

**Mariana Franzoni Maioral**

**INVESTIGAÇÃO DE DIFERENTES MECANISMOS  
APOPTÓTICOS INDUZIDOS POR COMPOSTOS DE ORIGEM  
NATURAL E SINTÉTICA EM CÉLULAS DE NEOPLASIAS  
HEMATOLÓGICAS**

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Farmácia da Universidade Federal de Santa Catarina para obtenção do Grau de Doutora em Farmácia.

Orientadora: Dr<sup>a</sup>. Maria Cláudia Santos da Silva

Florianópolis  
2017

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

Maioral, Mariana Franzoni  
Investigação de Diferentes Mecanismos Apoptóticos  
Induzidos por Compostos de Origem Natural e  
Sintética em Células de Neoplasias Hematológicas /  
Mariana Franzoni Maioral ; orientadora, Maria  
Cláudia Santos-Silv, 2017.  
190 p.

Tese (doutorado) - Universidade Federal de Santa  
Catarina, Centro de Ciências da Saúde, Programa de  
Pós-Graduação em Farmácia, Florianópolis, 2017.

Inclui referências.

1. Farmácia. 2. Leucemias agudas. 3. Morte  
celular (apoptose). 4. Citotoxicidade. 5.  
Chalconas. I. Santos-Silv, Maria Cláudia. II.  
Universidade Federal de Santa Catarina. Programa de  
Pós-Graduação em Farmácia. III. Título.

**“Investigação de diferentes mecanismos apoptóticos induzidos por compostos de origem natural e sintética em células de neoplasias hematológicas”**

**POR**

**Mariana Franzoni Maioral**

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

**Banca Examinadora:**

---

**Prof(a). Dr(a). Fátima Regina Mena Bareto Silva (UFSC – Membro Titular)**

---

**Prof(a). Dr(a). Iara Fabrícia Kretzer (UFSC – Membro Titular)**

---

**Prof(a). Dr(a). Izabella Thais da Silva (UFMG – Membro Titular)**

---

**Prof(a). Dr(a). Maria Cláudia Santos da Silva (UFSC – Orientador)**

---

**Prof(a). Dr(a). Tânia Beatriz Creczynski Pasa  
Coordenadora do Programa de Pós-Graduação em Farmácia da  
UFSC**

**Florianópolis, 31 de julho de 2017.**





Aos meus pais, **José e Sônia**, por terem me ensinado  
o caminho dos livros, do conhecimento e da ciência.

E à **Naia**, por caminhar ao meu lado.



## AGRADECIMENTOS

Existe um provérbio nigeriano que diz que é preciso toda uma vila para criar uma criança. Eu não sei muito sobre crianças, mas acho que também podemos dizer que é preciso toda uma vila para escrever uma tese. Isso porque um doutorado é muito mais do que os resultados relatados nessas páginas, é mais do que os trabalhos apresentados em congressos e do que os artigos publicados em periódicos internacionais. Esse trabalho leva o meu nome, mas ele não foi realizado apenas por mim. Ele só foi possível porque eu tive o privilégio de contar com pessoas extraordinárias que me inspiraram e me apoiaram ao longo do caminho e com oportunidades únicas que permitiram que eu fosse muito além do que um dia eu imaginei ser possível.

Agradeço primeiramente à minha “vila natal”: meus pais, **José e Sônia**, por todo o amor e cuidado e pela coragem de terem criado uma filha livre e curiosa. Agradeço aos meus irmãos, **Daniel e Rafael**, pelo apoio e inspiração de sempre, à minha família, em especial à minha tia **Mirta** que assume tão bem o papel de minha segunda mãe; e à **Tuni**, simplesmente por ainda estar por aqui enchendo nossas vidas de alegria.

Agradeço especialmente à **Naia**, por tudo e por tanto que nem cabe aqui. Obrigada, acima de tudo, por estar sempre ao meu lado, sendo casa e paz em tantas e tantas vilas, alegres ou sombrias, por todos os cantos desse mundo. *You are my ‘hygge’*.

Agradeço aos meus amigos do CA, em especial ao **Felipe** e à **Jamila**, e também ao **Caio**, à **Talita** e ao **Lorenzo**, que me ensina, com amor e paciência, o pouco que eu sei sobre vilas e crianças. Agradeço também ao **Alisson**, **Rafa** e **Fernando** pela amizade e por tornarem a minha vida mais divertida, e às queridas doutoras **Ale** e **Tuca** por serem fontes constantes de inspiração e por se manterem presentes mesmo distantes.

Agradeço aos meus colegas do LOEH, em especial à **Amanda**, **Manoela** e **Natália**, pela parceria nos experimentos e pelas inúmeras discussões e experiências trocadas ao longo desses anos. E também à professora **Ana Carolina**, pela orientação durante o estágio em docência e pelas brilhantes conversas científicas e não científicas. Com vocês, o trabalho pesado sempre pareceu um pouquinho mais leve.

Agradeço aos professores **Rosendo Yunes**, **Ricardo Nunes**, **Miriam Falkenberg**, **Louise Chiaradia-Delatorre** e **Patrícia Neuenfeldt** e às alunas **Gabriele Zatelli** e **Ana Cláudia Philippus** por

disponibilizarem os compostos utilizados neste trabalho e colaboração e disponibilidade de sempre.

Agradeço ao **PGFAR** e a **CAPES** pelas oportunidades, pelo apoio financeiro e por permitirem que eu vivesse a incrível experiência do doutorado sanduiche na Suíça; e também aos membros da banca, professoras **Izabella**, **Fátima** e **Iara**, pelas importantes contribuições para com este trabalho.

Agradeço imensamente ao **Prof. Denis Martinvalet** por ter me aceitado como parte do seu time e também aos demais colegas do *Département de Physiologie Cellulaire et Métabolisme* por terem me recebido tão bem na Universidade de Genebra. Um agradecimento especial à minha pequena vila suíça e àqueles que fizeram com que eu me sentisse em casa mesmo estando do outro lado do oceano: **Sarah**, **Émilie**, **Vanité**, **Yonca**, **Guillaume**, **Valentina**, **Miao** e **Olivier**. *Je vous remercie, très sincèrement, pour tout.*

Agradeço à querida professora de francês **Émilie Magne** por ter tornado essa língua desafiadora um pouquinho mais fácil, e também pela amizade, pelos camelos no deserto e pelas conversas que foram muito além das aulas.

Finalmente, agradeço à minha orientadora, **Prof. Maria Cláudia**, por todas as portas que me foram abertas ao longo desses 7 anos de laboratório, pela amizade construída, pelos ensinamentos compartilhados e pela paciência e confiança que sempre depositou em mim. De coração, eu serei eternamente grata por tudo.

A cada um de vocês, meus mais sinceros agradecimentos por fazerem da minha vila, aqui ou em qualquer parte do mundo, um lugar tão bonito, alegre, florido e cheio de vida.

*“Le véritable voyage, ce n’est pas de parcourir le désert ou de franchir de grandes distances sous-marine, c’est de parvenir en un point exceptionnel où la saveur de l’instant baigne tous les contours de la vie intérieure.”*

**Antoine de Saint-Exupéry**

Muito obrigada!

*“Don’t be afraid of hard work. Nothing worthwhile comes easily. Don’t let others discourage you or tell you that you can’t do it. In my day I was told women didn’t go into chemistry. I saw no reason why we couldn’t.”*

Gertrude B. Elliot



## RESUMO

As leucemias agudas são neoplasias malignas do sistema hematopoiético associadas a milhares de óbitos em todo o mundo. No presente trabalho foi avaliado o efeito citotóxico de 70 novas chalconas sintéticas e do composto natural **GE1**, uma quinona isolada de *Eugenia hiemalis*; e seus mecanismos de ação foram investigados em células de leucemia aguda. Inicialmente foram selecionadas as chalconas mais citotóxicas (**JA3** e **JA7**) e foi demonstrado, pelo método do MTT, que, assim como **GE1**, os compostos reduziram a viabilidade celular de diferentes linhagens tumorais de maneira dependente do tempo e da concentração. Os três compostos apresentaram altos índices de seletividade e não apresentaram citotoxicidade significativa sobre células não neoplásicas. **JA3**, **JA7** e **GE1** bloquearam o ciclo celular de células K562 e Jurkat e diminuíram a expressão do marcador de proliferação celular KI67. A morte por apoptose foi confirmada pela avaliação da morfologia celular, pelo ensaio de fragmentação do DNA e por citometria de fluxo pelo método da anexina-V. Os compostos aumentaram a produção de EROS, diminuíram a expressão das proteínas antiapoptóticas Bcl-2 e Bcl-xL e aumentaram a expressão das proteínas pró-apoptóticas Bax e Bak. Isso levou a um extenso dano mitocondrial manifestado pela perda do  $\Delta\psi_m$  e liberação de fatores apoptogênicos como AIF e citocromo *c*. Além disso, os compostos aumentaram a expressão de FasR, diminuíram a expressão de survivina e induziram a clivagem de caspase-3 e PARP. A morte celular induzida por **JA3** e **JA7** envolve ainda o estresse no RE e um tipo imunogênico de apoptose. A prevenção do estresse no RE ou o bloqueio da maquinaria pró-apoptótica inibiu a morte celular mediada por **JA3** e **JA7**, assim como o bloqueio da via Fas com a superexpressão de c-FLIP ou com o inibidor de caspase 8. Finalmente, a associação dos três compostos com citarabina e vincristina aumentou o efeito antileucêmico desses fármacos quando comparado aos compostos isolados. Os resultados apresentados fornecem novas informações sobre os mecanismos de morte dos compostos **JA3**, **JA7** e **GE1** e sugerem que os mesmos possam vir a representar alternativas promissoras ao tratamento convencional para as leucemias agudas.

**Palavras-chave:** Leucemia aguda, citotoxicidade, apoptose, ciclo celular, chalcona, acetato de miconidina.

## ABSTRACT

Acute leukemias are malignant neoplasms of the hematopoietic system associated with thousands of deaths worldwide. In this study, it was evaluated the cytotoxic effect of 70 new synthetic chalcones and of the natural compound **GE1**, a quinone isolated from *Eugenia hiemalis*, and their death mechanisms were further investigated in acute leukemia cells. Initially, the most cytotoxic chalcones (**JA3** and **JA7**) were selected and it was demonstrated, by the MTT method, that the compounds reduced the cell viability of different tumor cell lines in a concentration and time dependent manner. The three compounds were highly selective towards acute leukemia cells and were not significantly cytotoxic to non-neoplastic cells. **JA3**, **JA7** and **GE1** blocked the cell cycle of K562 and Jurkat cells and decreased the expression of the cell proliferation marker KI-67. Apoptotic cell death was confirmed by cell morphology, by DNA fragmentation and by flow cytometry using the annexin-V method. The results demonstrated that the compounds increased ROS production, decreased the expression of anti-apoptotic proteins Bcl-2 and Bcl-xL and increased the expression of pro-apoptotic proteins Bax and Bak. This resulted in an extensive mitochondrial damage manifested by  $\Delta\psi_m$  loss and by the release of apoptogenic factors such as AIF and cytochrome *c*. In addition, the compounds increased FasR expression, which also suggests the involvement of the extrinsic pathway, decreased survivin expression and induced caspase-3 and PARP cleavage. Cell death induced by chalcones **JA3** and **JA7** also involves ER stress and an immunogenic type of apoptosis. Preventing ER stress or blocking the positive regulation of the pro-apoptotic machinery inhibited **JA3** and **JA7**-induced cell death, as well as the blockage of the Fas pathway by c-FLIP overexpression or by caspase-8 inhibitor. Finally, the association of the three compounds with the drugs cytarabine and vincristine increased the antileukemic effect of these drugs when compared to the isolated compounds. The results provide novel insights about the mechanisms involved in cell death induced by **JA3**, **JA7** and **GE1** and suggest that they might represent promising alternatives to conventional treatment for acute leukemia.

