Ac-IETD-AMC (*N*-acetil-Ile-Glu-Thr-Asp-7-amino-4- metil cumarina) e do substrato fluorogênico para caspase-12Ac-ATAD-AFC(*N*-acetil-Ala-Thr-Ala- Asp- 7- amido-4-trifluorometilcumarina)e 100 µM do substrato fluorogênico para caspase-9 Ac-LEHD-AFC (*N*-acetil-Leu-His-Asp 7- amido-4-



trifluorometilcumarina) e incubados por 120 minutos a 37°C. A atividade das caspases foram avaliadas através da produção do AMC e do AFC fluorescentes. As fluorescências foram monitoradas em fluorímetro PerkinElmer LS55. Os resultados foram expressos em porcentagem com base nas unidades de fluorescência obtidas após correção pela concentração de proteína presente em cada amostra.

## **2.7. Determinação da concentração de cálcio intracelular**

Para a avaliação da concentração de cálcio intracelular,  $1 \times 10^6$  células L1210 foram incubadas com as chalconas por 4 horas nas concentrações respectivas de  $CC_{50}$  (R7-30  $\mu$ M, R13-40 $\mu$ M, R15- 40 $\mu$ M) e com 1  $\mu$ M do ionóforo de cálcio A23187. Após o tempo de incubação, as células foram centrifugadas a 400 x g por 10 min, ressuspensas em 300  $\mu$ L de tampão HBSS contendo 0,02% de Pluronic F127 e 3  $\mu$ M de Fluo-3 AM e incubadas por 20 minutos a 37°C. O Fluo-3 AM é uma sonda fluorescente que atravessa a membrana plasmática, tem sua porção éster clivada pelas esterases intracelulares, tornando-se impermeável a membrana celular e apresenta fluorescência quando ligada ao cálcio. Após 20 minutos, foi adicionado 1,2 mL de HBSS com 1% de soro bovino fetal e as células foram incubadas por mais 40 min a 37°C.

As células foram centrifugadas, lavadas 3 vezes com tampão HEPES contendo 0,02% de BSA, ressuspensas em 200  $\mu$ L do mesmo tampão e a leitura da fluorescência foi monitorada com excitação em 488 nm e emissão em 526 nm. A metodologia foi baseada nas normas de utilização do Fluo-3/AM da empresa Enzo Life Sciences com modificações.

## **2.8. Determinação da liberação de citocromo *c* no citosol**

A liberação de citocromo *c* da mitocôndria para o citoplasma foi avaliada segundo o método espectrofotométrico desenvolvido por Appaix e colaboradores (APPAIX et al., 2000).  $5 \times 10^6$  células L1210 foram incubadas com as chalconas nas concentrações respectivas de  $CC_{50}$  (R7-30  $\mu$ M, R13-40 $\mu$ M, R15- 40 $\mu$ M) por 4 horas. Após o tempo de incubação as células foram lavadas com PBS e permeabilizadas com 30  $\mu$ M de digitonina por 30 minutos a 4°C em uma solução contendo 10mg/mL de Tris-HCl (pH 7,0), 3mg/mL de EGTA e 50  $\mu$ g/mL de sacarose. As células foram então centrifugadas a 10.000 x g por 30 minutos e a absorbância dos sobrenadantes foi avaliada em 414nm. Uma curva padrão foi

realizada com citocromo *c* comercial e os valores de absorbância das amostras foram extrapolados nesta curva para obtenção da quantidade de citocromo *c* liberado. Os valores de citocromo *c* também foram corrigidos pela quantidade de proteína em cada amostra e foram expressos em porcentagem considerando o controle como 100%.

## 2.9. Extração de RNA

3 x 10<sup>6</sup> células L1210 foram incubadas com as chalconas nas concentrações respectivas de CC<sub>50</sub> (R7-30 µM, R13-40µM, R15- 40 µM) por 4 horas, centrifugadas a 400 x g por 10 minutos e o RNA total foi extraído com 0,5 mL de TRIZOL<sup>®</sup> (Invitrogen). Após incubação à temperatura ambiente (TA), às amostras foram adicionados 200 µL de clorofórmio e as mesmas foram agitadas e incubadas por 3 minutos a TA. As amostras foram centrifugadas por 15 minutos a 12000 x g (2-8°C). A fase aquosa foi coletada e transferida para um novo tubo onde adicionou-se mais 500 µL de álcool isopropílico. Agitou-se, incubou-se por 10 minutos a TA e centrifugou-se por 10 minutos a 12000 x g. O sobrenadante foi removido, o decantado foi lavado com etanol 75% e posteriormente centrifugados por 5 minutos a 7500 x g (2-8°C). O sobrenadante foi removido, o decantado foi seco a TA e o RNA foi dissolvido em 20 µL de água DEPC.

O RNA extraído foi quantificado por leitura espectrofotométrica em um NanoVue<sup>®</sup> (GE Healthcare) e a pureza foi avaliada através da razão 260/280 e 260/230. Dois microgramas de RNA foram tratados com DNase 1 (Invitrogen) segundo protocolo do fabricante.

## 2.10. Síntese de cDNA

A síntese de DNA complementar (cDNA) foi realizada utilizando o kit High-Capacity cDNA Reverse Transcription (Applied Biosystems, Foster City, CA, EUA). Em um microtubo de 0,2 mL o volume de RNA correspondente à concentração de 2 µg foi acrescido de 2 µL de iniciadores randômicos e água até o volume final de 10 µL. A reação foi incubada a 65°C por 5 minutos. Em seguida, o microtubo foi mantido em gelo e foram acrescentados 8 µL da mistura da reação contendo 2 µL de tampão 10X, 0,8 µL de 25X dNTP (100mM), 1,0 µL da enzima transcriptase reversa *MultiScribe<sup>TM</sup>*, 0,4 µL de Inibidor de RNase (RNAsin; Promega, Madison, WI, EUA) e 3,8 µL de água. A reação foi incubada a 25°C por 10 minutos, seguido por 37°C por 2 h e finalmente a 85°C por 5 minutos.

Assim foi obtido um volume final de 20  $\mu$ l de cDNA armazenado a  $-20^{\circ}\text{C}$  até sua utilização para as reações de amplificação por reação em cadeia da polimerase quantitativo (qPCR). Todas as incubações foram realizadas em termociclador Biocycler.

### 2.11. Curva de eficiência da reação de PCR

Visando determinar a eficiência da reação de PCR em tempo real, uma curva foi feita com diferentes concentrações de cDNA (1/25, 1/125, 1/625, 1/3125) para todos os pares de oligonucleotídeos (Tabela 1). A amplificação foi realizada utilizando o Power SYBR-Green PCR Master Mix (Applied Biosystems, Foster City, CA, EUA), conforme recomendação do fabricante. A análise da regressão linear dos valores de Cts em função do logaritmo da respectiva diluição forneceu o coeficiente angular da reta (a, em  $y=ax+b$ ) que foi utilizado para o cálculo da eficiência da amplificação dos produtos.

**Tabela 1. Oligonucleotídeos utilizados na reação de qPCR**

Genes	Senso	Antisenso	Produto (pb)
p21	5'-TGTCCTGCACTCTGGTGTCT-3'	5'-GGCACTTCAGGGTTTCTCT-3'	149
p53	5'-GTAAACGCTTCGAGATGTTCC-3'	5'-GACTGGCCCTCTTGGTCT-3'	123
Bid	5'-GAGATGGACCAACAATCCA-3'	5'-AGGCTGTCTTCACCTCATCAA-3'	126
Bax	5'-ACAGGGGCCCTTTTGTCTAC-3'	5'-GAGACACTCGCTCAGCTTCT-3'	125
Bak	5'-TACCTCCACCCAGCAAGAAC-3'	5'-GACCCACTTGACCCAAGA-3'	125
Bel-2	5'-AGAGACTCACCAGGGTCTGC-3'	5'-GCATACCTGGCGTCTCCTC-3'	113
Fas	5'-CTGGATGAAGAGCATGGTT-3'	5'-GCAGCGAACACAGTGTTCACA-3'	121
GAPDH	5'-GTGTCCGTCGTGGATCTGAC-3'	5'-GGAGACAACCTGGTCTCAG-3'	132
CHOP	5'-GGAAGTGCACTTTCATACACCACC-3'	5'-TGACTGGAACTGGAGAGCCGAGGCC-3'	315

### 2.12. Reação em cadeia da polimerase em tempo real (qPCR)

A análise da expressão gênica foi realizada através da quantificação relativa de cada gene em relação a um gene de expressão constitutiva. Esta quantificação foi possível de ser realizada já que todos os oligonucleotídeos apresentaram eficiências semelhantes ao controle endógeno e próximas a 100%. A quantificação relativa descreve mudanças de nível de expressão de um gene de interesse em uma amostra teste, relacionando esses valores a uma amostra utilizada como calibrador. Este calibrador pode, por exemplo, ser uma amostra que não recebeu o tratamento em estudo, ou uma amostra no tempo zero de tratamento. A partir destes critérios, pode-se utilizar o método comparativo  $2^{-\Delta\Delta\text{Ct}}$  (LIVAK; SCHMITTGEN, 2001). A quantificação relativa permite uma acurada comparação dos níveis de expressão de gene de interesse em uma amostra em relação à outra amostra.

A expressão dos genes p21, p53, Bid, Bax, Bak, BCL2, Fas e CHOP foi quantificada por meio do método de PCR quantitativo (qPCR) utilizando GAPDH como controle endógeno e o kit Power SYBR-Green PCR Master Mix® (Applied Biosystems, Foster City, CA, EUA) conforme indicações do fabricante.

O ensaio de PCR em tempo real foi realizado em termociclador ABI 7900HT (Applied Biosystem, Foster City, CA, EUA), nas seguintes condições: 50°C por 2 m, 95 °C por 10 minutos, 40 ciclos de 15 s a 95 °C para término do processo de desnaturação e por fim anelamento e alongação dos oligonucleotídeos a 57 °C por 1 minuto. Para todos os experimentos, o limiar de amplificação (Ct) foi determinado automaticamente pelo software.

Após o processo de amplificação, as amostras foram submetidas a curva de dissociação dos amplicons que representa a relação entre a temperatura e a quantidade de emissão de fluorescência da reação de PCR. A curva de dissociação permite verificar a formação de dímeros de oligonucleotídeos, ampliações inespecíficas, possíveis erros e contaminações.

### **2.13. Análise da expressão de proteínas por citometria de fluxo**

A expressão das proteínas Bcl-2, p53 e Fas foram analisadas por citometria de fluxo usando anticorpos específicos conjugados com o fluoróforo ficoeritrina (PE) segundo indicações do fabricante.  $1,5 \times 10^6$  células foram incubadas com as chalconas por 4 e 12 horas, lavadas com PBS e permeabilizadas por 30 minutos a 4°C com o tampão BD Cytotfix/Cytoperm™. As células foram lavadas e ressuspensas em tampão BD Perm/Wash™ contendo os anticorpos. Todas as marcações foram realizadas separadamente e para a proteína Fas a primeira fase de permeabilização não foi realizada já que essa proteína está localizada na membrana plasmática. Após 30 minutos de incubação as células foram lavadas e analisadas. Para cada amostra foi utilizado um controle de marcação inespecífica.

### **2.14. Avaliação do ciclo celular**

Para analisar o ciclo celular após os tratamentos com as chalconas, as células foram analisadas por citometria de fluxo, seguindo o método descrito por Yang e colaboradores (2007). As células ( $5 \times 10^5$ ) foram incubadas com as chalconas por 12 e 24 h (R7-30  $\mu$ M, R13-40 $\mu$ M, R15- $\mu$ M). Após o tempo de incubação as células foram transferidas para tubos

de ensaio tipo eppendorf e lavadas com PBS. Após desprezar o sobrenadante, foi adicionado às células 200  $\mu$ L de etanol 70% e as mesmas foram incubadas por 30 minutos a  $-4^{\circ}$  C. Foi então adicionado 1 mL de PBS + BSA 2% e centrifugado por 10 minutos à  $4^{\circ}$ C e 400 x g. Removido o sobrenadante, adicionou-se 0,25mL de RNase 100  $\mu$ g/mL + 0,1% de triton-X em PBS e no momento da análise, adicionou-se 20  $\mu$ g/mL de iodeto de propídeo. A análise do DNA foi realizada através da avaliação de 10 mil células em citômetro de fluxo (FACSCanto II, BD Biosciences). A população de células em cada fase do ciclo celular foi determinada usando o software WinMDI 2.9.

### **2.15. Análise estatística**

Os resultados foram expressos como a média  $\pm$  erro-padrão da média (EPM); cada experimento foi realizado em triplicata e repetido pelo menos três vezes. Para a avaliação estatística, foi utilizada a análise de variância de uma via (ANOVA), seguida do teste de Dunnet para comparar todos os tratamentos com o grupo controle. Um valor de  $p < 0,05$  foi considerado estatisticamente significativo.

### 3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

#### 3.1. Morte celular induzida pelas chalconas em células de leucemia murina (L1210)

A fim de melhor caracterizar a apoptose induzida pelas chalconas já verificada anteriormente (WINTER et al., 2010) e a necrose ainda não avaliada, foi realizado o teste da Anexina-V e do Iodeto de Propídio por citometria de fluxo que permite a quantificação das células nos diferentes estágios de morte celular.

O processo apoptótico produz uma assimetria da cadeia lipídica da membrana celular externalizando assim um fosfolipídio (fosfatidilserina). Este fosfolipídio pode ser identificado pela ligação à proteína Anexina V marcada com um fluoróforo que pode ser detectado por citometria de fluxo.

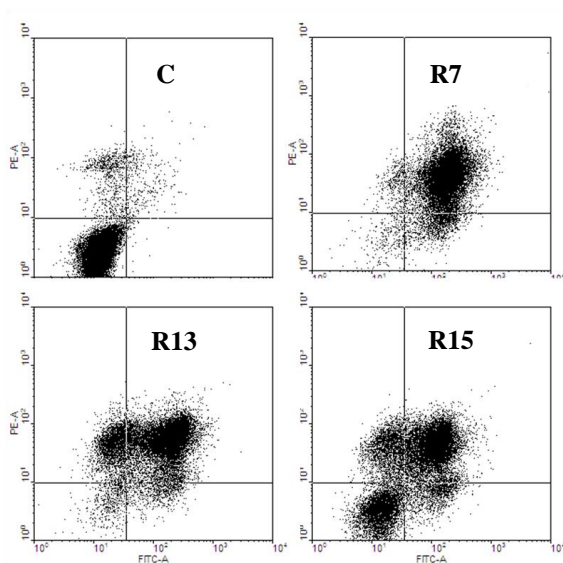
A necrose celular produz um rompimento da membrana celular o que permite que um corante impermeável à membrana celular, como o iodeto de propídio (IP), penetre livremente ligando-se ao DNA, podendo ser detectado também por citometria de fluxo. Desta forma podemos identificar e quantificar as células em apoptose (Anexina V positivas), as células em necrose (IP positivas), as células em apoptose tardia (Anexina V e IP positivas) e as células viáveis (Anexina V e IP negativas).

Após a análise das células no citômetro de fluxo foi obtido um gráfico do número de células encontradas com cada tipo de marcação. Cada um dos quadrantes obtidos representa um estágio celular. O quadrante inferior direito (ID) representa as células em apoptose, o quadrante superior esquerdo (SE) representa as células em necrose, o quadrante superior direito (SD) as células em apoptose tardia e o quadrante inferior esquerdo (IE) as células viáveis.

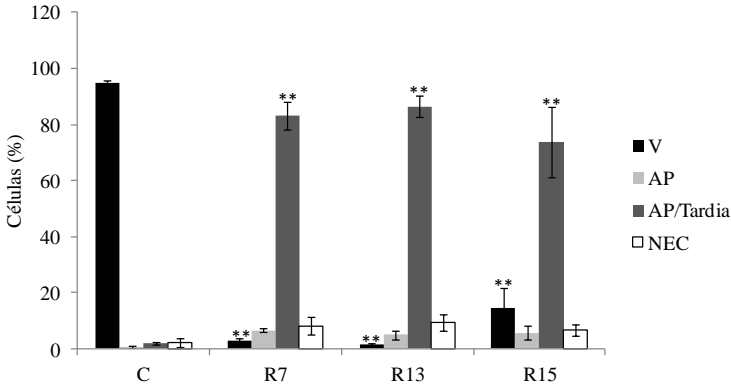
Podemos verificar que a apoptose foi o tipo de morte celular majoritário induzido por todas as chalconas (R7, R13 e R15) (Figuras 6 e 7).

O desenvolvimento de novos compostos para o tratamento de tumores malignos e das leucemias é baseado na capacidade destes compostos de inibirem a proliferação celular e induzirem a apoptose (HERR; DEBATIN, 2001). Da mesma forma, diversos estudos vêm sendo realizados para buscar novos agentes que induzam as células leucêmicas a apoptose (ZHANG et al., 2008; NICHOLSON, 2000; DEBATIN, 2004).

Nossos resultados confirmam que as chalconas induziram às células a apoptose e são, portanto, promissoras para o estudo de novos quimioterápicos. Outros autores também relataram que diferentes chalconas induziram a apoptose de células leucêmicas (PEDRINI et al., 2010; YE et al., 2005) e de outros tipos tumorais (YE et al., 2004; HSU et al., 2006).



**Figura 6: Análise do tipo de morte celular induzida pelas chalconas na linhagem de leucemia murina L1210.** A apoptose foi determinada pela análise da marcação com anexina V-FITC e a necrose pela marcação com IP. As células foram incubadas por 12 h com as chalconas ou com DMSO nas células controle. Os dot plots representam um dos experimentos realizados. As análises foram realizadas em um BD FACSanto II e avaliadas pelo software WinMID 2.9.



**Figura 7: Quantificação do tipo de morte celular induzida pelas chalconas na linhagem de leucemia murina L1210.** A apoptose foi determinada pela análise da marcação com anexina V-FITC e a necrose pela marcação com IP. As células foram incubadas por 12 h com as chalconas ou com DMSO nas células controle. **V:** células viáveis, **AP:** células em apoptose, **AP/Tardia:** células em apoptose tardia e **NEC:** células em necrose. Os resultados expressam a média  $\pm$  EPM. Valores de  $**p < 0,01$  foram considerados estatisticamente significativos quando comparados com o mesmo grupo nas células controle. O teste estatístico utilizado foi ANOVA de uma via seguido do teste de Dunnet.

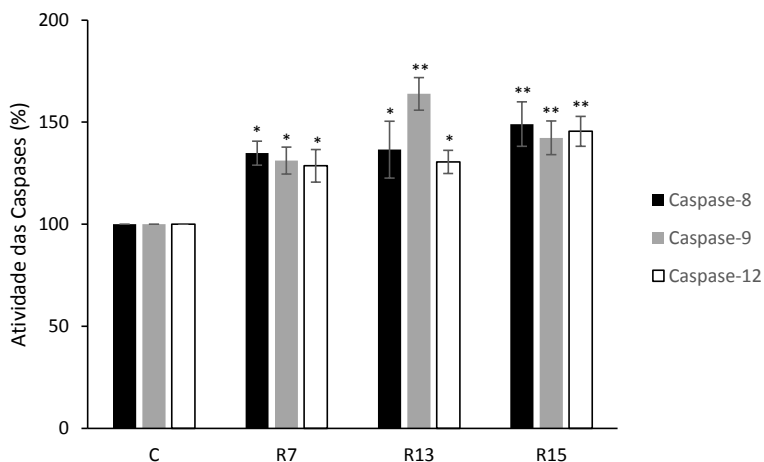
### 3.2. Avaliação da atividade das caspases 8, 9 e 12

As caspases são as principais proteases reguladoras da apoptose e estão diretamente envolvidas, tanto com a via extrínseca quanto com a via intrínseca deste tipo de morte celular (RIEDL; SHI, 2004). A caspase iniciadora 8 é responsável por transmitir os sinais de morte recebidos pelos receptores localizados na membrana celular enquanto a caspase iniciadora 9 é ativada na via intrínseca da apoptose quando ocorre a liberação de citocromo c. A ativação de ambas as caspases iniciadoras culmina na ativação da caspase-3 que é conhecida como caspase efetora e é responsável por clivar substratos específicos que induzem a fragmentação do DNA e culminam em apoptose (OLIVER; VALLETTE, 2005). Além das caspases iniciadoras 8 e 9, a caspase-12 é ativada em situações de estresse de retículo e também culmina em apoptose (GRÜTTER, 2000). Desta forma, é importante a detecção da atividade das caspases para melhor caracterizar a apoptose.



Em um trabalho anterior foi observado que as três chalconas induziram um aumento de 500% na atividade da caspase efetora 3 (WINTER et al., 2010). Neste trabalho, verificou-se que as chalconas induziram um aumento na atividade da caspase iniciadora 8 relacionada com a via extrínseca da apoptose, da caspase-9 relacionada com a via intrínseca e da caspase-12 que está relacionada a apoptose que ocorre em situações de estresse do retículo endoplasmático (Figura 8).

O processo de apoptose pode ser iniciado por estímulos externos ou internos caracterizando as vias extrínseca e intrínseca da apoptose respectivamente e também por situações em que as funções do retículo endoplasmático encontram-se comprometidas. Os resultados obtidos demonstram que a morte celular induzida pelas chalconas pode estar sendo iniciada, pela via extrínseca via caspase-8, pela via intrínseca via caspase-9 e pelo retículo endoplasmático via caspase-12.

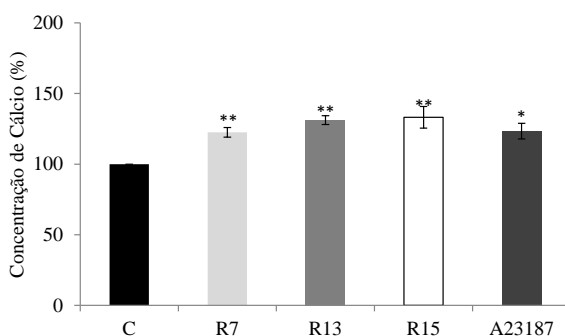


**Figura 8. Avaliação do efeito das chalconas R7, R13 e R15 na atividade das caspases 8 e 9 e 12 em células L1210.** Células foram incubadas com as chalconas por 4 h. A atividade das caspases foram obtidas através do monitoramento da clivagem do Ac-IETD-AMC, do Ac-LEHD-AFC e do Ac-ATAD-AFC, substratos fluorogênicos para caspase-8, 9 e 12 respectivamente, após 2 h de incubação. C representa o controle de células sem tratamento. Cada barra representa a Média ± EPM (n=5). Os dados foram expressos em porcentagem. Valores de \*p<0,05 e \*\*p<0,01 foram considerados estatisticamente significativos quando comparados com o controle sem tratamento, usando ANOVA seguido do teste de Dunnet.

Após a avaliação da atividade das caspases, buscou-se confirmar e elucidar as vias de apoptose envolvidas no mecanismo de ação das chalconas. Para isto, avaliou-se a expressão dos genes envolvidos em ambas as vias, intrínseca e extrínseca, possíveis alterações nas concentrações de cálcio intracelular resultantes do estresse de retículo endoplasmático, além da liberação de citocromo c que participa da sinalização da apoptose mitocondrial ou intrínseca.

### 3.3. Avaliação da concentração de cálcio intracelular

Nos ensaios de avaliação da concentração de cálcio intracelular observou-se que as três chalconas induziram aumento nas concentrações de cálcio intracelular assim como o ionóforo de cálcio A23187 utilizado como controle positivo (Figura 9). Estes resultados estão de acordo com o aumento da atividade das caspase 9 e 12 (Figura 8) também induzidos pelas chalconas e com o aumento da expressão do gene CHOP (*C/EBP-Homologous Protein*). A apoptose via estresse de retículo pode ser deflagrada quando há liberação de cálcio do RE que pode culminar na ativação das caspases 12 e 9 assim como de outras proteínas pró-apoptóticas como Bax, Bak e Bid (NAKAGAWA; YUAN, 2000).

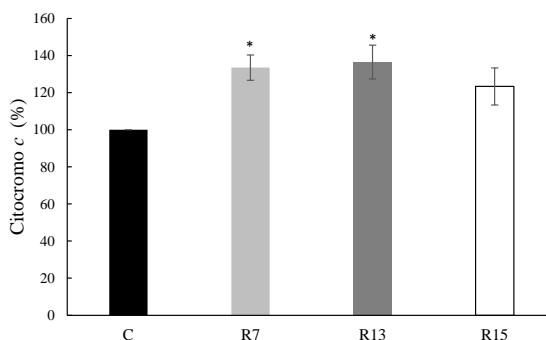


**Figura 9. Avaliação do efeito das chalconas R7, R13 e R15 na concentração de cálcio intracelular.** As células ( $1 \times 10^6$ ) foram incubadas com as chalconas por 4 h. A concentração de cálcio foi avaliada através da sonda fluorescente Fluo 3/AM. **C** representa o controle de células sem tratamento e **A23187** o controle positivo. Cada barra representa a Média  $\pm$  EPM (n=4). Os dados foram expressos em porcentagem em relação ao controle. Valores de \* $p < 0,05$  e \*\* $p < 0,01$  foram considerados estatisticamente significativos quando comparados

com o controle sem tratamento, usando ANOVA seguido do teste de Dunnett.

### 3.4. Avaliação da liberação de citocromo *c* no citosol

O citocromo *c* é um importante fator apoptogênico liberado da mitocôndria para o citosol e participa juntamente com a caspase-9 da formação do apoptossoma. Neste trabalho avaliou-se o efeito das chalconas na liberação de citocromo *c*. As chalconas **R7** e **R13** induziram aumento na liberação de citocromo *c* no citosol indicando que esses compostos induzem apoptose pela via intrínseca (Figura 10). Estes resultados corroboram com o aumento na atividade da caspase-9 (Figura 8), com o aumento na expressão dos genes pró-apoptóticos Bax, Bak e Bid e com a diminuição da expressão do gene anti-apoptótico Bcl-2 induzidos pela chalconas R7 e R13 (Figura 11).



**Figura 10. Avaliação do efeito das chalconas R7, R13 e R15 na liberação de citocromo *c*.** As células ( $5 \times 10^6$ ) foram incubadas com as chalconas por 4 h. O citocromo *c* foi avaliado em 414nm. C representa o controle de células sem tratamento. Cada barra representa a Média  $\pm$  EPM (n=6). Os dados foram expressos em porcentagem em relação ao controle. Valores de  $*p < 0,05$  foram considerados estatisticamente significativos quando comparados com o controle sem tratamento, usando ANOVA seguido do teste de Dunnett.

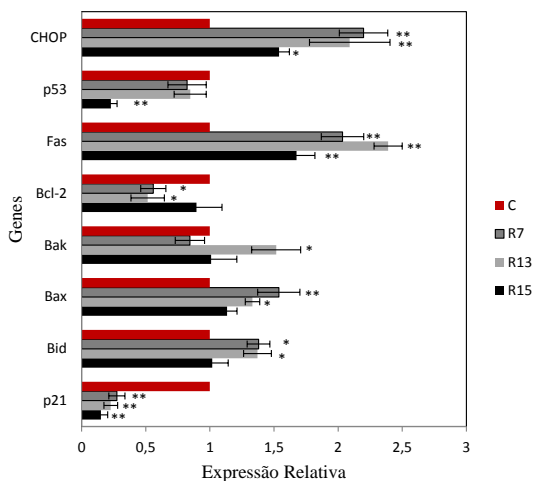
### 3.5. Avaliação da expressão gênica por PCR quantitativo

#### 3.5.1. Curvas de eficiência

Uma curva analítica de níveis de fluorescência detectáveis (Ct) foi gerada à partir de concentrações conhecidas de amostras de cDNA nas diluições 1/25, 1/125, 1/625 e 1/3125 para cada gene estudado. A curva padrão relaciona o nível de fluorescência com a quantidade de DNA amplificado. Pode-se observar que conforme a concentração do cDNA diminui, aumenta o número de ciclos necessários para se alcançar um nível de fluorescência detectável, ou nível crítico de “threshold” (Ct) (Apêndice A deste capítulo). Todos os primers em estudo apresentaram uma eficiência entre 90 e 98% (Apêndice B deste capítulo).

### 3.5.2. Quantificação relativa dos genes estudados

Na Figura 11 está representada a expressão relativa de cada gene alvo em relação às células controle (consideradas como 1), utilizando como gene normalizador o GAPDH.



**Figura 11. Efeito das chalconas R7, R13 e R15 na expressão dos genes CHOP, p53, Fas, Bcl-2, Bak, Bax, Bid e p21.** As células ( $3 \times 10^6$ ) foram incubadas com as chalconas por 4 h. A avaliação da expressão gênica foi realizada por PCR quantitativo em tempo real utilizando GAPDH como controle endógeno. Cada barra representa a Média  $\pm$  EPM ( $n=3$ ). Os dados foram expressos em relação ao controle de células sem tratamento considerado como 1. Valores de  $*p<0,05$  e  $**p<0,01$  foram considerados estatisticamente significativos quando comparados com o controle sem tratamento, usando ANOVA seguido do teste de Dunnet.

As chalconas **R7** e **R13** induziram aumento da expressão do receptor de morte Fas, da proteína Bid e de proteína pró-apoptótica Bax. Além disso, estas chalconas diminuíram a expressão da proteína antiapoptótica Bcl-2. Este conjunto de resultados demonstram que estas duas chalconas induzem a apoptose pelas vias extrínseca e intrínseca sendo que os resultados com a proteína Bid indicam uma conexão entre as duas vias.

O possível mecanismo de apoptose pela via extrínseca induzido pelas duas chalconas tem início na interação das mesmas com o receptor de morte Fas onde ocorre a ativação da caspase-8. A caspase -8 então cliva a proteína Bid em um fragmento de 15 kd (tBid), o qual migra para a mitocôndria induzindo a permeabilização da membrana mitocondrial e a liberação de citocromo *c* que é um forte ativador das proteínas Bax/Bak (BILLEN; SHAMAS-DIN; ANDREWS, 2009).

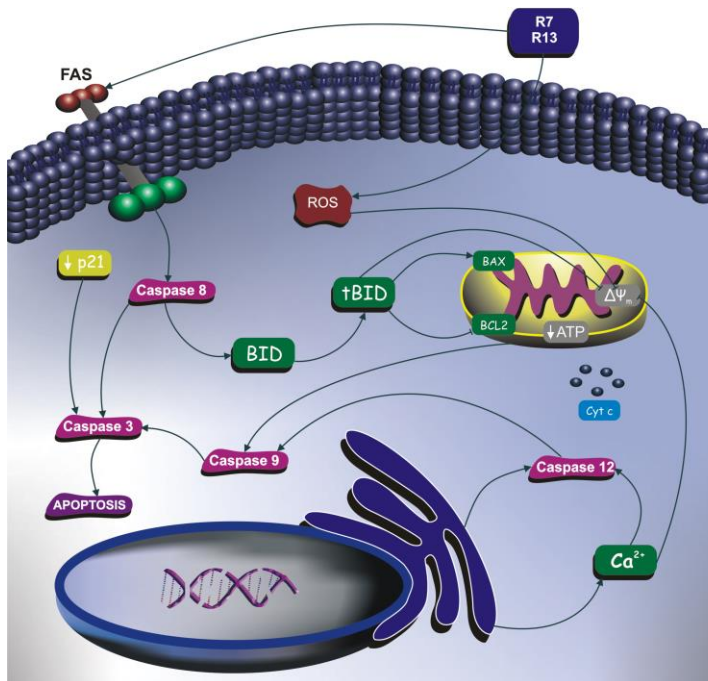
A apoptose pela via mitocondrial induzida por estas duas chalconas está inteiramente relacionada às proteínas Bax e Bak que fazem parte da grande família Bcl-2. A Bax induz a formação de poros na membrana mitocondrial e é responsável pela liberação de fatores pró-apoptóticos como: i) citocromo *c*, que leva a ativação da caspase-9 e ii) da proteína SMAC/DIABLO que inibe as IAPs (proteínas inibidoras da apoptose). Ao final, tanto a ativação da caspase-9 como a inibição das IAPs induzem a ativação da caspase 3 e a apoptose. Em resumo, a proteína Bax pode ser considerada uma iniciadora da via mitocondrial e uma intermediária da via extrínseca da apoptose (GHIBELLI; DIEDERICH, 2010). Resumidamente, o efeito das chalconas **R7** e **R13** em aumentar a expressão das proteínas pró-apoptóticas Bax e Bak e diminuir a expressão da proteína anti-apoptótica Bcl-2 pode estar relacionado a um dano mitocondrial (via intrínseca), a ativação da proteína Bid (via extrínseca) ou também a um estresse de retículo, que foi evidenciado pelo aumento das concentrações de cálcio e da atividade da caspase 12 (Figuras 9 e 8).

Em um trabalho anterior demonstramos que as chalconas **R7** e **R13** induziram um aumento de espécies reativas de oxigênio (EROs), perda do potencial de membrana mitocondrial e diminuição das concentrações de ATP (WINTER et al., 2010). Estes resultados corroboram os obtidos neste trabalho, permitindo sugerir que esses dois compostos induzem a apoptose pela via intrínseca.

O tratamento das células leucêmicas com todas as chalconas induziu um aumento na expressão do gene CHOP também conhecido como GADD153. O CHOP é um fator de transcrição ativado em situações de estresse de retículo (ER). Este fator induz a transcrição de diversos fatores indutores de ER como ATF4, ATF6 e XBP1. Além disso, o CHOP

está associado ao aumento de proteínas pró-apoptóticas mitocondriais e uma diminuição de proteínas anti-apoptóticas como Bcl-2 induzindo dessa forma o processo apoptótico (KIM; XU; REED, 2008; OYADOMARI; MORI, 2004). Esses resultados em conjunto com o aumento de cálcio intracelular (Figura 9) e a ativação de caspase-12 (Figura 8) confirmam que estas chalconas induzem estresse de retículo endoplasmático.

As duas chalconas também induziram uma forte diminuição da expressão da proteína p21 e não alteraram a expressão da proteína p53. A proteína p21 é uma proteína inibidora das ciclinas dependentes de quinases, que participa da regulação do ciclo celular, e atua induzindo a parada do ciclo celular (SHERR, 1996; VERMEULEN; BOCKSTAELE; BERNEMAN, 2003). No entanto, a proteína p21 também pode agir como anti-apoptótica por inibir a clivagem da caspase-3 e inibir as vias de estresse JNK1/SAPK e MAPK ASK1/MEKK5 (SUZUKI et al., 2000; DOTTO, 2000). As diferentes funções da proteína p21 estão relacionadas à localização intracelular, ou seja, no citoplasma a p21 pode levar à inativação das vias das MAPK e da caspase 3 e no núcleo à regulação do ciclo celular. Adicionalmente, uma alta expressão da proteína p21 no citoplasma poderia levar as células a resistência à apoptose (ASADA et al., 1999). Nossos resultados demonstram que as chalconas induzem a depleção da proteína p21 facilitando assim a ativação da caspase-3 e conseqüentemente a apoptose. A Figura 12 representa o provável mecanismo de ação das chalconas **R7** e **R13**.



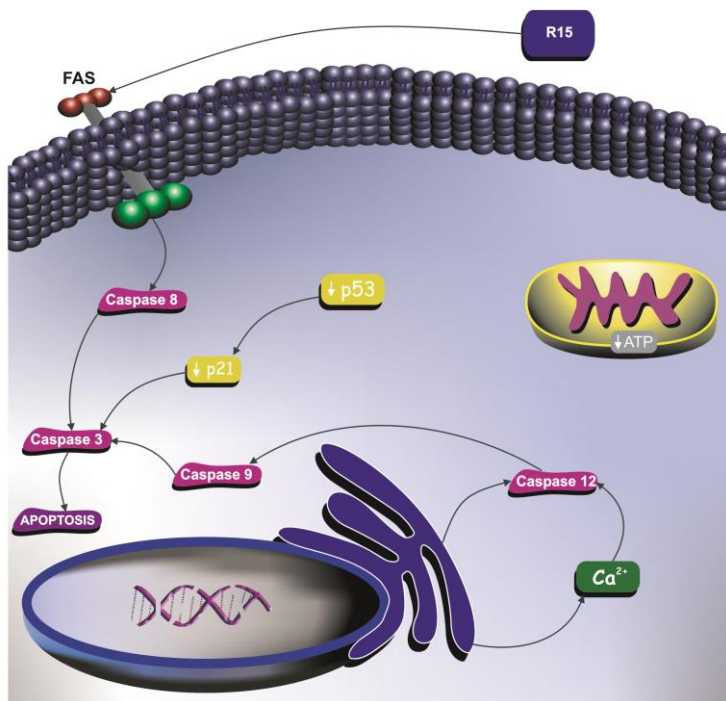
**Figura 12. Representação do provável mecanismo de ação das chalconas R7 e R13.** As chalconas induziram a via extrínseca da apoptose iniciada através da ativação do receptor de morte Fas, seguido pela ativação das caspases 8 e 3. A ativação da caspase 8 resultou na clivagem da proteína BID que induziu a apoptose via mitocondrial caracterizada pelo aumento das proteínas pró-apoptóticas Bax e Bak, diminuição da proteína anti-apoptótica Bcl-2, liberação de citocromo c, perda do potencial de membrana mitocondrial e diminuição de ATP. Estas duas chalconas também induziram estresse de retículo demonstrado através do aumento de cálcio intracelular e ativação das caspases 12 e 9.

A chalcona **R15** demonstrou ter um mecanismo de ação diferente das outras chalconas (Figura 13). Isto porque induziu aumento na expressão do Fas mas não da proteína Bid, induziu diminuição na expressão de p53 que não foi observado nos tratamentos com as outras chalconas e não induziu alterações na expressão das proteínas mitocondriais anti e pró-apoptóticas (Bcl-2, Bax e Bak).

A chalcona **R15** foi a substância que provocou o maior aumento da atividade da caspase 8 o que está relacionado a ativação da via extrínseca da apoptose. Esta chalcona também induziu aumento das caspases 9 e 12. O aumento da atividade da caspase-9, a qual relacionamos com a liberação das proteínas pró-apoptóticas nos tratamentos anteriores pode ser, neste caso, decorrente da ativação da caspase-12 em decorrência do estresse do RE. Todos estes resultados também estão de acordo com resultados anteriores, em que observamos que esta foi a única chalcona que não induziu a perda do potencial de membrana mitocondrial, demonstrando mais uma vez que a apoptose induzida neste caso parece não ter relação com a mitocôndria (WINTER et al., 2010).

A proteína p53 é um importante fator de transcrição celular envolvido na indução da apoptose e também na ativação da proteína p21 que resulta na parada da fase G1 do ciclo celular (SUZUKI; MATSUBARA, 2011; MIHARA et al., 2003; BENNETT et al., 1998). O gene p53 está mutado em cerca de 50% dos tumores (CHEOK et al., 2011) e a mutação neste gene está relacionada a um baixo prognóstico em crianças com LLA (KAWAMURA et al., 1999). Normalmente, o objetivo dos estudos que avaliam novos quimioterápicos é a indução da expressão de p53 selvagem ou a sua reativação (HUPP et al., 2000; LIU et al., 2008; MARTINEZ-RIVERA; SIDDIK, 2012). Novos estudos tem mostrado que a proteína p53 mutada pode alterar a transcrição de genes envolvidos na progressão tumoral e que não são regulados pela proteína p53 selvagem. Segundo esta nova abordagem, compostos que diminuem a expressão da p53 mutada poderiam ser alvos na busca por novos quimioterápicos (MARTINEZ-RIVERA; SIDDIK, 2012; CORY et al., 2006; BOSSI et al., 2006; OREN; ROTTER, 2010). Neste trabalho observamos que a chalcona **R15** induziu uma diminuição na expressão da proteína p53. Estes resultados estão de acordo com a diminuição da expressão da proteína p21. Mais estudos são necessários para avaliar a relação entre a diminuição de p53 e a morte celular induzida pelas chalconas. No entanto, a diminuição desta expressão corresponde a p53 mutada já que a linhagem L1210 utilizada apresenta essa mutação (CORY et al., 2006; HE; CORY, 1998). Sendo assim, a chalcona **R15** estaria induzindo a diminuição da expressão da proteína p53 mutada e a ativação de fatores envolvidos na progressão tumoral.





**Figura 13. Representação do provável mecanismo de ação da chalcona R15.** A chalcona R15 induziu a via extrínseca da apoptose através da ativação do receptor de morte Fas que consequentemente leva a ativação da caspase iniciadora 8 e da caspase efetora 3. Esta chalcona também induziu a apoptose por estresse de retículo evidenciado através do aumento de cálcio intracelular, ativação da caspase 12 e da caspase 9. A diminuição das concentrações de ATP observadas em estudo anterior podem ser consequência do processo de morte e não tem relação com a via mitocondrial da apoptose.

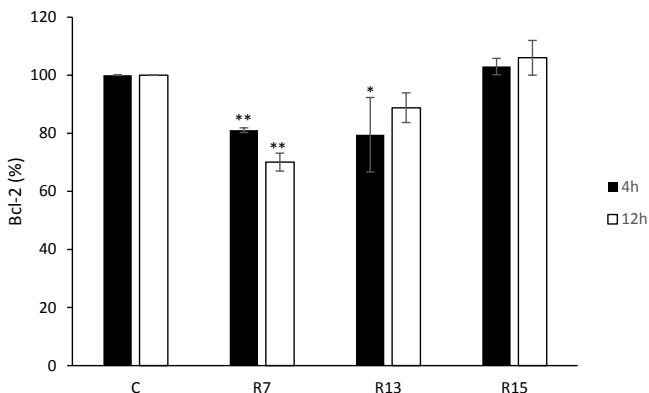
### 3.6. Análise da expressão das proteínas Bcl-2, p53 e Fas por citometria de fluxo

A fim de confirmar os resultados de expressão gênica obtidos por PCR, a expressão das proteínas Bcl-2, p53 e Fas foi avaliada por citometria de fluxo utilizando anticorpos específicos para estas proteínas.

Em relação a proteína Bcl-2 os resultados de citometria confirmaram que as chalconas R7 e R13 induzem uma diminuição na

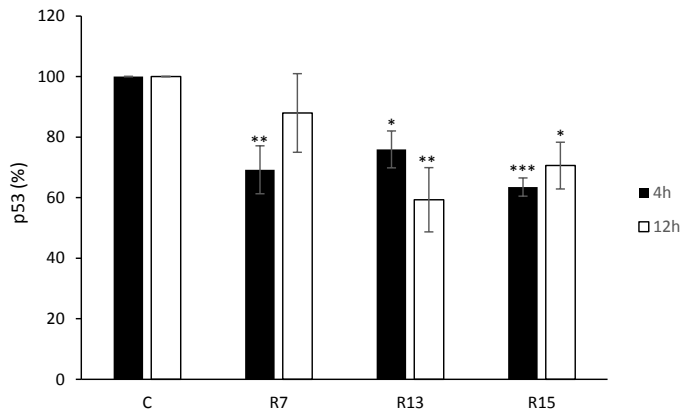
expressão desta proteína e a chalcona R15 não induz alteração (Figura 14) de acordo com os resultados de PCR apresentados na figura 11.

Muitos tumores, incluindo leucemias, se desenvolvem devido a uma alteração na expressão dos genes Bcl-2 e Bax. O aumento da expressão da proteína anti-apoptótica Bcl2 e diminuição da proteína pró-apoptótica Bax tem sido a causa do desenvolvimento de tumores e também tem sido considerado uma barreira nos tratamentos (PEPPER; BENTLEY; HOY, 1996; THOMAS et al., 1996; BUGGINS; PEPPER, 2010; KHAN; BISEN, 2013; KORABIOWSKA et al., 1999). Por isso, a diminuição da proteína Bcl-2 e aumento da proteína Bax tem sido sugerido como uma estratégia terapêutica no câncer (HIOKI et al., 2008; KO et al., 2013; ELUMALAI et al., 2012).



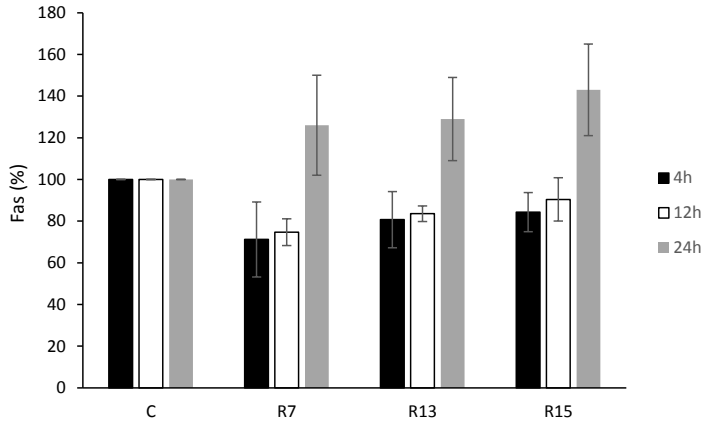
**Figura 14. Efeito das chalconas R7, R13 e R15 na expressão da proteína Bcl-2.** As células ( $1,5 \times 10^6$ ) foram incubadas com as chalconas por 4 e 12 horas. A avaliação da expressão protéica foi realizada por citometria de fluxo utilizando anticorpos específicos conjugados a ficoeritrina. Cada barra representa a Média  $\pm$  EPM (n=3). Os dados foram expressos em porcentagem. Valores de \* $p < 0,05$  e \*\* $p < 0,01$  foram considerados estatisticamente significativos quando comparados com o controle sem tratamento, usando ANOVA seguido do teste de Dunnet.

Todas as chalconas induziram uma diminuição na expressão da proteína p53. Estes resultados confirmam os resultados de PCR que demonstraram a diminuição da expressão de p53 induzida pela chalcona R15 e a tendência à diminuição induzida pelas chalconas R7 e R13 (Figura 15).



**Figura 15. Efeito das chalconas R7, R13 e R15 na expressão da proteína p53.** As células ( $1,5 \times 10^6$ ) foram incubadas com as chalconas por 4 e 12 horas. A avaliação da expressão protéica foi realizada por citometria de fluxo utilizando anticorpos específicos conjugados a ficoeritrina. Cada barra representa a Média  $\pm$  EPM ( $n=3$ ). Os dados foram expressos em porcentagem. Valores de \* $p < 0,05$ , \*\* $p < 0,01$  e \*\*\* $p < 0,001$  foram considerados estatisticamente significativos quando comparados com o controle sem tratamento, usando ANOVA seguido do teste de Dunnet.

Ao contrário do que foi observado no ensaio de PCR, as chalconas não induziram aumento do receptor de membrana Fas nos ensaios de citometria de fluxo após 4 e 12 horas de incubação. Por esta razão foram realizados testes com 24 horas de incubação e observou-se uma tendência de aumento da expressão de Fas induzido pelas chalconas (Figura 16). Embora o aumento não tenha atingido significância estatística, o conjunto dos resultados incluindo os de PCR e das atividades das caspases indicam que as chalconas ativam a via extrínseca da apoptose.



**Figura 16. Efeito das chalconas R7, R13 e R15 na expressão da proteína Fas.** As células ( $1,5 \times 10^6$ ) foram incubadas com as chalconas por 4, 12 e 24 horas. A avaliação da expressão protéica foi realizada por citometria de fluxo utilizando anticorpos conjugados a ficoeritrina. Cada barra representa a Média  $\pm$  EPM ( $n=3$ ). Os dados foram expressos em porcentagem.

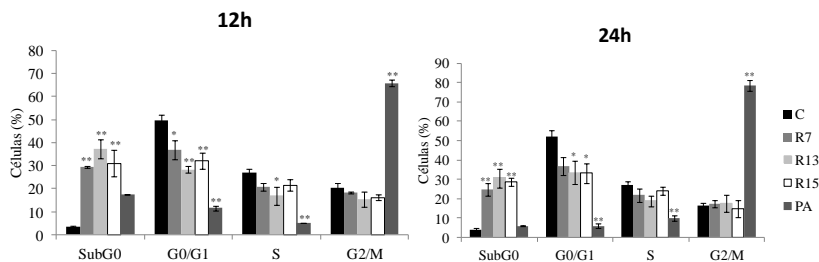
### 3.7. Efeito das chalconas no ciclo celular

O avanço no estudo molecular da carcinogênese e da apoptose tem mostrado que a regulação do ciclo celular exerce uma função na transformação maligna e no desenvolvimento de resistência aos quimioterápicos. Estas observações têm levado a pesquisa e ao desenvolvimento de fármacos com capacidade de inibir a progressão do ciclo celular em células malignas (SCHWARTZ; SHAH, 2005). Neste sentido, diversos estudos têm mostrado a atividade antiproliferativa de chalconas através da inibição do ciclo celular (ROZMER; BERKI; PERJÉSI, 2006; MIELCKE et al., 2012; RAO et al., 2010).

Assim, buscando-se elucidar uma possível ação das chalconas no ciclo celular, avaliou-se o efeito das mesmas após 12 e 24 h de incubação nas diferentes fases do ciclo celular.

Em comparação com o grupo controle, as células L1210 tratadas com as chalconas não induziram a parada do ciclo celular em nenhuma das fases em ambos os tempos de tratamento. Ao contrário, as chalconas induziram uma diminuição na proporção de células nas fases G0/G1 e S decorrente do aumento de células na fase SubG0 que corresponde às células em apoptose. O controle positivo (Paclitaxel) induziu a parada do

ciclo celular na fase G2/M como esperado, já que o mecanismo de ação deste fármaco é a inibição da despolimerização dos microtúbulos durante a mitose (Figura 17 e Apêndice C e D deste capítulo).



**Figura 17: Efeito das chalconas R7, R13 e R15 e do Paclitaxel no ciclo celular em células L1210.** Células L1210 foram incubadas com as chalconas e com o paclitaxel (PA), utilizado como controle positivo, por 12 e 24 h. As fases SubG0, G0/G1, S e G2/M foram determinadas pela análise do conteúdo de DNA após marcação com IP e analisadas em citometria de fluxo. A porcentagem de células em cada fase foi quantificada pelo software WinMDI 2.9. Cada ponto representa a média  $\pm$  EPM de três experimentos independentes. Valores de \*  $p<0,05$  e \*\*  $p<0,01$  foram considerados estatisticamente significativos quando comparados com o grupo controle em cada fase do ciclo celular, usando ANOVA, seguido do teste de Dunnet.

Sabe-se que o ciclo celular é regulado por diferentes proteínas. As CDKs (quinases dependentes de ciclinas) são controladoras positivas do ciclo celular e são expressas durante todo o ciclo na forma inativa, sendo ativadas quando ligadas as ciclinas. As ciclinas tem um padrão cíclico de variação durante o ciclo celular e são sintetizadas somente em fases específicas. As CKIs (quinases inibidoras de ciclinas) atuam bloqueando as CDKs e induzindo a parada do ciclo celular. As proteínas p21, p27 e p57 são CKIs importantes que atuam inibindo a proliferação celular (SHERR, 1996; VERMEULEN; BOCKSTAELE; BERNEMAN, 2003). Como demonstrado na Figura 11, as chalconas induzem uma forte diminuição na expressão do gene da proteína p21. Este fato pode estar relacionado à ausência do efeito das chalconas na parada do ciclo celular.

#### 4. CONCLUSÕES

De acordo com os resultados demonstrados neste capítulo, podemos concluir que todas as chalconas induziram a apoptose.

Em relação ao mecanismo de morte envolvido verificamos que as chalconas R7 e R13 induzem a apoptose pela via extrínseca e intrínseca, mecanismo viável, já que a proteína Bid é a responsável por interligar as duas vias. Além disso, estas chalconas induzem um estresse de retículo e a ativação da apoptose também por esta via.

A chalcona R15 parece ter um mecanismo de morte diferente ativando a via extrínseca da apoptose e induzindo o estresse de retículo. Esta chalcona que parece não ter nenhuma relação com a via mitocondrial da apoptose, apresenta um efeito sobre a proteína p53 não observado com as outras chalconas.

O fato das chalconas estudadas induzirem mais de uma via da apoptose pode representar uma vantagem considerando o tratamento de tumores que desenvolveram algum tipo de resistência contra uma das vias apoptóticas. Dessa forma, justifica-se como perspectivas que ensaios adicionais devem ser realizados para avaliar a eficácia destes compostos *in vivo*.

#### 5. PERSPECTIVAS

Como perspectivas no estudo da atividade das chalconas R7, R13 e R15, sugere-se:

- Avaliação da atividade antitumoral dos compostos em modelo murino de leucemia;
- Avaliação da atividade antitumoral dos compostos em outros modelos de câncer.

## ANEXO A - ARTIGO SUBMETIDO

Os resultados contidos neste capítulo resultaram na redação de um artigo submetido para a revista *Toxicology in vitro*.

### **Involvement of extrinsic and intrinsic apoptotic pathways together with endoplasmic reticulum stress in cell death induced by naphthylchalcones in a leukemic cell line: advantages of multi-target action.**

Evelyn Winter<sup>a</sup>, Louise Domeneghini Chiaradia<sup>b</sup>, Adny Henrique Silva<sup>a</sup>, Ricardo José Nunes<sup>b</sup>, Rosendo Augusto Yunes<sup>b</sup> and Tânia Beatriz Creczynski-Pasa<sup>a\*</sup>

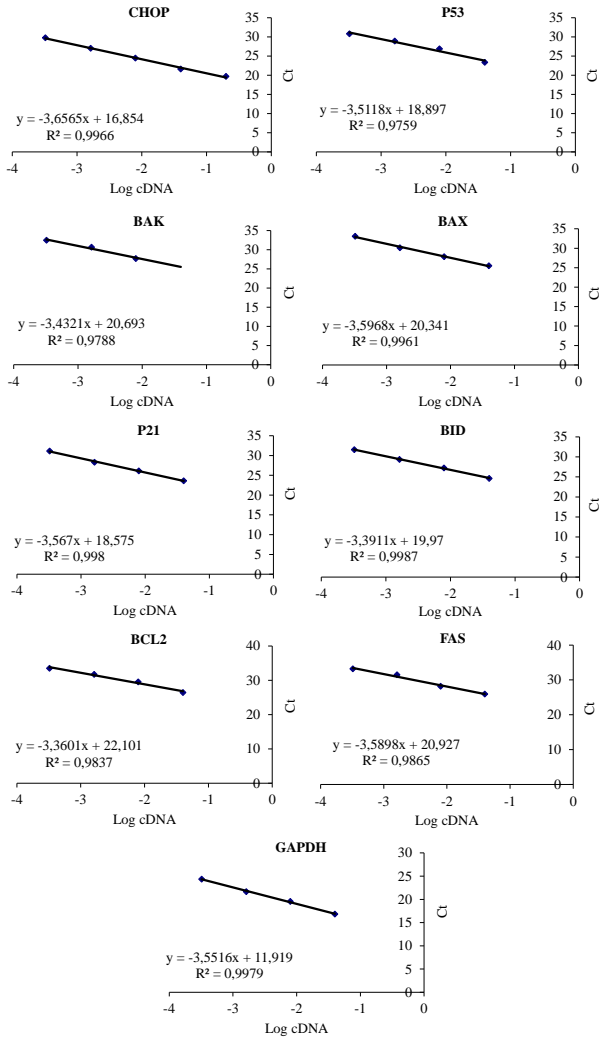
<sup>a</sup>Departamento de Ciências Farmacêuticas, <sup>b</sup>Departamento de Química, Universidade Federal de Santa Catarina, 88040-900, Florianópolis, SC, Brazil

\* Corresponding author. Tel: + 55 48 3721 2212; fax: + 55 48 37219542; e-mail: [tania.pasa@ufsc.br](mailto:tania.pasa@ufsc.br); [taniabcp@gmail.com](mailto:taniabcp@gmail.com);

#### **Abstract**

Chalcones, naturally occurring open-chain flavonoids abundant in plants, have demonstrated anticancer activity in multiple tumor cells. In a previous work, the potential anticancer activity of three naphthylchalcones named R7, R13 and R15 was shown. In this study, the mechanism of actions of these chalcones was originally shown. The chalcones presented concentration and time-dependent cytotoxicity. To determine the type of cell death induced by chalcones, we assessed a series of assays including measurements of the caspase-8, -9 and -12 activities, expression of important apoptosis-related genes and proteins, changes in the cell calcium concentration and cytochrome c release. The activities of caspase-8, -9 and -12 increased after the treatment of L1210 cells with the three compounds. Chalcones R7 and R13 induced an increase of pro-apoptotic proteins Bax, Bid and Bak (only chalcone R13), as well as a decrease in anti-apoptotic Bcl-2 expression. These chalcones also induced an increase in Fas and a decrease in p21 and p53 expression. Chalcone R15 seems to act by a different mechanism to promote cell death, as it did not change the mitochondrion-related proteins, nor did it induce the cytochrome c release. All compounds induced an increase in cell calcium concentration, which together with an increase in caspase-12 activity, suggest that chalcones could induce an endoplasmic reticulum (ER) stress. Taken together, these results suggest that chalcones induce apoptosis by different pathways, being an interesting strategy to suggest for cancer therapy.

## APÊNDICE A – Gráficos das Curvas de Eficiência dos Oligonucleotídeos



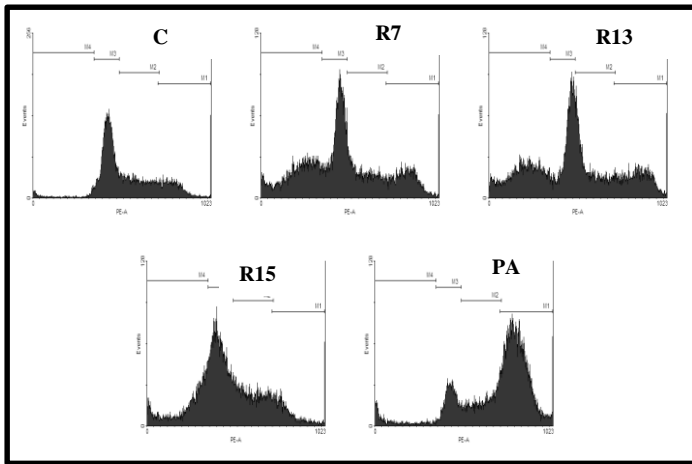


**APÊNDICE B** – Eficiência dos oligonucleotídeos (%).

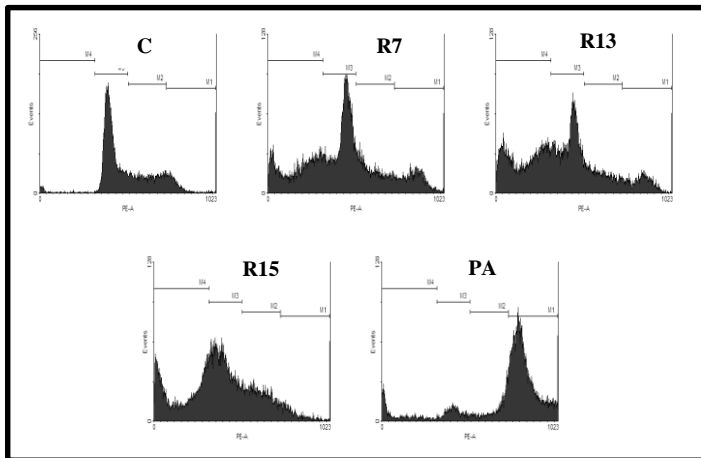
<b>OLIGONUCLEOTÍDEOS</b>	<b><i>EFICIÊNCIA (%)</i></b>
CHOP	88,6
p53	92,6
Bak	95,6
Bax	89,7
p21	90,7
Bid	97,2
Bcl-2	98,4
Fas	90,0
GAPDH	91,3

**APÊNDICE C – Histogramas dos experimentos de ciclo celular após 12 (A) e 24 h (B) de incubação.** Células L1210 foram incubadas com as chalconas e com o paclitaxel, utilizado como controle positivo. As fases SubG0, G0/G1, S e G2/M foram determinadas pela análise do conteúdo de DNA após marcação com IP e 10000 células foram analisadas em citômetro de fluxo BD FascCanto II. A porcentagem de células em cada fase foi quantificada pelo software WinMDI 2.9.

A)



B)



CAPÍTULO 2 –  
ENCAPSULAMENTO DAS  
CHALCONAS EM  
SISTEMAS  
NANOESTRUTURADOS  
LIPÍDICOS E AVALIAÇÃO  
DA EFICÁCIA  
ANTITUMORAL E DA  
TOXICIDADE DAS  
CHALCONAS LIVRES E  
ENCAPSULADAS

## 1. INTRODUÇÃO

Nos últimos anos, tem se buscado alternativas mais eficientes e menos tóxicas para diminuir os efeitos indesejáveis da quimioterapia para o tratamento do câncer e a nanotecnologia tem despertado o interesse de pesquisadores de várias áreas. Nanotecnologia pode ser definida como uma abordagem tecnológica envolvida no planejamento, síntese, caracterização e aplicação de materiais que apresentam pelo menos uma dimensão em escala nanométrica (SAHOO; PARVEEN; PANDA, 2007).

Entre as muitas aplicações da nanotecnologia, a vetorização de fármacos e as aplicações no segmento de imagens médicas têm auxiliado no diagnóstico e tratamento de pacientes com câncer (KAWASAKI; PLAYER, 2005; MACEWAN; CALLAHAN; CHILKOTI, 2010)

No caso da quimioterapia para o câncer em particular, em que o principal problema, está relacionado a baixa seletividade dos fármacos às células tumorais, a nanoencapsulação pode ser utilizada com alternativa para minimizar os efeitos adversos (KAWASAKI; PLAYER, 2005; BRIGGER; DUBERNET; COUVREUR, 2002). Especialmente para tumores sólidos, o aumento da permeabilidade vascular do tecido tumoral possibilita o extravasamento de carreadores de fármacos nanoestruturados apresentando entre 10 e 700 nanômetros de diâmetro. Este aumento da permeabilidade capilar é decorrente da má formação da neovasculatura dos tecidos tumorais caracterizando o efeito EPR (*Enhanced Permeability and Retention*). Assim, a aplicação da nanotecnologia melhoraria a seletividade dos agentes antitumorais e protegeria os tecidos saudáveis da exposição aos agentes citotóxicos, reduzindo os efeitos indesejados (YEZHELYEV et al., 2006; MAEDA, 2001). A encapsulação de quimioterápicos também facilita o uso daquelas substâncias que apresentam baixa solubilidade e daqueles fármacos que apresentam um curto tempo de meia-vida plasmática (YEZHELYEV et al., 2006; BRIGGER; DUBERNET; COUVREUR, 2002). Ainda entre as mais diversas vantagens do uso da tecnologia da nanoencapsulação, está o aumento da biodisponibilidade de fármacos no sistema nervoso central que é o local extramedular mais envolvido na LLA. A baixa capacidade dos fármacos quimioterápicos de atravessar a barreira hematoencefálica é o principal obstáculo para a cura de muitos tumores (BOSTROM et al., 2003). A encapsulação destes fármacos pode ser uma importante estratégia terapêutica nestes casos (KREUTER, 2001).

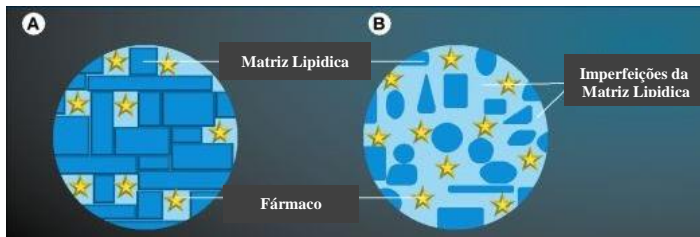
Uma classe de quimioterápicos bastante utilizada principalmente na primeira fase do tratamento da LLA são as antraciclinas (TALPAZ et al., 2006), no entanto, as mesmas apresentam uma significativa toxicidade cardíaca. Altas concentrações no pico plasmático estão associadas à cardiopatia congestiva ao longo do tratamento. Através da encapsulação, esta toxicidade pode ser diminuída principalmente porque os sistemas nanoestruturados permitem uma liberação controlada dos fármacos evitando os picos plasmáticos (HALEY; FRENKEL, 2008). Atualmente, existem muitos ensaios clínicos sendo realizados utilizando quimioterápicos encapsulados para o tratamento de vários tipos de câncer (NIH, 2011).

Os primeiros sistemas nanoestruturados desenvolvidos foram os lipossomas que são vesículas compostas por uma ou mais bicamadas lipídicas. Atualmente a doxorubicina lipossomal (Doxil®) é indicada nos EUA para os tratamentos de cancer de mama metastático e sarcoma de Kaposi (GABIZON; SHMEEDA; YECHEZKEL, 2003). Entretanto, os lipossomas apresentam uma importante limitação pois, podem apresentar problemas de estabilidade físico-química. Posteriormente aos lipossomas, foram desenvolvidos os nanocarreadores poliméricos, que são constituídos de polímeros naturais ou sintéticos. Para o desenvolvimento destas estruturas, pode ser utilizada uma variedade de polímeros biodegradáveis sendo possível modifica-los quimicamente no intuito de direcionar as partículas para alvos específicos (PRIDGEN; LANGER; FAROKHZAD, 2007).

As nanopartículas lipídicas foram desenvolvidas posteriormente e vem apresentando grande versatilidade em termos de materiais para a preparação das formulações, para diferentes objetivos. Estas estruturas lipídicas têm sido classificadas assim: nanopartículas lipídicas sólidas, carreadores lipídicos nano-estruturados e nanoemulsões (WISSING; KAISER; MÜLLER, 2004).

As nanopartículas lipídicas sólidas (NLS) são partículas que contem na sua matriz um lipídio sólido a temperatura ambiente e corporal e variam entre 50 e 1000 nm (Figura 18). Como vantagens no uso da NLS estão a capacidade de proteger o fármaco de degradação e a possibilidade de modular a liberação do mesmo (HUANG et al., 2008). Como desvantagem, este sistema nanoestruturado apresenta baixa capacidade de encapsulação, porque a utilização de um único lipídio gera cristais perfeitos dificultando a entrada do fármaco entre as cadeias lipídicas e nas imperfeições dos cristais (BUNJES; WESTESEN; KOCH, 1996). Além disso, a transição polimórfica durante a estocagem pode causar a expulsão do fármaco (WISSING; KAISER; MÜLLER, 2004).

Para melhorar a eficiência de encapsulação foram desenvolvidos os Nanocarreadores Lipídicos (NL) que podem ser compostos de dois lipídios sólidos diferentes ou de um lipídio sólido e um óleo (HUANG et al., 2008). A mistura de dois lipídios sólidos diferentes aumenta a distância entre as cadeias de ácidos graxos e aumenta a quantidade de fármaco encapsulado (MARCATO; 2009) (Figura 18). A presença de um óleo na formulação possibilita a encapsulação de fármacos que apresentam maior solubilidade em óleos do que em lipídios sólidos permitindo uma boa encapsulação da substância e ao mesmo tempo o lipídio sólido protege-o da degradação (WISSING; KAISER; MÜLLER, 2004). Como o óleo não sofre o processo de cristalização não ocorre a expulsão do fármaco como nas NLS (JENNING; MADER; GOHLA, 2000).



**Figura 18: Representação da encapsulação de um fármaco em um sistema nanolipídico sólido (A) e um sistema nanolipídico composto (B).**

**Fonte:** Adaptado de ANDRADE et al., 2011.

As nanoemulsões (NE) são sistemas compostos de gotículas de óleo dispersas em meio aquoso e estabilizados por surfactante. Além disso, são sistemas mais estáveis que não apresentam floculação ou coalescência durante longo tempo de estocagem (GAO et al., 2011).

Diversos trabalhos têm comparado diferentes formulações lipídicas com o intuito de desenvolver um carreador nanoestruturado que apresente baixa citotoxicidade, boa estabilidade, boa encapsulação e bom perfil de liberação dos fármacos encapsulados (HUANG et al., 2008; FANG et al., 2011; WANG et al., 2009).

Neste trabalho foram estudados três sistemas nanoestruturados lipídicos sendo uma nanopartícula lipídica sólida, uma nanopartícula lipídica composta e uma nanoemulsão. A síntese e a caracterização das nanopartículas foram realizadas em colaboração e estão descritas no Apêndice A. Inicialmente comparou-se a toxicidade dos três sistemas

nanoestruturados brancos. Em seguida, encapsulou-se as três chalconas e verificou-se o efeito antitumoral das moléculas livres e encapsuladas em células de leucemia L1210. Adicionalmente, comparou-se o efeito citotóxico dos compostos livres e encapsulados na nanoemulsão em células epiteliais VERO e *in vivo*.

## 2. MATERIAIS E MÉTODOS

### 2.1. Reagentes

Os meios de cultura DMEM e RPMI e o soro fetal bovino (SFB) foram adquiridos da Cultilab (São Paulo, Brasil); a penicilina e estreptomicina foram compradas da Gibco® (Grand Island, NY, EUA); o dimetil sulfoxido (DMSO) e o metanol foram adquiridos da Vetec; o brometo de dimetiazol difeniltetrazólio (MTT) e o Azul de Tripán foram adquiridos da Sigma; a lecitina S75 foi adquirida da Lipoid; o monoestearato de glicerila foi adquirido da Galena (Brasil); o miglyol 812M foi gentilmente cedido pela Sasol (Alemanha).

### 2.2 Formulação das nanopartículas lipídicas

A formulação das nanopartículas foi realizada pela aluna de doutorado do Programa de Pós-Graduação em Farmácia: Carine Dal Pizzol. A formulação e caracterização das nanopartículas estão descritas no Apêndice A deste capítulo. Os lipídios utilizados foram o monoestearato de glicerila (MEG), sólido à temperatura ambiente e o Miglyol (triglicerídeo de ácido cáprico e caprílico), líquido à temperatura ambiente (Tabela 2).

**Tabela 2: Composição das nanopartículas lipídicas**

Formulações	Chalconas (%)	Miglyol (mg/ml)	MEG (mg/ml)	Tween 80 (%)	Lecitina S75 (%)
R7 NLS	0,05	-	20	0,8	0,2
R7 NLC	0,05	10	10	0,8	0,2
R7 NE	0,05	20	-	0,8	0,2
R13 NLS	0,05	-	20	0,8	0,2
R13 NLC	0,05	10	10	0,8	0,2
R13 NE	0,05	20	-	0,8	0,2
R15 NLS	0,05	-	20	0,8	0,2
R15 NLC	0,05	10	10	0,8	0,2
R15 NE	0,05	20	-	0,8	0,2
NLS	-	-	20	0,8	0,2
NLC	-	10	10	0,8	0,2
NE	-	20	-	0,8	0,2

NLS – nanopartícula lipídica sólida, NLC – nanopartícula lipídica composta, NE - nanoemulsão



### **2.3. Cultura celular**

A linhagem de célula leucêmica linfoblástica de origem murina (L1210) e a linhagem de epitélio renal de macaco (VERO), obtidas da American Type Culture Cell (ATCC) foram utilizadas neste trabalho como modelos de leucemia e de células não tumorais, respectivamente. As células L1210 foram mantidas em garrafas plásticas de cultura, contendo meio RPMI 1640 e as células VERO em meio DMEM, ambos suplementados com 10% de soro fetal bovino, 100 U/mL de penicilina, 100 µg/mL de estreptomicina, 10 mM HEPES, pH 7.4, em estufa umidificada, a 37°C e com 5% CO<sub>2</sub>. Antes da realização de todos os experimentos, o número de células viáveis foi avaliado pelo método de Azul de Trypan (FRESHNEY, 1987), e a contagem realizada em câmara de Neubauer.

### **2.4. Tratamento celular das linhagens celulares com as chalconas livres, encapsuladas e com os sistemas nanosestruturados brancos**

Para os tratamentos com as chalconas livres, os compostos foram dissolvidos em uma solução estoque em DMSO e armazenados a 4°C. Essas soluções estoques foram diluídas em meio de cultura para atingir as concentrações desejadas nos experimentos (5 a 100 µM). Foram utilizados controles de células tratados com DMSO, diluído em meio de cultura, na mesma proporção utilizada para dissolver os compostos.

Para os tratamentos com as chalconas encapsuladas, as nanopartículas contendo as chalconas foram incubadas com as células em concentrações equivalentes aos tratamentos com as chalconas livres (5 a 100 µM).

Para os tratamentos com as nanopartículas brancas, foram plaqueados volumes necessários para obter as concentrações de chalcona desejadas, resultando na seguinte curva/concentração de lipídio: 0,05; 0,1; 0,2; 0,3; 0,5; 0,7 e 1 mg/mL.

Após a realização de curvas concentração-resposta foram calculados valores de CC<sub>50</sub> ou de área sobre a curva (ASC) para os tratamentos onde a máxima concentração não induziu 50% de morte celular.

## 2.5. Ensaio de viabilidade celular

A viabilidade celular foi analisada pelo método do MTT (Brometo de 3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difeniltetrazolio) (MOSMANN, 1983). O MTT é um sal de tetrazólio de cor amarela, que é reduzido a formazan, de cor azulada, pela atividade oxidativa das células, funcionando pois, como um indicador de viabilidade celular. Foram incubadas  $1 \times 10^5$  células por 24 h e  $5 \times 10^4$  por 48 h, em triplicata, com os compostos e as nanopartículas, em placas de 96 poços. Decorrido o tempo de incubação, o meio de cultura foi retirado e acrescentado um novo meio contendo o MTT (0,25  $\mu\text{g}/\mu\text{l}$ ) seguido de incubação por 1 hora, a 37°C. Este meio foi retirado e o precipitado formazan foi dissolvido em DMSO. O formazan formado foi medido em 540nm, com o uso de um leitor de microplacas. A densidade óptica, obtida do grupo controle, células sem tratamento, foi considerado como 100% de células viáveis.

## 2.6. Determinação da hemólise

A determinação da hemólise foi avaliada segundo Wang e colaboradores (2009). Amostras de sangue de indivíduos saudáveis foram obtidas por venopunção em tubos contendo 3,2 % de citrato de sódio. Os eritrócitos foram separados por centrifugação a 200 x g por 5 minutos e lavados 3 vezes com solução salina. Os eritrócitos correspondentes a 1 mL de sangue foram ressuspensos em 10 mL de solução salina.

Em tubos eppendorfs foram adicionados os compostos testes: 1) chalconas livres, 2) volume equivalente de chalconas encapsuladas e 3) diferentes concentrações de nanopartículas brancas. Posteriormente, foi adicionada solução salina qsp para 1,25 mL e 50  $\mu\text{L}$  da suspensão de eritrócitos. A incubação foi realizada a 37°C por 1 hora com agitação. Decorrido o tempo de incubação, as amostras foram centrifugadas e ao hemolisado foi adicionado 500  $\mu\text{L}$  de diclorometano para separar a fase lipídica das nanopartículas que causam turbidez ao hemolisado. As amostras foram novamente centrifugadas e a absorbância da fase aquosa foi avaliada em 415 nm. Como controle positivo foi adicionado 1,25mL de água à suspensão de eritrócitos. O controle positivo foi considerado 100 % de hemólise.

## 2.7. Estudos *in vivo*

Os estudos *in vivo* foram realizados em colaboração com a pesquisadora Claudriana Locatelli da Universidade do Oeste de Santa

Catarina (UNOESC) em Videira e com o pesquisador Celso Pilati da Universidade do Estado de Santa Catarina (UDESC) em Lages. O tratamento dos animais, assim como as coletas das amostras, as análises hematológicas e bioquímicas foram realizadas na UNOESC e as avaliações histopatológicas foram realizadas na UDESC. Os experimentos seguiram os preceitos éticos para experimentação animal e o protocolo experimental foi submetido para avaliação do Comitê de Ética em Pesquisa Animal o qual foi aprovado sob parecer número 137/08.

## 2.8. Animais

Foram utilizados camundongos albinos entre 6 e 8 meses pesando em torno de 30 g e fornecidos pelo biotério da UNOESC. Os animais foram alojados em gaiolas de plástico (15 x 36 x 30 cm) forradas com serragem, substituída a cada 3 dias para manutenção e higiene das gaiolas. Durante o período de permanência no biotério e durante os experimentos os animais foram mantidos em gaiolas individuais com livre acesso à água e comida em ambiente com temperatura de  $23 \pm 1$  °C e ciclo claro/escuro de 12 horas.

## 2.9. Tratamentos

Os animais foram randomizados em 9 grupos contendo 5 animais por grupo (Tabela 3). Todos os animais foram tratados diariamente por 14 dias o que caracteriza um estudo de toxicidade de repetidas doses. A administração dos tratamentos foi realizada pela via intraperitoneal.

**Tabela 3. Grupos de animais tratados com as chalconas livres e encapsuladas e com as nanopartículas brancas.**

GRUPOS	TRATAMENTOS
Grupo 1	R7
Grupo 2	R13
Grupo 3	R15
Grupo 4	R7 – NE
Grupo 5	R13 – NE
Grupo 6	R15 - NE
Grupo 7	NLS
Grupo 8	NLC
Grupo 9	NE

Os animais dos grupos 1, 2 e 3 foram tratados respectivamente com as chalconas R7, R13 e R15 livres na dose de 5 mg/Kg. As chalconas estavam inicialmente em uma solução 20mM de DMSO e foram dissolvidas em PBS para administração de cerca de 300  $\mu$ L em um animal de 30 g. Animais controles receberam o mesmo volume de PBS contendo apenas DMSO.

Os animais dos grupos 4, 5 e 6 também foram tratados com 5 mg/Kg de chalconas nanoencapsuladas. Foram administrados 300  $\mu$ L de nanoemulsão (para um animal de 30 g) contendo 0,5 mg/mL de chalconas. Os animais controles receberam apenas PBS.

Os animais dos grupos 7, 8 e 9 foram tratados apenas com as 3 nanopartículas lipídicas brancas. Foram administrados 300  $\mu$ L de nanopartículas (para um animal de 30 g) o que equivale a uma dose de 200 mg/Kg de lipídio. Os animais controles receberam apenas PBS.

## **2.10. Parâmetros de toxicidade**

Os parâmetros de toxicidade avaliados após a administração das chalconas livres, encapsuladas e das nanopartículas brancas foram: peso corporal, peso dos órgãos, parâmetros hematológicos, bioquímicos de funções hepática e renal, estresse oxidativo hepático e análise histopatológica de rim, baço, fígado, cérebro e pulmão.