**Key words:** Acute leukemia, cytotoxicity, apoptosis, cell cycle, chalcone, miconidine acetate.



## LISTA DE FIGURAS

Figura 1 - Marcadores de câncer .....	32
Figura 2 - Classificação das LAs de acordo com a linhagem afetada. .	34
Figura 3 - Estrutura química do acetato de miconidina (GE1).....	42
Figura 4 - Núcleo fundamental das chalconas.....	43
Figura 5 - Número de registros de patentes envolvendo chalconas no tratamento de neoplasias malignas até o ano de 2016.....	45
Figura 6 - Envolvimento do RE na morte celular.....	48
Figura 7 - Aumento de EROS, tumorigênese e morte celular.....	50
Figura 8 - Regulação do ciclo celular.....	51
Figura 9 - Resumo das vias extrínseca, intrínseca e comum da apoptose. .....	54
Figura 10 - Triagem das chalconas derivadas das séries PY, AN, KP, JE e JA.....	82
Figura 11 - Curvas concentração-resposta das chalconas KP12, JE16, JE18, JA3 e JA7 nas linhagens K562, Jurkat e HL-60.....	83
Figura 12 - Efeito citotóxico da chalcona JA3 sobre células de LA. .	85
Figura 13 – Efeito citotóxico da chalcona JA7 sobre células de LA....	86
Figura 14 - Efeito citotóxico das chalconas JA3 e JA7 sobre células de MM.....	87
Figura 15 - Efeito citotóxico da chalcona JA3 em linhagens de tumores sólidos.....	88
Figura 16 - Efeito citotóxico da chalcona JA7 em linhagens de tumores sólidos.....	89
Figura 17 - Efeito citotóxico das chalconas JA3 e JA7 em células- tronco tumorais U251NS.....	91
Figura 18 - Efeito citotóxico das chalconas JA3 e JA7 em células de linhagens não neoplásicas.....	92
Figura 19 - Efeito citotóxico de JA3 e JA7 sobre células mononucleadas.....	94
Figura 20 - Efeito das chalconas JA3 e JA7 sobre eritrócitos de SP....	95
Figura 21 - Efeito de JA3 e JA7 no ciclo celular de células K562 e Jurkat.....	96
Figura 22 - Efeito de JA3 e JA7 na expressão das proteínas KI-67 e PML.....	97
Figura 23 - Avaliação morfológica das células K562 e Jurkat após tratamento com as chalconas JA3 e JA7.....	98
Figura 24 - Efeito das chalconas JA3 e JA7 na exposição dos resíduos de fosfatidilserina em células K562 e Jurkat pelo método da Anexina V-FITC.....	99

Figura 25 - Efeito das chalconas JA3 e JA7 na fragmentação do DNA de células K562 e Jurkat.....	100
Figura 26 - Efeito das chalconas JA3 e JA7 no comprimento mitocondrial de células HeLa.....	101
Figura 27 - Efeito de JA3 e JA7 sobre o $\Delta\psi_m$ de células K562 e Jurkat.....	101
Figura 28 - Liberação de fatores apoptóticos pela mitocôndria após incubação com as chalconas JA3 e JA7.....	103
Figura 29 - Efeito das chalconas JA3 and JA7 na produção de EROS.....	104
Figura 30 - Efeito das chalconas JA3 e JA7 na expressão das proteínas Bcl-2, Bax e Bid.....	105
Figura 31 - Efeito da cicloheximida na viabilidade celular e na expressão de ciclina D1 em células K562 e Jurkat.....	106
Figura 32 - Efeito da pré-incubação com cicloheximida na viabilidade celular.....	107
Figura 33 - Efeito das chalconas JA3 e JA7 na expressão das proteínas Bcl-2, Bcl-xL, Bax e Bak com e sem pré-incubação com cicloheximida.....	108
Figura 34 - Efeito das chalconas JA3 e JA7 na expressão do receptor FasR.....	109
Figura 35 - Efeito das chalconas JA3 e JA7 em células K562 e Jurkat transfectadas com c-FLIP-FLAG.....	110
Figura 36 - Efeito das chalconas JA3 e JA7 em células K562 e Jurkat pré-incubadas com inibidor de caspase-8.....	112
Figura 37 - Efeito das chalconas JA3 e JA7 na expressão das proteínas survivina, caspase-3 e PARP.....	113
Figura 38 - Efeito das chalconas JA3 e JA7 no estresse do RE.....	114
Figura 39 - Efeito das chalconas JA3 e JA7 no estresse do RE após pré-tratamento com TUDC.....	115
Figura 40 - Efeito das chalconas JA3 e JA7 na liberação de ATP e na exposição de CALR em células K562 e Jurkat.....	116
Figura 41 - Efeito das chalconas JA3 e JA7 em associação com citarabina e vincristina.....	118
Figura 42 - Efeito citotóxico de GE1 sobre as células K562, Jurkat e MM-1.S.....	120
Figura 43 - Efeito citotóxico de GE1 sobre as células HT-29, HeLa e U251.....	121
Figura 44 - Efeito citotóxico do composto GE1 sobre as células U251NS.....	122

Figura 45 - Efeito citotóxico do composto GE1 sobre células não neoplásicas.....	123
Figura 46 - Efeito de GE1 no ciclo celular das células de LA K562 e Jurkat.....	125
Figura 47 - Efeito do composto GE1 na indução de morte celular por apoptose.....	126
Figura 48 - Efeito do composto GE1 na mitocôndria das células K562 e Jurkat.....	127
Figura 49 - Efeito do composto GE1 na produção de EROS.....	128
Figura 50 - Efeito de GE1 em proteínas das vias apoptóticas.....	130
Figura 51 - Efeito da associação do composto GE1 com os quimioterápicos citarabina e vincristina na morte das células K562 e Jurkat.....	131
Figura 52 - Esquema ilustrativo do mecanismo de ação dos compostos JA3, JA7 e GE1 em células de LA.....	159



## LISTA DE QUADROS

Quadro 1 - Fármacos derivados de produtos naturais utilizados na terapia do câncer.....	41
Quadro 2 - Efeitos <i>in vitro</i> das chalconas descritos na literatura. ....	44
Quadro 3 - Principais tipos de morte celular programada.....	46
Quadro 4 - Valores de $CI_{50}$ calculados nas células K562, Jurkat e HL60 após 24 h de incubação com as chalconas KP12, JE16, JE18, JA3 e JA7.....	83
Quadro 5 - Valores de $CI_{50}$ calculados para JA3 e JA7 em linhagens de LA.....	87
Quadro 6 - Valores de $CI_{50}$ para JA3 e JA7 em linhagens de tumores sólidos.....	90
Quadro 7 - Valores de $CI_{50}$ calculados para as chalconas JA3 e JA7 em linhagens não neoplásicas.....	93
Quadro 8 - IS das chalconas JA3 e JA7.....	93
Quadro 9 - Efeito das chalconas JA3 e JA7 sobre as fases do ciclo celular de células K562 e Jurkat.....	96
Quadro 10 - Viabilidade das células K562 e Jurkat transfectadas com cFLIP.....	111
Quadro 11 - Valores de $CI_{50}$ calculados para GE1 em diferentes linhagens tumorais.....	121
Quadro 12 - Índice de seletividade para o composto GE1. ....	124



## LISTA DE ABREVIATURAS

<b><math>\Delta\Psi_m</math></b>	Potencial de membrana mitocondrial
<b>AIF</b>	Fator indutor de apoptose
<b>ANOVA</b>	Análise de variância
<b>AO</b>	Laranja de acridina ( <i>acridine orange</i> )
<b>Apaf-1</b>	Fator ativador de apoptose 1
<b>ATCC</b>	<i>American Type Culture Collection</i>
<b>ATP</b>	Adenosina trifosfato
<b>Bax</b>	<i>Bcl-2-associated X protein</i>
<b>BCA</b>	Ácido bicinconínico
<b>Bcl-2</b>	<i>B-cell lymphoma protein-2</i>
<b>BCSH</b>	<i>British Committee for Standarts in Haematology</i>
<b>BCRJ</b>	Banco de Células do Rio de Janeiro
<b>BE</b>	Brometo de etídio
<b>BFM</b>	<i>Berlin-Frankfurt-Münster</i>
<b>BiP</b>	<i>Binding immunoglobulin protein</i>
<b>BSA</b>	Albumina bovina
<b>CALR</b>	Calreticulina
<b>Caspases</b>	<i>Cysteine-dependent aspartate-specific proteases</i>
<b>CD</b>	<i>Cluster of differentiation</i>
<b>CDKs</b>	Cinases dependentes de ciclinas
<b>c-FLIP</b>	Proteína reguladora das caspases-8 e -10
<b>CEPSH</b>	Comitê de Ética de Pesquisa em Seres humanos
<b>CFU</b>	Unidades formadoras de colônia
<b>CHOP</b>	<i>CCAAT-enhancer-binding protein homologous protein</i>
<b>CI<sub>50</sub></b>	Concentração inibitória 50%
<b>CKI</b>	Inibidores de CDK
<b>Cu</b>	Cobre
<b>DAMP</b>	Padrões moleculares associados a danos celulares
<b>DD</b>	Domínios de morte
<b>DISC</b>	Complexo sinalizador indutor de apoptose
<b>DMEM</b>	<i>Dulbecco's modified Eagle's médium</i>
<b>DMEM/F12</b>	<i>DMEM/Nutrient Mixture F-12</i>
<b>DMSO</b>	Dimetilsulfóxido
<b>DNA</b>	Ácido desoxirribonucleico
<b>EDTA</b>	Ácido etilenodiamino tetra-acético
<b>EGF</b>	Fator de crescimento epidermal
<b>EPM</b>	Erro padrão da média
<b>EROS</b>	Espécies reativas de oxigênio
<b>FADD</b>	Proteína adaptadora ( <i>Fas-Associated Death Domain</i> )

<b>FasL</b>	Ligante Fas
<b>FasR</b>	Receptor Fas
<b>FC</b>	Fração citosólica
<b>FGF</b>	Fator de crescimento fibroblástico
<b>FM</b>	Fração mitocondrial
<b>FSC</b>	<i>Forward Scatter</i>
<b>G0</b>	<i>Gap 0</i>
<b>G1</b>	<i>Gap 1</i>
<b>G2</b>	<i>Gap 2</i>
<b>GzmaA</b>	Granzima A
<b>Gzma B</b>	Granzima B
<b>HCl</b>	Ácido clorídrico
<b>HEPES</b>	ÁcidoN-[2-hidroxietyl]piperazina-N'-[2-etanosulfônico]
<b>ICAD</b>	Proteínas inibidoras de caspase
<b>IAP</b>	Proteínas inibidoras de apoptose
<b>IS</b>	Índice de seletividade
<b>LA</b>	Leucemia aguda
<b>LCT</b>	Lisados celulares totais
<b>LEAT</b>	Laboratório Estrutura e Atividade
<b>LLA</b>	Leucemia linfoblástica aguda
<b>LMA</b>	Leucemia mieloide aguda
<b>LOEH</b>	Laboratório de Oncologia Experimental e Hemopatias
<b>LPA</b>	Leucemia promielocítica aguda
<b>M</b>	Mitose
<b>MAMP</b>	Padrões moleculares associados a microorganismos
<b>MDR</b>	Proteínas de resistência a múltiplos fármacos
<b>MM</b>	Mieloma múltiplo
<b>MO</b>	Medula óssea
<b>MTT</b>	Brometo de 3-(4,5-dimetil-2-tiazolil)-2,5-difenil-2H-tetrazólio
<b>NFκB</b>	Fator nuclear Kappa B
<b>NK</b>	<i>Natural killers</i>
<b>OMS</b>	Organização Mundial da Saúde
<b>PARP</b>	<i>Poly-ADP-Ribose Polymerase</i>
<b>Pb</b>	Pares de base
<b>PBS</b>	Tampão fosfato
<b>PERK</b>	<i>PKR-like endoplasmic reticulum kinase</i>
<b>PI</b>	Iodeto de propídio
<b>PML</b>	<i>Promyelocytic leukemia protein</i>
<b>RE</b>	Reticulo endoplasmático
<b>RFP</b>	Proteína fluorescente vermelha
<b>RNA</b>	Ácido ribonucleico



<b>RNAse</b>	Ribonuclease
<b>RPMI</b>	<i>Roswell Park Memorial Institute</i>
<b>S</b>	Síntese
<b>SBF</b>	Soro bovino fetal
<b>SL-ICc</b>	Células iniciadoras de leucemia
<b>SMAC</b>	<i>Second Mitochondria-derived Activator of Caspases/Direct IAP</i>
<b>SNC</b>	Sistema nervoso central
<b>SP</b>	Sangue periférico
<b>SSC</b>	<i>Side Scatter</i>
<b>TCLE</b>	Termo de consentimento livre e esclarecido
<b>tBid</b>	Bid truncado
<b>TNF</b>	Fator de necrose tumoral
<b>TRADD</b>	<i>TNF Receptor-Associated Death Domain</i>
<b>TRAIL-R</b>	<i>TNF-related apoptosis-inducing ligand receptor</i>
<b>TUDC</b>	Tauroursodeoxicolato
<b>UPR</b>	<i>Unfolded protein response</i>
<b>WB</b>	<i>Western blot</i>