A avaliação do peso corporal foi realizada individualmente no início e a cada dois até o final dos 14 dias de tratamento. Após o término dos tratamentos, os animais foram sacrificados e os seguintes órgãos foram retirados e pesados: baço, rins, fígado, cérebro, pulmão, estômago e coração.

No hemograma, a contagem diferencial leucocitária foi realizada por meio de esfregaço sanguíneo e foram determinados os valores absolutos de polimorfos e mononucleares. A contagem de hemácias e leucócitos foi realizada em câmara de Neubauer, utilizando-se como diluidor o líquido de Dacie e de Turk, respectivamente. Na determinação dos parâmetros bioquímicos das enzimas hepáticas alanina aminotransferase (ALT), aspartato aminotransferase (AST), determinação de proteínas totais, albumina, uréia e creatinina foram utilizados kits comerciais (Labtest Diagnóstica SA, Brasil) de acordo com a metodologia descrita pelo fabricante.

Durante a necropsia foram coletadas amostras do pulmão, baço, rins, fígado e cérebro para exame histopatológico e de fígado para a medida do estresse oxidativo.

O estresse oxidativo hepático foi avaliado através dos seguintes parâmetros: quantidade de espécies reativas de oxigênio (EROS), lipoperoxidação (TBARS), concentração de glutatona reduzida (GSH), atividade da glutatona redutase (GR), glutatona peroxidase (GPx), catalase e glutatona S-transferase (GST). Para as análises, amostras de fígado foram homogeneizadas em tampão fosfato de sódio 20 mM, pH 7,4, contendo 0,1 % de Triton X-100 e 150 mM de cloreto de sódio. A homogeneização foi realizada com um homogeneizador de tecidos por cerca de 30 segundos, seguido de centrifugação a 10.000 x g durante 10 minutos, sendo todo o procedimento realizado a 4 °C. Os sobrenadantes obtidos foram utilizados nas determinações das atividades enzimáticas, lipoperoxidação, GSH e EROS. A avaliação do dano celular por meio da medida da lipoperoxidação, a atividade da catalase e a determinação de GSH foram realizadas em homogenato fresco. Para as demais determinações os sobrenadantes foram mantidos a -80 °C até a sua utilização em um prazo máximo de uma semana. A dosagem de proteína dos homogenatos foi realizada pelo método de Lowry (LOWRY, 1951).

### **2.11. Determinação de espécies reativas de oxigênio**

Este método consiste em avaliar a presença de espécies reativas no interior da célula, através da adição de acetato de diclorofluoresceína (DCFH-DA) à célula. Esse composto é transformado, no citoplasma, em diclorofluoresceína reduzida (DCFH) pelas esterases que, por sua vez, na presença de EROs, é oxidada em diclorofluoresceína (DCF), emitindo fluorescência.

Para o teste, 200 µg de homogenatos foram incubados com 0,1 µM de DCFH-DA por 30 minutos a 37°C em placas foscas de 96 poços. A fluorescência foi medida em um espectrofluorímetro (Perkin Elmer LS55). Os resultados foram obtidos como unidades de fluorescência e foram expressos em porcentagem de EROs em relação ao controle de células sem tratamento considerado como 100%.

### **2.12. Lipoperoxidação**

A lipoperoxidação foi avaliada através da análise das substâncias que reagem com o ácido tiobarbitúrico (TBARS), destacando-se o malondialdeído (MDA), produzindo uma base de Schiff de coloração rosa (BIRD; DRAPER, 1984). Para o teste foram adicionados em tubos de ensaio os homogenatos com volumes iguais de tampão tris-HCl (60 mM, pH 7,4, 0,1 mM DPTA), TCA 12% e TBA 0,73% agitando a cada adição. Os tubos foram mantidos a 100 °C por 1 hora. Posteriormente, o material foi resfriado e centrifugado (5 min a 10000 x g). A absorbância do sobrenadante foi medida em 535 nm, sendo os valores calculados com base em uma curva analítica de MDA realizada em paralelo.

### **2.13. Determinação de glutatona**

A determinação de glutatona foi determinada pelo método do DTNB (BEUTLER; KELLY, 1963). Este método é baseado na reação da GSH com o ácido 5,5-ditiobis-2-nitrobenzóico (DTNB) gerando o ânion tiolato (TNB) o qual se apresenta coloração amarela e pode ser determinado espectrofotometricamente em 412nm.

Para o teste, amostras de homogenato foram adicionadas a um tampão de fosfato de sódio 200 mM e pH 8,0 contendo 20 µM de DTNB. A formação do TNB foi monitorada após 10 minutos em 405 nm. A concentração de GSH foi calculada através de uma curva analítica de GSH padrão realizada em paralelo.

### **2.14. Atividades enzimáticas**

Todas as atividades enzimáticas foram realizadas através de cinéticas e avaliadas espectrofotometricamente. A GPx foi avaliada de acordo com Flohé & Gunzler (FLOHE; GUNZLER, 1984) usando 200 µg de proteína. A oxidação do NADPH foi monitorada em 340 nm. A atividade da catalase foi determinada segundo Aebi (AEBI, 1984) usando 0.1 mg de proteína. Neste teste, o decaimento de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> foi avaliado em 240 nm. A GR foi avaliada de acordo com Carlberg & Mannervick (CARLBERG; MANNERVIK, 1975) usando 200 µg de proteína e a oxidação de NADPH, que resulta da redução da glutatona oxidada, foi avaliada em 340 nm. A atividade da GST foi avaliada segundo Keen et al. (KEEN; HABIG; JAKOBY, 1976) com 100 µg de proteína. Este teste é baseado na conjugação realizada pela GST de GSH com CDNB

adicionados ao meio de reação. O conjugado pode ser detectado em 340 nm.

### **2.15. Avaliação histopatológica**

As amostras de tecidos para avaliação histopatológica foram coletadas na necropsia, fixadas por 24 horas e posteriormente conservadas em solução de formalina a 4 % tamponada com tampão fosfato de sódio 100 mM, pH 7,4. No processamento do material, os fragmentos de tecidos foram desidratados em álcool etílico em concentrações crescentes, diafanizados em xilol, impregnados e incluídos em parafina líquida para a realização dos cortes histológicos com 5  $\mu$ m de espessura, os quais foram submetidos a coloração com hematoxilina e eosina (H&E). As lâminas foram observadas no microscópio ótico para a elaboração do laudo histopatológico.

### **2.16. Análise estatística**

Os resultados foram expressos como a média  $\pm$  erro-padrão da média (EPM). Cada experimento *in vitro* foi realizado em triplicata e repetido pelo menos três vezes. Para os experimentos *in vivo* foram utilizados 5 animais por grupo. Para a avaliação estatística, foi utilizada a análise de variância de uma via (ANOVA), seguida do teste de Dunnet para comparar todos os tratamentos com o grupo controle. Um valor de  $p < 0,05$  foi considerado estatisticamente significativo.

### 3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

As nanopartículas lipídicas formuladas apresentaram tamanho, potencial zeta e polidispersão semelhantes conforme dados demonstrados na tabela 20 (Apêndice A). Os primeiros testes realizados com estas nanopartículas foram a avaliação da toxicidade destes sistemas buscando avaliar o sistema mais biocompatível.

#### 3.1. AVALIAÇÃO DA CITOTOXICIDADE DAS NANOPARTÍCULAS BRANCAS *IN VITRO* E *IN VIVO*

##### 3.1.1. Testes *in vitro*

##### 3.1.1.1. Citotoxicidade das nanopartículas lipídicas brancas em células não tumorais de epitélio renal (VERO)

Vários trabalhos tem avaliado o efeito de compostos encapsulados em diferentes sistemas nanoestruturados lipídicos e comparado o efeito dos lipídios na eficiência de encapsulação, taxa de liberação entre outros fatores (FANG et al., 2008; HUANG et al., 2008; WANG et al., 2009; FANG et al., 2011). No entanto, poucos estudos tem avaliado o efeito de diferentes nanopartículas em relação a toxicidade induzida pelos lipídios que as compõem (SOLMESKY et al., 2011; SILVA et al., 2012).

Neste trabalho, o potencial citotóxico das nanopartículas brancas NLS, NLC e NE foi avaliado em células não tumorais da linhagem VERO após 24 e 48 h de incubação e os resultados estão demonstrados na Figura 19.

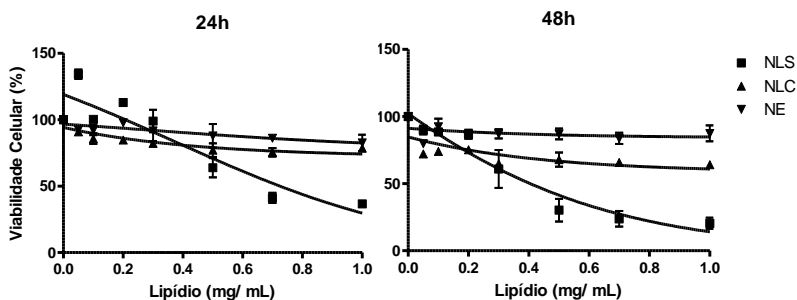
A NLS foi a formulação que induziu maior efeito citotóxico em células VERO com valores de  $CC_{50}$  de 0,7 e 0,4 mg/mL após 24 e 48 h de incubação respectivamente. Resultados similares foram encontrados em outros trabalhos que avaliaram a atividade citotóxica de NLS (SILVA et al., 2012; NASSIMI et al., 2010). A NLC induziu menor toxicidade e a NE não apresentou toxicidade mesmo após 48 h de incubação.

Estes resultados indicam que o lipídio sólido monoestearato de glicerila (MEG) seria o responsável pela toxicidade das NLSs e pela



parcial toxicidade das NLCs já que esta é a única diferença entre as três formulações.

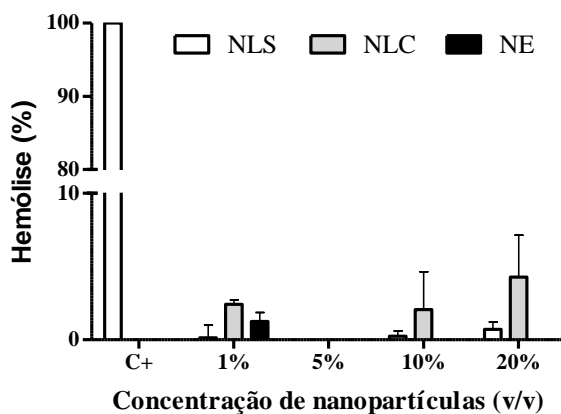
O MEG é amplamente usado em cosméticos e alimentos como surfactante e emulsificante (LI et al., 2011; RAWAT et al., 2011; TSAI et al., 2011). Entre os poucos estudos que avaliaram a toxicidade do MEG, não foi observada toxicidade tóxica em coelhos tratados com 100% deste lipídio nem toxicidade aguda após administração via oral de MEG em ratos. Calcificações renais foram observadas em ratos alimentados com uma dieta contendo 25% de MEG (FINAL, 1982).



**Figura 19. Toxicidade das nanopartículas lipídicas brancas em células não tumorais.** Células VERO foram incubadas com diferentes concentrações de nanopartículas por 24 e 48 h e a viabilidade celular foi avaliada pelo método do MTT. Os valores do eixo x correspondem a quantidade de lipídio final por poço. A concentração 0 corresponde a 100% de viabilidade celular. Cada ponto representa a Média  $\pm$  EPM (n=3).

### 3.1.1.2. Avaliação da hemólise induzida pelas nanopartículas lipídicas brancas

Grande parte dos quimioterápicos utilizados na clínica é administrada pela via intravenosa. Por esta razão, avaliamos o efeito das nanopartículas brancas em eritrócitos humanos. As nanopartículas lipídicas brancas não induziram hemólise até a concentração de 20% (v/v) indicando que esses sistemas nanoestruturados são seguros em relação a este aspecto para administração intravenosa (Figura 20).



**Figura 20: Porcentagem de hemólise induzida pelas nanopartículas brancas em eritrócitos humanos.** A hemólise foi avaliada em eritrócitos de indivíduos saudáveis após 1 h de incubação com as nanopartículas. Como controle positivo de hemólise foi utilizada água destilada. Os valores foram expressos em porcentagem e cada barra representa a Média  $\pm$  EPM, (n=2).

### 3.1.2. Testes *in vivo*

Para avaliação da citotoxicidade das nanopartículas brancas em um modelo *in vivo* utilizou-se camundongos que foram inoculados com as nanopartículas (200mg/Kg) durante 14 dias. Durante o tratamento avaliou-se o peso corporal dos animais e ao final do tratamento avaliou-se parâmetros hematológicos, bioquímicos, estresse oxidativo hepático e realizou-se análises histopatológicas em rim, pulmão, fígado, cérebro e baço.

#### 3.1.2.1. Avaliação do peso

O peso dos animais tratados com as nanopartículas foi avaliado a cada 2 dias durante os 14 dias de tratamento (Tabela 4). Para a análise estatística utilizou-se o teste ANOVA para amostras pareadas em que comparou-se todos os dias com o tempo 0. Nos animais controle observou-se um aumento de peso significativo a partir do 12º dia assim como para os animais tratados com as NLS e NE. Nos animais tratados

com as NLC houve um aumento de peso significativo no 14º dia. Apesar dessas pequenas diferenças encontradas, as nanopartículas lipídicas não induziram toxicidade em relação ao peso corporal dos animais quando comparado com os animais controle.

**Tabela 4: Avaliação do peso dos animais durante o tratamento com as nanopartículas lipídicas**

Dias	Controle (g)	NLS (g)	NLC (g)	NE (g)
0	33,0 ± 1,3	33,0 ± 1,3	32,6 ± 1,6	32,2 ± 3,2
2	33,6 ± 1,1	32,0 ± 1,2	32,8 ± 1,4	32,0 ± 3,2
4	33,4 ± 1,0	33,0 ± 1,6	32,8 ± 1,2	32,4 ± 2,5
6	33,2 ± 1,5	34,0 ± 1,2	33,8 ± 1,3	33,2 ± 2,5
8	32,8 ± 1,4	33,8 ± 1,3	33,8 ± 0,9	33,4 ± 2,2
10	34,8 ± 1,5	33,8 ± 1,2	33,8 ± 1,0	33,6 ± 2,3
12	35,6 ± 1,6**	35,4 ± 1,6**	34,8 ± 0,8	35,2 ± 2,2**
14	35,8 ± 1,5**	35,0 ± 1,5**	35,0 ± 0,9*	34,4 ± 2,1

\*p < 0,05 e \*\* p<0,01 usando ANOVA para medidas repetidas seguidos do teste de Dunnet, quando comparados com o dia 0.

### 3.1.2.2. Avaliação do peso dos órgãos

O peso do fígado, rins, baço, pulmão, cérebro, coração e estômago foram avaliados ao final dos 14 dias de tratamento com as nanopartículas lipídicas (Tabela 5). Não observou-se nenhuma diferença significativa de peso nos órgãos dos animais tratados com as nanopartículas em relação aos animais controle.

**Tabela 5: Avaliação do peso dos órgãos após 14 dias de tratamento com as nanopartículas lipídicas**

Órgãos	Controle (g)	NLS (g)	NLC (g)	NE (g)
Baço	0,20 ± 0,01	0,28 ± 0,06	0,21 ± 0,01	0,22 ± 0,02
Fígado	2,00 ± 0,11	2,27 ± 0,18	1,92 ± 0,12	2,18 ± 0,09
Coração	0,18 ± 0,01	0,28 ± 0,02	0,17 ± 0,01	0,19 ± 0,02
Pulmão	0,24 ± 0,01	0,23 ± 0,02	0,21 ± 0,01	0,22 ± 0,01
Cérebro	0,32 ± 0,02	0,33 ± 0,02	0,29 ± 0,02	0,35 ± 0,02
Rins	0,25 ± 0,01	0,28 ± 0,02	0,27 ± 0,03	0,26 ± 0,02
Estômago	0,30 ± 0,03	0,22 ± 0,01	0,27 ± 0,02	0,22 ± 0,02

### 3.1.2.3. Avaliação dos parâmetros bioquímicos séricos

O tratamento dos animais com as nanopartículas NLS e NE não induziu nenhuma alteração significativa dos parâmetros bioquímicos. Apenas a NLC induziu uma diminuição significativa da creatinina, no entanto sem relevância clínica (Tabela 6).

**Tabela 6: Avaliação dos parâmetros bioquímicos após 14 dias de tratamento com as nanopartículas lipídicas**

Parâmetros	Controle	NLS	NLC	NE
ALT (UI/L)	184 ± 19	157 ± 10,9	145 ± 14,5	157 ± 10
AST (UI/L)	181 ± 29	154 ± 15	140 ± 13	145 ± 6
Albumina (g/dl)	2,0 ± 0,11	1,9 ± 0,05	2,0 ± 0,08	2,0 ± 0,08
Proteínas Totais (g/dL)	5,8 ± 0,21	6,1 ± 0,19	5,7 ± 0,16	5,9 ± 0,18
Uréia (mg/dL)	61 ± 5,3	67 ± 4,3	59 ± 5,46	61 ± 4,6
Creatinina (mg/dL)	0,42 ± 0,03	0,36 ± 0,01	0,33 ± 0,02*	0,41 ± 0,01
Triglicérides (mg/dl)	71 ± 4	86 ± 6	86 ± 10	96 ± 14
Colesterol Total (mg/dl)	121 ± 13	113 ± 3,3	118 ± 4,5	120 ± 6,5

\*p < 0,05 usando ANOVA seguido do teste de Dunnet quando comparado com o grupo controle

### 3.1.2.4. Avaliação dos parâmetros hematológicos

A principal alteração hematológica observada nos animais tratados com as três nanopartículas lipídicas foi o aumento na contagem total de leucócitos e de células mononucleares (Tabela 7).

Esse aumento de mononucleares observado está possivelmente relacionado com a ativação do sistema fagocitário mononuclear que participa da resposta imune inata (VAN FURTH et al., 1972). Essas células fagocitárias interagem com as nanopartículas no sangue e podem induzir a estimulação ou supressão do sistema imune. A estimulação do sistema imune como ocorreu nos tratamentos com as nanopartículas pode ser interessante em tratamentos de tumores ou quando se deseja uma melhor resposta imune após a administração de vacinas. No entanto, a estimulação do sistema imune pode também induzir uma forte produção de citocinas, interferon- $\gamma$  e ativação de linfócitos desencadeando um processo inflamatório e gerando diversos efeitos colaterais (LANDESMAN-MILO; PEER, 2012).

Nossos resultados estão de acordo com outros estudos que mostraram a ativação do sistema imune induzida por diferentes nanopartículas lipídicas, poliméricas e de sílica. Em todos os casos a administração das nanopartículas induziu a produção de citocinas inflamatórias e/ou interferon- $\gamma$  e TNF- $\alpha$  (NGUYEN et al., 2012; QI; LU; WU, 2012; SEMETE et al., 2010; PARK; PARK, 2009). Neste trabalho apenas a NLS parece estar induzindo uma resposta inflamatória aguda observada através do aumento no número de bastonetes.

A NLC induziu um aumento significativo no número de basófilos e a NLS um aumento não significativo. Estes dados sugerem que as nanopartículas contendo o MEG poderiam induzir uma resposta alérgica.

**Tabela 7: Avaliação dos parâmetros hematológicos após 14 dias de tratamento com as nanopartículas lipídicas**

Parâmetros	Controle	NLS	NLC	NE
Eritrócitos ( $\times 10^5/\text{mm}^3$ )	52 $\pm$ 3	65 $\pm$ 2	54 $\pm$ 4	68 $\pm$ 4
Leucócitos ( $\times 10^2/\text{mm}^3$ )	48 $\pm$ 7	80 $\pm$ 13*	96 $\pm$ 12**	91 $\pm$ 3**
VCM (fL)	72 $\pm$ 8	65 $\pm$ 10	95 $\pm$ 7**	81 $\pm$ 8
HCM (pg)	24 $\pm$ 3	26 $\pm$ 3	31 $\pm$ 2**	26 $\pm$ 4
CHCM (%)	33 $\pm$ 3	32 $\pm$ 2	32 $\pm$ 4	32 $\pm$ 3
Hemoglobina (g/dL)	14 $\pm$ 2	17 $\pm$ 2	17 $\pm$ 3	18 $\pm$ 3
Hematócrito (%)	46 $\pm$ 3	52 $\pm$ 6	52 $\pm$ 4	55 $\pm$ 5
Neutrófilo ( $\times 10^2/\text{mm}^3$ )	14 $\pm$ 1	21 $\pm$ 2	20 $\pm$ 1	21 $\pm$ 2
Bastonete ( $\times 10^1/\text{mm}^3$ )	5 $\pm$ 5	32 $\pm$ 8**	10 $\pm$ 10	9 $\pm$ 9
Mononucleares ( $\times 10^2/\text{mm}^3$ )	34 $\pm$ 1	54 $\pm$ 3***	69 $\pm$ 1***	69 $\pm$ 4***
Eosinófilo ( $\times 10^1/\text{mm}^3$ )	5 $\pm$ 5	8 $\pm$ 8	10 $\pm$ 10	9 $\pm$ 9
Basófilo ( $\times 10^1/\text{mm}^3$ )	5 $\pm$ 5	32 $\pm$ 16	67 $\pm$ 19*	9 $\pm$ 9

\*p < 0,05; \*\*p < 0,01; \*\*\*p<0,001 usando ANOVA seguido do teste de Dunnet quando comparado com o grupo controle

### 3.1.2.5. Avaliação do estresse oxidativo hepático

Após os 14 dias de tratamento, os fígados dos animais foram retirados e parâmetros relacionados ao estresse oxidativo foram avaliados. As nanopartículas brancas induziram um aumento da lipoperoxidação hepática no entanto, nenhuma delas aumentou a quantidade de EROs e alterações nas enzimas ALT e AST (Tabela 6) sugerindo uma capacidade regenerativa dos animais revertendo possíveis danos que tenham sido induzidos. As nanopartículas contendo o lipídio

sólido (NLS e NLC) induziram uma diminuição na atividade das enzimas antioxidantes GR e GPx sugerindo que estas nanopartículas poderiam induzir um estresse oxidativo (Tabela 8).

As NLS e NLC induziram um forte aumento da atividade da enzima GST, responsável pela detoxificação de xenobióticos. Esse aumento fornece evidências de que o lipídio MEG poderia induzir uma resposta de detoxificação no fígado (Tabela 8).

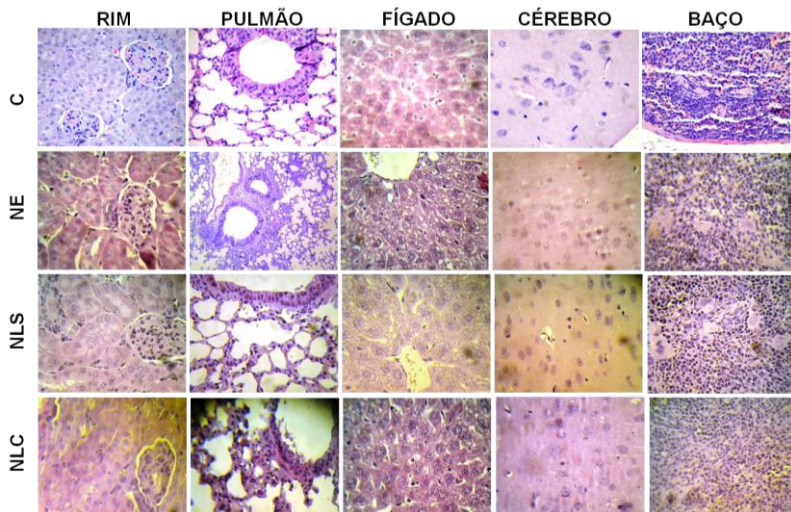
**Tabela 8: Avaliação do estresse oxidativo hepático após 14 dias de tratamento com as nanopartículas lipídicas**

Parâmetros (%)	Controle	NLS	NLC	NE
TBARS	100 ± 7	131 ± 3*	134 ± 5**	144 ± 10***
EROS	100 ± 16	77 ± 7	92 ± 10	95 ± 14
GSH	100 ± 20	99 ± 17	108 ± 30	118 ± 6
Catalase	100 ± 15	90 ± 5	84 ± 4	105 ± 9
GR	100 ± 0	59 ± 4**	76 ± 9*	106 ± 4
GPx	100 ± 6	68 ± 9**	87 ± 8	89 ± 3
GST	100 ± 6	178 ± 19 **	160 ± 25*	113 ± 14

\*p < 0,05; \*\*p < 0,01; \*\*\*p < 0,001 usando ANOVA seguido do teste de Dunnet quando comparado com o grupo controle

### 3.1.2.6. Análises histopatológicas

Após o final do tratamento com as nanopartículas, os animais foram eutanaziados e os seguintes órgãos foram retirados para realização de análise histopatológica: rim, pulmão, fígado, cérebro e baço. As nanopartículas não induziram alterações histopatológicas nos tecidos avaliados (Figura 21). Apesar das nanopartículas terem induzido aumento de lipoperoxidação no fígado, as análises histológicas não demonstram nenhuma alteração demonstrando assim, a capacidade regenerativa dos animais.



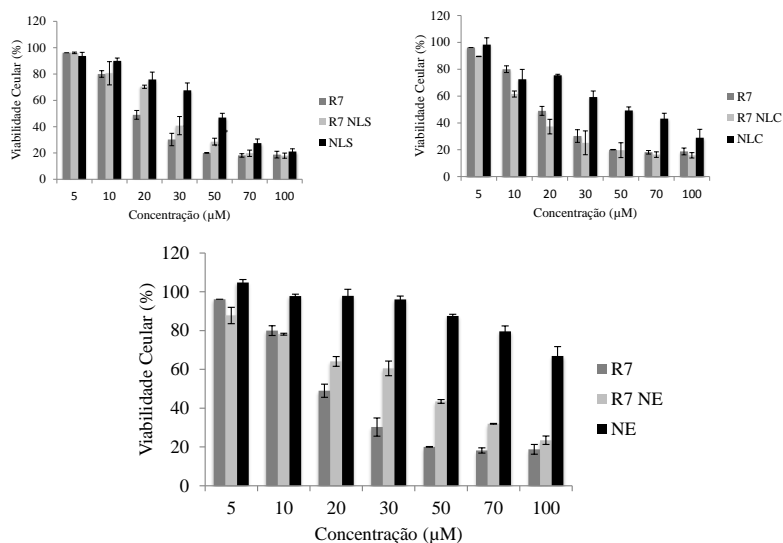
**Figura 21. Avaliação histopatológica do rim, pulmão, fígado, cérebro e baço dos animais inoculados com as nanopartículas lipídicas. Os cortes foram corados com hematoxilina e eosina. NLS: nanopartícula lipídica sólida, NLC: nanopartícula lipídica composta, NE: nanoemulsão, C: controle.**

### **3.2. AVALIAÇÃO DO EFEITO ANTITUMORAL DAS CHALCONAS LIVRES E ENCAPSULADAS *IN VITRO***

O efeito citotóxico das três chalconas estudadas neste trabalho foi comparado com o efeito destes mesmo compostos encapsulados nos três sistemas nanoestruturados lipídicos, em células de leucemia L1210.

A figura 22 apresenta o efeito citotóxico da chalcona R7 livre e encapsulada nos três sistemas nanoestruturados após 24 h de incubação. Em relação aos resultados após 24 h de incubação podemos verificar que a R7 encapsulada na NLS e na NLC apresentou toxicidade igual à R7 livre e semelhante às NLS e NLC brancas. A alta toxicidade das nanopartículas brancas nesse caso prejudica a análise dos resultados já que não é possível diferenciar se a morte foi causada pela chalcona ou pela nanopartícula. Como a NE não induziu toxicidade os resultados com a R7 encapsulada na NE podem ser melhor discutidos. Podemos verificar

que a R7 encapsulada na NE apresentou uma toxicidade semelhante à R7 livre.



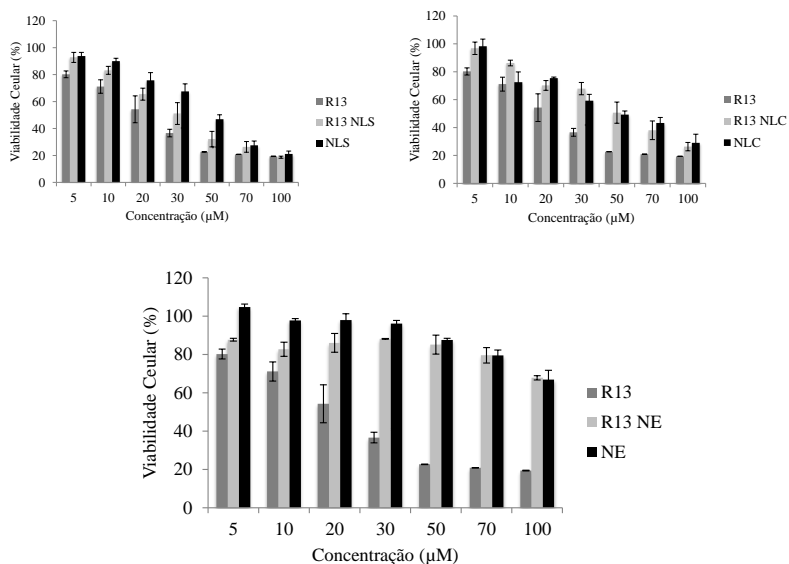
**Figura 22: Avaliação do efeito da chalcona R7 livre e encapsulada na NLS, NLC e NE em células L1210 após 24 h de incubação.**  $1 \times 10^5$  células foram incubadas com a chalcona livre, encapsulada e com as nanopartículas brancas. Os valores o eixo x se referem as concentrações de chalcona livre e encapsulada. A viabilidade celular foi avaliada pelo método do MTT. O controle de 100% de viabilidade celular corresponde a ausência de adições. Cada barra representa a Média  $\pm$  EPM (n=3).

Os resultados com a chalcona R13 encapsulada na NLS e na NLC também não podem ser bem discutidos pois estas nanopartículas brancas induziram uma alta toxicidade. A R13 encapsulada na NE não induziu a morte das células como induziu a R13 livre sugerindo que não ocorreu a liberação da chalcona em 24 h (Figura 23).

As nanopartículas contendo as chalconas poderiam ser englobadas pela célula por um processo de endocitose e então degradadas no interior da célula liberando as chalconas. No entanto, as chalconas podem ser liberadas já no meio de cultura e assim, para que tenham efeito precisariam se desligar da matriz lipídica. Entre as três chalconas estudadas, a chalcona R13 é a que apresenta o maior coeficiente de



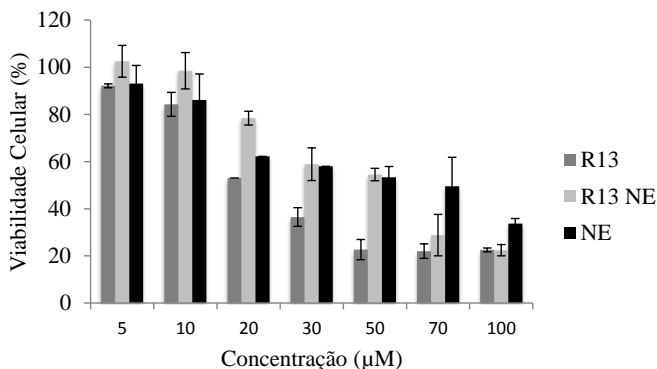
partição (log p = 5,14) quando comparado com as chalconas R7 (log p = 4,43 ) e R15 (log p = 4,58). A alta afinidade da chalcona R13 pela matriz lipídica poderiam impedir o seu efeito quando presentes no meio de cultura celular. Estudos de liberação precisam ser realizados para avaliar o perfil de liberação das chalconas das nanopartículas em meio de cultura e também em um tampão mimetizando o meio intracelular.



**Figura 23: Avaliação do efeito da chalcona R13 livre e encapsulada na NLS, NLC e NE em células L1210 após 24 h de incubação.**  $1 \times 10^5$  células foram incubadas com a chalcona livre, encapsulada e com a nanopartícula branca. Os valores do eixo x se referem as concentrações de chalcona livre e encapsulada. A viabilidade celular foi avaliada pelo método do MTT. A concentração 0 corresponde a 100% de viabilidade celular. Cada barra representa a Média  $\pm$  EPM (n=3).

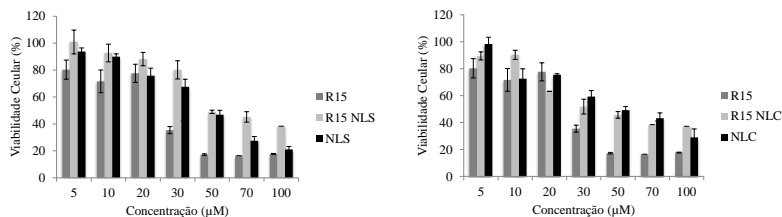
Realizou-se então uma incubação de 48 h e conforme a figura 24 pode-se verificar que a R13 encapsulada na NE apresentou o mesmo perfil observado em 24 h até a concentração de  $50 \mu\text{M}$ , ou seja, a R13 na NE apresentou toxicidade menor que a R13 livre. Após o tratamento de

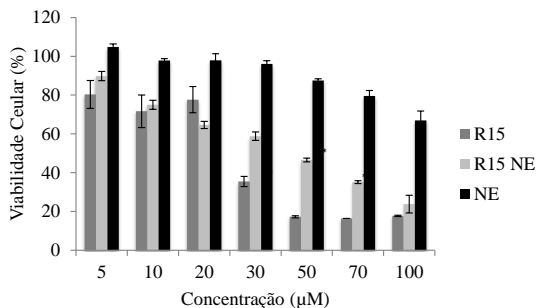
50 $\mu$ M, observa-se uma alta toxicidade da NE branca o que prejudica a análise dos resultados.



**Figura 24: Avaliação do efeito da chalcona R13 livre e encapsulada na NE em células L1210 após 48 h de incubação.**  $1 \times 10^5$  células foram incubadas com a chalcona livre, encapsulada e com a nanopartícula branca. Os valores do eixo x se referem as concentrações da chalcona livre e encapsulada. A viabilidade celular foi avaliada pelo método do MTT. A concentração 0 corresponde a 100% de viabilidade celular. Cada barra representa a Média  $\pm$  EPM (n=3).

Os resultados de toxicidade da R15 encapsulada na NLS e na NLC após 24 horas de incubação também são inconclusivos pelo mesmo motivo citado anteriormente. A R15 encapsulada na NE apresentou toxicidade semelhante à R15 livre assim como ocorreu com a R7 (Figura 25).





**Figura 25: Avaliação do efeito da chalcona R15 livre e encapsulada na NLS, NLC e NE em células L1210 após 24 h de incubação.**  $1 \times 10^5$  células foram incubadas com a chalcona livre, encapsulada e com a nanopartícula branca. Os valores do eixo x se referem as concentrações das chalconas livres e encapsuladas. A viabilidade celular foi avaliada pelo método do MTT. A concentração 0 corresponde a 100% de viabilidade celular. Cada barra representa a Média  $\pm$  EPM (n=3).

Todos os resultados demonstram que o melhor sistema para encapsulação das chalconas é a nanoemulsão, pois foi o sistema que apresentou menor toxicidade tanto para células VERO (Figura 19) como para células de leucemia L1210 (Figuras 22, 24 e 25). Além disso, todas as chalconas quando encapsuladas na nanoemulsão, com exceção da R13, apresentaram efeitos citotóxicos semelhantes às chalconas livres, indicando que este sistema tem uma capacidade boa de liberação dos compostos. A nanoemulsão foi o sistema nanoestruturado que apresentou menor tamanho e conseqüentemente maior área superficial, fator que pode facilitar a liberação das chalconas (Tabela 20, Apêndice A).

Fang e colaboradores (2011) avaliaram diferenças na liberação da triptantrina encapsulada em três sistemas lipídicos semelhantes aos testados neste trabalho e encontraram uma maior taxa de liberação com a NLC seguida da NE e a que apresentou menor taxa de liberação foi a NLS. Os mesmos resultados foram verificados por Huang e colaboradores (2008) que encapsularam a camptotecina também nos três sistemas nanoestruturados lipídicos.

A liberação de um ativo encapsulado em uma nanopartícula lipídica está diretamente relacionada à matriz lipídica correspondente. As NLS possuem uma baixa capacidade de encapsulação e liberação de fármacos porque a utilização de um único lipídio sólido gera cristas

perfeitos que dificultam a entrada e a saída do fármaco (BUNJES; WESTESEN; KOCH, 1996). A adição de um lipídio líquido a matriz lipídica sólida, como ocorre na NLC, possibilita uma melhor liberação das substâncias encapsuladas. Em relação a NE, as emulsões óleo em água possuem como característica geral a liberação rápida de fármacos, devido a baixa viscosidade da fase líquida e a alta área superficial da dispersão coloidal (WESTESEN; BUNJES; KOCH, 1997).

Pelo fato da encapsulação das chalconas R7 e R15 na nanoemulsão resultarem no mesmo efeito citotóxico das chalconas livres podemos sugerir que a encapsulação não melhorou o efeito antileucêmico dos compostos. No entanto, por ser um ensaio *in vitro* esses dados não descartam a possibilidade de que a encapsulação apresente vantagens *in vivo* como o aumento da penetração dessas moléculas na medula óssea e no sistema nervoso central.

### **3.3. AVALIAÇÃO DO EFEITO CITOTÓXICO DAS CHALCONAS LIVRES E ENCAPSULADAS *IN VITRO* E *IN VIVO***

#### **3.3.1. Testes *in vitro***

Inicialmente avaliou-se o efeito das três chalconas livres e encapsuladas na nanoemulsão em células não-tumorais VERO. Como é possível observar na Tabela 9, onde estão apresentados os valores de área sobre a curva (ASC), obtidas através do ensaio de viabilidade celular, as chalconas apresentaram toxicidade semelhante em células tumorais L1210 e não tumorais VERO, principalmente após 48 h de incubação.

Avaliou-se então, a toxicidade das chalconas encapsuladas na nanoemulsão em células de epitélio renal (VERO) e comparou-se com os resultados obtidos em células de leucemia L1210 para avaliar se a encapsulação poderia diminuir a toxicidade nestas células.

É possível verificar que houve uma diminuição da citotoxicidade (aumento da ASC) das chalconas R7 NE e R15 NE nas células VERO em comparação as células L1210. Além disso, calculou-se o índice de seletividade (IS) das chalconas livres e encapsuladas dividindo-se os valores de ASC obtidos nas células não-tumorais pela células tumorais. Quanto maior o IS maior a seletividade dos compostos pelas células tumorais e maior o seu potencial de utilização. Podemos verificar que a encapsulação aumentou o índice de seletividade das chalconas (Tabela 9).

**Tabela 9: Valores de ASC da citotoxicidade induzida pelas chalconas R7, R13 e R15 livres ou encapsuladas em células de leucemia L1210 e de epitélio renal VERO.**

	24h		
	L1210	VERO	IS
<b>R7</b>	3344 ± 57	4180 ± 7	1,25
<b>R7 NE</b>	4829 ± 43	<b>7684 ± 223</b>	1,6
<b>R13</b>	3542 ± 190	5064 ± 327	1,4
<b>R13 NE</b>	8562 ± 517	8624 ± 487	1,0
<b>R15</b>	3509 ± 181	3996 ± 328	1,1
<b>R15 NE</b>	4942 ± 35	<b>7300 ± 524</b>	<b>1,5</b>
<b>NE</b>	8778 ± 52	9351 ± 297	

Média ± EPM, n=3. ASC das células controle tratadas apenas com o veículo: 10.000. IS: Índice de Seletividade

Estes resultados demonstram que a incorporação das chalconas diminui a citotoxicidade das mesmas em células de epitélio renal e são interessantes, pois demonstram uma maior seletividade das chalconas encapsuladas pelas células tumorais.

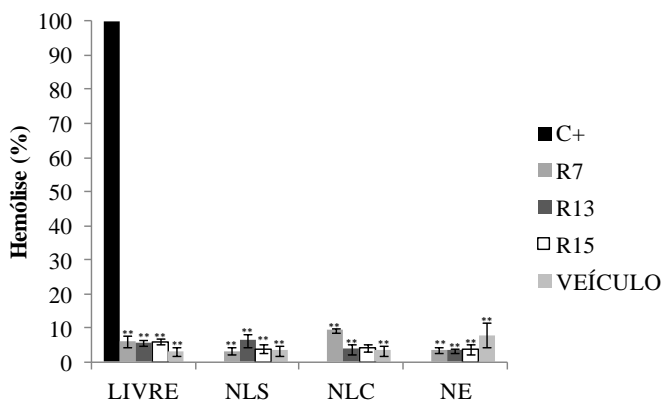
A hipótese que formulou-se em relação a maior captação pelas células tumorais está baseada no fato que as células tumorais proliferam rapidamente e possuem uma demanda maior de lipídios para síntese de membranas tanto nuclear como citoplasmática. Por esta razão, elas tendem a ter uma maior expressão de receptores de LDL e consequentemente captariam mais LDL que as células normais (NG; LOVELL; ZHENG, 2011; HAMMEL; LAGGNER; PRASSL, 2003). O aumento de receptores de LDL em células mononucleares de pacientes com leucemia mieloide aguda pode ser de 3 a 100 vezes maior que nas células normais (HO et al. 1978).

Os resultados obtidos podem ser relacionados aos resultados observados por HO e colaboradores em 1978 e por outros trabalhos que demonstraram uma maior seletividade de nanopartículas lipídicas para células tumorais (VERSLUIS, et al., 1996; TEIXEIRA et al., 2008). Ainda neste contexto, Graziani e colaboradores (2002) administraram nanopartículas lipídicas semelhantes a LDL marcadas radioativamente em 18 pacientes com câncer de mama e observaram uma concentração 4,5 vezes maior no tecido tumoral em relação ao tecido mamário normal. Dias e colaboradores (2007) administraram as mesmas nanopartículas

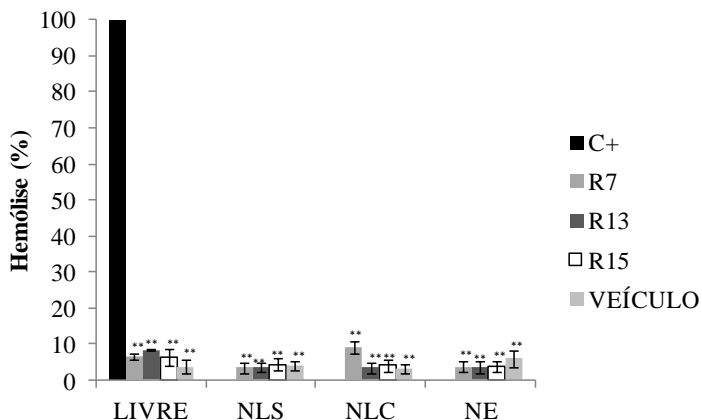
contendo Paclitaxel em pacientes com câncer ginecológico e também observaram uma maior concentração das nanopartículas no tecido tumoral. Almeida e colaboradores (2010) avaliaram o efeito de diferentes lipídios na captação de nanopartículas em diferentes tipos celulares e verificaram uma maior captação das nanopartículas em células de monócitos de origem tumoral em comparação aos outros tipos celulares.

### 3.3.1.1. Hemólise

Grande parte dos quimioterápicos utilizados na clínica é administrada pela via intravenosa. Por esta razão, continuando a análise da toxicidade das chalconas livres e encapsuladas, avaliou-se o efeito das mesmas em eritrócitos humanos. As chalconas livres ou encapsuladas não causaram hemólise significativa em comparação com o controle positivo, sugerindo que as mesmas poderiam ser utilizadas para administração intravenosa com segurança em relação a este aspecto (Figura 26 e 27).



**Figura 26: Porcentagem de hemólise causada por 10µM das chalconas livres, encapsuladas em eritrócitos humanos.** A hemólise foi avaliada em eritrócitos de indivíduos saudáveis após 1 h de incubação com os compostos. Como controle positivo de hemólise foi utilizada a água. Os valores foram expressos em porcentagem e cada barra representa a Média ± EPM, (n=3). Todos os tratamentos apresentaram um valor de  $**p < 0,01$  quando comparados com o controle positivo, usando ANOVA, seguido do teste de Dunnett.



**Figura 27: Porcentagem de hemólise causada por 50µM das chalconas livres e encapsuladas em eritrócitos humanos.** A hemólise foi avaliada em eritrócitos de indivíduos saudáveis após 1 h de incubação com os compostos. Como controle positivo de hemólise foi utilizada a água. Os valores foram expressos em porcentagem e cada barra representa a Média  $\pm$  EPM, (n=3). Todos os tratamentos apresentaram um valor de  $**p < 0,01$  quando comparados com o controle positivo, usando ANOVA, seguido do teste de Dunnet.

### 3.3.2. Testes *in vivo*

Para avaliação da toxicidade das chalconas encapsuladas escolheu-se utilizar as chalconas encapsuladas apenas na nanoemulsão por ser o sistema que apresentou menor toxicidade *in vitro* e comparou-se com a citotoxicidade das chalconas livres. Para esta avaliação *in vivo* utilizou-se camundongos Swiss que foram inoculados pela via intraperitoneal com 5 mg/Kg de chalconas livres e concentração equivalente das chalconas encapsuladas na NE durante 14 dias. Durante o tratamento avaliou-se o peso corporal dos animais a cada 2 dias e ao final do tratamento avaliou-se parâmetros hematológicos, bioquímicos, estresse oxidativo hepático e realizou-se análises histopatológicas em fígado.

### 3.3.2.1. Avaliação do peso

O peso dos animais tratados com as chalconas livres e encapsuladas na NE foi avaliado a cada 2 dias durante os 14 dias de tratamento (Tabela 10 e 11). Para a análise estatística utilizou-se o teste ANOVA para amostras pareadas onde comparou-se todos os dias com o tempo 0. Pode-se observar que as chalconas livres impediram o aumento de peso significativo observado nos animais controles já a partir do 4º dia (Tabela 10). Estes resultados sugerem que as chalconas livres induziram toxicidade nos animais.

**Tabela 10: Avaliação do peso dos animais durante o tratamento com as chalconas livres**

Dias	Controle (g)	R7 (g)	R13 (g)	R15 (g)
0	46 ± 1,1	45,8± 1,1	43,8±0,8	46±0,8
2	46,3 ±0,9	46,8±1,4	45±0,6	48±0,6*
4	47,3±0,9*	47±1,1	44,5±0,6	47,5±0,5
6	47,7±1,2**	48±1,1*	46,2±1,2	48,2±0,3*
8	47,3±0,9*	47,3±1,4	44,5±0,9	48±0,7*
10	47,7±1,2**	46,8±1,4	44,7±0,8	47,8±0,7
12	48,3±0,9**	46,8±1,3	44,8±0,5	47,7±0,6
14	48± 1,1**	46,7±1,6	44,5±0,7	47,3±0,9

\*p < 0,05; \*\* p<0,01 usando ANOVA para medidas repetidas seguidos do teste de Dunnett, quando comparados com o dia 0.

Como pode-se verificar na tabela 11, a encapsulação das chalconas não causou a mesma toxicidade verificada no peso dos animais tratados com as chalconas livres.

**Tabela 11: Avaliação do peso dos animais durante o tratamento com as chalconas encapsuladas**

Dias	Controle (g)	R7-NE (g)	R13-NE (g)	R15-NE (g)
0	29,0 ± 2,1	28,2 ± 1,3	28,3 ± 1,2	28,2 ± 1,6
2	29,7 ± 2,3	28,7 ± 1,4	28,8 ± 1,3	29,3 ± 1,4
4	30,7 ± 2,3	29,7 ± 1,4	29,3 ± 1,2	29,3 ± 1,5
6	29,0 ± 1,5	28,7 ± 1,0	29,5 ± 1,1	29,7 ± 1,5
8	30,7 ± 2,3	29,2 ± 1,5	29,2 ± 0,9	30,2 ± 1,5
10	30,7 ± 2,3	29,5 ± 1,3	31,2 ± 0,8***	30,8 ± 1,8*
12	31,3 ± 1,7*	29,8 ± 1,2*	31,5 ± 1,2***	30,3 ± 1,0
14	32,7 ± 1,3**	31,5 ± 0,8**	33,8 ± 1,0***	32,8 ± 1,8**

\*p < 0,05; \*\* p<0,01; \*\*\* p<0,001 usando ANOVA para medidas repetidas seguidos do teste de Dunnett, quando comparados com o dia 0.



### 3.3.2.2. Avaliação do peso dos órgãos

O peso do fígado, rins, baço, pulmão, cérebro, coração e estômago foi avaliado ao final dos 14 dias de tratamento com as chalconas livres (Tabela 12). A chalcona R15 induziu um aumento no peso do fígado e do pulmão.

**Tabela 12: Avaliação do peso dos órgãos após 14 dias de tratamento com as chalconas livres**

Órgãos	Controle (g)	R7 (g)	R13 (g)	R15 (g)
Baço	0,18 ± 0,03	0,23 ± 0,03	0,21 ± 0,01	0,27 ± 0,03
Fígado	2,21 ± 0,14	2,15 ± 0,09	2,02 ± 0,03	2,46 ± 0,16*
Coração	0,23 ± 0,02	0,21 ± 0,01	0,20 ± 0,04	0,23 ± 0,01
Pulmão	0,25 ± 0,01	0,28 ± 0,01	0,26 ± 0,01	0,29 ± 0,01*
Cérebro	0,42 ± 0,04	0,35 ± 0,02	0,36 ± 0,01	0,39 ± 0,01
Rins	0,65 ± 0,03	0,70 ± 0,06	0,62 ± 0,01	0,69 ± 0,03
Estômago	0,24 ± 0,03	0,30 ± 0,02	0,30 ± 0,01	0,31 ± 0,04

\*p < 0,05 usando ANOVA seguido do teste de Dunnet quando comparado com o grupo controle

O efeito das chalconas encapsuladas não foi diferente do efeito das chalconas livres. As principais alterações observadas foram o aumento do peso do baço e fígado (Tabela 13). Estes órgãos podem estar aumentados quando há uma ativação do sistema imune. Tanto as chalconas livres como a NE isoladamente induziram aumentos não significativos do peso desses órgãos. A associação das chalconas e da NE poderia ter resultado na hepatoesplenomegalia observada. Além disso a NE branca causou uma forte ativação do sistema reticuloendotelial o qual pode estar diretamente relacionado a aumento de fígado e baço.

**Tabela 13: Avaliação do peso dos órgãos após 14 dias de tratamento com as chalconas encapsuladas**

Órgãos	Controle (g)	NE + R7 (g)	NE + R13 (g)	NE + R15 (g)
Baço	0,17 ± 0,01	0,25 ± 0,03*	0,24 ± 0,01*	0,20 ± 0,01
Fígado	1,58 ± 0,13	1,96 ± 0,06*	2,05 ± 0,08**	1,96 ± 0,14*
Coração	0,18 ± 0,01	0,19 ± 0,01	0,20 ± 0,06	0,19 ± 0,01
Pulmão	0,21 ± 0,01	0,25 ± 0,01	0,25 ± 0,01	0,25 ± 0,02
Cérebro	0,39 ± 0,04	0,38 ± 0,03	0,37 ± 0,01	0,38 ± 0,02
Rins	0,39 ± 0,04	0,48 ± 0,03	0,50 ± 0,03	0,48 ± 0,04
Estômago	0,33 ± 0,04	0,26 ± 0,02*	0,33 ± 0,02	0,29 ± 0,02

\*p < 0,05 e \*\*p < 0,01 usando ANOVA seguido do teste de Dunnet quando comparado com o grupo controle

### 3.3.2.3. Avaliação dos parâmetros bioquímicos séricos

O tratamento dos animais com as chalconas livres induziu aumento da enzima hepática AST que pode estar relacionada com dano hepático mas também com outros danos musculares ou cardíacos. Neste caso sugerimos que o aumento desta enzima esteja relacionado a um dano hepático (Tabela 14). As chalconas encapsuladas não causaram o aumento desta enzima conforme pode ser observado na tabela 15.

As chalconas livres induziram algumas alterações nos parâmetros triglicéridos e colesterol total. As três chalconas induziram aumento de triglicéridos e a encapsulação da R13 e R15 impediu este aumento.

Curiosamente, as chalconas induziram uma diminuição dos níveis de colesterol total e a encapsulação da R7 impediu este efeito (Tabelas 14 e 15). A diminuição de colesterol induzida pelas chalconas pode ser resultado de uma inibição da enzima HMG-Coa redutase que participa da via de síntese do colesterol. Santos e colaboradores (2006) já demonstraram a atividade antilipidêmica de chalconas.

**Tabela 14: Avaliação dos parâmetros bioquímicos após 14 dias de tratamento com as chalconas livres.**

Parâmetros	Controle	R7	R13	R15
ALT (UI/L)	134 ± 6,5	101 ± 4**	109 ± 3,6**	111 ± 5,49*
AST (UI/L)	141 ± 10	161 ± 4,2	171 ± 4,1*	170 ± 2,81*
Albumina (g/dl)	2,3 ± 0,19	2,4 ± 0,15	2,37 ± 0,10	2,3 ± 0,10
Proteínas totais (g/dL)	5,81 ± 0,2	6 ± 0,19	5,2 ± 0,05*	5,47 ± 0,13
Uréia (mg/dL)	63 ± 3,86	78 ± 3,6	74 ± 2,17	69 ± 5,89
Creatinina (mg/dL)	0,45 ± 0,03	0,51 ± 0,01	0,51 ± 0,01	0,49 ± 0,02
Triglicéridos (mg/dl)	80 ± 3,7	129 ± 11,4**	125 ± 9*	115 ± 11*
Colesterol Total (mg/dl)	116 ± 5,76	77 ± 3,35**	85 ± 3**	78 ± 4,5**

\*p < 0,05; \*\*p<0,01 usando ANOVA seguido do teste de Dunnet quando comparado com o grupo controle

**Tabela 15: Avaliação dos parâmetros bioquímicos após 14 dias de tratamento com as chalconas encapsuladas.**

<b>Parâmetros</b>	<b>Controle</b>	<b>NE+R7</b>	<b>NE+R13</b>	<b>NE+15</b>
ALT (UI/L)	184 ± 18	104 ± 4,1**	111 ± 3,85**	100 ± 1,65**
AST (UI/L)	181 ± 29	168 ± 2,7	165 ± 8	178 ± 6,41
Albumina (g/dl)	2 ± 0,11	3,4 ± 0,15**	2,66 ± 0,21*	2,34 ± 0,15
Proteínas totais (g/dL)	5,81 ± 0,20	5,94 ± 0,28	5,64 ± 0,33	5,56 ± 0,14
Uréia (mg/dL)	61 ± 5,3	74 ± 7,5	64 ± 3,6	50 ± 2,18
Creatinina (mg/dL)	0,42 ± 0,03	0,44 ± 0,02	0,47 ± 0,03	0,48 ± 0,05
Triglicerídeos (mg/dl)	71 ± 4	145 ± 9,5**	99 ± 9,5	87 ± 10
Colesterol Total (mg/dl)	121 ± 13	94 ± 6,13	92 ± 2,0*	87 ± 7*

\*p < 0,05; \*\*p<0,01 usando ANOVA seguido do teste de Dunnet quando comparado com o grupo controle

#### **3.3.2.4. Avaliação dos parâmetros hematológicos**

O tratamento com as chalconas livres induziu poucas alterações nos parâmetros hematológicos dos animais tratados. A chalcona R15 induziu um aumento de neutrófilos indicando um possível processo inflamatório e a chalcona R13 induziu um aumento no número de basófilos indicando um processo alérgico (Tabela 16). A encapsulação dessas chalconas impediu parcialmente esses efeitos e adicionalmente pode-se observar um aumento de mononucleares induzido pela chalcona R7 na NE (Tabela 17). Este aumento pode estar relacionado a nanoemulsão e não à chalcona, já que as nanopartículas brancas induziram um aumento de mononucleares (Tabela 7).

**Tabela 16: Avaliação dos parâmetros hematológicos após 14 dias de tratamento com as chalconas livres**

Parâmetros	Controle	R7	R13	R15
Hemácias ( $\times 10^5/\text{mm}^3$ )	57 $\pm$ 3	57 $\pm$ 2	57 $\pm$ 2	59 $\pm$ 2
Leucócito ( $\times 10^2/\text{mm}^3$ )	46 $\pm$ 6	46 $\pm$ 5	53 $\pm$ 9	59 $\pm$ 10
VCM (fL)	88 $\pm$ 3	87 $\pm$ 4	85 $\pm$ 2	86 $\pm$ 2
HCM (pg)	28 $\pm$ 3	26 $\pm$ 3	24 $\pm$ 2	27 $\pm$ 2
CHCM (%)	32 $\pm$ 2	30 $\pm$ 4	28 $\pm$ 2	31 $\pm$ 3
Hemoglobina (g/dL)	16 $\pm$ 3	15 $\pm$ 2	14 $\pm$ 3	16 $\pm$ 4
Hematócrito (%)	50 $\pm$ 2	50 $\pm$ 3	49 $\pm$ 2	51 $\pm$ 4
Neutrófilo ( $\times 10^2/\text{mm}^3$ )	9 $\pm$ 1	14 $\pm$ 2	17 $\pm$ 4	22 $\pm$ 3*
Bastonete ( $\times 10^1/\text{mm}^3$ )	9 $\pm$ 5	18 $\pm$ 9	16 $\pm$ 11	24 $\pm$ 12
Mononuclear ( $\times 10^2/\text{mm}^3$ )	37 $\pm$ 2	30 $\pm$ 2	32 $\pm$ 4	36 $\pm$ 5
Eosinófilo ( $\times 10^1/\text{mm}^3$ )	-	-	-	-
Basófilo ( $\times 10^1/\text{mm}^3$ )	-	14 $\pm$ 5	27 $\pm$ 10*	-

\*p < 0,05 e \*\*p < 0,01 usando ANOVA seguido do teste de Dunnet quando comparado com o grupo controle

**Tabela 17: Avaliação dos parâmetros hematológicos após 14 dias de tratamento com as chalconas encapsuladas**

Parâmetros	Controle	NE+R7	NE+R13	NE+R15
Hemácias ( $\times 10^5/\text{mm}^3$ )	48 $\pm$ 3	45 $\pm$ 2	54 $\pm$ 7	57 $\pm$ 4
Leucócito ( $\times 10^2/\text{mm}^3$ )	72 $\pm$ 8	85 $\pm$ 2	66 $\pm$ 2	64 $\pm$ 3
VCM (fL)	87 $\pm$ 6	92 $\pm$ 7	88 $\pm$ 4	85 $\pm$ 3
HCM (pg)	29 $\pm$ 3	33 $\pm$ 4	27 $\pm$ 3	26 $\pm$ 5
CHCM (%)	33 $\pm$ 2	33 $\pm$ 2	31 $\pm$ 4	31 $\pm$ 2
Hemoglobina (g/dL)	14 $\pm$ 2	15 $\pm$ 3	15 $\pm$ 2	15 $\pm$ 1
Hematócrito (%)	42 $\pm$ 3	45 $\pm$ 2	48 $\pm$ 4	48 $\pm$ 2
Neutrófilo ( $\times 10^2/\text{mm}^3$ )	14 $\pm$ 2	10 $\pm$ 2	10 $\pm$ 1	10 $\pm$ 1
Bastonete ( $\times 10^1/\text{mm}^3$ )	14 $\pm$ 7	25 $\pm$ 8	20 $\pm$ 13	6 $\pm$ 6
Mononuclear ( $\times 10^2/\text{mm}^3$ )	58 $\pm$ 4	72 $\pm$ 3*	50 $\pm$ 3	54 $\pm$ 2
Eosinófilo ( $\times 10^1/\text{mm}^3$ )	-	-	-	-
Basófilo ( $\times 10^1/\text{mm}^3$ )	-	17 $\pm$ 17	26 $\pm$ 13	-

### 3.3.2.5. Avaliação do estresse oxidativo hepático

Após os 14 dias de tratamento, os fígados dos animais foram retirados e parâmetros relacionados ao estresse oxidativo foram avaliados. As chalconas livres induziram um forte estresse oxidativo

evidenciado através do aumento de EROs, lipoperoxidação (TBARS) e diminuição da glutatona (GSH) (Tabela 18).

**Tabela 18: Avaliação do estresse oxidativo hepático após 14 dias de tratamento com as chalconas livres**

Parâmetros (%)	Controle	R7	R13	R15
TBARS	100 ± 11	213 ± 22***	148 ± 18	139 ± 4
EROS	100 ± 14	158 ± 11*	181 ± 6**	228 ± 20**
GSH	100 ± 12	57 ± 8**	29 ± 3***	45 ± 5***
Catalase	100 ± 16	160 ± 23	135 ± 11	130 ± 16
GR	100 ± 11	92 ± 10	103 ± 7	79 ± 8
GPx	100 ± 9	96 ± 3	101 ± 1	80 ± 9
GST	100 ± 21	99 ± 12	108 ± 9	81 ± 10

\*p < 0,05; \*\*p < 0,01; \*\*\*p < 0,001 usando ANOVA seguido do teste de Dunnet quando comparado com o grupo controle

A encapsulação da chalcona R7 e R15 não causou o aumento de EROs e TBARS mas continuou causando a diminuição de GSH e ainda induziu uma diminuição de catalase. A encapsulação da chalcona R13 não alterou os efeitos causados pela chalcona livre mas melhorou os parâmetros de estresse (Tabela 19).

**Tabela 19: Avaliação do estresse oxidativo hepático após 14 dias de tratamento com as chalconas encapsuladas**

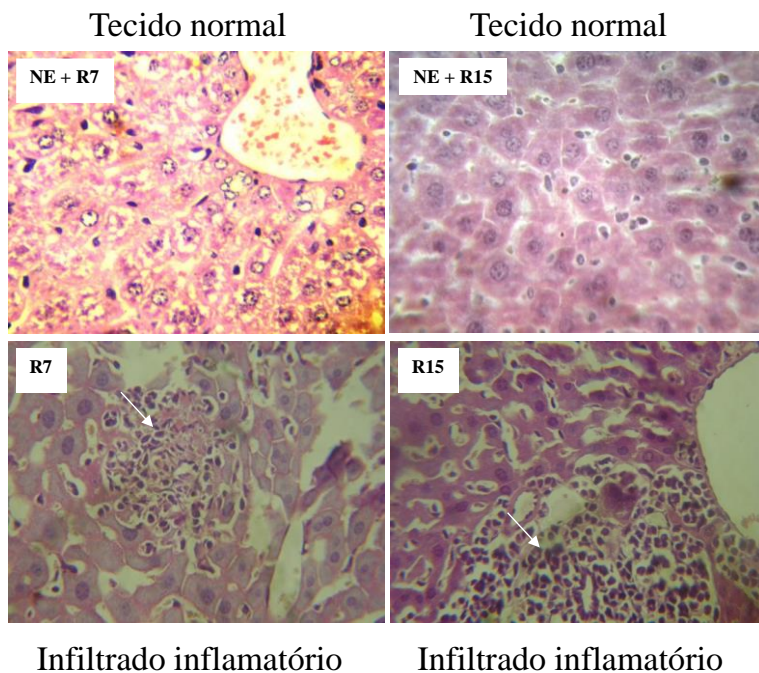
Parâmetros (%)	Controle	NE + R7	NE + R13	NE + R15
TBARS	100 ± 9	109 ± 3	125 ± 5*	109 ± 7
EROS	100 ± 11,9	129 ± 8	147 ± 17*	107 ± 10
GSH	100 ± 19	100 ± 3	46 ± 7**	46 ± 7**
Catalase	100 ± 15	61 ± 9*	31 ± 8***	77 ± 5
GR	100 ± 30	111 ± 6	102 ± 14	109 ± 21
GPx	100 ± 7,7	100 ± 3	95 ± 4	103 ± 4
GST	100 ± 6,7	99 ± 13	101 ± 15	113 ± 9

\*p < 0,05; \*\*p < 0,01; \*\*\* p<0,001 usando ANOVA seguido do teste de Dunnet quando comparado com o grupo controle

### 3.3.2.6. Análises histopatológicas

Após o final do tratamento com as chalconas livres e encapsuladas os fígados dos animais foram retirados para realização de análise

histopatológica. As chalconas R7 e R15 livre induziram uma inflamação no fígado evidenciado pela presença de um infiltrado inflamatório. A encapsulação evitou esta inflamação (Figura 28). Estes resultados estão de acordo com a diminuição do estresse oxidativo hepático observado na tabela 19, onde é possível verificar que a encapsulação impediu o aumento de EROS e lipoperoxidação induzido pelas chalconas livres. Estes resultados também estão de acordo com a diminuição da enzima AST quando as chalconas estavam na forma encapsulada (Tabela 15).



**Figura 28. Avaliação histopatológica do fígado dos animais inoculados com as chalconas R7 e R15 livres e encapsuladas.** Os cortes foram corados com hematoxilina e eosina e as setas indicam a presença de um infiltrado inflamatório.

#### 4. CONCLUSÕES

De acordo com os resultados descritos neste capítulo podemos concluir que entre as três nanopartículas lipídicas desenvolvidas, a nanoemulsão foi a que apresentou menor toxicidade *in vitro* e portanto foi escolhida como sistema para encapsulação das chalconas e testes *in vivo*.

O efeito citotóxico das chalconas R7 e R15, em células de leucemia L1210, não foi alterado após a encapsulação das chalconas demonstrando que *in vitro* a encapsulação não melhorou a atividade antileucêmica destas moléculas. A encapsulação da chalcona R13 diminuiu a toxicidade da mesma em células L1210 indicando que a molécula pode não estar sendo liberada do sistema nanoestruturado.

Em relação ao efeito das chalconas livres e encapsuladas na NE em células normais (VERO) e *in vivo* podemos concluir que a encapsulação diminuiu a toxicidade das chalconas em células VERO resultando assim em uma maior seletividade para células leucêmicas L1210. A encapsulação das chalconas também diminuiu os danos *in vivo* causados pelas chalconas livres.

Em resumo, os resultados obtidos demonstraram que a encapsulação não melhorou a atividade antileucêmica das chalconas mas diminuiu a toxicidade das mesmas em células normais.

#### 5. PERSPECTIVAS

- Avaliar o perfil de liberação das chalconas encapsuladas na nanoemulsão.
- Avaliar o efeito antitumoral das chalconas livres e encapsuladas em modelo de leucemia murino.

**ANEXO A - ARTIGO A SER SUBMETIDO****Development and evaluation of different lipid nanoparticles for drug delivery: study of cytotoxicity *in vitro* and *in vivo***

Evelyn Winter<sup>1</sup>, Carine Dal Pizzol<sup>1</sup>, Claudriana Locatelli<sup>2</sup>, Celso Pilatti<sup>3</sup>, Tânia Beatriz Crezkynski Pasa<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Departamento de Ciências Farmacêuticas, Universidade Federal de Santa Catarina P.O. Box 476, Florianópolis, SC, 88040-900, Brazil

<sup>2</sup>Curso de Farmácia, Universidade do Oeste de Santa Catarina, Videira, SC, 89560-000, Brazil and Universidade do Alto Vale do Rio do Peixe, Caçador, SC, 89500-000, Brazil.

<sup>3</sup>Departamento de Medicina Veterinária, Universidade do Estado de Santa Catarina, 88520-000 Lages, SC, Brazil

**ABSTRACT**

Lipid nanoparticles has received considerable attention in the field of drug delivery due the ability of incorporate lipophilic drugs and allow a controlled drug release. The solid lipid nanoparticles (SLN), the nanostructured lipid carriers (NLC) and the lipid emulsion (LE) are three different lipid nanostructured systems that have been widely used in the last years and present different physical characteristics. Despite the wide use of lipid nanoparticles in different fields the toxicity of these systems has not been sufficiently investigated so far, because there is a common sense that lipids are biocompatible. However, it was already observed that any material structured in nanoscale might change the physicochemical properties. Thus, the aim of this study was evaluate the cytotoxicity of these three nanoparticle systems. For this, we carried out an *in vitro* toxicity study, using VERO culture cells and, an *in vivo* study with mice. The animals were treated intraperitoneally with the lipid nanoparticles or vehicle for 14 days. After that histopathological, haematological and biochemical analysis were performed. Our results indicate that the nanoparticles containing the solid lipid (SLN and NLC) induced an important cytotoxicity *in vitro* but did not induce toxicity *in vivo* evidenced by the histopathological and weight body analysis. The LE did not induce *in vitro* toxicity and did not induce histopathological and weight body alteration but as the SLN and NLC induced a possible inflammatory process *in vivo*. All the nanoparticle systems induced lipid peroxidation in the liver of the animals but the oxidative stress was avoided by the antioxidant responses increase. The poor ability of cells in culture medium to induce the antioxidant responses can explain the higher cytotoxicity of the SLN and NLC *in vitro* than *in vivo*. This study provides important data for toxicological studies of different lipid nanoparticles however, further studies should be conducted in order to investigate the inflammatory response in order to establish the safety of these nanoparticles.



## APÊNDICE A – SÍNTESE E CARACTERIZAÇÃO DAS NANOPARTÍCULAS LIPÍDICAS

### Formulação das nanopartículas lipídicas

As nanopartículas lipídicas foram preparadas pela técnica de homogeneização a quente seguida por irradiação ultrassônica. A fase oleosa composta por 2% de lipídio e 0,2% de lecitina S75 foi dissolvida em 3% de solvente (50:50 etanol e acetona) e aquecida à cerca de 56 - 70°C até que o lipídio fundisse. Em seguida, a fase aquosa (0,8% de polissorbato 80 e 10mL de PBS), previamente aquecida na mesma temperatura, foi vertida à fase oleosa e submetida à irradiação ultrassônica por 3 m, a 20W de potência em banho de gelo. As chalconas foram adicionadas na fase oleosa da formulação (PATIL; PANDIT, 2007).

### Caracterização das nanopartículas lipídicas

O tamanho médio de partículas, a distribuição e o potencial zeta foram determinados por espalhamento de luz dinâmico e anemometria laser Doppler, respectivamente, utilizando um Zetasizer NanoZS (Malvern Instruments, UK), equipado com ângulo de espalhamento de 173°. As medidas foram realizadas a 25°C após diluição adequada das amostras em água destilada previamente filtrada. A distribuição de tamanho de partículas é dada pelo índice de polidispersidade (PDI). Para medir o potencial zeta, amostras de nanopartículas foram colocadas em uma célula específica quando um potencial de  $\pm 150$  mV foi estabelecido. Os valores de potenciais foram calculados a partir dos valores da média de mobilidade eletroforética, através da equação de Smoluchowski (CHANDRASEKHAR, 1943).

O tamanho, polidispersão e potencial zeta das nanoformulações estão descritos na tabela 20.

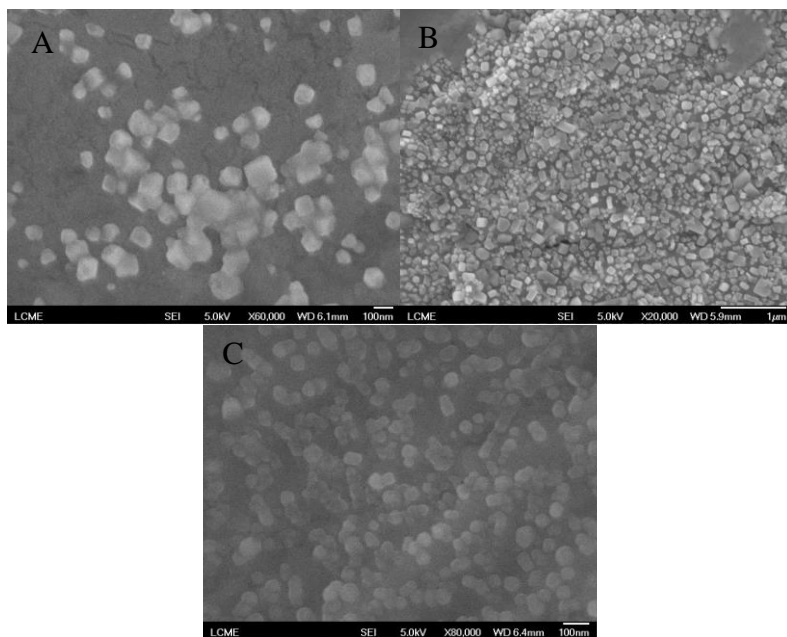
**Tabela 20: Tamanho de partícula, índice de polidispersão e valores de potencial zeta dos 3 sistemas nanoestruturados lipídicos com/sem chalcona encapsulada.**

<b>Form.</b>	<b>Tamanho (nm)</b>	<b>PDI</b>	<b>PZ</b>
<b>NLS R7</b>	236 ± 15	0,47 ± 0,03	-13 ± 1,0
<b>NLC R7</b>	125 ± 14	0,26 ± 0,03	-17 ± 2,6
<b>NE R7</b>	124 ± 6	0,24 ± 0,01	-24 ± 5,1
<b>NLS R13</b>	307 ± 24	0,41 ± 0,07	-13 ± 2,8
<b>NLC R13</b>	134 ± 24	0,21 ± 0,09	-15 ± 2,5
<b>NE R13</b>	107 ± 2	0,19 ± 0,01	-17 ± 2,8
<b>NLS R15</b>	135 ± 22	0,24 ± 0,06	-14 ± 0,7
<b>NLC R15</b>	93 ± 11	0,14 ± 0,01	-13 ± 1,4
<b>NE R15</b>	110 ± 3	0,17 ± 0,01	-19 ± 4,2
<b>NLS</b>	157 ± 18	0,26 ± 0,01	-13 ± 2,8
<b>NLC</b>	101 ± 15	0,14 ± 0,01	-14 ± 0,7
<b>NE</b>	117 ± 4	0,19 ± 0,02	-22 ± 1,4

Os resultados apresentados representam a Média ± EPM (n=3)

As características morfológicas das nanopartículas brancas foram caracterizadas por microscopia eletrônica de varredura de alta resolução (FEG-SEM) no Laboratório Central de Microscopia Eletrônica (UFSC). As medidas foram realizadas utilizando o equipamento FEG-SEM modelo JSM-6701F da JEOL, operando em 200 keV. Para realização das imagens amostras foram diluídas 100x, depositadas sobre suporte de alumínio e cobertas com um filme de ouro.

As NLS, NLC e NE apresentaram tamanho médio de 143, 138 e 109 nm respectivamente (valores foram calculados pelo ImageJ) (Figura 29).



**Figura 29. Microscopia eletrônica de varredura de alta resolução (FEG-SEM) das A) nanopartículas lipídicas sólidas (NLS), B) compostas (NLC) e C) nanoemulsão.**

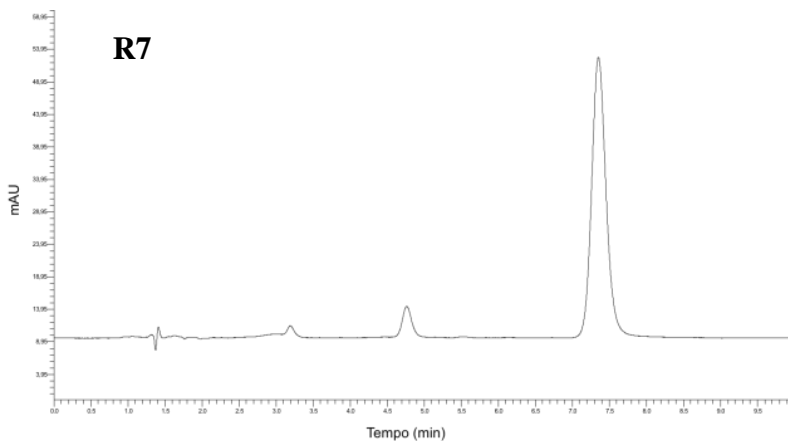
### **Método de doseamento das chalconas por cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE)**

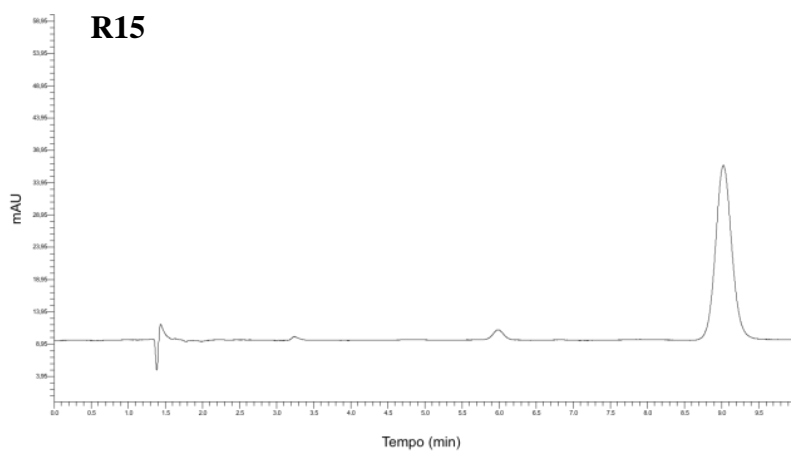
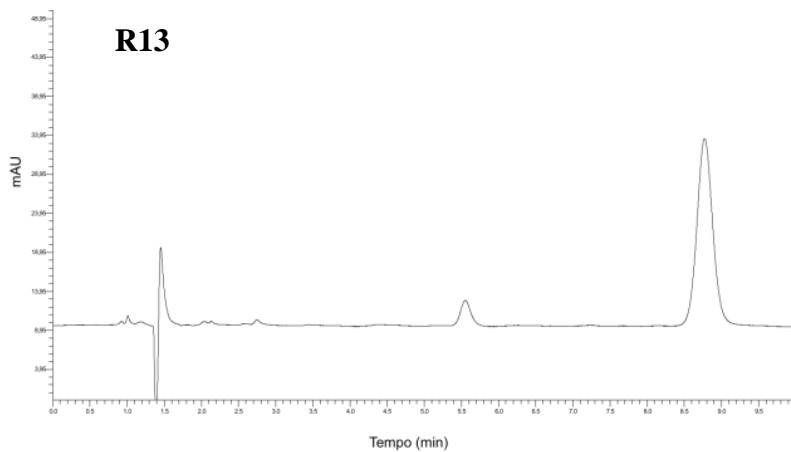
Para determinar a concentração de chalcona incorporada nas nanopartículas lipídicas um método por cromatografia líquida de alta eficiência foi desenvolvido. Foram realizadas leituras espectrofotométricas em vários comprimentos de onda para verificar o máximo de absorvância de luz UV das 3 moléculas. Embora, as três moléculas apresentem um pico de absorção máxima em diferentes comprimentos de onda, foi padronizado o comprimento de onda de 274 nm para a detecção das 3 chalconas.