## SUMÁRIO

<b>1 INTRODUÇÃO .....</b>	<b>27</b>
<b>2 OBJETIVOS .....</b>	<b>29</b>
2.1 OBJETIVO GERAL .....	29
2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS .....	29
<b>3 REVISÃO DA LITERATURA.....</b>	<b>31</b>
3.1 ASPECTOS GERAIS DO CÂNCER .....	31
3.2 LEUCEMIAS AGUDAS .....	32
3.3 TERAPIAS ANTILEUCÊMICAS .....	36
3.4 COMPOSTOS DE ORIGEM NATURAL COMO FONTE DE NOVOS QUIMIOTERÁPICOS .....	40
3.5 CHALCONAS: NOVAS ESTRATÉGIAS TERAPÊUTICAS .....	42
3.6 REGULAÇÃO DA MORTE CELULAR E POSSÍVEIS ALVOS TERAPÊUTICOS .....	45
<b>3.6.1 O papel do retículo endoplasmático (RE) na regulação         celular .....</b>	<b>47</b>
<b>3.6.2 A produção de espécies reativas de oxigênio (EROS) ...</b>	<b>48</b>
<b>3.6.3 Modulação e bloqueio do ciclo celular .....</b>	<b>50</b>
<b>3.6.4 Apoptose .....</b>	<b>53</b>
<b>4 MATERIAIS E MÉTODOS .....</b>	<b>61</b>
4.1 DESENHO EXPERIMENTAL PARA AS CHALCONAS .....	61
(continua) .....	61
4.2 DESENHO EXPERIMENTAL PARA O COMPOSTO GE1 .....	63
4.3 REAGENTES E ANTICORPOS .....	64
4.4 COMPOSTOS INVESTIGADOS .....	65
<b>4.4.1 Síntese química das chalconas.....</b>	<b>65</b>
<b>4.4.2 Isolamento do acetato de miconidina (GE1) .....</b>	<b>66</b>
4.5 LINHAGENS CELULARES E CULTIVO CELULAR .....	66
4.6 ENSAIOS DE VIABILIDADE CELULAR E DETERMINAÇÃO DAS CURVAS CONCENTRAÇÃO E TEMPO RESPOSTA .....	68
4.7 CÁLCULO DO ÍNDICE DE SELETIVIDADE (IS) .....	69
4.8 AVALIAÇÃO DO EFEITO DOS COMPOSTOS EM CÉLULAS DE SP .....	70
<b>4.8.1 Obtenção das células mononucleadas de indivíduos         saudáveis.....</b>	<b>70</b>
<b>4.8.2 Teste de hemólise .....</b>	<b>70</b>
4.9 AVALIAÇÃO DO CICLO CELULAR.....	71
4.10 DETERMINAÇÃO DO TIPO DE MORTE CELULAR .....	72

<b>4.10.1 Avaliação das alterações morfológicas por microscopia de fluorescência com BE/AO</b> .....	72
<b>4.10.2 Avaliação da exposição dos resíduos de fosfatidilserina pelo método da Anexina V-FITC</b> .....	72
<b>4.10.3 Fragmentação do DNA em gel de agarose</b> .....	73
4.11 AVALIAÇÃO DO POTENCIAL MITOCONDRIAL .....	73
4.12 OBSERVAÇÃO DA MORFOLOGIA MITOCONDRIAL POR MICROSCOPIA CONFOCAL APÓS TRANSFEÇÃO DE MITO-RFP COM LIPOFECTAMINA .....	74
4.13 AVALIAÇÃO DA PRODUÇÃO DE EROS .....	74
4.14 AVALIAÇÃO DA EXPRESSÃO DAS PROTEÍNAS BAX, BCL-2, FASR, AIF, SURVIVINA, KI-67 E PML POR CITOMETRIA DE FLUXO .....	75
4.15 AVALIAÇÃO DA EXPRESSÃO DAS PROTEÍNAS BAX, BAK, BCL-2, BCL-XL, CASPASE-3, PARP E BID POR WB .....	76
4.16 FRACIONAMENTO CELULAR .....	76
4.17 PRÉ TRATAMENTO COM CICLOHEXIMIDA .....	77
4.18 INIBIÇÃO DA VIA EXTRÍNSECA POR SUPEREXPRESSÃO DE C-FLIP .....	78
4.19 INIBIÇÃO DE CASPASE-8 COM O INIBIDOR Z-IETD-FMK .....	78
4.20 AVALIAÇÃO DA INDUÇÃO DE ESTRESSE NO RE .....	78
4.21 AVALIAÇÃO DA MORTE CELULAR IMONOGÊNICA .....	79
4.22 TRATAMENTO ASSOCIADO COM OS QUIMIOTERÁPICOS CITARABINA E VINCRISTINA .....	79
4.23 ANÁLISE ESTATÍSTICA .....	80
<b>5 RESULTADOS COM AS CHALCONAS SINTÉTICAS</b> .....	<b>81</b>
5.1 TRIAGEM DAS CHALCONAS SINTÉTICAS .....	81
5.2 INVESTIGAÇÃO DO EFEITO CITOTÓXICO DAS CHALCONAS JA3 E JA7 EM CÉLULAS NEOPLÁSICAS .....	84
<b>5.2.1 Efeito citotóxico das chalconas JA3 e JA7 sobre células de linhagens de LA</b> .....	<b>84</b>
<b>5.2.2 Efeito citotóxico das chalconas JA3 e JA7 sobre células de linhagem de MM</b> .....	<b>87</b>
<b>5.2.3 Efeito citotóxico das chalconas JA3 e JA7 sobre linhagens de tumores sólidos</b> .....	<b>88</b>
<b>5.2.3 Efeito citotóxico das chalconas JA3 e JA7 sobre células-tronco tumorais</b> .....	<b>91</b>

5.3. INVESTIGAÇÃO DO EFEITO CITOTÓXICO DAS CHALCONAS JA3 E JA7 SOBRE CÉLULAS NÃO NEOPLÁSICAS .....	91
<b>5.3.1 Efeito citotóxico das chalconas JA3 e JA7 sobre células de linhagens não neoplásicas .....</b>	<b>91</b>
<b>5.3.2 Cálculo do Índice de Seletividade (IS) .....</b>	<b>93</b>
<b>5.3.3 Efeito citotóxico das chalconas JA3 e JA7 em células mononucleadas de SP .....</b>	<b>94</b>
<b>5.3.4 Efeito das chalconas JA3 e JA7 sobre eritrócitos de SP</b>	<b>94</b>
5.4 INVESTIGAÇÃO DO EFEITO DAS CHALCONAS JA3 E JA7 SOBRE O CICLO CELULAR DE CÉLULAS K562 E JURKAT .	95
<b>5.4.1 Efeito das chalconas JA3 e JA7 sobre as fases do ciclo celular .....</b>	<b>95</b>
<b>5.4.2 Efeito das chalconas JA3 e JA7 sobre a expressão das proteínas KI-67 e PML .....</b>	<b>97</b>
5.5 INVESTIGAÇÃO DO EFEITO DAS CHALCONAS JA3 E JA7 NA INDUÇÃO DA APOPTOSE NAS LINHAGENS K562 E JURKAT .....	98
5.6 INVESTIGAÇÃO DO EFEITO DAS CHALCONAS JA3 E JA7 NAS MITOCÔNDRIAS DE CÉLULAS K562 E JURKAT .....	100
<b>5.6.1 Efeito das chalconas JA3 e JA7 sobre a liberação de fatores apoptóticos pela mitocôndria .....</b>	<b>102</b>
<b>5.6.2 Efeito das chalconas JA3 e JA7 sobre a produção de EROS .....</b>	<b>104</b>
5.7 INVESTIGAÇÃO DO EFEITO DAS CHALCONAS JA3 E JA7 NA EXPRESSÃO DE PROTEÍNAS DA FAMÍLIA BCL-2 EM CÉLULAS K562 E JURKAT .....	105
5.8 INVESTIGAÇÃO DO EFEITO DAS CHALCONAS JA3 E JA7 NA VIA EXTRÍNSECA DA APOPTOSE EM CÉLULAS K562 E JURKAT .....	108
5.9 INVESTIGAÇÃO DO EFEITO DAS CHALCONAS JA3 E JA7 NA VIA COMUM DA APOPTOSE EM CÉLULAS K562 E JURKAT .....	113
5.10 ENVOLVIMENTO DO EFEITO DAS CHALCONAS JA3 E JA7 NO ESTRESSE DO RE EM CÉLULAS K562 E JURKAT ..	114
5.11 INVESTIGAÇÃO DO EFEITO DAS CHALCONAS JA3 E JA7 NA MORTE CELULAR IMUNOGÊNICA EM CÉLULAS K562 E JURKAT .....	116
5.12 EFEITO DA ASSOCIAÇÃO DAS CHALCONAS JA3 E JA7 COM OS QUIMIOTERÁPICOS CITARABINA E VINCRISTINA NA MORTE DAS CÉLULAS K562 E JURKAT .....	117

<b>6 RESULTADOS COM O COMPOSTO GE1 (ACETATO DE MICONIDINA)</b> .....	<b>120</b>
6.1 EFEITO CITOTÓXICO DE GE1 SOBRE CÉLULAS DE NEOPLASIAS HEMATOLÓGICAS.....	120
6.2 EFEITO CITOTÓXICO DO COMPOSTO GE1 SOBRE CÉLULAS DE TUMORES SÓLIDOS .....	121
6.3 EFEITO CITOTÓXICO DO COMPOSTO GE1 SOBRE CÉLULAS-TRONCO TUMORAIS.....	122
6.4 EFEITO CITOTÓXICO DO COMPOSTO GE1 SOBRE CÉLULAS NÃO NEOPLÁSICAS.....	122
6.5 IS EM RELAÇÃO A CÉLULAS DE LA .....	124
6.5 EFEITO DO COMPOSTO GE1 NO CICLO CELULAR DE CÉLULAS K562 E JURKAT .....	124
6.6 EFEITO DO COMPOSTO GE1 NA INDUÇÃO DA APOPTOSE EM CÉLULAS K562 E JURKAT.....	126
6.7 EFEITO DO COMPOSTO GE1 NAS MITOCÔNDRIAS DE CÉLULAS K562 E JURKAT .....	127
6.8 EFEITO DO COMPOSTO GE1 NA PRODUÇÃO DE EROS EM CÉLULAS K562 E JURKAT .....	128
6.9 EFEITO DO COMPOSTO GE1 NAS VIAS DE APOPTOSE EM CÉLULAS K562 E JURKAT .....	129
6.10 EFEITO DA ASSOCIAÇÃO DO COMPOSTO GE1 COM OS QUIMIOTERÁPICOS CITARABINA E VINCRISTINA .....	130
<b>7 DISCUSSÃO</b> .....	<b>132</b>
<b>8 CONCLUSÕES</b> .....	<b>156</b>
<b>9 PERSPECTIVAS</b> .....	<b>160</b>
<b>REFERÊNCIAS</b> .....	<b>162</b>
<b>APÊNDICE 1 – Estrutura química das chalconas</b> .....	<b>183</b>
<b>APÊNDICE 2 – Parecer do Comitê de Ética em Pesquisa com Seres Humanos da Universidade Federal de Santa Catarina</b> .....	<b>189</b>

## 1 INTRODUÇÃO

“Câncer” é um termo utilizado para um grupo de doenças caracterizadas pela presença de células anormais que se multiplicam rapidamente e que podem invadir tecidos e órgãos adjacentes e causar metástase. Segundo a Organização Mundial da Saúde (OMS), os cânceres ou neoplasias malignas encontram-se entre as principais causas de morbidade e mortalidade no mundo, com 14 milhões de novos casos no ano de 2012 e 8,8 milhões de mortes em 2015. Nas próximas duas décadas, espera-se um aumento mundial de 70 % no número de novos casos de câncer (STEWART; WILD, 2014, SIEGEL; MILLER; JEMAL, 2016). No Brasil são esperados para o ano de 2017 aproximadamente 600 mil novos casos (INCA, 2015).

As leucemias agudas (LAs) são doenças do sistema hematopoiético caracterizadas por um bloqueio na diferenciação celular e pela proliferação descontrolada de células progenitoras anormais na medula óssea (MO) e/ou no sangue periférico (SP) (SWERDLOW et al, 2008; ARBER et al., 2016). As LAs são as causas mais frequentes de câncer em crianças, adolescentes e jovens adultos, com alta incidência também em pacientes acima de 60 anos de idade (STEWART; WILD, 2014). No ano de 2012, foram estimados cerca de 350 mil novos casos e 265 mil óbitos por leucemia no mundo. Somente no Brasil, espera-se para 2017 o surgimento de 10.070 novos casos (STEWART; WILD, 2014, INCA, 2015).