As análises foram realizadas em um cromatógrafo líquido de alta eficiência Perkin Elmer S 200 composto por uma bomba binária, um controlador automático de fluxo, um injetor automático (com alça

dosadora de até 200  $\mu\text{l}$ ) um detector espectrofotométrico UV/VIS e um desgaseificador. Foi utilizada uma coluna Zorbax ODS ( $5\ \mu\text{m} - 150\ \text{mm} \times 4,6\ \text{mm i.d.}$ ). A fase móvel foi constituída de uma mistura de metanol:água (85:15, v/v). Essa solução foi desgaseificada e filtrada. As condições de operação foram em modo isocrático, com fluxo de  $1,0\ \text{mL}\cdot\text{min}^{-1}$ , detecção de 274 nm e volume de injeção de  $20\ \mu\text{L}$  a temperatura ambiente.

A concentração das chalconas nas amostras foi estimada por CLAE utilizando o programa TOTALCHROM, através da medida da área dos picos detectados. As chalconas R7, R13 e R15 apresentaram picos com tempo de retenção em aproximadamente 7,36, 8,77 e 9,03 minutos respectivamente (Figura 30).



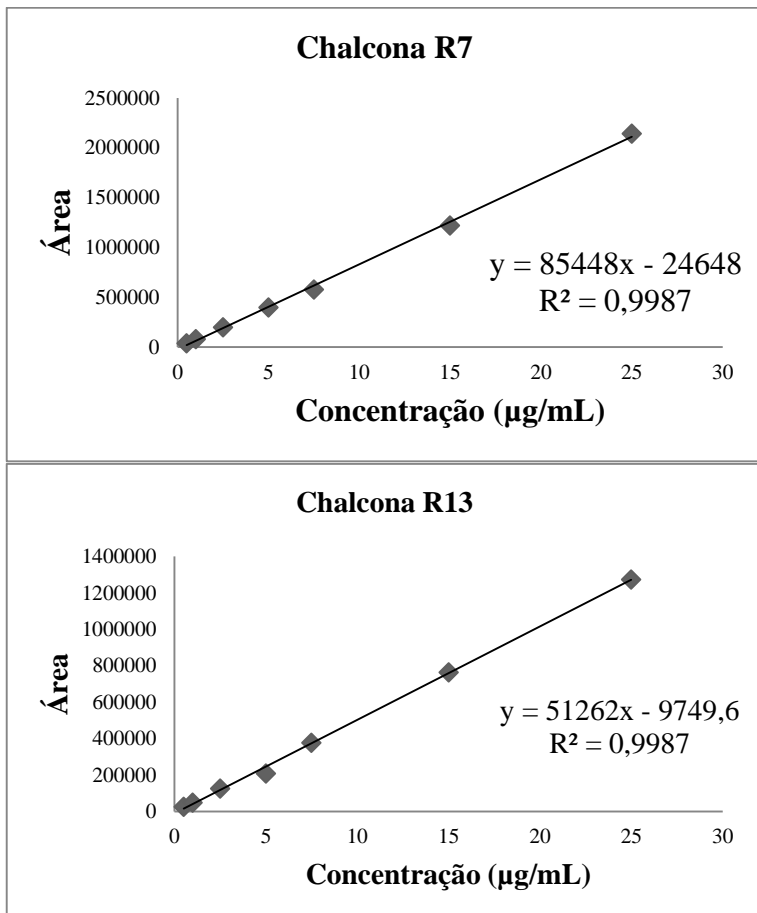


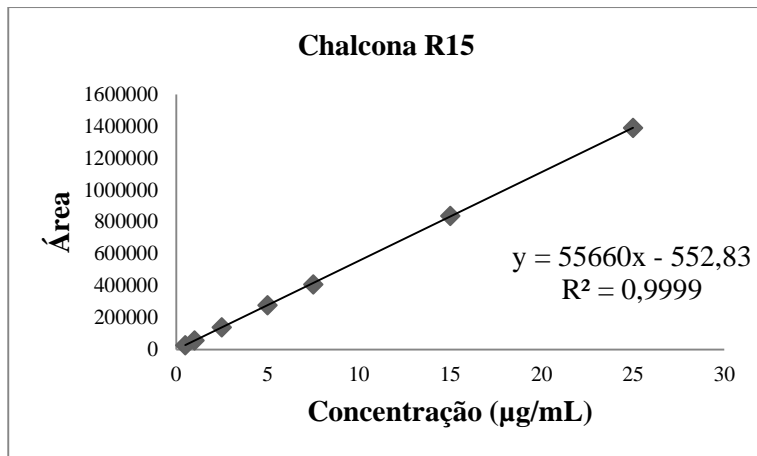
**Figura 30. Cromatograma obtido por CLAE das chalconas R7, R13 e R15**

### **Linearidade**

A linearidade do método foi avaliada através da construção de três curvas analíticas, em diferentes dias, contemplando concentrações de 0,5

a 25 µg/mL das chalconas. A equação da reta foi determinada através do estudo de regressão linear (Figura 31).



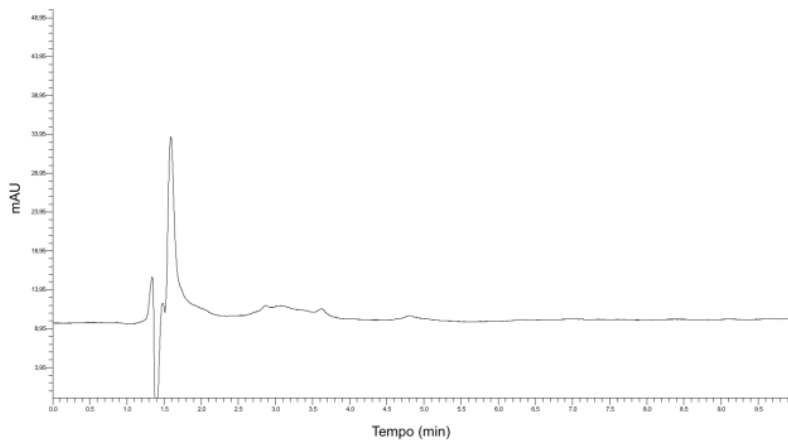


**Figura 31: Curvas de calibração das chalconas obtidas por CLAE e suas respectivas equações de reta.**

Dentro dessa faixa, o método demonstrou-se linear para as três chalconas, apresentando um coeficiente de correlação para a R7, R13 e R15 de  $R^2 = 0,9987$ ,  $R^2 = 0,9987$  e  $R^2 = 0,9999$ , respectivamente, indicando uma ótima correlação entre os dados.

### **Especificidade**

Uma amostra da formulação NLC, previamente dissolvida na fase móvel e posteriormente filtrada em membrana de  $0,45 \mu\text{m}$  de poro, foi injetada no cromatógrafo a fim de garantir que os componentes das nanopartículas não interferissem na detecção e quantificação das chalconas. No cromatograma apresentado na figura 31, é possível observar que não há interferência dos excipientes das formulações indicando que o método é específico.



**Figura 32. Cromatograma obtido por CLAE das chalconas R7, R13 e R15**

### **Determinação da eficiência de encapsulação (EE) das chalconas nas nanopartículas**

Para avaliação da eficiência de encapsulação, alíquotas de 500  $\mu\text{L}$  das formulações ( $n=3$ ) foram transferidas para unidades de ultrafiltração/centrifugação (Ultrafree-MC; Milipore – EUA) e centrifugadas a 10.000 x g por 30 minutos. Após a separação, 20  $\mu\text{L}$  do filtrado foi retirado e diluído na fase móvel para determinação da concentração de chalcona não encapsulada. A EE % foi calculada como sendo a diferença percentual entre a quantidade da molécula presente na suspensão após dissolução da mesma em metanol e aquela encontrada no filtrado (Tabela 21).



**Tabela 21. Teor total (TT) das chalconas encapsuladas e eficiência de encapsulação (EE).**

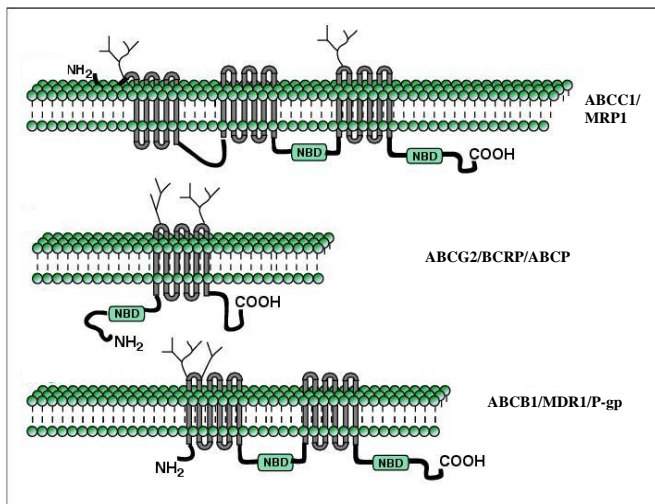
<b>Form.</b>	<b>TT (<math>\mu\text{g/mL}</math>)</b>	<b>EE (%)</b>
<b>NLS R7</b>	453 $\pm$ 60	91
<b>NLC R7</b>	441 $\pm$ 52	88
<b>NE R7</b>	430 $\pm$ 65	86
<b>NLS R13</b>	484 $\pm$ 19	97
<b>NLC R13</b>	490 $\pm$ 16	98
<b>NE R13</b>	467 $\pm$ 30	93
<b>NLS R15</b>	476 $\pm$ 40	95
<b>NLC R15</b>	481 $\pm$ 26	96
<b>NE R15</b>	467 $\pm$ 30	93

CAPÍTULO 3 –  
IDENTIFICAÇÃO DE  
NOVOS INIBIDORES DA  
PROTEÍNA DE  
RESISTÊNCIA ABCG2

## 1. INTRODUÇÃO

Um dos maiores obstáculos para a terapia quimioterápica não só das leucemias mas de um grande número de tumores é a resistência à múltiplos fármacos, fenômeno conhecido como “multidrug resistance” ou MDR. Esta resistência pode ser causada por diversos fatores entre eles: 1) alteração na expressão do receptor membranar do quimioterápico, 2) mutação das proteínas-alvo dos quimioterápicos, 3) modificações no metabolismo do fármaco, 4) alterações na via apoptótica, 5) alterações nos pontos de checagem do ciclo celular, 6) compartimentalização intracelular do fármaco, 7) aumento do efluxo dos fármacos, entre outros (GOTTESMAN, 2002; GOTTESMAN et al., 2009).

O aumento do efluxo dos fármacos do meio intracelular para o meio extracelular é um dos principais mecanismos da resistência a múltiplos fármacos que consiste principalmente na presença dos transportadores ABC (do inglês *ATP-binding cassette*). Estes transportadores são proteínas transmembranares que possuem basicamente 3 regiões: porção extracelular, porção transmembranar e sítio de ligação de nucleotídeos (NBD). Todos os membros da família dos transportadores ABC apresentam a mesma topologia contendo as 3 regiões básicas citadas acima, no entanto essas regiões podem estar organizadas de diferentes formas com dois ou três domínios transmembranares e dois sítios de ligação de ATP (por exemplo a P-gp e a MRP1 respectivamente) ou ainda apenas um domínio transmembranar e um sítio de ligação de ATP (por exemplo a ABCG2) (Figura 33). Pelo menos dois sítios de ligação de ATP são necessários para que ocorra o efluxo de xenobióticos portanto a proteína ABCG2 é considerada um meio transportador e precisa estar associada a uma segunda proteína para formar um dímero e realizar o efluxo de moléculas (DEAN; RZHETSKY; ALLIKMETS, 2001).



**Figura 33. Estrutura das proteínas de resistência MRP1, ABCG2 e P-gp.** Fonte: Adaptado de VAUTIER et al., 2006.

Entre as proteínas pertencentes ao grupo dos transportadores ABC 48 delas já foram descritas no homem. Muitas destas proteínas apresentam importantes funções fisiológicas na detoxificação celular em órgãos como fígado e rins e na proteção contra a entrada de xenobióticos em órgãos como o cérebro e também na placenta. Três destas proteínas no entanto, apresentam uma forte relevância clínica em pacientes com câncer. São elas a ABCB1 também conhecida como P-gp ou MDR1; ABCC1 também conhecida como MRP1 e ABCG2 também conhecida como BCRP ou MXR (SZAKACS et al., 2006).

A resistência a múltiplos fármacos está altamente envolvida nas leucemias já que os principais quimioterápicos utilizados no tratamento da mesma, como vincristina, doxorrubicina, mitoxantrona e metotrexato são substratos de um ou mais transportadores ABC (XIA; SMITH, 2012; SWERTS et al., 2006; MORAES et al., 2013).

Na tabela 22 estão descritos os principais fármacos antitumorais que são transportados pelas diferentes proteínas de resistência.

**Tabela 22. Fármacos transportados pelas proteínas de resistência ABCB1, ABCC1 e ABCG2.**

<b>CLASSE</b>	<b>FÁRMACOS</b>	<b>TRANSPORTADOR</b>
<b>Antraciclinas</b>	Doxorrubicina Daunorrubicina Epirrubicina Idarrubicina	ABCB1 (P-gp), ABCC1 (MRP1), ABCG2 (BCRP)
<b>Epidofilotoxinas</b>	Etoposídeo Teniposídeo	ABCB1 (P-gp), ABCC1 (MRP1), ABCG2 (BCRP)
<b>Alcalóides da Vinca</b>	Vincristina Vimblastina Vinorelbina	ABCB1 (P-gp), ABCC1 (MRP1)
<b>Taxanos</b>	Paclitaxel Docetaxel	ABCB1 (P-gp)
<b>Inibidores de quinases</b>	Flavopiridol Imatinibe	ABCB1 (P-gp), ABCG2 (BCRP)
<b>Outras</b>	Mitroxantrona Tamoxifeno Mitomicina Actinomicina D Metotrexato	ABCB1 (P-gp), ABCC1 (MRP1), ABCG2 (BCRP)

**Fonte:** Adaptado de STAVROVSKAYA; STROMSKAYA, 2008.

Entre as três proteínas relacionadas à resistência que estão presentes no câncer, a glicoproteína-P (P-gp) foi a primeira a ser descoberta e a única que já possui a estrutura elucidada. Em 1976 Juliano e Ling demonstraram a presença deste transportador em células tumorais resistentes a vários quimioterápicos (JULIANO; LING, 1976).

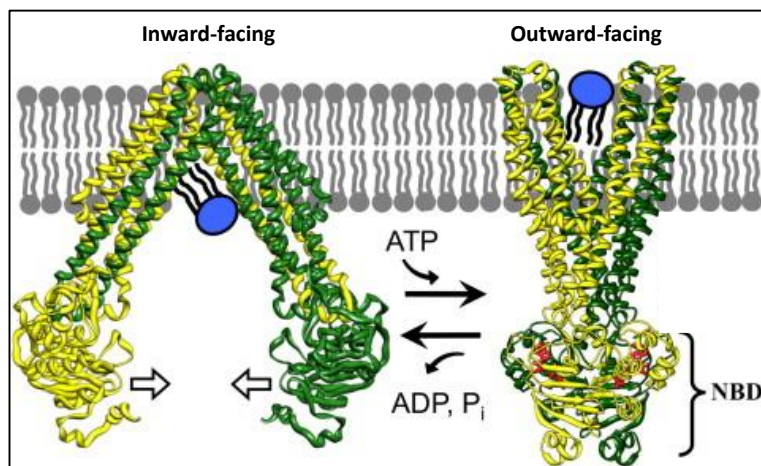
A segunda proteína envolvida na resistência em células tumorais é chamada de MRP1 e foi identificada por Cole e colaboradores em 1992 (COLE et al., 1992). A presença da proteína MRP1 confere resistência a diversos quimioterápicos como antraciclinas, alcalóides da vinca e camptotecina. Mesmo apresentando substratos em comum com outros transportadores como P-gp, poucos inibidores desta proteína existem até o momento (SUN et al., 2012).

A última proteína a ser descoberta e estudada foi a ABCG2. Três grupos foram responsáveis por identificá-la e nomeá-la de acordo com o modelo utilizado na sua descoberta. Doyle e colaboradores em 1998 identificaram a presença desta proteína em células de câncer de mama (MCF7) tratadas com adriamicina. Por ter sido estudada em células de câncer mamário este grupo nomeou esta proteína BCRP (*breast cancer resistance protein*) (DOYLE et al., 1998). Outro grupo nomeou esta proteína como MXR pois a identificaram em células resistentes a mitoxantrona (MIYAKE et al., 1999) e o terceiro grupo nomeou esta proteína como ABCP (*placenta-specific ATP-binding cassette*) devido sua presença na placenta (ALLIKMETS et al., 1998).

A proteína ABCG2 possui 655 aminoácidos, uma massa de aproximadamente 72kDa e possui importantes funções fisiológicas. Está presente na placenta cuja função está relacionada à proteção do feto, em órgãos como fígado, rins, intestino, e também na barreira hematoencefálica, testículos, glândulas mamárias entre outros (VLAMING; LAGAS; SCHINKEL, 2009). Esta proteína também está presente em neoplasias incluindo câncer de mama, pulmão, pâncreas, cólon, esôfago, estômago, cérebro e em tumores hematológicos (NATARAJAN et al., 2012). Assim como todos os transportadores ABC, o transporte de substratos realizado por essa proteína possui como fonte de energia a hidrólise de ATP.

O mecanismo básico do efluxo de moléculas pela proteína ABCG2 e pelos transportadores ABC em geral, tem como ponto central a hidrólise de ATP no domínio de ligação de nucleotídeos (NBD). Duas regiões NBD são necessárias para que a hidrólise de ATP aconteça e por esta razão, duas proteínas ABCG2 são necessárias para formar uma unidade funcional. A ligação e hidrólise de ATP induzem mudanças conformacionais nos domínios NBDs que são transmitidas para as regiões transmembranares da proteína. Essas mudanças conformacionais são: o fechamento dos domínios NBD intracelulares e a abertura dos domínios transmembranares para o meio extracelular (conformação *outward-facing*). Após a hidrólise e a dissociação do ATP em ADP e fosfato inorgânico (Pi), os domínios NBD assumem novamente a posição aberta

e levam ao fechamento dos domínios transmembranares (conformação *inward-facing*) (Figura 34). Outras conformações intermediárias podem ocorrer e estudos recentes, em que foram cristalizados diferentes transportadores acoplados a diferentes substratos, têm demonstrado que outros fatores podem estar envolvidos no mecanismo de transporte básico (DAWSON; HOLLENSTEIN; LOCHER, 2007).



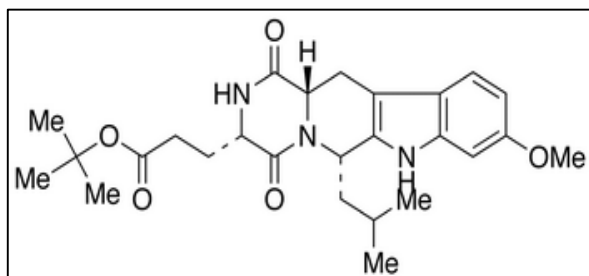
**Figura 34. Mecanismo de ação dos transportadores ABC.** A ligação e hidrólise de ATP favorece o fechamento dos domínios NBDs e a abertura dos domínios transmembranares para o meio extracelular (conformação *outward-facing*). Após a hidrólise do ATP em ADP+Pi ocorre a abertura dos domínios NBDs e o transportador volta para a posição inicial (conformação *inward-facing*). **Fonte:** Adaptado de KAWAI et al., 2011.

A presença dos transportadores ABC em células tumorais representa um importante entrave no tratamento quimioterápico. Por esta razão tem se buscado inibidores destas bombas de efluxo que possam impedir a expulsão dos fármacos, que apresentem alta afinidade pelo transportador, que sejam específicos para apenas um transportador, que não apresentem interação farmacocinética com outros quimioterápicos, que não sejam transportados e apresentem baixa toxicidade (SCHMIDT et al., 2013; BOUMENDJEL et al., 2011).

Os inibidores da P-gp foram os primeiros a serem estudados e são divididos em 3 gerações: a primeira geração corresponde a moléculas

como verapamil e ciclosporina A que não foram promissoras para este fim por apresentarem uma alta toxicidade nas doses efetivas (OZOLS et al., 1987; ANGLICHEAU et al., 2006). Entre os inibidores de segunda geração destacam-se o elacridar (GF120918) e o valsopodar (PSC-833), no entanto esses inibidores alteram a farmacocinética dos fármacos co-administrados por interagirem com enzimas do citocromo P450. Finalmente os inibidores de terceira geração como tariquidar, zosuquidar foram desenvolvidos mas os resultados de testes clínicos não demonstraram os efeitos positivos esperados e os testes não chegaram a fase III (DARBY; CALLAGHAN; McMAHO, 2011).

Os inibidores da proteína ABCG2 foram estudados mais recentemente e podem ser divididos em inibidores não específicos, como o elacridar que inibe também a P-gp, e inibidores específicos como a fumitremorgina C (FTC) a qual foi o primeiro inibidor de ABCG2 identificado. Apesar da especificidade, a FTC apresentou muitos efeitos neurotóxicos e a eficácia do fármaco nem chegou a ser testada em ensaios clínicos. Com base na estrutura da FTC, novos inibidores foram desenvolvidos e entre eles o Ko143 apresentou menos efeitos tóxicos e tem sido um dos inibidores mais utilizados em modelos celulares (Figura 35) (SCHMIDT et al., 2013; ALLEN; LOEVEZIEN; LAKHAI, 2002).



**Figura 35. Estrutura do Ko143**

A terceira geração de inibidores de ABCG2 correspondem a derivados de flavonóides e a quarta e última geração de inibidores correspondem a compostos obtidos por modificações químicas a partir de moléculas com afinidade por transportadores ABC, na tentativa de diminuir os efeitos tóxicos destas moléculas e potencializar o efeito inibitório sobre ABCG2. Entre estes novos inibidores estão compostos



derivados do tariquidar, estilbenos, chalconas e cromonas (SCHMIDT et al., 2013).

A fim de encontrar novos inibidores mais potentes e específicos para ABCG2, derivados de chalconas e cromonas foram sintetizados e as respectivas atividades inibitórias foram avaliadas. A última etapa deste trabalho de doutorado foi desenvolvida durante estágio de doutoramento em Lyon (França) no laboratório: “Mécanisme et Modulation de la Résistance aux Médicaments” do Institut de Biologie et Biochimie des Protéines (IBCP), sob orientação do Dr. Attilio Di Pietro.

Os resultados apresentados neste capítulo estão separados segundo a classe dos compostos testados como possíveis inibidores de ABCG2: chalconas, cromonas e bis-chalconas. Dentro de cada item estão descritos os resultados encontrados, a discussão e a conclusão.

## 2. MATERIAIS E MÉTODOS

### 2.1. Reagentes

Os meios DMEM alta glicose, RPMI-1640, os antibióticos G418, penicilina e estreptomicina e o soro fetal bovino foram adquiridos da PAA (França). O anticorpo primário anti-human CD338 (ABCG2) clone 5D3 foi adquirido da eBioscience (San Diego, CA) e o anticorpo secundário Alexa Fluor 488 Goat Anti-mouse IgG foi adquirido da Life Technologies (Carlsbad, CA). A mitoxantrona, ATP-Mg, Ko143 e outros reagentes foram adquiridos da Sigma (França).

### 2.2. Compostos

Os compostos testados como inibidores de ABCG2 foram sintetizados por diferentes laboratórios: as chalconas e bis-chalconas foram sintetizadas pelo grupo de pesquisa do Prof.<sup>o</sup> Rosendo Augusto Yunes, do Departamento de Química da Universidade Federal de Santa Catarina e as cromonas foram sintetizadas pelo laboratório do Dr. AHCène Boumendjel da Université de Grenoble, Département de Pharmacochimie Moléculaire, França.

Todos os compostos foram dissolvidos em DMSO e posteriormente diluídos em meio de cultura.

### 2.3. Células

A linhagem de células embrionárias renais humanas (HEK293) transfectadas com o gene ABCG2 ou com o vetor vazio (*pcDNA3.1*) foram obtidas como descrito previamente (AHMED-BELKACEM et al., 2005). As células transfectadas com o vetor contendo o gene de resistência foram denominadas HEK293/*ABCG2* e as células transfectadas com o vetor vazio foram denominadas HEK293/*pcDNA3.1*. As células contendo o vetor vazio foram usadas como controle de células não-resistentes. Todas as células HEK293 foram cultivadas em DMEM alta glicose suplementado com 10% de SBF e 1% de penicilina/estreptomicina. Estas células também foram cultivadas na presença do antibiótico G418 (0,75mg/ml) utilizado como agente de seleção das células transfectadas.

A linhagem HEK293 transfectada com o gene *MRP1* ou com o vetor vazio (*pcDNA5*) foi cedida pela Dra. Susan E. Bates (NCI, NIH, Bethesda, MD). Estas células foram cultivadas em DMEM alta glicose suplementado com 10% de SBF, 1% de penicilina/estreptomicina e higromicina B (200 µg/ml) como agente de seleção. As células NIH-3T3 transfectadas com o gene *MDR1* (P-gp) foram cultivadas em DMEM alta glicose suplementado com 10% de SBF, 1% de penicilina/estreptomicina e 60 ng/ml de colchicina como agente de seleção.

As linhagens tumorais H460 (células humanas de câncer de pulmão de grandes células), H23 (células humanas de câncer de pulmão de células não-pequenas), PANC-1 (células humanas de câncer de pâncreas) e SF295 (células humanas de glioblastoma) foram selecionadas com mitoxantrona nas seguintes concentrações: H460/20nM, H23/10nM, PANC-1/100nM e SF295/500nM. Tanto as células não resistentes como as células resistentes (selecionadas à mitoxantrona) foram gentilmente cedidas pelo Dr. R. W. Robey e Dra S. E. Bates do Instituto Nacional do Câncer (NCI – Bethesda). Estas células foram cultivadas em RPMI-1640 suplementado com 10% de SBF, 1% de penicilina/estreptomicina e as células resistentes com as respectivas concentrações de mitoxantrona.

#### **2.4. Avaliação da atividade inibitória de ABCG2**

Para o teste de avaliação da atividade inibitória dos compostos testados, as células resistentes e não-resistentes ( $1,5 \times 10^6$ ) foram dispostas em placas de 24 poços. Após 24 ou 48 horas de adesão, o meio de cultura foi retirado e as células foram incubadas por 30 minutos a 37°C com concentrações específicas dos compostos testados e 5 µM de mitoxantrona utilizada como substrato. Após a incubação, as células foram lavadas, ressuspensas em PBS e mantidas em gelo até a análise por citometria de fluxo. Foram coletados 10.000 eventos de cada amostra. A fluorescência obtida nas células não resistentes (HEK293/*pcDNA3.1*) tratadas apenas com mitoxantrona foram consideradas como 100% de inibição e a inibição causada pelos compostos foram calculadas com base neste valor de fluorescência do controle. Como controle induzindo 100% de inibição também foi utilizado o Ko143 (1 µM). Valores de  $EC_{50}$  (concentração necessária para causar 50% do efeito máximo) foram calculados pelo GraphPad Prisma 5.

## 2.5. Viabilidade celular

Para avaliação da viabilidade celular, as células ( $1 \times 10^4$ ) foram dispostas em placas de 96 poços. Após 24 horas de adesão celular, concentrações crescentes dos compostos foram adicionadas e após 72 horas de incubação foi realizado o teste do MTT. Os controles contendo apenas DMSO foram considerados 100% de viabilidade. A  $CC_{50}$  (concentração citotóxica para 50% das células) foi calculada pelo GraphPad Prisma 5.

## 2.6. Avaliação da atividade ATPásica de ABCG2

A atividade ATPásica da ABCG2 foi realizada através da quantificação do fosfato inorgânico liberado após a hidrólise de ATP através de um ensaio colorimétrico usando membranas de inseto ricas em ABCG2 e colesterol (Sf9) (OZVEGY et al., 2001; TELBISZ et al., 2007). O ensaio foi realizado em placa de 96 poços onde foram incubados 0,5 mg/ml de membranas com os compostos testados, com ou sem ortovanadato de sódio (0,33 mM) para inibição da hidrólise de ATP pela Na/K ATPase e com ATP-Mg (3,9 mM) por 30 minutos a 37°C em tampão pH 8 (Tris-HCl / NaCl 50 mM). A reação foi parada com a adição de SDS 10% e a revelação do Pi liberado foi realizada com a adição de uma mistura de uma parte de tampão zinco-molibdato com 4 partes de uma solução 10% de ácido ascórbico. A absorbância foi avaliada em 880 nm após 30 min de incubação. Os resultados foram expressos em nmol de Pi/ min/mg de proteína.

A avaliação da atividade ATPásica basal foi realizada apenas na presença de ATP e dos reagentes citados acima. Para avaliar a atividade ATPásica estimulada, adicionou-se ao teste 2  $\mu$ M de quercetina que corresponde a um substrato da proteína ABCG2 e estimula a atividade ATPásica.

## 2.7. Avaliação da ligação do anticorpo anti-ABCG2 (5D3)

O anticorpo anti-ABCG2 clone 5D3 liga-se em um epítipo externo da proteína ABCG2 e estudos demonstraram que a ligação deste anticorpo é dependente da conformação da proteína (OZVEGY-LACZKA et al., 2005; TELBISZ et al., 2012). Baseado nesses dados, o anticorpo 5D3,

como é conhecido, pode auxiliar nos estudos de avaliação da interação entre inibidores e ABCG2.

Para o ensaio, células HEK293/*ABCG2* ( $0,5 \times 10^6$ ) foram lavadas e incubadas com os compostos em teste e ao mesmo tempo com o anticorpo primário 5D3 ou com o isotipo controle ( $1 \mu\text{g/mL}$ ) por 45 min a  $37^\circ\text{C}$  em PBS/BSA 0,5 %. Após a incubação com o anticorpo primário, as células foram lavadas e incubadas com o anticorpo secundário Alexa Fluor 488 ( $3 \mu\text{g/mL}$ ) por 30 minutos a  $37^\circ\text{C}$ . Nova lavagem foi realizada, as células foram então ressuspensas em PBS/BSA 0,5 % e a ligação do 5D3 foi avaliada por citometria de fluxo. A fluorescência obtida no tratamento com  $1 \mu\text{M}$  de Ko143 foi considerada 100 % de ligação do anticorpo e foi utilizada como base para calcular o efeito causado pelos demais compostos.

## **2.8. Análise estatística**

Os resultados foram expressos como a média  $\pm$  desvio padrão (SD). Cada experimento foi repetido pelo menos três vezes. Para a avaliação estatística, foi utilizada a análise de variância de uma via (ANOVA) seguida do teste de Dunnet. Um valor de  $p < 0,05$  foi considerado estatisticamente significativo.

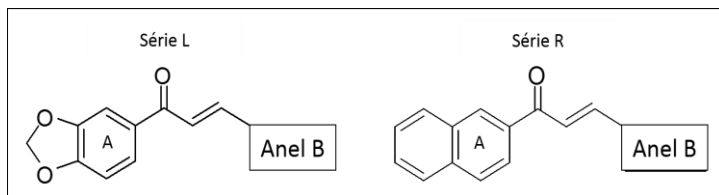
### 3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

#### 3.1 Chalconas

##### 3.1.1. Efeito de chalconas como inibidores da proteína ABCG2

Na busca de novos inibidores de ABCG2, avaliou-se o efeito de 61 chalconas. Para avaliar o efeito inibitório destas moléculas, células HEK293 transfectadas com o gene *ABCG2* (HEK293/*ABCG2*) foram incubadas com 5  $\mu\text{M}$  de cada chalcona e a porcentagem de inibição da proteína foi calculada.

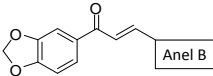
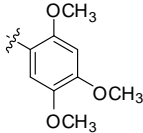
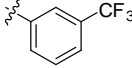
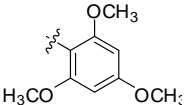
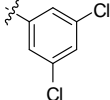
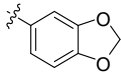
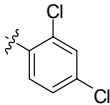
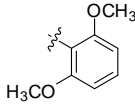
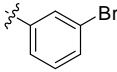

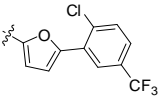

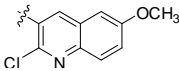
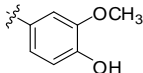
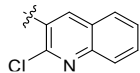
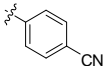
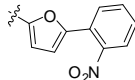
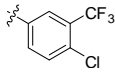
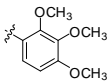
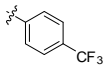
Inicialmente, avaliou-se o efeito de diferentes substituintes no anel B da estrutura geral das chalconas. Duas séries de chalconas foram analisadas: série L contendo um grupamento metilenodioxifenil e série R contendo um grupamento naftil no anel A que não variou entre as chalconas da mesma série (Figura 36).

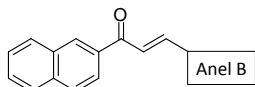


**Figura 36. Estruturas das chalconas da série L e R.**

Na tabela 23 estão descritos os valores de inibição obtidos com as chalconas da série L e R.

**Tabela 23. Efeito de chalconas(5 $\mu$ M) pertencentes a série L e R sobre a inibi o da proteína ABCG2 em células HEK293/ABCG2.**

					
Chalcona	Anel B	Inibi�o (%)	Chalcona	Anel B	Inibi�o (%)
L32		86 $\pm$ 2	L42		24 $\pm$ 4
L33		65 $\pm$ 1	L43		28 $\pm$ 8
L34		19 $\pm$ 1	L44		18 $\pm$ 4
L35		62 $\pm$ 10	L45		13 $\pm$ 8
L36		10 $\pm$ 4	L46		11 $\pm$ 1
L37		9 $\pm$ 3	L47		6 $\pm$ 0
L38		45 $\pm$ 15	L48		9 $\pm$ 7
L39		12 $\pm$ 2	L49		20 $\pm$ 4
L40		12 $\pm$ 3	L50		28 $\pm$ 2
L41		9 $\pm$ 1			



Chalcona	Anel B	Inibição (%)	Chalcona	Anel B	Inibição (%)
R51		28 ± 9	R57		20 ± 2
R52		69 ± 9	R58		21 ± 9
R53		48 ± 3	R59		65 ± 11
R54		19 ± 5	R60		28 ± 7
R55		1 ± 0	R61		12 ± 7
R56		26 ± 1			

Podemos observar que no mínimo duas metoxilas no anel B são exigidas para uma ótima atividade inibitória (**L32**, **L33**, **L35**, **R52**, **R53** e **R59**). A exceção para esta regra foi a chalcona **L50** que apesar de possuir 3 metoxilas não apresentou uma atividade inibitória satisfatória indicando que a metoxila na posição 3 pode resultar em uma molécula inativa. A presença de todos os outros substituintes como Cl (**L40**, **L43**, **L44**, **L46**, **L47**, **L48**, **R51**, **R58** e **R61**), Br (**L45** e **R57**), CF<sub>3</sub> (**L40**, **L41**, **L42**, **L46**, **R54** e **R55**), NO<sub>2</sub> (**L37**, **L49** e **R60**), CN (**L39** e **R56**) e OH (**L38**) resultaram em moléculas menos ativas.

Estes resultados estão de acordo com outros trabalhos que também demonstraram a importância de grupamentos metoxila na inibição da proteína ABCG2 (AHMED-BELKACEM et al., 2005; AHMED-



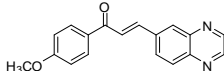
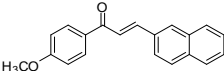
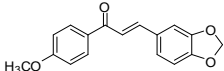
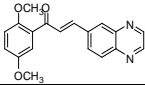
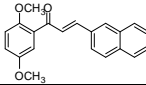
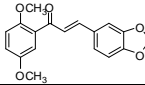
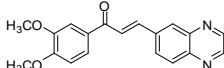
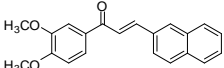
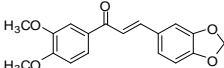
BELKACEM et al., 2007; VALDAMERI et al., 2012a; VALDAMERI et al., 2012b). Em um trabalho anterior, avaliamos a atividade de 54 chalconas e os resultados demonstraram que as chalconas que continham 3 metoxilas causaram um efeito inibitório maior que as chalconas contendo 2 metoxilas e estas causaram um efeito maior que as chalconas contendo apenas 1 metoxila (RANGEL et al., 2013).

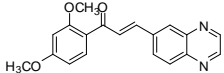
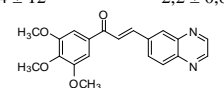
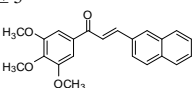
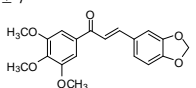
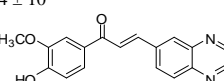
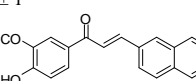
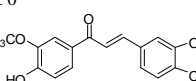
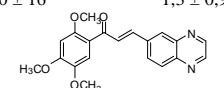
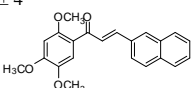
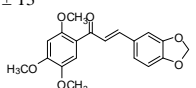
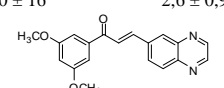
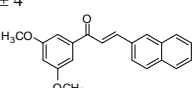
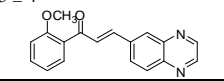
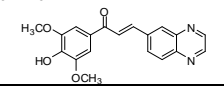
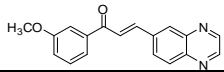
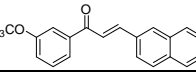
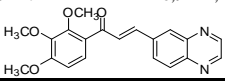
Após a avaliação da importância da presença de metoxilas para atividade inibitória da proteína ABCG2, sintetizou-se novas chalconas que desta vez apresentavam no mínimo uma metoxila no anel A em vez de no anel B e fixou-se os grupamentos do anel B: série N contendo um grupamento quinoxalina; série C contendo um grupamento naftil e série P contendo um grupamento 3,4-metilenodioxifenil no anel B.

Na tabela 24 estão descritos os resultados das porcentagens de inibição obtidas com as 3 séries de chalconas testadas. Os compostos da série N foram os que apresentaram melhor atividade inibitória e por isso tiveram seus valores de EC<sub>50</sub> de inibição calculados.

Os resultados apresentados na tabela 24 confirmam a importância de pelo menos duas metoxilas na estrutura geral das chalconas. Além da importante presença das metoxilas, pode-se observar que as chalconas contendo o grupamento quinoxalina (série N) causaram uma maior inibição que as chalconas contendo os grupamento naftil (série C) e 3,4-metilenodioxifenil (série P).

**Tabela 24. Efeito das chalconas (5µM) das séries N, C e P sobre a inibição da proteína ABCG2 em células HEK293/ABCG2.**

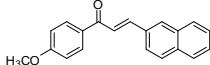
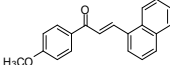
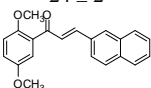
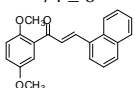
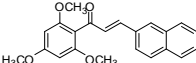
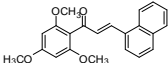
SÉRIE N Anel B = Quinoxalina		SÉRIE C Anel B = 2-naftil	SÉRIE P Anel B = 3,4- metilenodioxifenil
Inibição (%)	EC <sub>50</sub> (µM)	Inibição (%)	Inibição (%)
61 ± 8		18 ± 1	29 ± 2
			
78 ± 5	2,1 ± 0,7	24 ± 2	37 ± 9
			
73 ± 11	2,3 ± 0,5	72 ± 8	61 ± 10
			

<p><b>N4</b></p> <p>86 ± 13      1,9 ± 0,7</p> 		
<p><b>N5</b></p> <p>64 ± 12      2,2 ± 0,6</p> 	<p><b>C5</b></p> <p>42 ± 5</p> 	<p><b>P5</b></p> <p>54 ± 7</p> 
<p><b>N6</b></p> <p>44 ± 10</p> 	<p><b>C6</b></p> <p>41 ± 1</p> 	<p><b>P6</b></p> <p>3 ± 0</p> 
<p><b>N7</b></p> <p>80 ± 16      1,3 ± 0,9</p> 	<p><b>C7</b></p> <p>60 ± 4</p> 	<p><b>P7</b></p> <p>83 ± 13</p> 
<p><b>N8</b></p> <p>60 ± 16      2,6 ± 0,9</p> 	<p><b>C8</b></p> <p>31 ± 4</p> 	
<p><b>N9</b></p> <p>35 ± 4</p> 		
<p><b>N10</b></p> <p>50 ± 10</p> 		
<p><b>N11</b></p> <p>51 ± 1</p> 	<p><b>C11</b></p> <p>21 ± 2</p> 	
<p><b>N12</b></p> <p>39 ± 7      6,9 ± 2,2</p> 		

Dando continuidade à avaliação do efeito de diferentes substituintes no anel B, comparou-se o efeito de chalconas contendo o grupamento 2-naftil (série R) e 1-naftil (série A) no anel B. Na tabela 25, podemos observar que as chalconas da série A foram mais ativas que as

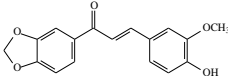
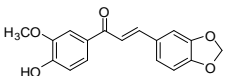
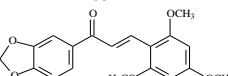
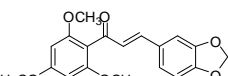
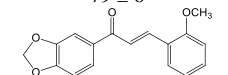
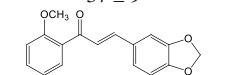
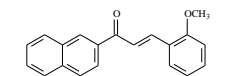
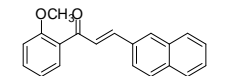
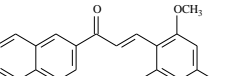
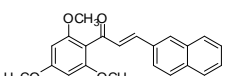
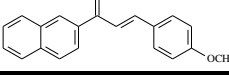
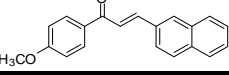
respectivas chalconas da série R, ou seja, a posição do grupo naftil altera a atividade inibitória das chalconas.

**Tabela 25. Efeito de duas séries de chalconas (5 $\mu$ M) sobre a inibição da proteína ABCG2 em células HEK293/ABCG2.**

Série C Anel B = 2-naftil	Série A Anel B = 1-naftil
Inibição (%)	Inibição (%)
<p><b>C1</b> 18 <math>\pm</math> 1</p> 	<p><b>A1</b> 59 <math>\pm</math> 5</p> 
<p><b>C2</b> 24 <math>\pm</math> 2</p> 	<p><b>A2</b> 74 <math>\pm</math> 6</p> 
<p><b>C13</b> 5 <math>\pm</math> 1</p> 	<p><b>A13</b> 66 <math>\pm</math> 7</p> 

Após a confirmação da importância das metoxilas na atividade inibitória das chalconas buscou-se avaliar se a posição das mesmas poderia alterar a atividade das chalconas e para isto, comparou-se o efeito de chalconas com estruturas invertidas contendo metoxilas ora no anel A e ora no anel B. As chalconas das séries R e L apresentam metoxilas no anel B e anéis bicíclicos no anel A e as chalconas das séries C e P apresentam metoxilas no anel A e anéis bicíclicos no anel B (Tabela 26).

**Tabela 26. Comparação do efeito de chalconas(5µM) contendo metoxilas no anel B (série L e R) e chalconas contendo metoxilas no anel A (série P e C) sobre a inibição da proteína ABCG2 em células HEK293/ABCG2.**

Série L e R Metoxilas no anel B Inibição (%)	Série P e C Metoxilas no anel A Inibição (%)
<b>L38</b> $45 \pm 15$ 	<b>P6</b> $3 \pm 0$ 
<b>L33</b> $65 \pm 1$ 	<b>P33</b> $12 \pm 4$ 
<b>L2</b> $79 \pm 6$ 	<b>P2</b> $37 \pm 9$ 
<b>R53</b> $48 \pm 3$ 	<b>C2</b> $24 \pm 2$ 
<b>R13</b> $42 \pm 9$ 	<b>C13</b> $5 \pm 1$ 
<b>R1</b> $50 \pm 1$ 	<b>C1</b> $18 \pm 1$ 

Os resultados apresentados na tabela 26 demonstram que os compostos que apresentam metoxilas no anel B são mais ativos que os compostos inversos. Resultados semelhantes foram obtidos por Valdameri e colaboradores (2012) com chalconas contendo como anel bicíclico um grupamento indol (VALDAMERI et al., 2012b).

O conjunto de resultados obtidos após a análise do efeito das 61 chalconas testadas permitiram a identificação de novas relações estrutura-atividade para inibidores da proteína ABCG2.

Primeiro, a boa eficiência das chalconas substituídas tanto com 1-naftil como com quinoxalina no anel B permite concluir que há uma poliespecificidade do anel B, ou seja, o anel B parece poder acomodar diferentes anéis bicíclicos.

Segundo, a presença de pelo menos duas metoxilas na estrutura geral das chalconas é exigida para que ocorra uma máxima inibição da proteína ABCG2.

Terceiro, a posição das metoxilas no anel B resultam em uma maior atividade inibitória que a presença de metoxilas no anel A. Estudos complementares de 3DQSAR serão realizados para avaliar melhor a interferência dos grupos metoxilas na inibição da proteína ABCG2.

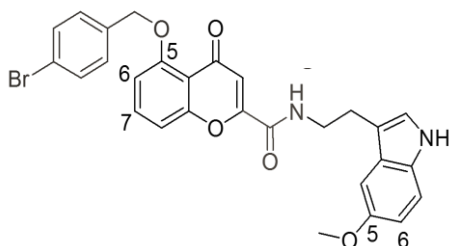
Ao final deste estudo através do qual verificou-se o efeito de 61 chalconas fica como perspectiva, a síntese de novos compostos que apresentem pelo menos 2 grupos metoxilas no anel B e anéis bicíclicos quinoxalina ou 1-naftil no anel A na tentativa de maximizar o efeito inibitório já observado nos casos isolados.

### **3.2. Cromonas**

Um dos inibidores da proteína ABCG2 é o elacridar (GF120918), no entanto esse composto é inespecífico e também inibe o transporte de substratos pela P-gp (DARBY; CALLAGHAN; McMAHO, 2011). Em um estudo anterior, um inibidor de ABCG2 chamado MBLI-87 foi desenvolvido com base na estrutura do GF120918 e apresentou promissores resultados em testes *in vivo* (ARNAUD et al., 2011). Na tentativa de diminuir os efeitos citotóxicos deste composto, o núcleo básico das acridonas do GF120918 foi substituído pelo núcleo básico das cromonas e o composto 6g (Figura 37) foi o que apresentou melhor atividade inibitória (VALDAMERI, et al., 2012c).

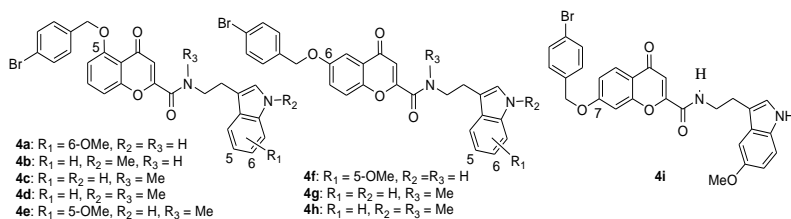
#### **3.2.1. Efeito de cromonas como inibidores da proteína ABCG2**

Neste trabalho de doutorado avaliou-se a atividade de 14 novas cromonas derivadas da cromona 6g (Figura 37), divididas em três classes, em relação ao efeito inibitório sobre a proteína de resistência ABCG2.



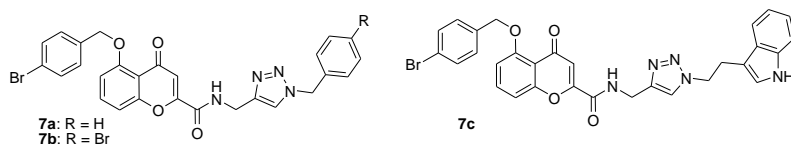
**Figura 37. Estrutura da cromona 6g**

As modificações realizadas nas 9 cromonas da classe I (Figura 38) foram: alteração da posição do radical *p*-bromobenziloxi da posição 5 para a posição 6 (**4f**, **4g**, **4h**) e posição 7 (**4i**), a metilação da ligação amida ( $R_3$ ) na tentativa de evitar a degradação *in vivo* por esterases (**4c**, **4d**, **4e**, **4g**, **4h**), a N-metilação do anel indólico (**4b**, **4d**, **4h**) e a alteração ou retirada da metoxila do anel indólico ( $R_1$ ).



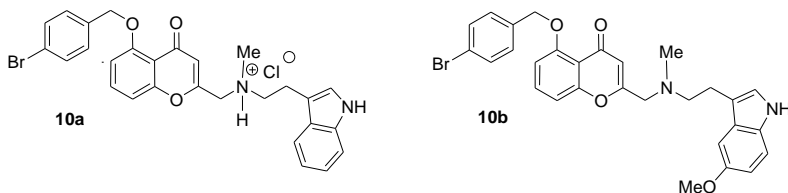
**Figura 38. Estruturas das cromonas de Classe I**

As modificações realizadas nas três cromonas da classe II (Figura 39) foram: inserção de um espaçador triazol (**7a**, **7b**, **7c**) e a substituição do anel indol por um fenil (**7a**) e bromo-fenil (**7b**).



**Figura 39. Estruturas das cromonas de Classe II**

As duas cromonas pertencentes a classe III sofreram modificações na ligação amida central (Figura 40). A cromona **10a** recebeu uma carga positiva na tentativa de melhorar a solubilidade da mesma e a cromona **10b** perdeu a ligação carbonila.



**Figura 40. Estruturas das cromonas de Classe III**

O efeito inibitório de ABCG2 induzido pelas 14 cromonas sintetizadas foi avaliado através da inibição do transporte de mitoxantrona em duas linhagens celulares: células HEK293/*ABCG2* e células de câncer de pulmão H460 que foram selecionadas com 20nM de mitoxantrona. As células HEK293 transfectadas expressam majoritariamente ABCG2 e as células H460 podem expressar outras proteínas de resistência. Foram calculados para cada cromona valores de  $EC_{50}$  de inibição e a porcentagem de inibição máxima de ABCG2 quando atingiu-se o platô de atividade de cada composto. Como controles foram utilizados o **Ko143** (1 $\mu$ M), que corresponde ao inibidor de ABCG2 mais potente e mais utilizado na literatura e a cromona **6g** afim de comparar o efeito de todos os derivados com este composto. Os resultados obtidos com cada um dos derivados da cromona **6g** estão descritos na tabela 27.

**Tabela 27. Efeito de cromonas sobre a inibição da proteína ABCG2 em células HEK293 transfetadas e H460 selecionadas à mitoxantrona.**

Compostos	Células transfetadas com ABCG2 (HEK293/ABCG2)		Células tumorais selecionadas à mitoxantrona (H460/MX)	
	EC <sub>50</sub> (µM)	Inibição Máxima (%)	EC <sub>50</sub> (µM)	Inibição Máxima (%)
<b>Ko143</b>	0,09 ± 0,01	106 ± 1	0,07 ± 0,01	116 ± 6
<b>6g</b>	0,13 ± 0,09	98 ± 7	0,05 ± 0,01	107 ± 11
<i>Classe I</i>				
<b>4a</b>	0,10 ± 0,03	91 ± 30	0,08 ± 0,04	89 ± 5
<b>4b</b>	0,30 ± 0,01	81 ± 2	0,22 ± 0,03	102 ± 8
<b>4c</b>	1,11 ± 0,05*	105 ± 29	0,57 ± 0,06*	89 ± 9
<b>4d</b>	1,00 ± 0,28	88 ± 11	0,50 ± 0,05	84 ± 12*
<b>4e</b>	0,96 ± 0,03	101 ± 20	0,53 ± 0,16	96 ± 4
<b>4f</b>	0,29 ± 0,14	108 ± 27	0,10 ± 0,02	109 ± 9
<b>4g</b>	2,58 ± 0,57***	54 ± 16*	1,67 ± 0,42***	50 ± 5***
<b>4h</b>	2,06 ± 0,51***	50 ± 15*	2,15 ± 0,50***	61 ± 1***
<b>4i</b>	1,27 ± 0,59**	80 ± 5	1,54 ± 0,20***	93 ± 8
<i>Classe II</i>				
<b>7a</b>	1,52 ± 0,69***	78 ± 9	0,50 ± 0,13	76 ± 13**
<b>7b</b>	0,57 ± 0,01	95 ± 17	0,71 ± 0,04**	76 ± 6**
<b>7c</b>	0,49 ± 0,03	87 ± 17	0,46 ± 0,12	86 ± 3
<i>Classe III</i>				
<b>10a</b>	1,77 ± 0,46***	46 ± 10**	1,11 ± 0,17***	104 ± 12
<b>10b</b>	1,13 ± 0,59*	75 ± 8	0,60 ± 0,17*	106 ± 13

\*p < 0,05; \*\*p < 0,01; \*\*\*p < 0,001 usando ANOVA seguido do teste de Dunnet quando comparado com a cromona 6g.

Podemos verificar que em geral, todas as modificações realizadas na cromona **6g** não melhoraram e até diminuíram a inibição de ABCG2 com exceção da cromona **4a** que apresenta uma alteração do grupo metóxi da posição 5 para a posição 6 do anel indol. A cromona **4a** foi o derivado com melhor atividade inibitória da proteína ABCG2 tanto em células transfetadas quanto em células selecionadas e apresentou valores de EC<sub>50</sub> comparadas ao padrão ouro **Ko143**.

Em relação as outras modificações realizadas nas cromonas podemos verificar que a alteração do grupo *p*-bromobenziloxi da posição 5 para a posição 6 (**4f**) induziu um aumento de 3 vezes na EC<sub>50</sub> e a alteração para a posição 7 (**4i**) aumentou cerca de 13 vezes a EC<sub>50</sub> em relação a cromona mais ativa (**4a**).

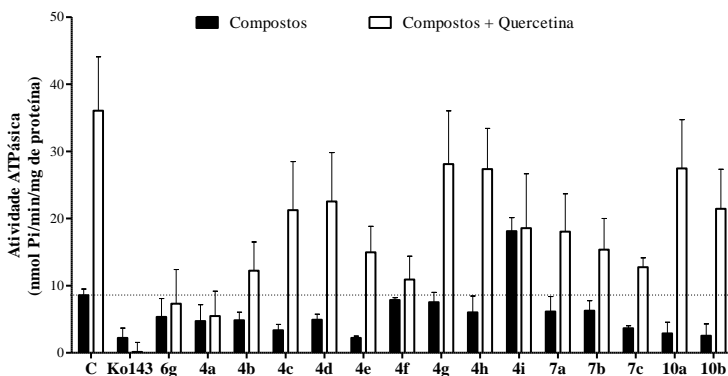
A importância do anel indólico também foi confirmada já que a substituição do mesmo por um fenil (**7a**) ou bromo-fenil (**7b**) induziu cerca de 15 e 6 vezes menor afinidade, respectivamente.



O resultados mais originais e inesperados foram referentes as modificações na ligação amida central. Uma simples N-metilação em **4e** e **4c** produziu uma diminuição da atividade em cerca de 9-11 vezes. Esta metilação somada a alteração da posição do grupo *p*-bromobenziloxi para a posição 6 produziu o efeito inibitório mais fraco como pode ser observado com os compostos **4h** e **4g** que atingiram um platô de no máximo 50% de inibição de ABCG2. Outro forte efeito negativo foi observado quando uma carga positiva foi adicionada ao nitrogênio metilado na cromona **10a** gerando uma inibição de ABCG2 de apenas 46%.

### 3.2.2. Efeito de cromonas na atividade ATPásica

O efeito dos derivados de cromona na atividade ATPásica foi avaliado em membranas de inseto (Sf9) com superexpressão da proteína ABCG2. A atividade obtida sem a presença do substrato quercetina foi considerada como atividade ATPásica “basal” e a atividade obtida após a estimulação com quercetina foi denominada atividade ATPásica “estimulada”. Os resultados obtidos com todas as cromonas estão mostrados na ausência (barras pretas) e na presença (barras brancas) de quercetina e expressos em nmol de Pi liberado por minuto e por mg de proteína (Figura 41).



**Figura 41. Efeito das cromonas na atividade ATPásica.** As membrana de inseto (10  $\mu$ g) ricas em ABCG2 (Sf9) foram incubadas com 2  $\mu$ M das cromonas isoladas ou associadas a 2  $\mu$ M de quercetina por 30 minutos. Como controle foram utilizados DMSO (barra preta) e quercetina isolada (barra branca). Os resultados estão expressos em Média  $\pm$  SD.

Similarmente ao Ko143 e a cromona **6g**, a cromona **4a**, mais potente, inibiu a atividade ATPásica basal e inibiu completamente a atividade ATPásica estimulada pela quercetina demonstrando que mesmo na presença de um substrato, esses compostos conseguem bloquear completamente a proteína ABCG2.

Um forte aumento da atividade ATPásica basal foi induzida pela cromona **4i** que apresenta como modificação o grupamento *p*-bromobenziloxi na posição 7. Esse aumento sugere que essa cromona tenha um mecanismo de ação semelhante ao de um substrato. Esta mesma cromona também diminuiu a atividade estimulada pela quercetina até o mesmo nível da sua própria atividade ATPásica sugerindo que a cromona **4i** impede a ação da quercetina.

Todas as outras cromonas não alteraram ou diminuíram levemente a atividade ATPásica basal o que sugere que as mesmas apresentam um mecanismo de ação diferente de um substrato e dos inibidores potentes como o **Ko143** e as cromonas **6g** e **4a**.

A atividade ATPásica estimulada parece sofrer influência principalmente das alterações no grupo amida central. Pode-se notar que as cromonas com menor atividade inibitória de ABCG2 (Tabela 30) e que não apresentam a ligação amida central ou sofreram alteração nesta ligação (**4c**, **4d**, **4g**, **4h**, **10a**, **10b**) não aboliram o aumento da atividade ATPásica estimulada pela quercetina. Já os compostos com a ligação amida íntegra mas com outras alterações na molécula (**4b**, **4f**, **7a**, **7b**, **7c**) induziram uma inibição intermediária da atividade ATPásica estimulada. Essa inibição parcial da atividade ATPásica estimulada pode estar relacionada ao menor efeito inibitório que esses compostos exercem sobre a proteína ABCG2 quando comparado com as cromonas **6g** e **4a**.

As principais evidências encontradas através da análise da atividade ATPásica é que a atividade basal e estimulada são influenciadas por diferentes mecanismos e envolvem diferentes conformações do transportador já que este pode ser modulado separadamente por diferentes modificações na estrutura dos inibidores. Com base na estrutura de transportadores ABC que já possuem a estrutura cristalizada e com base no mecanismo “*inward-facing*” (abertura para o meio intracelular) e “*outward-facing*” (abertura para o meio extracelular), sugerimos que os diferentes inibidores poderiam estar modulando diferentes estágios conformacionais do transportados ABCG2.

### 3.2.3. Efeito de cromonas na ligação do anticorpo anti-ABCG2 clone 5D3

A ligação do anticorpo anti-ABCG2 clone 5D3 ocorre em um epítipo externo da proteína ABCG2 e a sua ligação está diretamente relacionada a conformação da proteína e a hidrólise de ATP. Trabalhos recentes demonstraram que inibidores não-transportados de ABCG2 como o **Ko143** inibem a hidrólise de ATP e induzem 100% de ligação do anticorpo 5D3. Ao contrário, substratos transportados como prazosina e quercetina estimulam a hidrólise de ATP e induzem uma diminuição da ligação deste anticorpo. Sendo assim, a análise da ligação do anticorpo 5D3 em conjunto com as análises de hidrólise de ATP permitem caracterizar a interação dos inibidores com a proteína de resistência (OZVEGY-LACZKA et al., 2005; TELBISZ et al., 2012).

Na tabela 28 estão descritos os resultados obtidos com todas as cromonas testadas nas concentrações de 2 e 5  $\mu\text{M}$ .

**Tabela 28. Porcentagem de ligação do anticorpo anti-ABCG2 (5D3) após incubação com 2 e 5  $\mu\text{M}$  das cromonas**

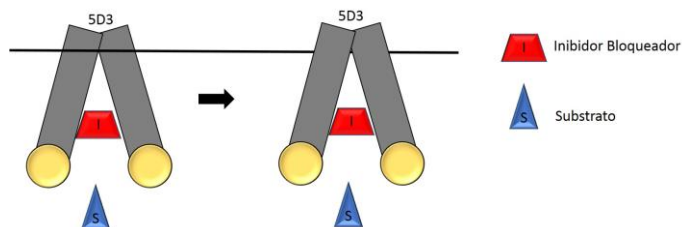
Cromonas	Ligação do 5D3 (%)	
	2 $\mu\text{M}$	5 $\mu\text{M}$
<b>Ko143</b>	100	100
<b>6g</b>	100,5 $\pm$ 1,7	103,5 $\pm$ 3,8
<b>4a</b>	96,4 $\pm$ 2,6	101,0 $\pm$ 9,6
<b>4b</b>	88,7 $\pm$ 9,6	98,0 $\pm$ 8,0
<b>4c</b>	74,6 $\pm$ 14,4**	95,9 $\pm$ 6,1
<b>4d</b>	76,4 $\pm$ 5,7*	98,9 $\pm$ 7,5
<b>4e</b>	82,8 $\pm$ 2,7	97,4 $\pm$ 5,8
<b>4f</b>	93,3 $\pm$ 2,8	99,9 $\pm$ 6,9
<b>4g</b>	47,6 $\pm$ 1,9***	79,4 $\pm$ 0,8***
<b>4h</b>	40,9 $\pm$ 6,8***	72,1 $\pm$ 3,9***
<b>4i</b>	64,6 $\pm$ 11,0***	90,1 $\pm$ 1,5
<b>7a</b>	74,3 $\pm$ 6,9**	95,4 $\pm$ 3,8
<b>7b</b>	78,7 $\pm$ 14,6*	91,8 $\pm$ 2,5
<b>7c</b>	93,1 $\pm$ 8,7	105,2 $\pm$ 3,2
<b>10a</b>	57,4 $\pm$ 6,3***	95,4 $\pm$ 3,3
<b>10b</b>	82,3 $\pm$ 10,1	102,5 $\pm$ 2,7

\*p < 0,05; \*\*p < 0,01; \*\*\*p < 0,001 usando ANOVA seguido do teste de Dunnet quando comparado com o Ko143 considerado 100%

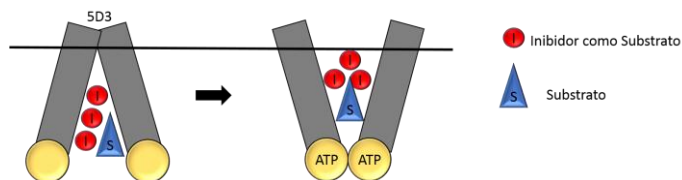
Podemos observar que as cromonas **6g** e **4a** foram as que induziram maior ligação do anticorpo (aproximadamente 100%) similar ao que ocorre com o Ko143 sugerindo que estas cromonas se ligam no mesmo sítio deste composto e não são transportadas. A cromona **4i** induziu uma baixa ligação do anticorpo (64,6%) o que em conjunto com a estimulação da hidrólise de ATP sugere que esta cromona funciona como um substrato. As cromonas **4g**, **4h** e **10a** foram os compostos que induziram menor ligação do anticorpo devido ao fraco efeito inibitório evidenciado pelos altos valores de  $EC_{50}$  de inibição (Tabela 27). As outras cromonas induziram efeitos intermediários tanto na ligação do anticorpo como na hidrólise de ATP sugerindo que essas cromonas apresentam ainda diferentes sítios de ligação.

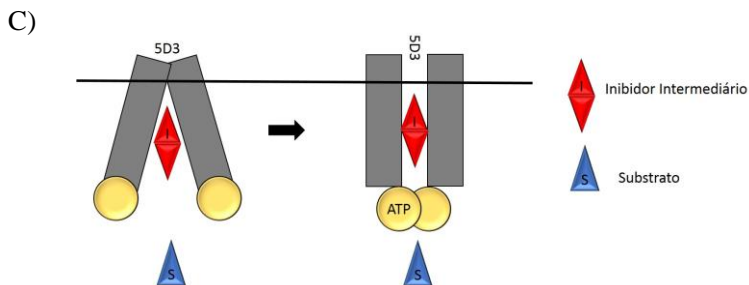
A análise em conjunto dos resultados de atividade ATPásica e ligação do anticorpo 5D3 permite concluir que as cromonas pertencem possivelmente a três diferentes grupos de inibidores de acordo com as diferentes regiões de ligação na proteína ABCG2: 1) inibidores bloqueadores da proteína como o Ko143 (Figura 42A); 2) inibidores como substratos que podem se ligar no mesmo sítio dos substratos ou em outro sítio mas induzindo a mesma conformação aberta (*outward-facing*) induzida por um substrato (Figura 42B) e 3) inibidores intermediários que se ligam em outro sítio da proteína que possivelmente permite uma ligação intermediária do anticorpo e uma hidrólise intermediária de ATP (Figura 42C).

A)



B)





**Figura 42. Mecanismo de ação dos Inibidores Bloqueadores, Inibidores como Substratos e do Inibidores Intermediários.** A avaliação da atividade inibitória de cada composto juntamente com os resultados de atividade ATPásica e ligação do anticorpo 5D3 permite elucidar três mecanismos de ação dos inibidores de ABCG2. Os inibidores podem ser classificados como bloqueadores, como substratos e intermediários segundo o seu sítio de ligação.

Entre esses três grupos, as cromonas **6g** e **4a** estariam entre os inibidores bloqueadores como o Ko143 pois inibem completamente a hidrólise de ATP e permitem uma ligação de 100% do anticorpo 5D3. Estes efeitos são resultados da conformação da proteína (inward-facing) que fica fechada para o meio extracelular impedindo o transporte de substratos. Estes inibidores podem ser considerados ideais pois causam um bloqueio total do transportador.

A cromona **4i** foi o único composto que induziu aumento na hidrólise de ATP e diminuição da ligação do anticorpo 5D3 sugerindo que o mesmo permite a conformação da proteína aberta para o meio extracelular (*outward-facing*).

Todas as outras cromonas testadas estão incluídas no terceiro grupo de inibidores que induzem efeitos intermediários tanto em relação a hidrólise de ATP como em relação a ligação do anticorpo 5D3. Estas cromonas possivelmente se ligam em sítio diferentes da proteína e induzem uma conformação diferente daquela observada nos inibidores bloqueadores (inward-facing) e nos inibidores como substratos (*outward-facing*).

Após a análise dos 14 compostos derivados da cromona **6g** e a determinação de que a cromona **4a** foi a que apresentou melhor atividade e bloqueou completamente a proteína ABCG2, comparou-se o efeito das cromonas **6g** e **4a** em linhagens tumorais resistentes a mitoxantrona.

### 3.2.4. Efeito das cromonas 6g e 4a em linhagens tumorais resistentes a mitoxantrona

Afim de verificar se a cromona **4a** possui alguma vantagem ou desvantagem em relação a cromona **6g**, testou-se o efeito de ambas em três linhagens tumorais que foram selecionadas com concentrações crescentes de mitoxantrona assim como a linhagem H460 testada anteriormente. Ao contrário da linhagem HEK293/*ABCG2* que apresenta somente a expressão da proteína *ABCG2*, as linhagens tumorais selecionadas com mitoxantrona podem expressar outras proteínas de resistência tornando essas linhagens modelos mais próximos ao que acontece com pacientes em tratamento quimioterápico.

Na tabela 29 estão descritos os valores de  $EC_{50}$  de inibição das cromonas **6g** e **4a** em todas as linhagens. Podemos verificar que as cromonas apresentaram praticamente o mesmo efeito nas linhagens resistentes de tumor de pâncreas (PANC-1) e de pulmão (H23). A cromona **4a** apresentou um efeito melhor que a cromona **6g** na linhagem de glioma (SF295) induzindo uma  $EC_{50}$  cerca de 2 vezes menor.

**Tabela 29. Efeito das cromonas 6g e 4a sobre a inibição da proteína ABCG2 em células tumorais resistentes.**

	Cromonas	
	6g	4a
	$EC_{50}$ ( $\mu$ M)	$EC_{50}$ ( $\mu$ M)
PANC-1	$0,315 \pm 0,006$	$0,334 \pm 0,068$
SF295	$0,978 \pm 0,208$	$0,574 \pm 0,053$
H23	$0,134 \pm 0,032$	$0,148 \pm 0,066$

### 3.2.5. Efeito de cromonas como inibidores da proteína P-gp e MRP1

Entre as características de um bom inibidor dos transportadores ABC a seletividade para apenas um transportador é uma vantagem pois permite uma melhor caracterização do transporte. Além disso, até hoje

nenhum inibidor de dois transportadores apresentou alta efetividade (SCHMIDT et al., 2013).

Afim de avaliar se as cromonas apresentavam seletividade para a proteína ABCG2, testou-se o efeito dos melhores compostos da classe I, na concentração de 1 e 5  $\mu\text{M}$ , em uma linhagem transfectada com o gene *MDR1* (NIH-3T3/*MDR1*) utilizando rodamina como substrato e uma linhagem transfectada com o gene *MRP1* (HEK293/*MRP1*) utilizando calcéina como substrato. Os resultados estão expressos em porcentagem de inibição em cada concentração utilizada (Tabela 30).

Os resultados obtidos demonstram que as cromonas são seletivas para a proteína ABCG2 pois não inibiram as proteínas MRP1 e P-gp.

**Tabela 30. Efeito das cromonas sobre a inibição das proteínas MRP1 e MDR1 em células tumorais resistentes.**

Cromona	[ $\mu\text{M}$ ]	HEK293- <i>MRP1</i>	NIH-3T3- <i>MDR1</i>
		Inhibition (%)	Inhibition (%)
6g	1	1,94 $\pm$ 2,0	-0,04 $\pm$ 0,05
	5	5,27 $\pm$ 1,5	1,62 $\pm$ 0,87
4a	1	0,04 $\pm$ 1,8	-1,42 $\pm$ 0,31
	5	4,95 $\pm$ 0,21	-0,06 $\pm$ 0,15
4b	1	1,13 $\pm$ 0,94	-0,38 $\pm$ 0,05
	5	1,72 $\pm$ 2,00	2,97 $\pm$ 0,55
4c	1	-0,8 $\pm$ 1,52	1,51 $\pm$ 0,99
	5	4,41 $\pm$ 0,56	3,43 $\pm$ 0,95
4d	1	2,75 $\pm$ 0,61	0,98 $\pm$ 0,89
	5	5,48 $\pm$ 2,88	2,05 $\pm$ 1,03
4e	1	1,96 $\pm$ 0,51	0,83 $\pm$ 1,18
	5	8,33 $\pm$ 0,51	2,71 $\pm$ 0,46
4f	1	-1,0 $\pm$ 3,43	-0,7 $\pm$ 0,21
	5	-4,19 $\pm$ 3,67	0,07 $\pm$ 0,42

### 3.2.6. Citotoxicidade das cromonas

Um dos grandes problemas com a utilização dos inibidores dos transportadores ABC é a toxicidade intrínseca que os mesmos apresentam. Desta forma, a citotoxicidade das cromonas foi avaliada em células de fibroblasto HEK293/*pcDNA3.1*. Na Tabela 31 estão descritos os valores de  $CC_{50}$  para cada uma das cromonas estudadas e o valor do índice terapêutico (IT) que é calculado dividindo-se a  $CC_{50}$  pela  $EC_{50}$  de inibição de cada cromona. O índice terapêutico permite realizar uma comparação entre a concentração tóxica e a concentração efetiva de cada substância.

**Tabela 31. Citotoxicidade e Índice Terapêutico (IT) das cromonas em células HEK293/*pcDNA3.1***

Cromonas	$CC_{50}$ ( $\mu$ M)	IT
<b>6g</b>	16	127
<b>4a</b>	21	203
<b>4b</b>	18	60
<b>4c</b>	20	18
<b>4d</b>	>100	>100
<b>4e</b>	21	22
<b>4f</b>	5	18
<b>4g</b>	33	13
<b>4h</b>	>100	>49
<b>4i</b>	16	13
<b>7a</b>	10	6
<b>7b</b>	1	1
<b>7c</b>	5	10
<b>10a</b>	>100	>56
<b>10b</b>	>100	>88

Podemos notar que a ligação amida central é um fator importante em relação a toxicidade das cromonas. As cromonas que não apresentam a ligação amida central (**10a** e **10b**) e as cromonas que apresentam uma metilação da amida central (**4d** e **4h**) não induziram toxicidade das células HEK293 normais. As cromonas **4c**, **4e** e **4g** também não apresentam a ligação amida central no entanto apresentam uma amina secundária em vez de uma amina terciária no anel indólico. A amina secundária parece ser mais tóxica que a amida terciária como pode ser observado quando compara-se a citotoxicidade das cromonas **4g** com **4h** e **4d** com **4e**.

Apesar da baixa toxicidade das cromonas **4d**, **4h**, **10a** e **10b**, esses compostos foram os menos ativos na inibição da proteína ABCG2



diminuindo a potencialidade de utilização destas moléculas como inibidores de bombas de efluxo.

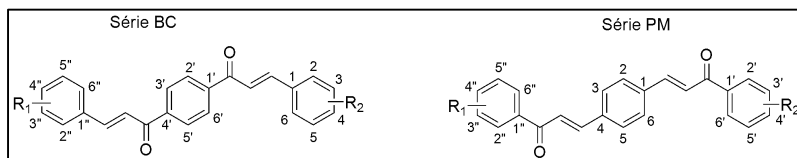
As cromonas contendo o grupo triazol (**7a**, **7b** e **7c**) foram as mais tóxicas e com menor atividade inibitória de ABCG2 como pode ser visto pelo seu baixo índice terapêutico. Esses resultados indicam que esse grupamento triazol não se apresenta como um bom substituinte para as cromonas.

As cromonas **6g** e **4a** apesar de induzirem uma toxicidade mediana apresentam valores de  $EC_{50}$  de inibição muito baixos e portanto um índice terapêutico elevado (127 e 203 respectivamente). Por serem compostos seletivos para a proteína ABCG2 (Tabela 30) e por apresentarem um alto IT estas cromonas podem ser consideradas potenciais inibidores para testes *in vivo* e posteriormente para a utilização na clínica.

### 3.3. Bis-chalconas

#### 3.3.1. Efeito de bis-chalconas como inibidores da proteína ABCG2

Continuando a avaliação de novos possíveis inibidores da proteína de resistência ABCG2, testou-se a atividade de bis-chalconas inéditas que apresentam basicamente duas estruturas básicas em função da posição da carbonila ao lado do anel aromático central (série BC) ou separado do anel aromático por uma dupla ligação (série PM) (Figura 43).

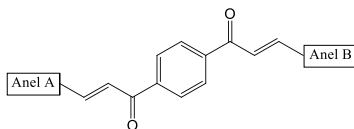


**Figura 43. Estrutura das bis-chalconas da série PM e BC.**

Testou-se a atividade de 16 bis-chalconas pertencentes a série PM e 17 bis-chalconas pertencentes a série BC. Inicialmente realizou-se um *screening* em que avaliou-se a atividade inibitória de ABCG2 com 5  $\mu$ M de cada composto. Para os compostos que induziram uma inibição maior que 60% calculou-se o valor de  $EC_{50}$  de inibição. Na tabela 32 estão descritos os resultados de inibição de ABCG2 obtidos com cada uma das bis-chalconas.

**Tabela 32. Efeito das bis-chalconas da série PM e BC na inibição de ABCG2**

Chalcona	AnelA=B	Inibição a 5µM (%)	Inibição EC <sub>50</sub> (µM)	Chalcona	AnelA=B	Inibição a 5µM (%)	Inibição EC <sub>50</sub> (µM)
PM1		27 ± 4		PM9		92 ± 7	0,5 ± 0,3
PM2		58 ± 6	1,1 ± 0,1	PM10		23 ± 3	
PM3		84 ± 26	2,3 ± 0,2	PM11		25 ± 3	
PM4		103 ± 1	0,8 ± 0,3	PM12		94 ± 13	1,1 ± 0,1
PM5		104 ± 4	0,9 ± 0,1	PM13		41 ± 5	
PM6		19 ± 1		PM14		-2 ± 1	
PM7		97 ± 6	1,3 ± 0,2	PM15		79 ± 4	1,8 ± 0,4
PM8		45 ± 2		PM16		28 ± 7	



Chalcona	Anel A=B	Inibição a 5μM (%)	Inibição EC <sub>50</sub> (μM)	Chalcona	AnelA=B	Inibição a 5μM (%)	Inibição EC <sub>50</sub> (μM)
BC1		18 ± 5		BC14		2 ± 2	
BC2		43 ± 17		BC15		100 ± 15	0,4 ± 0,02
BC4		64 ± 11	2,1 ± 0,4	BC16		-2 ± 3	
BC6		11 ± 2		BC17		18 ± 2	
BC7		90 ± 6	0,7 ± 0,02	BC18		34 ± 1	
BC8		7 ± 6		BC19		17 ± 7	
BC10		13 ± 1		BC20		117 ± 1	0,1 ± 0,01
BC11		13 ± 1		BC21		96 ± 11	1,4 ± 0,6
BC13		98 ± 4	0,3 ± 0,07				

Através da análise dos resultados esboçados na tabela 32, podemos confirmar a importância das metoxilas para a atividade inibitória de ABCG2. Assim como nos resultados obtidos com as chalconas, as bis-chalconas que apresentaram pelo menos uma metoxila foram as mais ativas.

A posição das metoxilas também pode interferir na atividade inibitória das bis-chalconas. Podemos observar que metoxilas nas posições 2 e 5 (**PM7**, **PM12** e respectivas BC), tanto do anel A como do anel B, exercem uma ação positiva enquanto metoxilas na posição 4 (**PM1** e respectiva BC) exercem uma ação negativa sobre a inibição da proteína ABCG2.