Apesar do aumento significativo na compreensão fisiopatológica das neoplasias hematológicas e do surgimento de novas estratégias terapêuticas, a maioria dos casos de LA permanece incurável (VILLALBA, et al., 2014; VASEKAR et al., 2016). A quimioterapia com fármacos citotóxicos e citostáticos ainda é a principal opção de tratamento. Embora a quimioterapia resulte em altas taxas de remissão na fase inicial da doença, o prognóstico é comprometido pela frequência de recidivas (VASEKAR et al., 2016) e a sobrevida global a longo prazo continua baixa (GROVE; VASSILOU, 2014, SIEGEL; MILLER; JEMAL, 2016). Além disso, os agentes quimioterápicos disponíveis na atualidade são altamente citotóxicos para células não neoplásicas, o que resulta em uma série de efeitos adversos que comprometem a qualidade de vida do paciente (HOIJAT-FARSANGI, 2015).

Considerando o prognóstico desfavorável e o aumento da expectativa de vida em países em desenvolvimento, os quais são

responsáveis por 70 % dos novos casos de câncer, as LAs tornaram-se um importante problema de saúde pública (RODRIGUES; FERREIRA, 2010, STEWART; WILD, 2014). Sabe-se que a prevenção e o tratamento das LAs exigem abordagens multifatoriais e elevados recursos financeiros. Assim, um número crescente de pesquisadores e companhias farmacêuticas têm se empenhado na busca por substâncias biologicamente ativas de origem natural ou sintética que possam vir a se tornar novas terapias antitumorais. O objetivo destes estudos é encontrar novos compostos antineoplásicos que tenham uma maior especificidade na indução de morte em células tumorais, com efeitos adversos mínimos para o paciente (KOSIOR; LEWANDOWSKA-GRYGIEL; GIANNOPOULOS, 2011).

Nesse contexto, o Laboratório de Oncologia Experimental e Hemopatias (LOEH) tem estudado o efeito citotóxico de diferentes classes de compostos de origem natural, sintética e semissintética e, dessa forma, contribui com a investigação de novos quimioterápicos. Estudos prévios realizados no laboratório demonstraram o efeito citotóxico de chalconas derivadas do 1-naftaldeído e do 2-naftaldeído (MAIORAL et al., 2013, MAIORAL et al., 2016, MAIORAL et al., 2017) e, a partir da estrutura desses e de outros compostos semelhantes, 70 novas chalconas foram sintetizadas. Ademais, considerando a importância de produtos de origem natural como protótipo para o desenvolvimento de novos fármacos, o LOEH vem investigando o efeito citotóxico e os mecanismos de ação de compostos isolados da espécie *Eugenia hiemalis* Cambessèdes (Mirtaceae), destacando-se o acetato de miconidina (3-metoxi-4-acetoxi-5-npentil-fenol), denominado, no laboratório, de **GE1**.

Assim, o alvo do presente estudo é a busca por novos compostos com efeito citotóxico sobre células leucêmicas que induzam morte celular sem apresentar citotoxicidade significativa em células não neoplásicas, bem como o estudo dos seus principais mecanismos de ação.



## 2 OBJETIVOS

### 2.1 OBJETIVO GERAL

Avaliar o efeito citotóxico de 70 chalconas sintéticas e do composto natural acetato de miconidina (**GE1**), uma quinona isolada de *E. hiemalis*, sobre diferentes linhagens tumorais e investigar os principais mecanismos envolvidos na morte induzida pelos compostos mais efetivos em células de leucemias agudas humanas.

### 2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Realizar a triagem de 70 chalconas sintéticas inéditas derivadas do aldeído do pireno, da acetofenona do antraceno, do aldeído do antraceno, da acetofenona bifênil e do aldeído bifênil em células de leucemia mieloide aguda K562.
- Selecionar as chalconas com maior atividade citotóxica e determinar sua resposta em relação à concentração e ao tempo de incubação em seis linhagens de leucemias humanas: K562, Jurkat, U937, Kasumi, HL-60 e CEM; e em uma linhagem de mieloma múltiplo MM-1S.
- Investigar a capacidade das chalconas selecionadas de induzir morte celular em tumores não hematológicos utilizando, como modelo, as seguintes linhagens de tumores sólidos: HT-29, MDA-MB-231, SSC-25, A549, HeLa e U251.
- Avaliar o efeito citotóxico das chalconas selecionadas sobre células de linhagem de células-tronco tumorais U251NS.
- Avaliar o efeito citotóxico das chalconas selecionadas sobre as linhagens celulares não neoplásicas L929, NIH/3T3 e MRC-5 e sobre células de sangue periférico de indivíduos saudáveis.
- Analisar o efeito das chalconas selecionadas no ciclo celular e na expressão das proteínas KI-67 e PML em células K562 e Jurkat.
- Verificar se as chalconas selecionadas causam morte celular por apoptose nas células K562 e Jurkat.
- Avaliar o efeito das chalconas selecionadas sobre as mitocôndrias de células K562 e Jurkat e sobre a produção de espécies reativas de oxigênio.
- Investigar se o efeito citotóxico das chalconas selecionadas sobre as células K562 e Jurkat envolve os seguintes fatores

reguladores de apoptose: proteínas antiapoptóticas Bcl-2 e Bcl-xL, proteínas pró-apoptóticas Bax e Bak, receptor Fas, fator indutor de apoptose (AIF), citocromo *c*, endonuclease G, SMAC, survivina, caspase-3 e PARP.

- Avaliar se a morte celular induzida pelas chalconas selecionadas envolve a produção de estresse no retículo endoplasmático e a expressão de marcadores de morte celular imunogênica.
- Verificar o efeito da associação das chalconas selecionadas com os quimioterápicos citarabina e vincristina.
- Determinar a citotoxicidade do composto natural **GE1** sobre as linhagens de leucemia aguda K562 e Jurkat, sobre a linhagem de mieloma múltiplo MM-1S, sobre as linhagens de tumores sólidos HT-29, HeLa e U251 e sobre a linhagem de célula-tronco tumoral U251NS.
- Avaliar o efeito citotóxico do composto **GE1** sobre células não neoplásicas L929, e sobre células de sangue periférico de indivíduos saudáveis.
- Analisar o efeito do composto **GE1** no ciclo celular e na expressão das proteínas KI-67 e PML em células K562 e Jurkat.
- Verificar se o composto **GE1** causa morte celular por apoptose em células K562 e Jurkat.
- Avaliar o efeito do composto **GE1** sobre as mitocôndrias de células K562 e Jurkat e sobre a produção de espécies reativas de oxigênio.
- Investigar se o efeito citotóxico do composto **GE1** sobre as células K562 e Jurkat envolve os seguintes fatores reguladores de apoptose: proteínas antiapoptóticas Bcl-2 e Bcl-xL, proteínas pró-apoptóticas Bax e Bak, receptor Fas, fator indutor de apoptose (AIF), citocromo *c*, endonuclease G, survivina, caspase-3 e PARP.
- Verificar o efeito da associação do composto **GE1** com os quimioterápicos citarabina e vincristina.

### 3 REVISÃO DA LITERATURA

#### 3.1 ASPECTOS GERAIS DO CÂNCER

O termo “câncer” foi originalmente utilizado por Hipócrates no século IV a.C. e tem origem no termo latino “karkinos” que significa “caranguejo”. Esse nome seria uma maneira de diferenciar o câncer, ou neoplasia maligna, dos tumores benignos. Isso porque, enquanto esses últimos formam massas compactas e bem delimitadas, o câncer apresenta um alto potencial invasivo e a capacidade de se espalhar pelo organismo de forma análoga às garras de um caranguejo (RETIEF; CILLIERS, 2011; STRONG, 2015).

O processo de surgimento do câncer (carcinogênese) é dividido em três fases. A primeira, ou Iniciação, envolve uma mutação que pode ser herdada da linhagem germinativa ou adquirida por fatores ambientais. Na segunda fase, ou Promoção, a célula mutada sofre a ação de agentes oncopromotores, como protooncogenes promotores do crescimento celular, genes supressores de tumor, genes que regulam a morte celular programada e genes de reparo ao DNA (SCHREIBER; OLD; SMYTH, 2011). Essas células alteradas passam a se comportar de maneira desordenada, multiplicando-se descontroladamente. Assim, na última etapa, ou Progressão, ocorre o crescimento da massa tumoral e a migração para outros tecidos, ocasionando metástases (WINBERG, 2010).

Em termos gerais, as neoplasias malignas podem ser divididas em duas categorias: tumores sólidos e tumores hematológicos. Os tumores sólidos são caracterizados pela formação de massas celulares neoplásicas em tecidos previamente íntegros, e podem ser classificados em carcinomas, quando originados em tecidos glandular e de revestimento; e sarcomas, quando originados em tecidos conectivos como músculos, ossos e gordura (SIDOW; SPIES, 2015). Os tumores hematológicos são aqueles originados na MO e/ou nos linfonodos em decorrência de alterações na hematopoiese normal, e são divididos em leucemias, linfomas e mielomas. Dentre todos os novos casos de câncer diagnosticados anualmente, os tumores hematológicos estão entre os mais prevalentes (SMITH et al., 2011, HU; SHILATIFARD, 2016). Os principais marcadores das neoplasias malignas estão descritos na Figura 1.

Figura 1 - Marcadores de câncer



Adaptado de: HANAHAN; WEINBERG, 2011.

### 3.2 LEUCEMIAS AGUDAS

As leucemias são neoplasias do sistema hematopoiético caracterizadas por uma proliferação descontrolada de células hematopoiéticas anormais que podem se acumular na MO e/ou no SP, invadir outros tecidos e causar metástase. A proliferação do clone leucêmico pode surgir em diferentes fases de diferenciação dos precursores linfóides e mielóides, o que caracteriza esse tipo de neoplasia como uma doença heterogênea do ponto de vista biológico e morfológico (SWERDLOW et al., 2008, MARIANI; CABRETA, 2014, HU; SHILATIFARD, 2016).

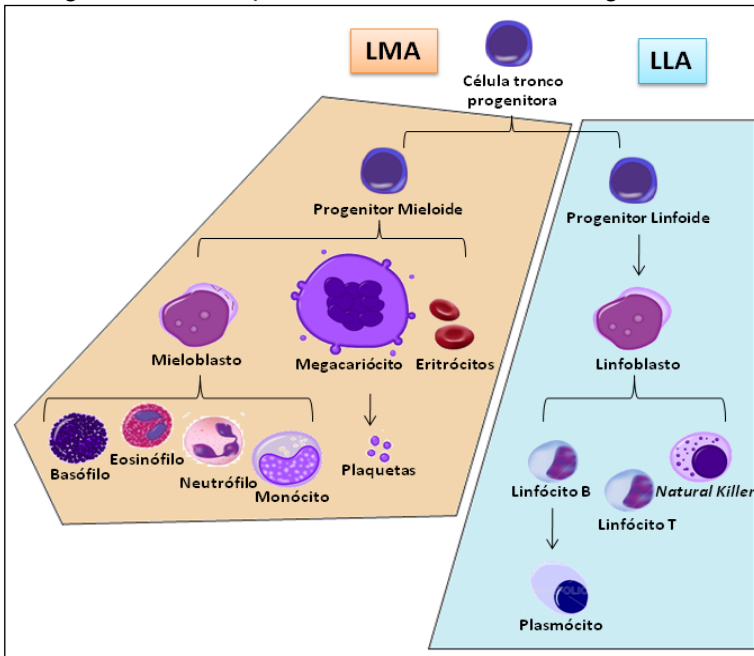
As leucemias podem ser divididas de acordo com a linhagem celular acometida e com o grau de maturação das células afetadas. Assim, segundo a linhagem celular, as leucemias são divididas em mielóides ou linfóides. Nas leucemias mielóides a mutação responsável pela formação do clone leucêmico tem origem em células comprometidas com a linhagem mieloide, as quais, em situações normais, dariam origem aos granulócitos, monócitos, eritrócitos e plaquetas. As leucemias linfóides, por sua vez, se originam de mutações

em células comprometidas com a linhagem linfóide e que, normalmente, originariam os linfócitos B e T e as células *Natural Killers* (NK) (BAIN, 2007, STEWART; WILD, 2014). As leucemias podem ser divididas também de acordo com o estágio de maturação dos precursores afetados em agudas ou crônicas. As leucemias crônicas caracterizam-se pela presença de células que mantêm a capacidade de maturação (BAIN, 2007; VARDIMAN et al., 2010), enquanto que nas LAs há um bloqueio na diferenciação hematopoiética normal que leva à proliferação clonal de células progenitoras (BAIN, 2007; PUI, 2009; SWERDLOW et al., 2008; VARDIMAN, 2010) (Figura 2).