Além da relação das metoxilas na atividade destes compostos, a posição da carbonila parece também ser importante, já que na série BC, na qual a carbonila está ao lado do anel aromático central, os valores de  $EC_{50}$  são menores que os valores da série PM (**BC7**<**PM7**; **BC13**<**PM13**; **BC15**<**PM15**). A única exceção foi o composto **BC7** que apresentou uma  $EC_{50}$  maior que o composto **PM7**. Confirmando a maior atividade da série BC, a bis-chalcona **BC20** foi o composto que apresentou melhor atividade com uma  $EC_{50}$  de 0,1  $\mu\text{M}$  equivalente ao inibidor padrão (Ko143).

Afim de continuar os testes para caracterizar a atividade das bis-chalconas, selecionou-se o composto mais ativo em cada uma das séries, ou seja, as bis-chalconas **PM9** e **BC20**.

### 3.3.2. Citotoxicidade das bis-chalconas **BC20** e **PM9** em células normais

Afim de avaliar a citotoxicidade dos compostos **BC20** e **PM9**, utilizou-se células HEK293 normais e calculou-se os respectivos valores de  $CC_{50}$  e índice terapêutico (IT) (Tabela 33).

**Tabela 33. Valores de  $CC_{50}$  de citotoxicidade e índice terapêutico (IT) induzidos pelas bis-chalconas **BC20** e **PM9****

<b>BC20</b>		<b>PM9</b>	
<b>CC<sub>50</sub> (<math>\mu\text{M}</math>)</b>	<b>IT</b>	<b>CC<sub>50</sub> (<math>\mu\text{M}</math>)</b>	<b>IT</b>
1,2	12	2,5	5

Apesar de apresentarem uma alta toxicidade, estes compostos apresentam ainda um índice terapêutico maior que 1. Na concentração equivalente a  $EC_{50}$  de inibição (0,1  $\mu\text{M}$  para **BC20** e 0,5 $\mu\text{M}$  para **PM9**) esses compostos não induzem nenhuma toxicidade em células normais.

### 3.3.3. Efeito das bis-chalconas na sensibilização de células HEK293 resistentes a mitoxantrona

Afim de avaliar se as bis-chalconas poderiam sensibilizar células HEK293 transfectadas com o gene *ABCG2* e portanto resistentes a mitoxantrona realizou-se testes de citotoxicidade (MTT) e avaliou-se a  $CC_{50}$  da mitoxantrona (MX) isolada e após associação com cada uma das bis-chalconas (Tabela 34).

**Tabela 34. Citotoxicidade da mitoxantrona isolada e associada as bis-chalconas BC20 e PM9 em células HEK293/ABCG2**

	$CC_{50}$ ( $\mu\text{M}$ )
<b>MX</b>	25
<b>MX + BC20 (0,1<math>\mu\text{M}</math>)</b>	7
<b>MX + PM9 (0,5<math>\mu\text{M}</math>)</b>	8

A mitoxantrona (MX) isolada apresenta uma  $CC_{50}$  de 10  $\mu\text{M}$  em células HEK293 normais e uma  $CC_{50}$  2,5 vezes maior em células HEK293/ABCG2 (25 $\mu\text{M}$ ). As bis-chalconas BC20 e PM9 conseguiram diminuir a  $CC_{50}$  da MX em células HEK293/ABCG2 para valores semelhantes a  $CC_{50}$  da mesma em células não resistentes. Esses resultados demonstram que esses compostos possuem a capacidade de resensibilizar células ABCG2 ao mesmo nível de células não resistentes.

### 3.3.4. Efeito das bis-chalconas BC20 e PM9 em linhagens tumorais resistente a mitoxantrona

Afim de complementar os resultados de inibição de ABCG2, avaliou-se a atividade inibitória dos compostos **BC20** e **PM9** em células tumorais selecionadas com mitoxantrona.

Na tabela 35 estão descritos os valores de  $EC_{50}$  das duas bis-chalconas nas linhagens de câncer de pulmão H23 e H460 e de câncer de pâncreas PANC-1. Podemos observar que a bis-chalcona **BC20** apresentou melhor atividade que a bis-chalcona **PM9** também nas linhagens H460 e H23. Além disso podemos sugerir que estes compostos possuem potencial para utilização na clínica já que apresentaram uma ótima capacidade de inibir a proteína ABCG2 nas linhagens tumorais resistentes.

**Tabela 35. Efeito das bis-chalconas BC20 e PM9 sobre a inibição da proteína ABCG2 em células tumorais resistentes.**

	Bis-chalconas	
	BC20	PM9
	$EC_{50}$ ( $\mu$ M)	$EC_{50}$ ( $\mu$ M)
<b>PANC-1</b>	0,21 $\pm$ 0,177	0,20 $\pm$ 0,182
<b>H460</b>	0,08 $\pm$ 0,005	1,63 $\pm$ 0,079
<b>H23</b>	0,22 $\pm$ 0,113	1,17 $\pm$ 0,712

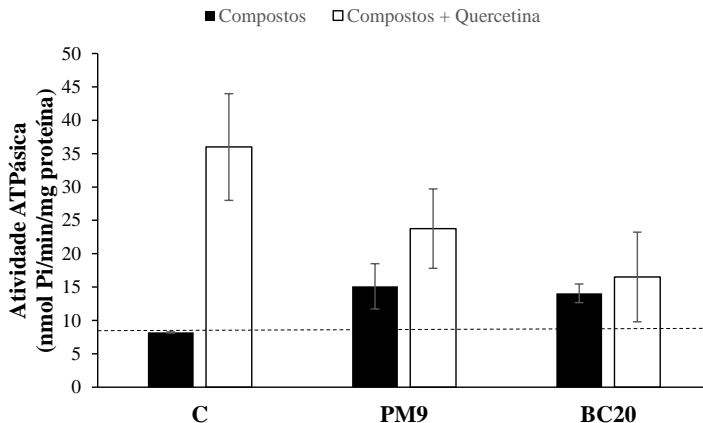
### 3.3.5. Efeito das bis-chalconas BC20 e PM9 na atividade ATPásica

O efeito das bis-chalconas **BC20** e **PM9** na atividade ATPásica foi avaliado em membranas de inseto (Sf9) com superexpressão da proteína ABCG2. Assim como nos testes com as cromonas, a atividade ATPásica obtida sem a presença do substrato quercetina foi considerada “basal” e a atividade obtida após a estimulação com quercetina foi denominada “estimulada”. Os resultados obtidos com todas as cromonas estão demonstrados na ausência (barras pretas) e na presença (barras brancas) de quercetina e expressos em porcentagem (Figura 44).

As bis-chalconas **PM9** e **BC20** induziram um aumento da atividade ATPásica basal sugerindo que esses compostos possuem um mecanismo de ação semelhante aos substratos desta proteína.

A bis-chalcona **BC20** conseguiu diminuir a atividade ATPásica estimulada pela quercetina ao nível da sua atividade ATPásica basal. A bis-chalcona **PM9** também induziu uma diminuição da atividade ATPásica

estimulada mas em menor grau que a **BC20**. Estes dados sugerem que esses compostos estariam competindo ou se ligando no mesmo sítio do substrato e em vez de haver um efeito somatório da quercetina e da bis-chalcona, esta última parece estar exercendo um efeito preferencial sobre a proteína ABCG2.



**Figura 44. Efeito das bis-chalconas na atividade ATPásica.** 10 $\mu$ g de membrana de inseto ricas em ABCG2 (Sf9) foram incubadas com 2 $\mu$ M das bis-chalconas isoladas ou associadas a 2 $\mu$ M de quercetina por 30 minutos. Como controle foram utilizados DMSO (barra preta) e quercetina isolada (barra branca). Os resultados estão expressos em Média  $\pm$  SD.

### 3.3.6. Efeito das bis-chalconas BC20 e PM9 na ligação do anticorpo anti-ABCG2 clone 5D3

Afim de sugerir um mecanismo de ação destes compostos, avaliou-se a ligação do anticorpo 5D3 nas células HEK293/ABCG2 após tratamento com os respectivos compostos. Na tabela 38 estão descritas as porcentagens de ligação do anticorpo 5D3 após incubação das células com 2 $\mu$ M de cada compostos (Tabela 39).

**Tabela 36. Porcentagem de ligação do anticorpo anti-ABCG2 (5D3) após incubação com 2 $\mu$ M de BC20 e PM9**

	Ligação do 5D3 (%)
<b>BC20</b>	86
<b>PM9</b>	79

Podemos observar que as bischalconas induziram uma diminuição da ligação do anticorpo 5D3. Estes dados em conjunto com a avaliação da atividade ATPásica sugerem que assim como a cromona **4i** esses 2 compostos podem ser considerados “inibidores como substratos” da proteína ABCG2.

### **3.3.7. Efeito da bis-chalcona BC20 em associação com a cromona 6g**

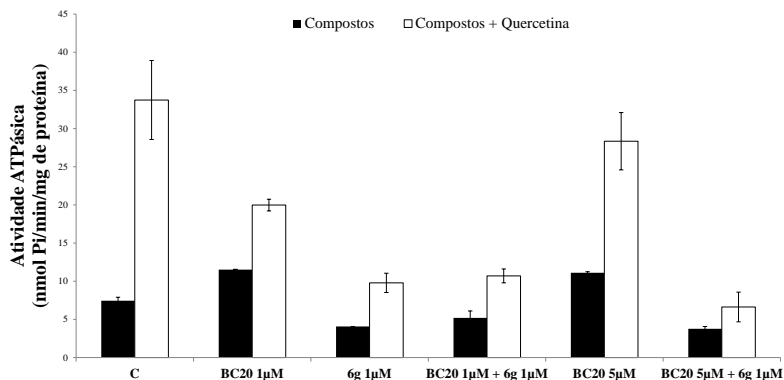
Afim de avaliar o efeito da co-incubação de um “transportador bloqueador” e de um “inibidor como substrato”, associou-se a cromona **6g** com a bis-chalcona **BC20**.

Inicialmente realizou-se uma curva de concentração de **BC20** e associou-se uma concentração fixa da cromona **6g** (0,1 $\mu$ M). Calculou-se a EC<sub>50</sub> de inibição da bis-chalcona isolada e associada a cromona. A co-incubação com a cromona induziu uma diminuição de 15 vezes a EC<sub>50</sub> da bis-chalcona, ou seja, a cromona potencializou o efeito da bis-chalcona. Realizou-se também um teste onde variou-se a concentração da cromona **6g** e adicionou-se uma concentração fixa de **BC20** (0,1 $\mu$ M). A adição de **BC20** diminuiu 3 vezes o valor de EC<sub>50</sub> da cromona **6g**. Estes resultados demonstram que a cromona **6g** exerce um efeito maior sobre a bis-chalcona **BC20** do que a bis-chalcona exerce sobre a cromona.

Afim de melhor caracterizar o efeito de ambos os compostos juntos, avaliou-se a atividade ATPásica dos compostos isolados e associados. Podemos observar na figura 45 que a associação de 1 $\mu$ M dos dois compostos resultou em uma diminuição da atividade ATPásica semelhante a atividade da cromona **6g** isolada. Aumentou-se então a concentração de **BC20** para 5 $\mu$ M e manteve-se a concentração de 1 $\mu$ M da cromona **6g**. Novamente o efeito inibitório da atividade ATPásica



semelhante ao da cromona foi observado. Estes resultados confirmam que o efeito bloqueador de ABCG2 induzido pela cromona **6g** prevalece sobre o efeito indutor da atividade ATPásica induzido pela **BC20**.



**Figura 45. Efeito sobre a atividade ATPásica de BC20 associada a cromona 6g.** 10µg de membrana de inseto ricas em ABCG2 (Sf9) foram incubadas com 1 e 5µM das bis-chalconas isoladas ou associadas a 1 µM de cromona 6g por 30 minutos. As barras pretas correspondem à atividade ATPásica basal e as barras brancas à atividade ATPásica estimulada por quercetina. Os resultados estão expressos em Média ± SD.

#### 4. CONCLUSÕES

Os resultados obtidos após a análise das três classes de compostos estudados, como possíveis inibidores da proteína de resistência ABCG2, permite concluir que a cromona **4a** foi o melhor derivado sintetizado pois apresentou uma EC<sub>50</sub> de inibição semelhante ao inibidor padrão Ko143, induziu o bloqueio completo da proteína ABCG2 e um alto índice terapêutico.

A bis-chalcona **BC20** também apresentou uma ótima atividade inibitória de ABCG2 no entanto, apresentou maior toxicidade e o seu mecanismo de ação indica que este composto induz a mesma conformação da proteína induzida por um substrato não sendo portanto melhor que a cromona **4a**.

#### 5. PERSPECTIVAS

- Realizar estudos de 3DQSAR com as chalconas e as bis-chalconas para avaliar qual a interferência da presença e da posição das metoxilas.
- Realizar estudos *in vivo* com a cromona 4a para avaliar seu efeito em modelo murino de câncer super-resistente.

# ANEXO A -Artigo publicado na “Drug Design, Development And Therapy” como co-primeira autora.

Drug Design, Development and Therapy

Dovepress

open access to scientific and medical research

Open Access Full Text Article

ORIGINAL RESEARCH

## New structure–activity relationships of chalcone inhibitors of breast cancer resistance protein: polyspecificity toward inhibition and critical substitutions against cytotoxicity

This article was published in the following Dove Press journal:

Drug Design, Development and Therapy

27 September 2013

Number of times this article has been viewed

Luciana Pereira Range<sup>1,2,\*</sup>  
Evelyn Winter<sup>1,3,\*</sup>  
Charlotte Gauthier<sup>1</sup>  
Raphaël Terreur<sup>4</sup>  
Louise D Chiaradia-Delatorre<sup>5</sup>  
Alessandra Mascarello<sup>5</sup>  
Ricardo J Nunes<sup>5</sup>  
Rosendo A Yunes<sup>5</sup>  
Tania B Creczynski-Pasa<sup>3</sup>  
Sira Macalou<sup>1</sup>  
Doriane Lorendeau<sup>1</sup>  
Hélène Baubichon-Cortay<sup>1</sup>  
Antonio Ferreira-Pereira<sup>2</sup>  
Attilio Di Pietro<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Equipe Labellisée Ligue 2013, BMSSI UMR 5086 CNRS/Université Lyon 1, Institut de Biologie et Chimie des Protéines, Lyon, France; <sup>2</sup>Department of General Microbiology, Institute of Microbiology, Federal University of Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, Brazil; <sup>3</sup>Department of Pharmaceutical Sciences, PPGFAR, Federal University of Santa Catarina, Florianópolis, Santa Catarina, Brazil; <sup>4</sup>Equipe BISI, BMSSI UMR 5086 CNRS/Université Lyon 1, Institut de Biologie et Chimie des Protéines, Lyon, France; <sup>5</sup>Department of Chemistry, Federal University of Santa Catarina, Florianópolis, Santa Catarina, Brazil

\*These authors contributed equally to this work.

Correspondence: Attilio Di Pietro  
Equipe Labellisée Ligue 2013, BMSSI UMR 5086 CNRS/Université Lyon 1, Institut de Biologie et Chimie des Protéines, 7 Passage du Vercors, 69347 Lyon cedex 07, France  
Tel +33 4 7272 2629  
Fax +33 4 7272 2604  
Email a.dipietro@ibcp.fr

**Abstract:** Adenosine triphosphate-binding cassette subfamily G member 2 (ABCG2) plays a major role in cancer cell multidrug resistance, which contributes to low efficacy of chemotherapy. Chalcones were recently found to be potent and specific inhibitors, but unfortunately display a significant cytotoxicity. A cellular screening against ABCG2-mediated mitoxantrone efflux was performed here by flow cytometry on 54 chalcone derivatives from three different series with a wide panel of substituents. The identified leads, with submicromolar IC<sub>50</sub> (half maximal inhibitory concentration) values, showed that the previously identified 2'-OH-4',6'-dimethoxyphenyl, as A-ring, could be efficiently replaced by a 2'-naphthyl group, or a 3',4'-methylenedioxyphenyl with lower affinity. Such a structural variability indicates polyspecificity of the multidrug transporter for inhibitors. At least two methoxyl groups were necessary on B-ring for optimal inhibition, but substitution at positions 3, 4, and 5 induced cytotoxicity. The presence of a large *O*-benzyl substituent at position 4 and a 2'-naphthyl as A-ring markedly decreased the cytotoxicity, giving a high therapeutic ratio, which constitutes a critical requirement for future in-vivo assays in animal models.

**Keywords:** ABC transporters, BCRP/ABCG2, cancer chemotherapy, drug transport, inhibitory chalcone derivatives, multidrug resistance transporters.

### Introduction

Cancer cells display a strong ability to acquire resistance to antitumor drugs, termed multidrug resistance (MDR), which constitutes a critical hurdle to cancer therapy. While several mechanisms can induce cellular resistance to chemotherapeutics, the energy-dependent drug efflux, mediated by adenosine triphosphate-binding cassette (ABC) transporters, is recognized to play a major role. Overexpression of multidrug ABC transporters in tumors alters anticancer drug efficacy by significantly reducing their intracellular accumulation. ABC subfamily G member 2 (ABCG2), also called ABCP for its abundance in placenta,<sup>1</sup> BCRP (breast cancer resistance protein),<sup>2</sup> or MXR (mitoxantrone resistance protein),<sup>3</sup> was the most recently discovered of the three main multidrug ABC transporters overexpressed in cancer cells, after ABC subfamily C member 1 (ABCC1)/MDR protein 1 (MRP1)<sup>4</sup> and ABCB1/MDR1/P-glycoprotein.<sup>5</sup> ABCG2 was shown to confer resistance to a wide variety of anticancer agents,<sup>6</sup> revealing a characteristic polyspecificity toward transport drug substrates. Its clinical relevance was demonstrated in both adult and childhood acute myeloid leukemia,<sup>6,7</sup> and it was clearly involved in drug bioavailability at various protection barriers.<sup>8,9</sup> Overcoming MDR

submit your manuscript | www.dovepress.com

Dovepress

https://doi.org/10.3171/DDDT.44983

Drug Design, Development and Therapy 2013:7 1043–1052



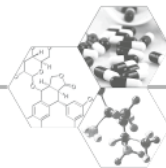
© 2013 Range et al. This work is published by Dove Medical Press Ltd, and licensed under Creative Commons Attribution – Non Commercial (unported, v3.0) license. The full terms of the license are available at <http://creativecommons.org/licenses/by-nc/3.0/>. Non-commercial use of the work is permitted without any further permission from Dove Medical Press Limited, provided the work is properly attributed. Permissions beyond the scope of the license are administered by Dove Medical Press Limited. Information on how to request permission may be found at <http://www.dovepress.com/permissions.php>

1043

## ANEXO B - Revisão publicada na “Future Medicinal Chemistry” como co-autora.

### REVIEW

### SPECIAL FOCUS: COMBATING RESISTANCE: ONCOLOGY



## ABCG2: recent discovery of potent and highly selective inhibitors

ABCG2 impacts oral availability, tissue distribution and excretion of its substrates, including anticancer and anti-infectious drugs. Highly expressed at physiological barriers, its secretion level significantly controls drug distribution. Furthermore, its increased content into many types of cancer may lead to cell chemoresistance. Owing to the clinical relevance of ABCG2 in the multidrug resistance phenomenon, ABCG2 constitutes an appealing therapeutic target to increase drug distribution. Development of ABCG2 inhibitors can be used in combination with anticancer drugs to block the drug secretion from cancer cells. Very recently, an alternative use of ABCG2 inhibitors in enhancing the bioavailability of ABCG2 substrates has emerged. Hence, it is important to investigate ABCG2 inhibitors with high selectivity, high potency and safety. New inhibitors discovered during the last 5 years will be presented and discussed.

ABCG2 encodes the integral membrane protein breast cancer resistance protein (ABCG2) that recognizes and secretes a wide range of structurally unrelated compounds. ABCG2 is composed of 655 amino acids, with a molecular mass of 72.1 kDa, ranking it among the smallest human ABC proteins so far reported. Another significant point distinguishing ABCG2 from the main known transporters is that it is a half-transporter containing only one ATP-binding site and six transmembrane spans. The ABCG2 protein is strongly expressed at different membrane barriers such as in brain, placenta, kidney, small intestine, liver, ovary and colon normal tissues, leading to important physiological protection and secretion functions [1-4]. ABCG2 is localized at the apical membrane of polarized cells, such as intestinal and blood-brain barriers, where it plays a physiological role by limiting drug accumulation into the CNS [5,4]. ABCG2, in mice, strongly mediates the biliary excretion of sulfate and glucuronide conjugates [7]. Contribution to drug distribution was clearly demonstrated using *Abcg2*<sup>-/-</sup> knockout mice. Biliary and renal excretion of ABCG2 substrate drugs in *Abcg2*<sup>-/-</sup> mice is significantly reduced, whereas the plasma concentrations of these drugs are increased, by comparison with those in wild-type mice. Recently, imatinib distribution has been studied by comparing plasma and brain concentrations following intravenous administration of radiolabeled drug to wild-type *Abcb1*<sup>+/+</sup> and *Abcg2*<sup>-/-</sup> mice. A role of these ABC proteins in limiting brain exposure has been clearly demonstrated [8]. As with the well-known role of ABCB1 in

conferring resistance to tumor cells, ABCG2 was found to behave similarly with a panel of clinically relevant drugs, including the anticancer agents topotecan, SN-38, mitoxantrone, doxorubicin, methotrexate, gefitinib and imatinib [6,9-10]. Taken together, it appears of great interest to identify *in vivo* potent and specific inhibitors of ABCG2 that could be used to alter the pharmacokinetics of drugs and/or improve response to therapy using anticancer ABCG2 substrates. For example, failure of leukemia treatments by anticancer agents has been clearly correlated to ABCG2 expression [9]. In addition to its involvement in multidrug resistance (MDR) to anticancer drugs, ABCG2 was also recognized to catalyze the secretion of antiviral drugs, including zidovudine and lamivudine [20-24].

Since its discovery, significant efforts were made to conceive inhibitors of this protein for future *in vivo* clinical use as MDR modulators. According to *in vitro* assays, many molecules have been found to reverse ABCG2-mediated secretion and drug resistance, including fumitremogin C from *Aspergillus fumigatus*, the P-gp inhibitor GF120918, estrone and 17 $\beta$ -estradiol, the coumestrol antibiotic novobiocin, genistein and so on. Nevertheless, few of them had been assayed in *in vivo* models and no clinical studies have been conducted so far, probably due to high intrinsic toxicity of these compounds. However, P-gp inhibitors have been studied in clinical trials for over 10 years with disappointing results [25]. In this regard, tariquidar (XR9576), a characteristic inhibitor of P-gp was found to induce marginal effect on restoring sensitivity

Florine Lecerf-Schmid<sup>1</sup>,  
Basile Peres<sup>1</sup>, Glauco  
Valdameri<sup>2,3</sup>, Charlotte  
Gauthier<sup>1</sup>, Evelyn Winter<sup>2</sup>,  
Léa Payen<sup>4,5,6</sup>, Attilio  
Di Pietro<sup>7</sup> & Ahcène  
Boumendjel<sup>8</sup>

<sup>1</sup>Université Joseph Fourier, Grenoble 1, CNRS UMR 5083, Département de Pharmacoclinique Moléculaire, Grenoble, France  
<sup>2</sup>Equipe Labellisée Ligue 2013, BMSS UMR 5086 CNRS/Université Lyon 1, IBCF, Lyon, France

<sup>3</sup>Department of Biochemistry & Molecular Biology, Federal University of Paraná, Curitiba, PR, Brazil

<sup>4</sup>Université de Lyon, Lyon 1, ISPB, Lyon, France

<sup>5</sup>INSERM U1052, Centre de Recherche en Cancérologie de Lyon, F-69000 & Centre Léon Bérard, FNCLCC, Lyon, France

<sup>6</sup>Hospices Civils de Lyon, Biochemistry laboratory of Lyon Sud (CBS), Lyon, France

<sup>7</sup>Author for correspondence: Tel.: +33 4 76 63 53 11

E-mail: ahcene.boumendjel@ujf-grenoble.fr

FUTURE  
SCIENCE part of  
fsg

## ANEXO C – Artigo publicado na revista Journal of Medicinal Chemistry.

## Structure–Activity Relationships of Chromone Derivatives toward the Mechanism of Interaction with and Inhibition of Breast Cancer Resistance Protein ABCG2

Evelyn Winter,<sup>†,‡,∇</sup> Florine Lecerf-Schmidt,<sup>§,∇</sup> Gustavo Gozzi,<sup>†,¶</sup> Basile Peres,<sup>§</sup> Mark Lightbody,<sup>§</sup> Charlotte Gauthier,<sup>†</sup> Csilla Ozvegy-Laczka,<sup>‡</sup> Gergely Szakacs,<sup>‡</sup> Balazs Sarkadi,<sup>¶</sup> Tânia B. Creczynski-Pasa,<sup>‡</sup> Ahcène Boumendjel,<sup>§,○</sup> and Attilio Di Pietro<sup>\*,†,□</sup>

<sup>†</sup>Equipe Labellisée Ligue 2013, BMSSI UMR 5086 CNRS/Université Lyon 1, IBCP, 69367 Lyon, France

<sup>‡</sup>Department of Pharmaceutical Sciences, PGFAR, Federal University of Santa Catarina, Florianopolis, Santa Catarina, Brazil

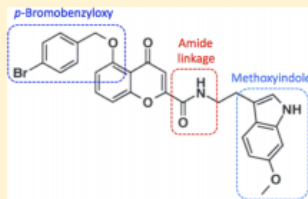
<sup>§</sup>Département de Pharmacochimie Moléculaire, UMR5063 CNRS-Université Joseph Fourier de Grenoble I, Grenoble, France

<sup>¶</sup>Department of Biochemistry and Molecular Biology, Federal University of Paraná, Curitiba, Paraná, Brazil

<sup>□</sup>Institute of Enzymology, Center for Natural Sciences, Hungarian Academy of Sciences, Budapest, Hungary

<sup>○</sup>Molecular Biophysics Research Group, Hungarian Academy of Sciences, Semmelweis University, Budapest, Hungary

**ABSTRACT:** We recently identified a chromone derivative, 5-(4-bromobenzoyloxy)-2-(2-(5-methoxyindolyl)ethyl-1-carbonyl)-4H-chromen-4-one, named here as chromone 1, as a potent, selective, nontoxic, and nontransported inhibitor of ABCG2-mediated drug efflux (Valdameri et al. *J. Med. Chem.* 2012, 55, 966). We have now synthesized a series of 14 derivatives to study the structure–activity relationships controlling both drug efflux and ATPase activity of ABCG2 and to elucidate their molecular mechanism of interaction and inhibition. It was found that the 4-bromobenzoyloxy substituent at position 5 and the methoxyindole are important for both inhibition of mitoxantrone efflux and inhibition of basal ATPase activity. Quite interestingly, methylation of the central amide nitrogen strongly altered the high affinity for ABCG2 and the complete inhibition of mitoxantrone efflux and coupled ATPase activity. These results allowed the identification of a critical central inhibitory moiety of chromones that has never been investigated previously in any series of inhibitors.



### ■ INTRODUCTION

Anticancer chemotherapy is hampered by cross-resistance of tumor cells to cytotoxic drugs. The involved mechanisms are diverse and often lead to an intracellular decrease of the anticancer drugs. One of these mechanisms is attributed to transmembrane efflux pumps belonging to the large family of ATP-binding cassette (ABC) proteins that use ATP hydrolysis as a source of energy to catalyze the efflux of a large panel of cytotoxic agents. Among these ABC transporters, three are now well-recognized to play a key role in the efflux of chemotherapeutics from cancer cells: P-glycoprotein (P-gp, ABCB1),<sup>1</sup> multidrug resistance protein 1 (MRP1, ABCC1),<sup>2</sup> and breast cancer resistance protein (BCRP, ABCG2).<sup>3–5</sup> One of the strategies to abolish tumor resistance to chemotherapy is to develop selective and nontoxic inhibitors of P-gp, MRP1, and BCRP. The combination of inhibitors with anticancer drugs should lead to higher accumulation of the drug inside the cell, allowing for the efficient antiproliferative action of the anticancer drugs.

BCRP/ABCG2, the most recently discovered of the three multidrug transporters, was described to act as a half-transporter

requiring at least dimerization to be functional, whereas P-gp and MRP1 act as full-transporters. ABCG2 was reported to confer resistance to a panel of structurally unrelated chemotherapeutic drugs, constituting a major hurdle to chemotherapy success. Intense investigations were therefore aimed at developing ABCG2 inhibitors to be used as reversal agents in combination with anticancer drugs. Recently, a panel of highly active and selective inhibitors was reported for which the activity was ascertained by both accumulation assays and cytotoxicity when combining inhibitors with anticancer drugs.

The first selective inhibitor of ABCG2 was fumitremorgin C (FTC),<sup>6</sup> which, because of its high neurotoxicity, was found to be clinically useless. Synthetic analogues, such as Ko143, were then conceived and allowed the identification of less toxic and more potent inhibitors.<sup>7,8</sup> The P-gp inhibitors tariquidar and elacridar were used as templates for designing new and potent ABCG2 inhibitors,<sup>9–12</sup> however, no mechanistic data are available regarding the inhibitory effects.

Received: July 11, 2013

Published: December 4, 2013

**ANEXO D – Artigo submetido para a revista: Drug Design, Development And Therapy.****QUINOXALINE-SUBSTITUTED CHALCONES AS NEW INHIBITORS OF BREAST CANCER RESISTANCE PROTEIN ABCG2: POLYSPECIFICITY AT B-RING POSITION**

EVELYN WINTER<sup>1,2</sup>, LOUISE DOMENEGHINI CHIARADIA-DELATORRE<sup>3</sup>, CHARLOTTE GAUTHIER<sup>1</sup>, ALESSANDRA MASCARELLO<sup>3</sup>, PAULO CÉSAR LEAL<sup>3</sup>, ROSENDO AUGUSTO YUNES<sup>3</sup>, RICARDO JOSÉ NUNES<sup>3</sup>, TANIA BEATRIZ CRECZYNSKI-PASA<sup>2</sup>, ATTILIO DI PIETRO<sup>1\*</sup>

<sup>1</sup>Equipe Labellisée Ligue 2013, BMSSI UMR 5086 CNRS/Université Lyon 1, Institut de Biologie et Chimie des Protéines, 7 Passage du Vercors, 69367 Lyon cedex 07, France,

<sup>2</sup>Department of Pharmaceutical Sciences, PPGFAR, Federal University of Santa Catarina, 88040-900 Florianópolis, SC, Brazil.

<sup>3</sup>Department of Chemistry, Federal University of Santa Catarina, 88040-900 Florianópolis, SC, Brazil.

\* Corresponding author: Attilio Di Pietro (Telephone: +33-4-7272-2629; Fax: +33-4-7272-2629; E-mail: [a.dipietro@ibcp.fr](mailto:a.dipietro@ibcp.fr))

**Abstract**

A series of chalcones substituted by a quinoxaline unit at B-ring have been synthesized and checked as inhibitors of ABCG2-mediated mitoxantrone efflux. These compounds appeared more efficient than analogs containing other B-rings such as 2-naphthyl or 3,4-methylenedioxyphenyl, while a similar inhibitory activity was obtained when B-ring is 1-naphthyl group. In all cases, 2 or 3 methoxy groups had to be present on the phenyl A-ring to produce a maximal inhibition. An even higher potency was observed when the 2-naphthyl or 3,4-methylenedioxyphenyl groups were shifted to A-ring and methoxy substituents to the phenyl B-ring, indicating preferences among polyspecificity.

**ANEXO E – Artigo submetido para a revista: Journal of Medicinal Chemistry.****Bis-chalcones, as inedited inhibitors of Breast Cancer Resistance Protein, bind to a different site than chromones.**

Evelyn Winter,<sup>1,2</sup> Louise Domeneghini Chiaradia-Delatorre,<sup>3</sup> Charlotte Gauthier,<sup>1</sup> Rosendo Augusto Yunes,<sup>3</sup> Ricardo José Nunes,<sup>3</sup> Tânia Creczynski-Pasa,<sup>2</sup> and Attilio Di Pietro<sup>1,\*</sup>

<sup>1</sup>Equipe Labellisée Ligue 2013, BMSSI UMR 5086 CNRS/Université Lyon 1, IBCP, 69367 Lyon, France,

<sup>2</sup>Department of Pharmaceutical Sciences, PGFAR, Federal University of Santa Catarina, Florianopolis, SC, Brazil,

<sup>3</sup>Department of Chemistry, Federal University of Santa Catarina, Florianopolis, SC, Brazil.

**SUMMARY**

Potent ABCG2 inhibitors were recently identified as asymmetric chromones with different types of substituents. Since homodimeric inhibitors are known to be more active than the monomeric moieties on other multidrug ABC transporters, we synthesized a series of 33 bis-chalcones that were analyzed for their ability to inhibit mitoxantrone efflux from ABCG2-transfected HEK293 cells. Potent bis-chalcone inhibitors were identified, with efficiency depending on both position of the central ketone groups and the number and positions of lateral methoxy substituents. The best derivative, namely BC20, was selective for ABCG2 over ABCB1 and ABCC1, apparently not transported by ABCG2, and as active on various drug-selected cancer cells overexpressing ABCG2. BC20 stimulated the ABCG2 basal ATPase activity, suggesting a different binding site than chromone 1 which inhibited. Combination of both types of inhibitors produced synergistic effects, leading to complete inhibition at very low concentrations.

**REFERÊNCIAS**

- AEBI, H. Catalase *in vitro*. **Methods in Enzymology**, v.105, p.121-6, 1984.
- AGOSTINI, M.; TUCCI, P.; MELINO, G. Cell death pathology: Perspective for human diseases. **Biochemical and Biophysical Research Communications**, v. 414, p. 451–455, 2011.
- AHMED-BELKACEM, A. et al. Cancer Resistance Protein ABCG2 and Tectochrysin as Potent and Specific Inhibitors of Breast Flavonoid Structure-Activity Studies Identify 6-Prenylchrysin. **Cancer Research**, v. 65, p- 4852-4860, 2005.
- AHMED-BELKACEM, A. et al. Nonprenylated Rotenoids, a New Class of Potent Breast Cancer Resistance Protein Inhibitors. **J. Med. Chem.**, v. 50, p. 1933-1938, 2007.
- ALLEN, J.D. et al. Potent and Specific Inhibition of the Breast Cancer Resistance Protein Multidrug Transporter in Vitro and in Mouse Intestine by a Novel Analogue of Fumitremorgin C. **Molecular Cancer Therapeutics**, v. 1, p. 417-425, 2002.
- ALLIKMETS, R. A, et al. Human Placenta-specific ATP-Binding Cassette Gene (ABCP) on Chromosome 4q22 That Is Involved in Multidrug Resistance. **Cancer Research**, v. 58, p. 5337-5339, 1998.
- ALMEIDA, V.L., et al. Câncer e agentes antineoplásicos ciclo-celular específicos e ciclo-celular não específicos que integram com o DNA: uma introdução. **Quim Nova**, v. 28, n. 1, p. 118-129, 2005.
- ALMEIDA, C.P., et al. Modification of composition of a nanoemulsion with different cholesteryl ester molecular species: effects on stability, peroxidation, and cell uptake. **International Journal of Nanomedicine**, v. 5, p. 679-686, 2010.
- AMARANTE-MENDES, G. P. Apoptose: programa molecular de morte celular. **Einstein**, p. 15-18, 2003.
- ANDRADE, F. et al. Nanocarriers for pulmonary administration of peptides and therapeutic proteins. **Nanomedicine**, v. 6, n.1, p.123-141, 2011.
- ANGLICHEAU, D., et al. Role of P-glycoprotein in cyclosporine cytotoxicity in the cyclosporine–sirolimus interaction. **Kidney International**, v. 70, p. 1019–1025, 2006.



APPAIX, F. et al. Rapid spectrophotometric method for quantitation of cytochrome c release from isolated mitochondria or permeabilized cells revisited. **Biochim Biophys Acta-Bioenerg**, v. 1457, p. 175-181, 2000.

ARMSTRONG, S.A.; LOOK, A.T. Molecular genetics of acute lymphoblastic leukemia. **Journal of Clinical Oncology**, v.23, p. 6306–15, 2005.

ARNAUD, O., et al. The acridone derivative MBLI-87 sensitizes breast cancer resistance protein-expressing xenografts to irinotecan. **European Journal of Cancer**, v. 47, p.640-648, 2011.

ASADA, M. et al. Apoptosis inhibitory activity of cytoplasmic p21<sup>Cip1/WAF1</sup> in monocytic differentiation. **EMBO J**, v. 18, p. 1223-1234, 1999.

BASSAN, R.; HOELZER, D. Modern Therapy of Acute Lymphoblastic Leukemia. **Journal of Clinical Oncology**, v. 29, p. 532-543, 2011.

BENNETT, M., et al. Cell surface trafficking of Fas: A rapid mechanism of p53-mediated apoptosis. **Science**, v. 282, p. 290-293, 1998.

BERRIDGE, M.J. The endoplasmic reticulum: a multi-functional signaling organelle. **Cell Calcium**, v. 32, p. 235–249, 2002.

BEUTLER, E.D.; KELLY, B.M. Improved method for the determination of blood glutathione. **J. Lab. Clin. Med.**, v. 61, p. 882-8, 1963.

BILLEN, L.P.; SHAMAS-DIN, A.; ANDREWS, D.W. Bid: a Bax-like BH3 protein. **Oncogene**, v. 27, p. S93–S104, 2009.

BIRD, R.D.; DRAPER, A.H. Comparative studies on different methods of malondyaldehyde determination. **Meth. Enzymol.**, v. 90, p.105-10, 1984.

BOSTROM, B.C., et al. Dexamethasone versus prednisone and daily oral versus weekly intravenous mercaptopurine for patients with standard-risk acute lymphoblastic leukemia: a report from the Children's Cancer Group. **Blood**, v.101, p. 3809–17, 2003.

BOUILLET, P.; STRASSER, A. BH3-only proteins – evolutionarily conserved pro-apoptotic Bcl-2 family members essential for initiating programmed cell death. **Journal of Cell Science**, v. 115, p. 1567-1574, 2002.

BOUMENDJEL, A. et al. Targeting the multidrug ABCG2 transporter with flavonoidic inhibitors: in vitro optimization and in vivo validation. **Curr Med Chem**, v. 18, p. 3387-3401, 2011.

BRASIL. Inca. Ministério Da Saúde. **ATLAS DE MORTALIDADE POR CÂNCER**. Disponível em:

<<http://mortalidade.inca.gov.br/Mortalidade/>>. Acesso em: 21 fev. 2011b.

BRASIL. Ministério da Saúde Instituto Nacional de Câncer José Alencar Gomes Da Silva. **Estimativa 2012 – Incidência de Câncer no Brasil**. Rio de Janeiro: Coordenação Geral de Ações Estratégicas / Coordenação de Educação (CEDC), 2011a, 48 p.

BRECKENRIDGE, D.G. et al. Regulation of apoptosis by endoplasmic reticulum pathways. **Oncogene**, v. 22, p. 8608-8618, 2003.

BRIGGER, I.; DUBERNET, C.; COUVREUR, P. Nanoparticles in cancer therapy and diagnosis. **Adv Drug Deliv Rev**, v.54, p. 631-651, 2002.

BRINI, M. Effects of PMCA and SERCA pump overexpression on the kinetics of cell Ca<sup>2+</sup> signaling. **The EMBO Journal**, v. 19, p. 4926-4935, 2000.