O surgimento de um processo leucêmico está relacionado a uma série de aberrações cromossômicas e mutações somáticas adquiridas que irão determinar os aspectos clínicos e biológicos da doença (REINICH et al., 2015). A classificação atual, proposta pela OMS em 2008 e revisada em 2016, envolve informações morfológicas, citoquímicas, imunofenotípicas e genéticas associadas às características clínicas. Segundo a OMS, a leucemia linfoblástica aguda (LLA) é resultante de múltiplas mutações em uma única célula progenitora linfóide. Além de se agruparem na MO, os linfoblastos podem se acumular em sítios extramedulares, especialmente em órgãos hematopoiéticos secundários e meninges. A LLA é a forma mais frequente de câncer em crianças e representa cerca de 25 % dos diagnósticos de câncer em crianças abaixo dos 15 anos de idade. Em adultos, a LLA é menos frequente e, geralmente, apresenta um pior prognóstico. A sobrevivência geral, por mais de cinco anos, ocorre em, aproximadamente, 40 % dos pacientes acometidos com a doença (SWERDLOW et al., 2008; SWERDLOW et al., 2016, SIEGEL; MILLER; JEMAL, 2016).

A leucemia mieloide aguda (LMA) inclui as neoplasias que envolvem a linhagem granulocítica (SWERDLOW et al., 2008) e geralmente afeta primariamente a MO e, em menor grau, os órgãos hematopoiéticos secundários. Diferente das LLAs, as LMAs são mais frequentes em adultos, principalmente naqueles com mais de 60 anos de idade, faixa etária que apresenta o pior prognóstico devido a maior incidência de anormalidades genéticas desfavoráveis (CORNELL; PALMER, 2012, WEINBERG et al., 2009). Como consequência, apenas cerca de 27 % dos pacientes com LMA sobrevivem após cinco anos do diagnóstico (SIEGEL; MILLER; JEMAL, 2016).

Figura 2 - Classificação das LAs de acordo com a linhagem afetada.



As LAs são divididas em LMA, quando há o comprometimento da linhagem mieloide, e LLA quando há o comprometimento da linhagem linfóide. Fonte: MAIORAL, 2013.

Nas últimas décadas, estudos demonstram que as LAs, semelhante a outras neoplasias malignas, não são formadas por uma população homogênea de células, mas sim por uma mistura heterogênea de células tronco-tumorais, que mantêm a doença, e células ligeiramente mais diferenciadas (LANG; WOJCIK; RIEGER, 2015, HU; SHILATIFARD, 2016). As células-tronco tumorais, presentes em tumores sólidos e hematológicos, apresentam características semelhantes a células-tronco normais, como a capacidade de autorrenovação e diferenciação celular. Essas células são altamente tumorigênicas, podem sobreviver e, em geral, persistir nos tumores por um longo período de tempo e são responsáveis por causar recidivas e metástase pela geração de novos tumores (KHAN et al., 2015, BABASHAH, 2015, WANG et al., 2017). Segundo a literatura, as células-tronco tumorais compreendem pequenas populações,

normalmente não mais do que 25 % das células tumorais totais (TAKEBE et al., 2015).

Estudos que sugerem a heterogeneidade das LAs datam da década de 70 (MOORE; WILLIAMS; METCALF, 1973). Segundo Bonnet e Dick (1997), os blastos leucêmicos possuem uma capacidade de proliferação limitada, o que sugere a existência de uma subpopulação de células-tronco tumorais com alta capacidade de proliferação e potencial de autorrenovação responsável pela manutenção da doença. Apesar de as células progenitoras mais diferenciadas possuírem a capacidade de autorrenovação, apenas as células-tronco leucêmicas seriam capazes de manter essa característica por um número de divisões sucessivas suficiente para manter um clone imortal (TESTA, 2011). Inicialmente, acreditava-se que esta subpopulação era formada pelas unidades formadoras de colônia de LMA ou LLA (CFU-LMA ou CFU-LLA), que correspondem a 1 % das células leucêmicas. Porém foi demonstrado a existência de um grupo de células chamadas SL-ICc (*leukemia-initiating cells*) encontradas na frequência de  $1 \times 10^6$  blastos leucêmicos, capazes de repopular, a longo prazo, o sistema hematopoiético de camundongos imunodeficientes, induzindo uma nova e heterogênea leucemia (HOPE; JIN; DICK, 2004; MARIANI; CALABRETTA, 2014). O isolamento dessas células consiste na separação das frações celulares segundo a expressão de antígenos de membrana CDs (*cluster of differentiation*). Foi observado que as células SL-ICs são CD34+/CD38-, enquanto que as CFUs são CD34+/CD38+. Assim, acredita-se que o clone leucêmico seja originado hierarquicamente das células tronco leucêmicas SC-ICs, que originam as CFU-LLA e CFU-LMA, as quais, por sua vez, originam os blastos leucêmicos (HOPE; JIN; DICK, 2004; MARIANI; CALABRETTA, 2014, TAKEBE et al., 2015, WANG et al., 2017).

A caracterização das células-tronco leucêmicas é fundamental para a compreensão dos mecanismos celulares e moleculares envolvidos na leucemogênese. Clinicamente, a existência dessa população celular implica que a remissão completa da doença e a cura a longo prazo só pode ser atingida quando estas células forem eliminadas (MOSNA; CAPELLI; GOTTARDI, 2017). Isso explicaria porque um quimioterápico que parece altamente efetivo no início do tratamento mostra-se ineficaz quando o paciente sofre recidiva. As células-tronco leucêmicas contribuem para a geração de subclones, persistência de doença residual mínima, resistência ao tratamento, altas taxas de recidivas e pior prognóstico (WANG et al., 2017). Suas características de resistência à apoptose, relativa quiescência, autorrenovação e

aumento de bombas de efluxo requerem uma abordagem diferenciada das terapias convencionais, pois as mesmas são mais resistentes a quimioterapia e radioterapia tradicional (MARIANI; CALABRETTA, 2014, KHAN et al., 2015, LANG; WOJCIK; RIEGER, 2015, REINISCH et al., 2015; TAKEBE et al., 2015).

### 3.3 TERAPIAS ANTILEUCÊMICAS

Mesmo considerando os grandes avanços nas pesquisas básicas e clínicas, o câncer continua sendo uma das principais causas de mortalidade mundial (HOIJAT-FARSANGI, 2015). O tratamento para pacientes com LAs continua sendo um desafio para a comunidade científica, pois o prognóstico geralmente é comprometido pela frequência de recidivas ou pela dificuldade de tratamento da doença refratária (VASEKAR et al., 2015; BOSE; GRANT, 2015, HOIJAT-FARSANGI, 2015, MOSNA; CAPELLI; GOTTARDI, 2017).

O esquema padrão de combate às LAs costuma ser uma ação combinada de diferentes fármacos citotóxicos administrados de forma sistêmica. A quimioterapia tem como alvo inibir a proliferação celular, promover a morte e/ou induzir a diferenciação celular, com o objetivo de eliminar o clone leucêmico da MO e restaurar a hematopoiese normal (VASEKAR et al., 2015). O conceito de associação terapêutica apresenta benefícios à sobrevida do paciente, pois se baseia no potencial sinérgico ou aditivo de dois ou mais compostos. A associação de diferentes fármacos, utilizando dosagens menores do que aquelas consideradas efetivas para cada um deles, é uma estratégia para induzir a morte celular de forma mais efetiva em células tumorais e aumentar a eficácia terapêutica. Esse recurso é eficaz para retardar, minimizar ou evitar a resistência ao tratamento e também para diminuir os efeitos adversos decorrentes das terapias isoladas (FUSO et al., 2016).

Atualmente, o tratamento para as LMAs é constituído de duas fases: a quimioterapia de indução e a terapia de pós-remissão. Para as LLAs, o tratamento, em geral, é dividido em fase de indução, terapia de consolidação, profilaxia e/ou tratamento do sistema nervoso central (SNC) e transplante de células tronco. A primeira fase, de indução, tem como objetivo alcançar a remissão completa, a qual é definida como a ausência de manifestações extramedulares, valores hematológicos normais no SP, menos de 5% de blastos na MO e ausência de fenótipos leucêmicos. A segunda fase, chamada de consolidação ou pós-remissão, tem o propósito de manter esta remissão e de eliminar as células leucêmicas residuais que possam levar o paciente à recidiva. A fase de



manutenção, que pode durar de um a dois anos após a fase anterior, tem como objetivo reforçar o efeito alcançado nas fases anteriores e prevenir recidivas. A profilaxia e/ou tratamento do SNC, realizada nos casos de LLA, objetiva eliminar as células leucêmicas de locais que não são facilmente alcançados pelos quimioterápicos de uso sistêmico devido à presença da barreira hematoencefálica. O transplante de MO é utilizado apenas em alguns casos, como, por exemplo, em pacientes com alterações genéticas de risco desfavorável, e visa aumentar a sobrevida a longo prazo e as chances de cura do paciente (CORNELL; PALMER, 2012).

O protocolo de tratamento mais utilizado em pacientes portadores de LMA é o *British Committee for Standards in Haematology* (BCSH), utilizado há 40 anos, o qual recomenda o uso combinado de citarabina com uma antraciclina (em geral, metoxantrona ou daunorrubicina) (BOSE; GRANT, 2015). O primeiro fármaco (citarabina ou citosina arabinosídeo) é um análogo da citidina com uma molécula de açúcar modificada (arabinose ao invés de ribose) que, ao sofrer as mesmas reações de fosforilação do nucleosídeo natural na célula alvo, é convertido a sua forma trifosfato, o qual compete com a citidina para incorporação no DNA. Depois de incorporada, ela impede a replicação do material genético durante a fase S do ciclo celular e também inibe a DNA polimerase, o que resulta na diminuição da replicação e da reparação do DNA. As antraciclinas inibem a síntese de DNA e a transcrição de RNA em proteínas pela modulação da ação da topoisomerase II, cuja atividade está aumentada em células proliferativas (SZWED et al., 2014, SAULTZ; GARZON, 2016).

O tratamento de pacientes portadores de LLA segue o protocolo AIEOP-BFM-LLA-2009, baseado no *Berlin-Frankfurt-Münster* (BFM). Em linhas gerais, os protocolos de tratamento recomendam diferentes combinações dos fármacos vincristina, prednisona e uma antraciclina. Em alguns protocolos, são ainda utilizados os fármacos ciclofosfamida e asparaginase (DEANGELO et al., 2015). A vincristina, um alcaloide da vinca, atua pela ligação com a tubulina, e, dessa forma, inibe a polimerização dos microtúbulos, o que resulta no impedimento da formação do fuso mitótico e no bloqueio da divisão celular na metáfase (CHAO et al., 2015, HAVERKAMP et al., 2015). A prednisona é um fármaco imunomodulador que induz a diferenciação celular e estimula a apoptose em células tumorais. A ciclofosfamida, por meio dos seus metabólitos ativos, se liga ao DNA, inibindo sua replicação e iniciando a morte celular. A asparaginase hidrolisa a L-asparagina à ácido L-aspártico e amônia nas células

leucêmicas, o que resulta na depleção de asparagina (aminoácido essencial) e provoca a inibição da síntese proteica e interrupção do ciclo celular (PUI; EVANS, 2006; BASSAN; HOELZER, 2011).

Para que o paciente entre em remissão completa, o tratamento das LAs costuma ser bastante agressivo, pois a remissão parcial não oferece benefícios à sobrevida e as recidivas costumam ser frequentes (VASEKAR et al., 2015). Apesar de cerca de 80% dos pacientes atingirem a remissão completa na fase de indução, a maioria dos pacientes sofre recidiva e a cura ou mesmo remissões prolongadas são incomuns, principalmente naqueles pacientes com idade superior a 60 anos (GROVE; VASSILOU, 2014; SEVAN; OZCAL, 2015).

A sobrevida das células leucêmicas após a remissão completa durante a quimioterapia pode ter diferentes explicações. A primeira delas está relacionada à expressão de proteínas de resistência a múltiplos fármacos (MDR), que promovem o efluxo de uma grande variedade de substratos químicos para fora da célula. Estas proteínas são responsáveis por grande parte das falhas nos tratamentos com quimioterápicos e estão envolvidas na resistência a uma série de compostos com diferentes estruturas e mecanismos de ação (RUMJANEK; VIDAL; MAIA, 2013). A incapacidade da maior parte dos quimioterápicos em eliminar as células-tronco leucêmicas representa outro importante desafio, pois elas são responsáveis pela manutenção do fenótipo leucêmico. Como estas células são quiescentes, elas não são sensíveis aos quimioterápicos que normalmente têm como alvo as células em divisão (LANCET; KARP, 2010; DORRANCE et al., 2015; KHAN et al., 2015). Outros mecanismos envolvidos na resistência a quimioterapia ainda estão relacionados a distúrbios no ciclo celular (ZHANG et al., 2015).