BROWN, J.M.; ATTARDI, L.D. The role of apoptosis in cancer development and treatment response, **Nature Reviews**, v. 5, p. 231-237, 2005.

BUGGINS, A.G.S.; PEPPER, C.J. The role of Bcl-2 family proteins in chronic lymphocytic leukaemia. **Leukemia Research**, v. 34, p. 837-842, 2010.

BUNJES, H.; WESTESEN, K.; KOCH, M.H.J. Crystallization tendency and polymorphic transitions in triglyceride nanoparticles. **International Journal of Pharmaceutics**, v. 129, p. 159-173, 1996.

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

CALANDRELLA, N., et al. Carnitine reduces the lipoperoxidative damage of the membrane and apoptosis after induction of cell stress in experimental glaucoma. **Cell Death Dis.**, v.1, e62, 2010.

- CARLBERG, I.; MANNERVIK, B. Purification and characterization of flavoenzyme glutathione reductase from rat liver. **Journal of Biological Chemistry**, v.250, p.5475-5480, 1975.
- CASTEDO, M., et al. Cell death by mitotic catastrophe: a molecular definition. **Oncogene**, v. 23, p. 2825-837, 2004.
- CHANDRASEKHAR, S. Stochastic Problems in Physics and Astronomy. **Reviews of Modern Physics**, v.15, p. 1-89, 1943.
- CHEN, D., et al. Dietary flavonoids as proteasome inhibitors and apoptosis inducers in human leukemia cells. **Biochemical Pharmacology**, v. 69, p.1421-1432, 2005.
- CHEN, Y.H. et al. Generation of reactive oxygen species mediates butein-induced apoptosis in neuroblastoma cells. **Oncology Reports**, v. 27, p.1233-1237, 2012.
- CHIARADIA, L.D. **Síntese, caracterização e estudo da relação estrutura-atividade (REA) de chalconas e de compostos heterocíclicos biologicamente ativos em doenças negligenciadas, hiperglicemia e leucemia**. 2010. 524f. Tese (Doutorado em Química). Universidade Federal de Santa Catarina, Florianópolis.
- CHO, K. et al. Therapeutic Nanoparticles for Drug Delivery in Cancer. **Clinical Cancer Research**, v. 14, p. 1310-1316, 2008.
- COLE, S.P.C. et al. Overexpression of a Transporter Gene in a Multidrug-Resistant Human Lung Cancer Cell Line. **Science**, v. 258, p. 1650-1654, 1992.
- COTRAN, R. S.; KUMAR, V.; ROBBINS, S. L. **Robbins: Patologia Estrutural e Funcional**.5.ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 1996.
- COULTRAS, L.; STRASSER, A. The role of the Bcl-2 protein family in cancer. **Seminars in Cancer Biology**, v. 13, p. 115–123, 2003.
- CRAGG, G.M.; NEWMAN, D.J.; SNADER, K.M. Natural Products in Drug Discovery and Development. **J. Nat. Prod.**, v. 60, p. 52-60, 1997.
- CRAGG, G.M.; NEWMAN, D.J. Natural Products: a continuing source of novel drug leads. **Biochimica et Biophysica Acta.**, v. 1830, p. 3670-3695, 2013.
- CROZIER, A.; JAGANATH, I.B.; CLIFFORD, M.N. Dietary phenolics: chemistry, bioavailability and effects on healthy. **Natural Product Reports**, v. 26, n. 8, p. 965-1096, 2009.

- DANAELI, G., et al. Causes of cancer in the world: comparative risk assessment of nine behavioural and environmental risk factors. **Lancet**, v. 366, p. 1784-93, 2005.
- DANIAL, N.N.; KORSMEYER, S.J. Cell death: critical control points. **Cell**, v. 116, p. 205-19, 2004.
- DARBY, R.A.J.; CALLAGHAN, R.; McMAHON, R.M. P-glycoprotein Inhibition: The Past, the Present and the Future. **Current Drug Metabolism**, v. 12, p. 722-731, 2011.
- DAWSON, R.J.P.; HOLLESTEIN, K.; LOCHER, K.P. Uptake or extrusion: crystal structures of full ABC transporters suggest a common mechanism. **Molecular Microbiology**, v. 65, p. 250-257, 2007.
- DEAN, M.; RZHETSKY, A.; ALLIKMETS, R. The Human ATP-Binding Cassette (ABC) Transporter Superfamily. **Genome Research**, v. 11, p. 1156-1166, 2001.
- DEBATIN, K.M. Apoptosis pathways in cancer and cancer therapy. **Cancer Immunol Immunother**, v. 53, p. 153-59, 2004.
- DIAS, M.L.N. et al. Pharmacokinetics and tumor uptake of a derivatized form of paclitaxel associated to a cholesterol-rich nanoemulsion (LDE) in patients with gynecologic cancers. **Cancer Chemother Pharmacol**, v. 59, p.105-111, 2007.
- DILLER, L. Adult Primary Care after Childhood Acute Lymphoblastic Leukemia. **The New England Journal of Medicine**, v. 365, p. 1417-1424, 2011.
- DIMRI, G.P. What has senescence got to do with cancer? **Cancer Cell**, v. 7, p. 505-12, 2005.
- DOTTO, G.P. p21WAF1=Cip1 : more than a break to the cell cycle ? **Biochimica et Biophysica Acta**, v. 1471, p. M43-M56, 2000.
- DOYLE, L.A. et al. A multidrug resistance transporter from human MCF-7 breast cancer cells. **PNAS**, v. 95, p. 15665-15670, 1998.
- DRUKER, B.J. Imatinib as a paradigm of targeted therapies. **Advances in Cancer Research**, v. 91, p.1-30, 2004.
- DUCHEN, M.R. Mitochondria and calcium: from cell signalling to cell death. **Journal of Physiology** , v. 529, p. 57-68, 2000.

EDINGER, A. L.; THOMPSON, C. B. Death by design: apoptosis, necrosis, and autophagy. **Current Opinion in Cell Biology**, v. 16, p. 663-669, 2004.

FADERL, S. JEHA, S.; KANTARJIAN, H.M. The biology and therapy of adult acute lymphoblastic leukemia. **Cancer**, v. 98, n. 7, p. 1337-54, 2003.

FANG, J. Y. et al. Lipid nanoparticles as vehicles for topical psoralen delivery: solid lipid nanoparticles (SLN) versus nanostructured lipid carriers (NLC). **Eur J Pharm Biopharm**, v. 70, p. 633-640, 2008.

FANG, Y. P. et al. Tryptanthrin-loaded nanoparticles for delivery into cultured human breast cancer cells, MCF7: the effects of solid lipid/liquid lipid ratios in the inner core. **Chem Pharm Bull (Tokyo)**, v. 59, p. 266-271, 2011.

FINAL Report on the Safety Assessment of Glyceryl Stearate and Glyceryl Stearate/SE. **International Journal of Toxicology**, v. 1, p. 169-192, 1982.

FLOHÉ, L.; GUNZLER, W. A. Assays of glutathione peroxidase. **Methods in Enzymology**, v.105, p.114-121, 1984.

FOWLER, Z.L.; KOFFAS, M.A.G. Biosynthesis and biotechnological production of flavanones: current state and perspectives. **Appl Microbiol Biotechnol**, v.83, p. 799-808, 2009.

FRESHNEY, R. **Culture of animals cells: A manual of basic technique**. New York, Alan R. Liss. Inc., p.117, 1987.

GABIZON, A.; SHMEEDA, H.; YECHEZKEL, B. Pharmacokinetics of Pegylated Liposomal Doxorubicin: Review of Animal and Human Studies. **Clinical Pharmacokinetics**, v. 42, p. 419-436, 2003.

GAO, F. et al. Nanoemulsion improves the oral absorption of candesartan cilexetil in rats: Performance and mechanism. **Journal of Controlled Release**, v. 149, p. 168-174, 2011.

GHIBELLI, L.; DIEDERICH, M. Multistep and multitask Bax activation. **Mitochondrion**, v. 10, p. 604-613, 2010.

GOTTESMAN, M.M. et al. Defeating Drug Resistance in Cancer. **Discovery Medicine**, v. 6, p. 18-23, 2009.

GOTTESMAN, M.M. Mechanisms of cancer drug resistance. **Annu. Rev. Med**, v. 53, p. 615-627, 2002.

- GRAUX, C. Biology of acute lymphoblastic leukemia (ALL): Clinical and therapeutic relevance. **Transfusion and Apheresis Science**, v. 44, p. 183-189, 2011.
- GRAZIANI, S.R. et al. Uptake of a Cholesterol-Rich Emulsion by Breast Cancer. **Gynecologic Oncology**, v. 85, p. 493–497, 2002.
- GREAVES, M. F. Stem cell origins of leukaemia and curability. **British Journal of Cancer**, v. 67, n. 3, p. 413-23, 1993.
- GREAVES, M. Infection, immune responses and the aetiology of childhood leukaemia. **Nature Reviews**, v.6, p. 193-203, 2006.
- GREAVES, M. Molecular genetics, natural history and the demise of childhood leukaemia. **Europ. J. of Cancer**, v. 35, n. 2, p. 173-85, 1999.
- GROENENDYK, J.; MICHALAK, M. Endoplasmic reticulum quality control and apoptosis. **Acta Biochimica Polonica**, v. 52, p. 381-395, 2005.
- GRÜTTER, M.G. Caspases: key players in programmed cell death. **Current Opinion in Structural Biology**, v.10, p.649–655, 2000.
- HALEY, B.; FRENKEL, E. Nanoparticles for drug delivery in cancer treatment. **Urologic Oncology: Seminars and Original Investigations**, v. 26, p. 57-64, 2008.
- HAMMEL, M.; LAGGNER, P.; PRASSL, R. Structural characterisation of nucleoside loaded low density lipoprotein as a main criterion for the applicability as drug delivery system. **Chemistry and Physics of Lipids**, v. 123, p. 193-207, 2003.
- HANAHAN, D.; WEINBERG, R.A. Hallmarks of cancer: The Next Generation. **Cell**, v. 144, p. 646-674, 2011.
- HARVEY, A. Natural Products in Drug Discovery. **Drug Discovery Today**, v.13, p. 894- 901, 2008.
- HEIDARI, N.; HICKS, M.A.; HARADA, H. GX15-070 (obatoclax) overcomes glucocorticoid resistance in acute lymphoblastic leukemia through induction of apoptosis and autophagy. **Cell Death Dis.**, v.1, e79, 2010.
- HERR, I.; DEBATIN, K.M. Cellular stress response and apoptosis in cancer therapy. **Blood**, v. 98, n. 9, p. 2603-14, 2001.

HIOKI, M. et al. Combination of oncolytic adenovirotherapy and Bax gene therapy in human cancer xenografted models. Potential merits and hurdles for combination therapy. **Int. J. Cancer**, v. 122, p. 2628-2633, 2008.

HO, Y.K. et al. Low-density lipoprotein (LDL) receptor activity in human acute myelogenous leukemia cells. **Blood**, v. 53, p.1099-1114, 1978.

HOELZER, D.; GOKBUGET, N. Recent approaches in acute lymphoblastic leukemia in adults. **Review Clinical in Oncology/Hematology**, v. 36, p. 49-58, 2000.

HSU, Y.L., et al. Chalcone inhibits the proliferation of human breast cancer cell by blocking cell cycle progression and inducing apoptosis. **Food and Chemical Toxicology**, v. 44, p. 704–713, 2006.

HUANG, S.; SINICROPE, F.A. BH3 mimetic ABT-737 potentiates TRAIL-mediated apoptotic signaling by unsequestering Bim and Bak in human pancreatic cancer cells. **Cancer Res**, v. 68, p. 2944–2951, 2008.

HUANG, Z. R. et al. Development and evaluation of lipid nanoparticles for camptothecin delivery: a comparison of solid lipid nanoparticles, nanostructured lipid carriers, and lipid emulsion. **Acta Pharmacol Sin**, v. 29, p. 1094-1102, 2008.

JAFFE, E. F., et al. **World Healthy Organization Classification of Tumours: Patology and Genetics of Tumours of Haematopoietic and Lymphoid Tissues**. Lyon: IARC Press, 2001.

JENNING, V.; MADER, K.; GOHLA, S.H. Solid lipid nanoparticles (SLN™) based on binary mixtures of liquid and solid lipids: a H-NMR study. **International Journal of Pharmaceutics**, v.205, p. 15-21, 2000.

JULIANO, R.L.; LING, V. A surface glycoprotein modulating drug in chinese hamster ovary cell mutants. **Biochimica et Biophysica Acta**, v. 455, p. 152-162, 1976

KACHADOURIAN, R.; DAY, B.J. Flavonoid-induced glutathione depletion: Potential implications for cancer treatment. **Free Radical Biology & Medicine**, v. 41, p. 65–76, 2006.

KASTE, S.C. et al. Changes in Bone Mineral Density in Survivors of Childhood Acute Lymphoblastic Leukemia. **Pediatr Blood Cancer**, v. 46, p. 77 – 87, 2006.

- KAWAI, T. et al. Catalytic activity of MsbA reconstituted in nanodisc particles is modulated by remote interactions with the bilayer. **FEBS Letters**, v. 585, p. 3533–3537, 2011.
- KAWASAKI, E.S.; PLAYER, T.A. Nanotechnology, nanomedicine, and the development of new, effective therapies for cancer. **Nanomed.: Nanotech., Biol. and Med.**, v. 1, p. 101-109, 2005.
- KEEN, J. B.; HABIG, W. H.; JAKOBY, W. B. Mechanism for several activities from glutathione S-transferase. **Journal of Biological Chemistry**. v.251, p.6183-6188, 1976.
- KHAN, Z.; BISEN, P.S. Oncoapoptotic signaling and deregulated target genes in cancers: Special reference to oral cancer. **Biochimica et Biophysica Acta**, v. 1836, p. 123–145, 2013.
- KIECHLE, F. L.; ZHANG, X. Apoptosis: biochemical aspects and clinical implications. **Clinica Chimica Acta**, v. 326, p. 27-45, 2002.
- KIM, I., XU, W.; REED, J.C. Cell Death and endoplasmic reticulum stress: disease relevance and therapeutic opportunities. **Nature Reviews: Drug Discovery**, v. 7, p. 1013-1030, 2008.
- KO, Y.J. et al. Soy soluble polysaccharide induces apoptosis in HCT-116 human colon cancer cells via reactive oxygen species generation. **Mol Med Rep**, 2013.
- KORABIOWSKA, M. et al. Bcl2 and Bax expression in naevi and melanomas and their relation to ploidy status and proliferation. **Pol J Pathol**, v. 50, p. 17-21, 1999.
- KOZLOWSKI, D., et al. Density functional theory study of the conformational, electronic, and antioxidant properties of natural chalcones. **Journal of Physical Chemistry A**, v.111,p.1138-1145, 2007.
- KREUTER, J. Nanoparticles systems for brain delivery of drugs. **Adv Drug Deliv Rev.**, v. 23, n. 1, p. 65-81, 2001.
- LANDESMAN-MILO, D.; PEER D. Altering the immune response with lipid-based nanoparticles. **Journal of Controlled Release**, v. 161, p. 600-608, 2012.
- LEE, D.H., et al. Flavonoids isolated from korea *Citrus aurantium*L. induce G2/M phase arrest and apoptosis in human gastric cancer AGS cells. **Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine**, 2012, doi:10.1155/2012/515901.



LEE, H.J. et al. Philadelphia Chromosome-Positive Acute Lymphoblastic Leukemia - Current Treatment and Future Perspectives. **Cancer**, p.1583-1594, 2011.

LEWINSONHN, T.M.; PRADO, P.I. **Biodiversidade Brasileira**: Síntese do Estado Atual do Conhecimento, 1ª. ed. São Paulo: Pinsky, 2002, 17-25p apud BARREIRO, E. J.; BOLZANI, V. S. Biodiversidade: fonte potencial para a descoberta de fármacos. **Quim. Nova**, v. 32, p. 679-688, 2009.

LI, H., et al. Cleavage of Bid by Caspase 8 Mediates the Mitochondrial Damage in the Fas Pathway of Apoptosis. **Cell**, v. 94, p. 491–501,1998.

LI, S. et al. Preparation, characterization, pharmacokinetics and tissue distribution of solid lipid nanoparticles loaded with tetrandrine. **AAPS PharmSciTech**, v. 12, p. 1011-1018, 2011.

LIVAK, K.J.; SCHMITTGEN, T.D. Analysis of Relative Gene Expression Data Using Real-Time Quantitative PCR and the  $2^{-\Delta\Delta CT}$  Method. **Methods**, v. 25, p. 402–408, 2001.

LOWRY, O.H., et al. Protein measurement with the Folin phenol reagent. **Journal of Biological Chemistry**, v. 193, p. 265-75, 1951.

LUM, J.J.; DEBERARDINIS, R.J.; THOMPSON, C.B. Autophagy in metazoans: cell survival in the land of plenty. **Nat Rev Mol Cell Biol**, v. 6, p. 439-48, 2005.

MACEWAN, S.R.; CALLAHAN, D.J.; CHILKOTI, A. Stimulus-responsive macromolecules and Nanoparticles for cancer drug delivery. **Nanomedicine**, v.5, p. 793-806, 2010.

MAEDA, H. The enhanced permeability and retention (EPR) effect in tumor vasculature: the key role of tumor-selective macromolecular drug targeting. **Advan. Enzyme Regul.**, v. 41, p. 189–207, 2001

MARCATO, P. Preparação, caracterização e aplicações em fármacos e cosméticos de nanopartículas lipídicas sólidas. **Revista Eletrônica de Farmácia**, v.VI, p. 1-37, 2009.

MERTENS, A.C. et al. Cause-Specific Late Mortality Among 5-Year Survivors of Childhood Cancer: The Childhood Cancer Survivor Study. **J Natl Cancer Inst**, v. 100, p. 1368-1379, 2008.

MERTENS-TALCOTT, S.; PERCIVAL, S. Ellagic acid and quercetin interact synergistically with resveratrol in the induction of apoptosis and

- cause transient cell cycle arrest in human leukemia cells. **Cancer Letters**, v. 218, p. 141-151, 2005.
- MIELCKE, T.R., et al. Activity of novel quinoxaline-derived chalcones on in vitro glioma cell proliferation. **European Journal of Medicinal Chemistry**, v. 48, p. 255-264, 2012.
- MIHARA, M. et al., p53 Has a Direct Apoptogenic Role at the Mitochondria. **Molecular Cell**, v. 11, p. 577–590, 2003.
- MIYAKE, K. et al. Molecular Cloning of cDNAs Which Are Highly Overexpressed in Mitoxantrone resistant Cells: Demonstration of Homology to ABC Transport Genes. **Cancer Research**, v. 59, p. 8-13, 1999.
- MOOI, W.J.; PEEPER, D.S. Oncogene-induced cell senescence-halting on the road to cancer. **New England Journal of Medicine**, v.355, p. 1037-1046, 2006.
- MOSMANN, T. Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: application to proliferation and cytotoxicity assays. **J Immunol Methods**. v. 65, n. 1-2, p. 55-63, 1983.
- NAKAGAWA, T et al. Caspase-12 mediates endoplasmic- reticulum-specific apoptosis and cytotoxicity by amyloid- $\beta$ . **Nature**, v. 403, p. 98-103, 2000.
- NAKAGAWA, T.; YUAN, J. Cross-talk between Two Cysteine Protease Families: Activation of Caspase-12 by Calpain in Apoptosis. **The Journal of Cell Biology**, v. 150, p. 887-894, 2000.
- NAKATANI, N., et al. Induction of Apoptosis in Human Promyelocytic Leukemia Cell Line HL-60 by C-Benzylated Dihydrochalcones, Uvaretin, Isouvaretin and Diuvaretin. **Biol. Pharm. Bull.**, v. 28, n. 1, p. 83—86, 2005.
- NATARAJAN, K. et al. Role of breast cancer resistance protein (BCRP/ABCG2) in cancer drug resistance. **Biochemical Pharmacology**, v. 83, p. 1084–1103, 2012.
- NG, K.K., LOVELL, J.F.; ZHENG G. Lipoprotein-Inspired Nanoparticles for Cancer Theranostics. **Accounts of Chemical Research**, v. 44, p. 1105-1113, 2011.

NGUYEN, D. N. et al. Lipid-derived nanoparticles for immunostimulatory RNA adjuvant delivery. **PNAS**, v. **109**, p. E797-803, 2012.

NGUYEN, M., et al. Small molecule obatoclax (GX15-070) antagonizes MCL-1 and overcomes MCL-1-mediated resistance to apoptosis. **Proc Natl Acad Sci USA**, v. 104, p.19512–19517, 2007.

NGUYEN, T., et al. The role of activated MEK-ERK pathway in quercetin-induced growth inhibition and apoptosis in A549 lung cancer cells. **Carcinogenesis**, v. 25, n. 5, p. 647-659, 2004.

NICHOLSON, D.W. From bench to clinic with apoptosis-based therapeutic agents. **Nature**, v. 407, p. 810-16, 2000.

NIH - U.S. NATIONAL INSTITUTE OF HEALTH (Estados Unidos da América). **ClinicalTrials.gov**: A service of the U.S. National Institutes of the Health. Disponível em: <<http://clinicaltrials.gov/>>. Acesso em: 21 fev. 2011.

NUTT, L.K. et al. Bax and Bak Promote Apoptosis by Modulating Endoplasmic Reticular and Mitochondrial Ca<sup>2+</sup> Stores. **The Journal of Biological Chemistry**, v. 277, p. 9219-9225, 2002.

OAKES, S.A. et al. Regulation of endoplasmic reticulum Ca<sup>2+</sup> dynamics by proapoptotic BCL-2 family members. **Biochemical Pharmacology**, v. 66, p. 1335–1340, 2003.

OKADA, H.; MAK, T.W. Pathways of apoptotic and nonapoptotic death in tumour cells. **Nat Rev Cancer**, v. 4, p. 592-603, 2004.

OLIVER, L.; VALLETTE, F.M. The role of caspases in cell death and differentiation. **Drug Resistance Updates**, v. 8, p. 163–170, 2005.

ONCIU, M. Acute Lymphoblastic Leukemia. **Hematol Oncol Clin N Am**, v. 23, p. 655–674, 2009.

OYADOMARI, S.; MORI, M. Roles of CHOP/GADD153 in endoplasmic reticulum stress. **Cell Death and Differentiation**, v.11, p. 381-389, 2004.

OZOLS, R.F. et al. Verapamil and Adriamycin in the Treatment of Drug-Resistant Ovarian Cancer Patients. **Journal of Clinical Oncology**, v. 5, p. 641-647, 1987.

ÖZVEGY, C. et al. Functional Characterization of the Human Multidrug transporter, ABCG2, Expressed in Insect Cells. **Biochemical and Biophysical Research Communications**, v. 285, p. 111-117, 2001.

ÖZVEGY-LACZKA, C. et al. Function-dependent conformational changes of the ABCG2 multidrug transporter modify its interaction with a monoclonal antibody on the cell surface. **The Journal of Biological Chemistry**, v. 280, p.4219-4227, 2005.

PARK, E. J.; PARK, K. Oxidative stress and pro-inflammatory responses induced by silica nanoparticles in vivo and in vitro. **Toxicol Lett**, v. 184, p. 18-25, 2009.

PATIL, M.N.; PANDIT, A.B. Cavitation : A novel technique for making stable nano-suspensions. **Ultrasonics Sonochemistry**, v. 14, n. 5, p.519-530, 2007.

PEDRINI, F.S. et al. 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, p. 1128-1136, 2010.

PEPPER, C.; BENTLEY, P.; HOY, T. Regulation of clinical chemoresistance by bcl-2 and bax oncoproteins in B-cell chronic lymphocytic leukaemia. **Br J Haematol**, v. 95, p. 513-7, 1996.

PRIDGEN, A.M.; LANGER, R.; FAROKHZAD, O.C. Biodegradable, polymeric nanoparticle delivery systems for cancer therapy. **Future Medicine**, v. 2, p. 669-80, 2007.

PUI, C. H. Childhood leukemias. **The New England Journal of Medicine**, v. 332, n. 24,p. 1618-30, 1995.

PUI, C.H. et al. Biology, Risk Stratification, and Therapy of Pediatric Acute Leukemias: An Update. **Journal of Clinical Oncology**, v. 29, p. 551-565, 2011.

PUI, C.H. Toward optimal central nervous system-directed treatment in childhood acute lymphoblastic leukemia. **Journal of Clinical Oncology**, v. 21, n. 2, p. 179-181, 2003.

PUI, C.H.; CAMPANA, D.; EVANS, W.E. Childhood acute lymphoblastic leukaemia: current status and future perspectives. **Lancet Oncology**, v. 2, n. 10, p. 597-607, 2001.

PUI, C.H.; EVANS, W.E. Acute lymphoblastic leukemia. **The New England Journal of Medicine**, v.339, n. 9, p.605–15, 1998.

PUI, C.H.; EVANS, W.E. Drug therapy - Treatment of acute lymphoblastic leukemia. **The New England Journal of Medicine**, v.354, n. 2, p. 166-178, 2006.

QI, J.; LU, Y; WU, W. Absorption, disposition and pharmacokinetics of solid lipid nanoparticles. **Curr Drug Metab**, v. 13, p. 418-428, 2012.

RANGEL, L.P. et al. New structure–activity relationships of chalcone inhibitors of breast cancer resistance protein: polyspecificity toward inhibition and critical substitutions against cytotoxicity. **Drug Des Devel Ther**, v. 7, p. 1043–1052, 2013.

RAO, Y.K., et al. Chalcone HTMC causes in vitro selective cytotoxicity, cell-cycle G1 phase arrest through p53-dependent pathway in human lung adenocarcinoma A549 cells, and in vivo tumor growth suppression. **Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters**, v. 20, p. 6508–6512, 2010.

RAWAT, M. K.; JAIN, A.; SINGH, S. In vivo and cytotoxicity evaluation of repaglinide-loaded binary solid lipid nanoparticles after oral administration to rats. **J Pharm Sci**, v. 100, p. 2406-2417, 2011.

REN, W., et al., Flavonoids: Promising anticancer agents. **Medicinal Res Rev**, v. 23, n. 4, p. 519–534, 2003.

REULEN, R.C. et al. Long-term Cause-Specific Mortality Among Survivors of Childhood Cancer. **JAMA**, v. 14, p. 172-179, 2010.

RICHARDSON, R.B. Promotional etiology for common childhood acute lymphoblastic leukemia: The infective lymphoid recovery hypothesis. **Leukemia Research**, v. 35, p. 1425-1431, 2011.

RIEDL, S. J; SHI, Y. Molecular mechanisms of caspase regulation during apoptosis. **Nature**, v. 5, p. 897-906, 2004.

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

ROCHA, A.B.; LOPES, R.M.; SCHWARTSMANN, G. Natural products in anticancer therapy. **Current Opinion in Pharmacology**, v. 1, p. 364–369, 2001.

ROWE, J.M. Prognostic factors in adult acute lymphoblastic leukaemia. **British Journal of Haematology**, v. 150, p. 389-405, 2010.

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, p. 1354-1362, 2006.

RUBNITZ, J. E. et al. Frequency and prognostic significance of HRX rearrangements in infant acute lymphoblastic leukemia: a Pediatric Oncology Group study. **Blood**, v. 84, n. 2, p. 570-573, 1994.

RUFINI, A.; MELINO, G. Cell death pathology: The war against cancer. **Biochemical and Biophysical Research Communications**, v. 414, p. 445–450, 2011.

SAHOO, S.K.; PARVEEN, S.; PANDA, J.J. The present and future of nanotechnology in human health care. **Nanomedicine: Nanotechnology, Biology and Medicine**, v. 3, p. 20-31, 2007.

SALVESEN, G.S.; DUCKETT, C.S. IAP proteins: blocking the road to death's door. **Nature Reviews**, v.3, p. 401-410, 2002.

SANTOS, L. et al. Biological evaluation of chalcones and analogues as hypolipidemic agents. **Archiv der Pharmazie**, v. 339, p. 541-546, 2006.

SARASTE, A.; PULKKI, K. Morphologic and biochemical hallmarks of apoptosis. **Cardiovascular Research**, v. 45, p. 528-37, 2000.

SASSONE, J., et al. Mutant Huntingtin induces activation of the Bcl-2/adenovirus E1B 19-kDa interacting protein (BNip3). **Cell Death Dis.**, v.1, e.7, 2010.

SAYERS, T. Targeting the extrinsic apoptosis signaling pathway for cancer therapy. **Cancer Immunol Immunother**, v. 60, p. 1173–1180, 2011.

SCHMIDT, F.L. et al. ABCG2: recent discovery of potent and highly selective inhibitors. **Future Med Chem**, v. 2013.

SCHWARTZ, G.K.; SHAH, M.A. Targeting the Cell Cycle: A New Approach to Cancer Therapy. **Journal of Clinical Oncology**, v.23, p. 9408-9421, 2005.

SEMETE, B. et al. In vivo uptake and acute immune response to orally administered chitosan and PEG coated PLGA nanoparticles. **Toxicol Appl Pharmacol**, v. 249, p. 158-165, 2010.

- SHERR, C.J. Cancer Cell Cycles. **Science**, v. 274, p. 1672-1677, 1996.
- SILVA, A. H. et al. In vitro biocompatibility of solid lipid nanoparticles. **Sci Total Environ**, v. 432, p. 382-388, 2012.
- SITIA, R.; BRAAKMAN, I. Quality control in the endoplasmic reticulum protein factory. **Nature**, v. 426, p. 891-894, 2003.
- SOLMESKY, L. J. et al. Assessing cellular toxicities in fibroblasts upon exposure to lipid-based nanoparticles: a high content analysis approach. **Nanotechnology**, v. 22, p. 494016, 2011.
- STAVROVSKAYA, A.A.; STROMSKAYA, T.P. Transport Proteins of the ABC Family and Multidrug Resistance of Tumor Cells. **Biochemistry (Moscow)**, v. 73, p. 592-604, 2008.
- STOCK, W. Adolescents and Young Adults with Acute Lymphoblastic Leukemia. **Hematology**, p. 21-29, 2010.
- SUN, Y.L. et al. Role of ABC transporters in cancer chemotherapy. **Chinese Journal of Cancer**, v. 31, p. 51-58, 2012.
- SUZUKI, A., et al. Procaspase 3/p21 complex formation to resist Fas-mediated cell death is initiated as a result of the phosphorylation of p21 by protein kinase A. **Cell Death and Differentiation**, v.7, p. 721 -728, 2000.
- SUZUKI, K.; MATSUBARA, H. Recent Advances in p53 Research and Cancer Treatment. **Journal of Biomedicine and Biotechnology**, v. 2011, ID 978312, 2011.
- SWERTS, K. et al. Prognostic significance of multidrug resistance-related proteins in childhood acute lymphoblastic leukaemia. **European Journal Of Cancer**, v. 42, p. 295-309, 2006.
- SZAKÁCS, G. et al. Targeting multidrug resistance in cancer. **Nature Reviews/Drug Discovery**, v. 5, p. 219-234, 2006.
- TALPAZ, M., et al. Dasatinib in imatinib-resistant Philadelphia chromosome-positive leukemias. **The New England Journal of Medicine**, v. 354, p. 2531-41, 2006.
- TAYLOR, W.R.; STARK, G.R. Regulation of the G2/M transition by p53. **Oncogene**, v. 20, p. 1803-1815, 2001.

TEIXEIRA, R.S., et al. Delivery of daunorubicin to cancer cells with decreased toxicity by association with a lipidic nanoemulsion that binds to LDL receptors. **J Pharm Pharmacy**, v. 60, p. 1287-1295, 2008.

TELBISZ, A. et al. Antibody binding shift assay for rapid screening of drug interactions with the human ABCG2 multidrug transporter. **European Journal of Pharmaceutical Sciences**, v. 45, p.101-109, 2012.

TELBISZ, A. et al. Membrane cholesterol selectively modulates the activity of the human ABCG2 multidrug transporter. **Biochimica et Biophysica Acta**, v. 1768, p. 2698–2713, 2007.

THOMAS, A. et al. Drug-induced apoptosis in B-cell chronic lymphocytic leukemia: relationship between p53 gene mutation and bcl-2/bax proteins in drug resistance. **Oncogene**, v. 12, p. 1055-62, 1996.

THOMAS, I.H. et al. Bone mineral density in young adult survivors of acute lymphoblastic leukemia. **Cancer**, v. 113, p. 3248-3256, 2008.

TORMO, D. et al. Targeted activation of innate immunity for therapeutic induction of autophagy and apoptosis in melanoma cells. **Cancer Cell**, v. 16, p. 103-114, 2009.

TSAI, M. J. et al. Oral apomorphine delivery from solid lipid nanoparticles with different monostearate emulsifiers: pharmacokinetic and behavioral evaluations. **J Pharm Sci**, v. 100, p. 547-557, 2011.

VALDAMERI G. et al. Substituted Chromones as Highly Potent Nontoxic Inhibitors, Specific for the Breast Cancer Resistance Protein. **Journal of Medicinal Chemistry**, v. 55, p. 966-970, 2012c.

VALDAMERI, G. et al. Investigation of Chalcones as Selective Inhibitors of the Breast Cancer Resistance Protein: Critical Role of Methoxylation in both Inhibition Potency and Cytotoxicity. **Journal of Medicinal Chemistry**, v. 55, p. 3193-3200, 2012b.

VALDAMERI, G. et al. Methoxy Stilbenes as Potent, Specific, Untransported, and Noncytotoxic Inhibitors of Breast Cancer Resistance Protein. **ACS Chemical Biology**, v. 7, p. 322-330, 2012a.

VAN FURTH, R. et al. The mononuclear phagocyte system: a new classification of macrophages, monocytes, and their precursor cells. **Bull World Health Organ**, v. 46, p. 845-852, 1972.



- VAUTIER, S. et al. ABCB1 (P-glycoprotéine) et barrière hémato-encéphalique: implication dans les maladies neurologiques et leur traitements. **JPharmClin**, v. 25, p. 225-235, 2006.
- VENTURA, A., et al. Restoration of p53 function leads to tumour regression in vivo. **Nature**, v. 445, p. 661–665, 2007.
- VERMEULEN, K.; BOCKSTAELE, D.R.V.; BERNEMAN, Z. The cell cycle: a review of regulation, deregulation and therapeutic targets in cancer. **Cell Prolif.**, v.36, p.131-149, 2003.
- VERSLUIS, A.J., et al. Receptor-mediated uptake of low-density lipoprotein by B16 melanoma cells in vitro and in vivo in mice. **British Journal of Cancer**, v. 74, p. 525-532, 1996.
- VLAMING, M.H.; LAGAS, J.S.; SCHINKEL, A.H. Physiological and pharmacological roles of ABCG2 (BCRP): Recent findings in Abcg2 knockout mice. **Advanced Drug Delivery Reviews**, v. 61, p. 14–25, 2009.
- WANG, J.J., et al. Lipid nanoparticles with different oil/fatty ester ratios as carriers of buprenorphine and its prodrugs for injection. **European Journal of Pharmaceutical Sciences**, v. 38, p. 138–146, 2009.
- WEAVER, B.A.; CLEVELAND, D.W. Decoding the links between mitosis, cancer, and chemotherapy: the mitotic checkpoint, adaptation, and cell death. **Cancer Cell**, v. 8, p. 7-12, 2005.
- WESTESEN, K.; BUNJES, H.; KOCH, M.H.J. Physicochemical characterization of lipid nanoparticles and evaluation of their drug loading capacity and sustained release potential. **Journal of Controlled Release**, v. 48, p. 223-236, 1997.
- WHO - World Health Organization. Disponível em:  
<<http://www.who.int/cancer>>, Acesso em 21 fev. 2011.
- WINTER, E., et al. Naphthylchalcones induce apoptosis and caspase activation in a leukemia cell line: The relationship between mitochondrial damage, oxidative stress, and cell death. **Bioorg Med Chem**, v. 18, p.8026-8034, 2010.
- WISSING, S.A.; KAYSER, O.; MULLER, R.H. Solid lipid nanoparticles for parenteral drug delivery. **Advanced Drug Delivery Reviews**, v. 56, p. 1257 – 1272, 2004.

- WOO, Y., et al. Flavanones inhibit the clonogenicity of HCT116 colorectal cancer cells. **Int J Mol Med**, v. 29, p.403-408, 2012.
- WÜNSCH-FILHO, V., MONCAU, J.E. Mortalidade por câncer no Brasil 1980-1995: padrões regionais e tendências temporais. **Rev Assoc Med Bras**, v. 48, n. 3, p. 250-257, 2002.
- XIA, C.Q.; SMITH, P.G. Drug Efflux Transporters and Multidrug Resistance in Acute Leukemia: Therapeutic Impact and Novel Approaches to Mediation. **Mol Pharmacol**, v. 82, p.1008-1021, 2012.
- XUE, W., et al. Senescence and tumour clearance is triggered by p53 restoration in murine liver carcinomas, **Nature**, v. 445, p. 656-660, 2007.
- YANG, L., et al. 23,24-Dihydrocucurbitacin B induces G2/M cell-cycle arrest and mitochondria-dependent apoptosis in human breast cancer cells (Bcap37). **Cancer Lett.**, v. 256, p. 267-278, 2007.
- YE, C.L., et al. In vitro anti-tumor activity of 2',4'-dihydroxy-6'-methoxy-3',5'-dimethylchalcone against six established human cancer cell lines. **Pharmacological Research**, v. 50, p. 505-510, 2004.
- YE, C.L., et al. Induction of apoptosis in K562 human leukemia cells by 2',4'-dihydroxy-6'-methoxy-3',5'-dimethylchalcone. **Leukemia Research**, v. 29, p. 887-892, 2005.
- YE, L. et al. The citrus flavonone hesperetin inhibits growth of aromatase-expressing MCF-7 tumor in ovariectomized athymic mice. **J Nutrit Biochem**, 2012, doi: 10.1016/j.jnutbio.2011.07.003.
- YEZHELYEV, M.V., GAO, X., XING, Y., AL-HAJJ, A., NIE, S., O'REGAN, R. M. Emerging use of nanoparticles in diagnosis and treatment of breast cancer. **Lancet Oncol**, 7, 657-67, 2006.
- ZAIDI, N.F. Intracellular calcium modulates the nuclear translocation of calsenilin. **Journal of Neurochemistry**, v. 89, p. 593-601, 2004.
- ZHANG, G., et al. Effect of dimethyl sulfides on the induction of apoptosis in human leukemia Jurkat cells and HL-60 cells. **Bioscience Biothecnology Biochemistry**, v. 72, n. 11, p. 2966-2972, 2008.
- ZIEGLER, U.; GROSCURTH, P. Morphological features of cell death. **News Physiol Sci**, v. 19, p. 124-28, 2004.

ZONG, W.X. et al. Bax and Bak can localize to the endoplasmic reticulum to initiate apoptosis. **The Journal of Cell Biology**, v. 162, p. 59-69, 2003.

ZUSE, A., et al. 9-Benzylidene-naphtho[2,3-b]thiophen-4-ones and benzylidene-9(10H)-anthracenones as novel tubulin interacting agents with high apoptosis-inducing activity. **Europ J Pharmacol**, v. 575, p. 34-45, 2007.