Outra possibilidade envolvida na sobrevida de células tumorais após a quimioterapia é a existência de efeitos citoprotetores presentes nas células tumorais, como, por exemplo, o aumento da expressão de proteínas antiapoptóticas, como a proteína survivina, e a expressão de proteínas inibidoras das vias de morte celular (PARK et al., 2011; ZHANG et al., 2015). A autofagia também tem sido descrita na literatura como um possível mecanismo citoprotetor (HU et al., 2017). Inicialmente, a presença de autofagossomas em células em processo de morte sugeria que a autofagia poderia ser um mediador primário de morte celular do tipo II (para contrastar com a apoptose que seria do tipo I). No entanto, estudos recentes indicam que distúrbios na autofagia na realidade sensibilizariam células e organismos para agentes tóxicos. De fato, o impedimento da fusão de autofagossomas com os lisossomas,

ou seja, a inibição da autofagia, parece resultar em morte celular por apoptose. A capacidade da autofagia de reduzir a carga mitocondrial e, assim, diminuir a quantidade de moléculas pró-apoptóticas liberadas (como o citocromo *c*) também contribui de forma importante para os efeitos protetores da autofagia (VITALE et al., 2015, ONDREJ et al., 2016, ZHANG et al., 2017).

Assim, apesar de ser o protocolo mais utilizado no tratamento das LAs, a quimioterapia apresenta evidentes limitações de sua efetividade. Além disso, está associada a uma variedade de efeitos adversos, já que tem como princípio atingir células em divisão, independentemente de elas serem normais ou tumorais (HOIJAT-FARSANGI, 2015). Como consequência, a qualidade de vida dos pacientes que fazem uso de quimioterápicos fica seriamente prejudicada e, em muitos casos, a melhora do quadro clínico é ínfima (SURYADEYARA et al., 2015). Por isso, novas formas de tratamento têm sido estudadas como alternativa ou complemento à quimioterapia tradicional. O transplante de MO com células-tronco hematopoéticas foi primeiramente realizado na década de 70 (THOMAS et al., 1979) e tem se mostrado o tratamento antileucêmico mais efetivo, capaz de resultar em uma significativa melhora na sobrevida quando realizado de forma alogênica ou autóloga. Porém, considerando a heterogeneidade clínica, molecular e genética das LAs, o transplante de MO não é indicado para todos os pacientes e complicações relacionadas ao transplante ainda são frequentes (BRISSOT; MOHTY, 2015, MOSNA; CAPELLI; GOTTARDI, 2017).

Nas últimas décadas, a imunoterapia com anticorpos monoclonais contra moléculas específicas da superfície de células tumorais tem se mostrado uma alternativa promissora para o tratamento de leucemias e linfomas (SURYADEYARA et al., 2015, VASEKAR et al., 2015, YU et al., 2017). As tecnologias de sequenciamento do DNA permitem levar em consideração a heterogeneidade das LAs e o desenvolvimento de novos tratamentos baseados em características clínicas, genéticas e moleculares individuais de cada subtipo de LA, ou seja, buscam uma abordagem mais individualizada e tem como alvo mutações específicas. Mais de 97% dos pacientes têm pelo menos uma das mutações mais frequentemente encontradas e várias dessas características moleculares já estão sendo utilizadas para orientar o tratamento (KHALED; AL MALKI; MARCUCCI, 2017). Mais recentemente, a atenção da comunidade científica tem se voltado para as células-tronco leucêmicas, e a erradicação desse tipo celular parece

ser um ponto importante no tratamento de pacientes com LAs (DORRANCE et al., 2015, WANG et al., 2017).

Além das novas abordagens terapêuticas, considerando a dificuldade de tratamento das LAs, as frequentes recidivas e a elevada morbidade dos quimioterápicos disponíveis atualmente, a busca por novos compostos antileucêmicos que tenham maior eficiência em induzir a morte nas células tumorais de forma seletiva, com o mínimo de efeitos adversos para o paciente, é um grande alvo de investigação da indústria farmacêutica e da comunidade científica.

### 3.4 COMPOSTOS DE ORIGEM NATURAL COMO FONTE DE NOVOS QUIMIOTERÁPICOS

As plantas são fontes importantes de produtos naturais biologicamente ativos e são utilizadas em todo o mundo há milhares de anos, muito antes da invenção dos fármacos modernos (WANG; CALWAY; YUAN, 2012). Dentre as substâncias isoladas de plantas, destacam-se os flavonoides, ligninas, terpenos, alcaloides, entre outros (SILVA et al., 2010); muitos dos quais constituem modelos para a síntese de novos fármacos, incluindo novos agentes quimioterápicos (SAFARZADEH; SOTORBANI; BARADARAN, 2014, NEWMAN; CRAGG, 2016).

Segundo a OMS, atualmente 80% da população mundial faz uso da medicina tradicional para a atenção primária à saúde, o que inclui o uso de plantas medicinais (WHO, 2017). De fato, dos 207 fármacos aprovados para o tratamento do câncer até 2014, 77 % são provenientes, direta ou indiretamente, de fontes naturais (NEWMAN; CRAGG, 2016). Dentre os quimioterápicos mais conhecidos obtidos de plantas encontram-se o paclitaxel (Taxol<sup>®</sup>), isolado em 1971 de *Taxus brevifolia* (WANI et al., 1971) e os alcaloides da vinca, presentes em *Catharanthus roseus* (COSTA; HRESHCHYSHYN; HOLLAND, 1962). Alguns quimioterápicos de origem natural usados no tratamento de tumores sólidos e hematológicos estão descritos no Quadro 1.

Quadro 1 - Fármacos derivados de produtos naturais utilizados na terapia do câncer.

FÁRMACO	FONTE	ALVO MOLECULAR	INDICAÇÃO	Referência
<b>Vimblastina</b> <b>Vincristina</b> <b>Vindesina</b> <b>Vinorelbina</b>	<i>Catharanthus roseus</i> (planta)	Tubulina/ Microtúbulo	LLA, câncer de mama, testículo, linfoma de Hodking	CHAO et al., 2015, HAVERKAM P et al., 2015
<b>Paclitaxel</b> <b>Docetaxel</b>	<i>Taxus brevifolia</i> (planta)	Microtúbulo	Câncer de mama e ovário	DRANITSARI S et al., 2015
<b>Etoposídeo</b> <b>Teniposídeo</b>	<i>Podophyllum peltatum</i> (planta) <b>Semissíntese</b>	Topoisomerase II	Câncer de pulmão, ovário, testículo, LLA	EZOE, 2012, HYDER et al., 2015
<b>Camptotecina</b>	<i>Camptotheca acuminata</i> (planta)	Topoisomerase I	Câncer de colon	CROSS-KNORR et al., 2013
<b>Irinotecan</b> <b>Topotecan</b>	<i>Camptotheca acuminata</i> (planta) <b>Semissíntese</b>	Topoisomerase I	Cólon, ovário, pulmão,	KAWANO et al., 2014, WESTOVER et al., 2015
<b>Dauno/</b> <b>Doxorrubicina</b> <b>(antraciclina)</b>	<i>Streptomyces peucetius</i> , (microorganismo)	Topoisomerase II	LA, linfomas, tumores de mama, estômago, pulmão, ovário, colón	SAULTZ ; GARZON, 2016; SZWED et al., 2014
<b>Citarabina</b>	<i>Tectitethya crypta</i> (esponja marinha)	Inibe a replicação do DNA	Leucemias e linfomas	KONUMA et al., 2015

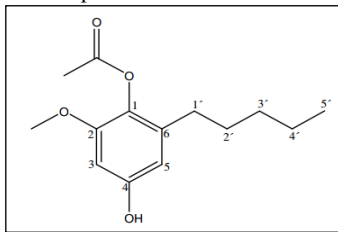
Considerando que o Brasil, apesar de possuir a maior diversidade vegetal do mundo, teve apenas 10 % de suas plantas avaliadas quanto às suas características biológicas, existem inúmeras possibilidades de se encontrar novas moléculas a partir do metabolismo secundário de plantas brasileiras com importância para a química medicinal e com potencial atividade para o desenvolvimento de novos quimioterápicos (AMARANTE et al., 2011).

A espécie *Eugenia hiemalis* Cambessèdes (Mirtaceae) é uma árvore conhecida popularmente como “guamirim” e distribui-se pelo Brasil, Argentina, Uruguai e Paraguai (SOBRAL et al., 2017). Poucos trabalhos foram encontrados na literatura investigando as substâncias isoladas dessa espécie. No entanto, o gênero *Eugenia* é bastante conhecido pela comunidade científica, e inúmeros estudos analisaram a

composição química e as atividades biológicas de extratos e frações de espécies deste gênero. Foi observada principalmente a presença de flavonoides, antocianinas, taninos, triterpenos, esteroides e carotenoides (MAGINA et al., 2012; CARVALHO JUNIOR et al., 2014). Devido à grande quantidade de compostos fenólicos, espécies do gênero *Eugenia* apresentam marcante atividade antioxidante, além de atividade antibacteriana, antifúngica, antiviral, anti-inflamatória, entre outras (MAGINA et al., 2012; FERREIRA et al., 2014).

O acetato de miconidina (2-metóxi-1-acetóxi-6-n-pentilfenol) (**GE1**) (Figura 3) é um derivado de hidroquinona isolado das folhas e dos botões florais de *E. hiemalis* (FALKENBERG, 1996). As quinonas são substâncias oxigenadas que se originam da oxidação de compostos aromáticos e são descritas na literatura por suas atividades antibacteriana, antifúngica, antiviral e anticolinesterásica (RAJENDRAN, 2016). Apesar de existirem estudos antigos relatando a atividade antibacteriana, antimalárica e antitumoral da miconidina (PAHN; MOLINA-PORTELA; STOPPANI, 1988, EFFERTH et al., 1996), não foram encontrados estudos investigando os mecanismos envolvidos na possível atividade antitumoral e antileucêmica do acetato de miconidina.

Figura 3 - Estrutura química do acetato de miconidina (GE1).



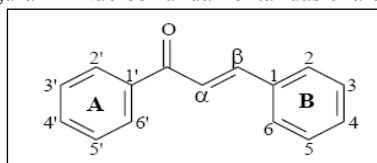
Fonte: FALKENBERG, 1996.

### 3.5 CHALCONAS: NOVAS ESTRATÉGIAS TERAPÊUTICAS

A possibilidade de utilizar substâncias de origem natural como protótipo para o desenvolvimento de novos compostos sintéticos e semissintéticos tem contribuído para o surgimento de novos fármacos, incluindo novos quimioterápicos (HOIJAT-FARSANGI, 2015, NEWMAN; CRAGG, 2016).

As chalconas, ou 1,3-difenil-2-propen-1-ona, são compostos fenólicos de cadeia aberta na qual dois anéis aromáticos são unidos por três carbonos, uma carbonila e dois carbonos  $\alpha$ ;  $\beta$ -insaturados (Figura 4). As chalconas são descritas na literatura como precursoras das flavonas e são consideradas uma classe específica de flavonoides (RAZMI et al., 2013, NKUÉTÉ et al., 2015, DAS; MANNA, 2016).

Figura 4 - Núcleo fundamental das chalconas.



Fonte: DAS; MANA, 2016.

As chalconas de origem natural são encontradas em diferentes partes de plantas, principalmente nas famílias *Fabaceae*, *Piperaceae*, *Cannabaceae* e *Moraceae* (SIKANDER et al.; 2011). Em plantas, as chalconas são sintetizadas pela enzima chalcona sintase a partir de uma molécula de p-cumaril-CoA e três moléculas de malonil-CoA. O aminoácido L-fenilalanina é convertido em p-cumaril-CoA, o que resultana formação do anel B e da ponte de três carbonos. O anel A é formado pela condensação de três moléculas de malonil-CoA (DÍAZ-TIELAS et al., 2016).

Com o surgimento de estudos que avaliam a relação estrutura e atividade, tem crescido o interesse pela síntese e semissíntese de novas chalconas a fim de melhorar suas propriedades biológicas. A síntese de novos compostos ocorre, principalmente, pela substituição dos anéis arilo e introdução de porções heterocíclicas (LEON-GONZALEZ et al., 2015). Suas atividades biológicas parecem estar relacionadas à presença da ligação dupla  $\alpha$ ,  $\beta$  associada à funcionalidade da carbonila e às posições dos grupos hidroxila (ou seus substituintes químicos), já que a remoção destes tornaram os compostos inativos (DAS; MANNA, 2016, DÍAZ-TIELAS et al., 2016).

Estudos demonstram que esses compostos alcançam concentrações plasmáticas satisfatórias, não causam toxicidade significativa em modelos não neoplásicos, possuem fraca interação com o DNA e, conseqüentemente, baixo risco de mutagenicidade. Considerando que um grande número de fármacos antitumorais

utilizados na clínica apresenta efeitos genotóxicos devido à sua interação com os grupos amino dos ácidos nucleicos, as chalconas apresentam a vantagem de possuírem forte afinidade pelos tióis em contraste com as aminas (DÍAZ-TIELAS et al., 2016).

As chalconas apresentam diversas propriedades terapêuticas, destacando-se seu efeito antiproliferativo (NG et al., 2017), antioxidante (CHU; GUO, 2016) e citotóxico (MAIORAL et al., 2017). Por isso, são considerados promissores compostos antitumorais e quimiopreventivos. Os efeitos antiproliferativos induzidos por chalconas em várias linhagens neoplásicas, incluindo as LAs, têm sido explicados por sua ação na regulação gênica, inibição da proliferação celular, bloqueio do ciclo celular e indução da morte celular por apoptose (LEON-GONZALEZ et al., 2015, DAS; MANNA, 2016). Outras propriedades atribuídas às chalconas estão descritas no Quadro 2.

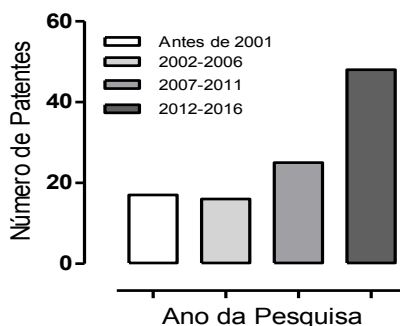
Quadro 2 - Efeitos *in vitro* das chalconas descritos na literatura.

<b>EFEITO</b>	<b>REFERÊNCIA</b>
<b>ANALGÉSICO</b>	RAZMI et al., 2013, PINHO-RIBEIRO et al., 2015
<b>ANTIBACTERIANO</b>	SALEM et al., 2014, SASHIDHARA et al., 2015, SHAKHATREH et al., 2016, KHAN, 2017, RAMÍREZ-PRADA et al., 2017
<b>ANTIFÚNGICO</b>	SALEM et al., 2014, ZHENG et al., 2015, SHAKHATREH et al., 2016, RAMÍREZ-PRADA et al., 2017
<b>ANTI-INFLAMATÓRIO</b>	RAZMI et al., 2013, PINHO-RIBEIRO et al., 2015, CHU ; GUO, 2016
<b>ANTILEISHMANIOSE</b>	GUPTA et al., 2014, PASSALACQUIA et al., 2015
<b>ANTIMALÁRICO</b>	RAMÍREZ-PRADA et al., 2017, SINGH et al., 2017
<b>ANTIOXIDANTE</b>	SALEM et al., 2014, CHU ; GUO, 2016
<b>ANTIPROLIFERATIVO</b>	HU et al., 2015, NKUÉTÉ et al., 2015, MAIORAL et al., 2016, MAIORAL et al., 2017, NG et al., 2017
<b>ANTIVIRAL</b>	ADIANTI et al., 2014, PATIL et al., 2017
<b>CITOTÓXICO</b>	ZHENG et al., 2015, SAFTA et al., 2015, NKUÉTÉ et al., 2015, SASHIDHARA et al., 2015, HYDER et al., 2015, WANG et al., 2015, RAMÍREZ-PRADA et al., 2017, MAIORAL et al., 2017



O aumento no interesse por novas chalconas sintéticas devido ao seu promissor potencial terapêutico é confirmado pelo Escritório Europeu de Patentes (ESPACENET, 2017). Nos últimos cinco anos (2012-2016), foram registradas 48 patentes de novos derivados de chalconas com atividade antitumoral. Esse número vem crescendo se considerarmos que nos anos 2002-2006 houve apenas 16 novas patentes e 25 entre os anos 2007-2011 (Figura 5). Foram encontradas quatro patentes envolvendo chalconas sintéticas no tratamento de leucemias, todas registradas entre os anos 2010 e 2014. Os dados foram obtidos a partir de uma consulta ao banco de patentes Espacenet, utilizando-se como palavras-chave: *chalcone*, e sua inserção com os termos *cancer*, *tumor* e *leukemia*.

Figura 5 - Número de registros de patentes envolvendo chalconas no tratamento de neoplasias malignas até o ano de 2016.



Fonte: A autora.

### 3.6 REGULAÇÃO DA MORTE CELULAR E POSSÍVEIS ALVOS TERAPÊUTICOS

A homeostase de células não neoplásicas é o resultado de um equilíbrio entre proliferação, diferenciação e morte celular programada. Já os processos malignos são caracterizados por falhas em um ou mais desses processos, o que pode resultar em proliferação celular descontrolada e imortalidade (GALLUZI et al., 2016). O objetivo fundamental de novos agentes quimioterápicos é provocar alterações celulares que gerem estresse e que culminem, em geral, em dano ao DNA celular. Em resposta ao estresse, as células apresentam mecanismos de sinalização que podem levar à restauração da homeostase e promoção da sobrevivência celular ou iniciar a morte celular

programada (ZHANG et al., 2015). A busca por novos quimioterápicos que induzam as células tumorais à morte programada justifica-se pela eliminação celular de forma rigorosamente controlada (BOSE; GRANT, 2015) sem atingir os tecidos adjacentes. Dentre os diversos tipos de morte celular programada, a apoptose é a mais bem estudada na literatura (LI; DEWSON, 2015). Outros tipos de morte celular podem ser observados no Quadro 3.

Quadro 3 - Principais tipos de morte celular programada.

MORTE	PRINCIPAIS CARACTERÍSTICAS	REFERÊNCIA
<b>Anoikis</b>	Ativação de caspase-3, -6, -7; superexpressão de BIM, inibição da via ERK1	TAN et al., 2015
<b>Autofagia</b>	Degradação de SQSTM1, lipidação de MAP1LC3, formação de autofagossomas	ZHANG et al., 2015, KANIA, E.; ORZECZOWSKI, 2015, KULKARNI et al., 2016
<b>Apoptose</b>	Perda do $\Delta\Psi_m$ e permeabilização da membrana mitocondrial, clivagem de Bid, ativação de caspase-3, -6, -7, -8, -9 e dos receptores de morte	LU et al., 2014, WOO et al., 2017, XU et al., 2017, SORIANO et al., 2017
<b>Cornificação</b>	Ativação de transglutaminases e ativação de caspase-14	ZOUBOULIS, 2017
<b>Mitose catastrófica</b>	Ativação de caspase-3; ativação de TP53 e TP73; bloqueio da mitose	MAK et al., 2015, PREVOROVSKY et al., 2016
<b>Necroptose</b>	Ativação dos receptores de morte, inibição de caspases, ativação de IFNs e STAT3	DING et al., 2015, CUI et al., 2017
<b>Netose</b>	Inibição de caspases, ativação de NADPH oxidase, ativação de neutrófilos	ZHAO; FOGG; KAPLAN, 2015
<b>Partanatos</b>	Acúmulo de PAR mediado por PARP1, perda do $\Delta\Psi_m$ , depleção de ATP e NADH, translocação de AIF nuclear	SORIANO et al., 2017
<b>Piroptose</b>	Ativação de caspase-1 e -7, liberação de IL-1 $\beta$ e 1 $\delta$	KOVACS; MIAO, 2017

### 3.6.1 O papel do retículo endoplasmático (RE) na regulação celular

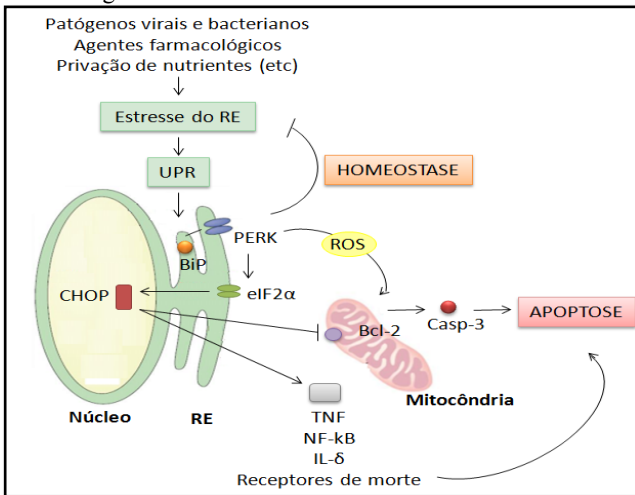
O RE é uma organela essencial para a homeostase celular e participa de processos importantes como a síntese, secreção e modificação de proteínas, lipídios e esteróis, a motilidade celular, o metabolismo mitocondrial, o ciclo celular, a apoptose e a manutenção do cálcio intracelular. O lúmen do RE é um ambiente oxidativo fundamental para a formação de pontes dissulfídicas nas proteínas em maturação, o que permite a estabilização de suas estruturas. Além disso, o RE contém proteínas denominadas chaperonas, que controlam a produção e o enovelamento de proteínas. Assim, o RE é uma organela extremamente sensível a perturbações na homeostase celular desencadeada por diferentes tipos de estresse. Essas perturbações, que podem ter origem endógena ou exógena, podem levar a um acúmulo de proteínas não enoveladas no interior do RE, o que desencadeia um processo chamado de estresse no RE (SANO; REED, 2013, KANIA; PAJAK; ORZECOWSKI, 2015).

Nas células eucarióticas, essa condição é detectada por diferentes sensores que, quando ativados, desencadeiam vias de transdução de sinal que induzem a expressão de componentes do sistema de degradação associado ao RE com o objetivo de restaurar a homeostase. A ativação desses sensores gera uma resposta específica denominada de resposta a proteínas não enoveladas, ou UPR (do inglês *unfolded protein response*). Um exemplo desses sensores é a proteína BiP, localizada no lúmen do RE. Em condições fisiológicas, BiP se liga a diversos fatores de transcrição, incluindo a proteína PERK, inativando-os. Conforme as proteínas não enoveladas se acumulam no lúmen do RE, elas competem com PERK pela ligação com BiP. O resultado é a ativação de PERK e a consequente fosforilação da proteína eIF2 $\alpha$  no citosol. Como resultado da clivagem de eIF2 $\alpha$ , ocorre a inibição da tradução de mRNA, o que diminui a síntese de proteínas e a sobrecarga de proteínas não enoveladas no RE, restaurando a homeostase celular (DUFHEY et al., 2014, GALLUZI et al., 2016).

Porém, as respostas adaptativas ao estresse celular nem sempre são bem-sucedidas e, quando a homeostase é irremediavelmente perdida, a célula gera uma resposta que leva à morte celular programada. Assim, a fosforilação de eIF2 $\alpha$  em consequência da UPR permite também a expressão de genes reguladores da apoptose, incluindo a proteína CHOP. A produção de CHOP é a via pró-apoptótica em resposta ao estresse no RE mais bem descrita na

literatura. Os mecanismos pelos quais CHOP leva à morte celular ainda não estão completamente elucidados, porém foi demonstrado que a ativação de CHOP resulta na inibição da transcrição de membros antiapoptóticos da família Bcl-2 e na regulação positiva de membros da família dos receptores de morte. Além disso, a UPR pode ativar a transcrição de NFκB por mecanismos que envolvem PERK, resultando na regulação de mediadores inflamatórios, como a interleucina-δ e TNF-α, e em uma morte celular imunogênica (KEEP et al., 2009, LU et al., 2014, GARG et al., 2015, GALLUZI et al., 2016) (Figura 6).

Figura 6 - Envolvimento do RE na morte celular.



Perturbações na homeostase do RE por diferentes estímulos causam sobrecarga de proteínas mal formadas no lúmen do RE, gerando o estresse do RE. Este fenômeno desencadeia a UPR, que tem como objetivo restaurar as funções do RE e aliviar o estresse a fim de recuperar a homeostase. A perda da ligação BiP-PERK ativa PERK que fosforila o fator iniciador eIF2α que, por sua vez, inibe a síntese de proteínas e a sobrecarga no RE. No entanto, se a homeostase não puder ser reestabelecida, será ativado pela UPR uma via de morte celular programada através da transcrição de CHOP. CHOP inibe a expressão de Bcl-2 e ativa a transcrição de vários genes com funções pró-apoptóticas e promove, assim, a apoptose. Fonte: Adaptado de DUFFEY et al., 2014.

### 3.6.2 A produção de espécies reativas de oxigênio (EROS)

Os mecanismos de morte celular também podem ser influenciados por um desequilíbrio no metabolismo oxidativo,

denominado de estresse oxidativo. A mitocôndria é a principal organela envolvida nesse desequilíbrio, pois é responsável pelo maior consumo de oxigênio intracelular durante a respiração mitocondrial e, conseqüentemente, é o principal gerador de EROS (MOLONEY; COTTER, 2017).

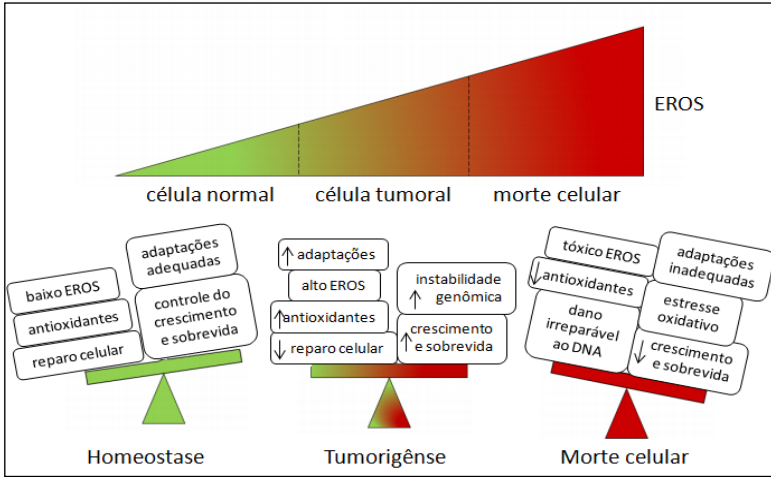
As EROS desempenham um papel fundamental na fisiopatologia celular e estão relacionadas à mecanismos de proliferação celular e às vias de sinalização. A principal função das defesas antioxidantes do organismo é evitar o acúmulo de EROS a concentrações excessivas de forma a manter o equilíbrio entre redução e oxidação (equilíbrio redox) (JANEJDRAN, 2016, PACKIRISWAMY et al., 2017). A homeostase celular é mantida pelo equilíbrio entre sistemas oxidantes e antioxidantes, sendo que em várias doenças como nas neoplasias, o equilíbrio redox encontra-se perturbado (NILAND et al., 2010, SULLIVAN; CHANDEL, 2014).

De fato, o estresse oxidativo está altamente associado ao desenvolvimento de processos malignos. Diferentes tipos de células tumorais demonstraram produzir concentrações elevadas de EROS em comparação com células não neoplásicas, devido, principalmente, à presença de mitocôndrias disfuncionais, à ativação de oncogenes e ao desequilíbrio antioxidante (WOO et al., 2017, ZHAO et al., 2017). Concentrações elevadas de EROS são consideradas oncogênicas, pois podem causar danos ao DNA, proteínas e lipídios, promovendo a instabilidade genética e a tumorigênese. O aumento de EROS também resulta na ativação de vias de sinalização pró-sobrevivência, o que contribui para o crescimento celular anormal, bloqueio da diferenciação, metástase e resistência à apoptose. Esses resultados apresentam implicações clínicas importantes, que incluem resistência à terapia medicamentosa, bem como uma alta incidência de recidivas (JACQUEMIN et al., 2015, RANEJDRAN, 2016, PACKIRISWAMY et al., 2017) (Figura 7).

Enquanto o aumento moderado de EROS pode estimular a divisão celular e o crescimento tumoral, o aumento elevado ou tóxico de EROS em células tumorais é antitumorigênico, pois resulta em um aumento excessivo do estresse oxidativo e, conseqüentemente, à indução de morte celular. Como as células tumorais já produzem uma grande quantidade de espécies reativas, elas tem uma capacidade de adaptação limitada e precisam de defesas antioxidantes para evitar maiores danos celulares. Por essa razão, as terapias utilizadas para elevar a produção de EROS podem ser tão efetivas quanto as terapias

que diminuem sua produção e podem ter potenciais implicações clínicas (MOLONEY; COTTER, 2017, ZHAO et al., 2017).

Figura 7 - Aumento de EROS, tumorigênese e morte celular.



Células tumorais produzem concentrações elevadas de EROS em comparação com células não neoplásicas. A capacidade antioxidante das células tumorais regula os níveis excessivos de EROS enquanto mantém a sinalização pró-tumorigênica e a resistência à apoptose. O aumento de EROS a níveis tóxicos pode ativar vias antitumorais, o que resulta em estresse oxidativo e morte. Adaptado de MOLONEY; COTTER, 2017.

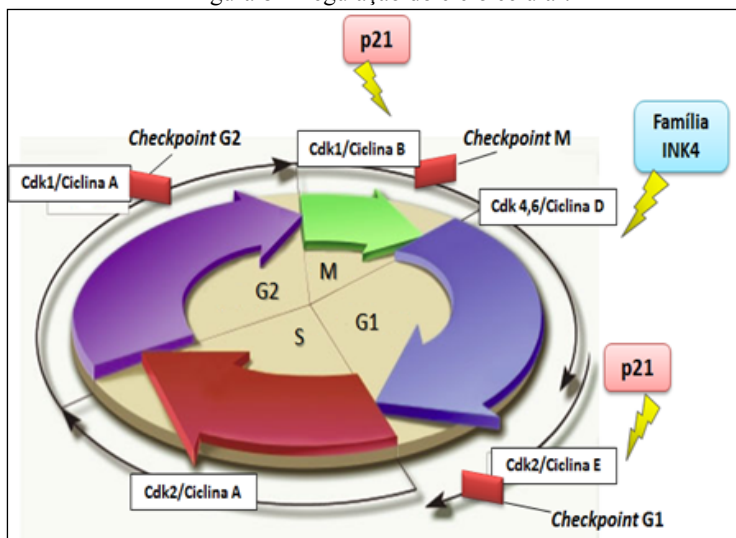
### 3.6.3 Modulação e bloqueio do ciclo celular

O ciclo celular possui inúmeros mecanismos de checagem que tem por objetivo monitorar e responder a distúrbios celulares, e, dessa forma, impedir a progressão de células alteradas até que os erros sejam reparados ou até a promoção da apoptose (ABBAS; DUTTA, 2009).

O ciclo celular é composto de duas fases principais, mitose e interfase (Figura 8). A mitose, dividida em prófase, metáfase, anáfase e telófase, é o processo de divisão celular, enquanto que a interfase é o período entre duas mitoses e é dividida em *gap1* (G1), síntese (S) e *gap2* (G2). Na fase G1 ocorre a preparação para a divisão, com aumento do volume celular, condensação dos cromossomos e produção de proteínas que serão essenciais para a nova célula. Na fase S ocorre a replicação do DNA, de forma que a célula duplique precisamente seus cromossomos. Após a replicação, inicia-se a fase G2, durante a qual a

célula sintetiza componentes necessários para a mitose como, por exemplo, o fuso mitótico. Após a divisão do material nuclear ocorre a citocinese, finalizando o ciclo de replicação. A célula que não está em replicação encontra-se na fase G<sub>0</sub> ou quiescência. Nessa fase, apesar das células estarem metabolicamente ativas, o DNA encontra-se altamente envelado e a atividade nuclear é baixa. A célula tumoral não finaliza o ciclo de replicação celular de forma normal, ou seja, não retorna à fase G<sub>0</sub>, passando diretamente da mitose para uma nova fase G<sub>1</sub> (ZARITSKY; WOLDRINGH, 2015, TAN; SLAWSON, 2017).

Figura 8 - Regulação do ciclo celular.



As fases do ciclo celular são representadas por G<sub>1</sub>, S, G<sub>2</sub> e M. Os três principais bloqueios do ciclo celular são os pontos de checagem das fases G<sub>1</sub>, G<sub>2</sub> e M. Fonte: MAIORAL, 2013.

O termo *checkpoint* ou pontos de checagem do ciclo celular refere-se aos mecanismos pelos quais a célula bloqueia de forma ativa o ciclo celular até que um processo como a replicação do DNA ou a mitose ocorra de forma completa e assertiva. Durante o ciclo celular são reconhecidos três pontos de bloqueio principais: em G<sub>1</sub>, antes de a célula entrar na fase S do ciclo; em G<sub>2</sub>, antes de a célula entrar em mitose; e durante a metáfase, impedindo a ligação dos cromossomos aos microtúbulos. Perturbações nesses pontos de checagem comprometem a integridade do genoma e podem promover o

desenvolvimento de neoplasias, além de afetarem significativamente a eficácia das terapias antitumorais (WIMAN; ZHIVOTOVSKY, 2017).

A progressão do ciclo celular é controlada, principalmente, por um grupo de proteínas chamadas “cinases dependentes de ciclinas” (CDKs) que interagem com ciclinas específicas e promovem a ativação das cinases, as quais, por sua vez, fosforilam uma série de substratos-chave que permitem a progressão de uma fase para outra do ciclo celular (ZARITSKY; WOLDRINGH, 2015). Em situações anormais, o ciclo celular pode ser inibido por um grupo de proteínas denominadas de “inibidores de CDK” (CKI), as quais regulam negativamente as vias sinalizadoras de progressão da divisão celular até que o reparo do DNA esteja completo. As CKIs atuam formando complexos estáveis com as CDKs, o que impede que as mesmas se liguem às suas respectivas ciclinas. A proteína p21 é um exemplo de CKI que bloqueia o checkpoint entre as fases G1 e S do ciclo celular, o que resulta no bloqueio da mitose (BONELLI et al., 2014).

As CKIs, por sua vez, são reguladas por uma série de sinais intracelulares e extracelulares. Em situações que envolvem lesão ao DNA, ativação de genes aberrantes, estresse do RE, perda de adesão à matriz extracelular ou hipóxia, o gene supressor de tumor p53 é transcrito, o que leva à tradução da proteína p53. Esta, por sua vez, monitora a integridade do genoma, impedindo a proliferação de células com DNA mutado por inibir o ciclo mitótico no início da fase G1. (ROY; BANERJEE, 2015, TAN; DUNCAN; SLAWSON, 2017). Além disso, a p53 ativa a transcrição de genes de reparo ao DNA com o objetivo de impedir a propagação do erro genético para as células filhas. Se o reparo ao DNA não for efetuado, a p53 dispara o mecanismo de apoptose pela ativação de Bax e inibição de Bcl-2. Devido às suas atividades antineoplásicas e ao auxílio na manutenção da homeostase celular, a proteína p53 é considerada a “guardiã do genoma” (BONELLI et al., 2014, SAFTA et al., 2015, TAN et al., 2015).

A proteína supressora de tumor PML é uma importante reguladora da atividade de p53 e dos processos mediados por esta proteína, como o bloqueio do ciclo celular e o reparo ao DNA. A proteína PML foi originalmente identificada em células de leucemia promielocítica aguda (LPA) como resultado da translocação entre os cromossomos 15 e 17. Em resposta ao estresse celular, PML aumenta a estabilidade de p53 e diminui sua degradação, principalmente por sequestrar Mdm2, o principal inibidor de p53. Dessa forma, PML é capaz de regular a quantidade e a atividade dessa proteína no meio intracelular. Além da regulação de p53 e do seu efeito no ciclo celular,



a proteína PML induz a ativação de caspase-3 e a regulação de membros da família Bcl-2. Também inibe a ativação do receptor AKT, um proto-oncogene que atua como fator anti-apoptótico por levar à liberação de cálcio pelo RE. A proteína PML também é capaz de regular a apoptose induzida por FasL e por TNF $\alpha$ , os quais são importantes reguladores da imunidade e da inflamação. Assim, PML é capaz de induzir a célula à morte pela ativação de diferentes vias de apoptose (SALOMONI; DVORKINA; MICHOD, 2012, GUAN; KAO, 2015, ZHAO et al., 2017).

A proliferação celular descontrolada é considerada um dos principais mecanismos biológicos envolvidos na oncogênese. A proteína KI-67 é considerada um marcador de proliferação celular, pois células em constante ciclagem expressam essa proteína em concentrações variáveis durante todas as fases do ciclo celular e também durante a mitose, enquanto que células quiescentes na fase G0 não a expressam. Como todas as células proliferativas (incluindo células tumorais) expressam KI-67, a mesma tem sido utilizada como ferramenta diagnóstica para diferentes tipos de neoplasias e sua expressão está associada a variabilidades prognósticas como, por exemplo, a progressão tumoral e o índice de diferenciação de tumor. Apesar de ser reconhecida como uma proteína reguladora do ciclo celular, as funções específicas da proteína KI-67 permanecem inconclusivas. Algumas das funções propostas incluem a organização e manutenção da arquitetura do DNA e a síntese de ribossomos durante a mitose (PATHMANATHAN; BALLEINE, 2013, DENKERT, 2015).

#### **3.6.4 Apoptose**

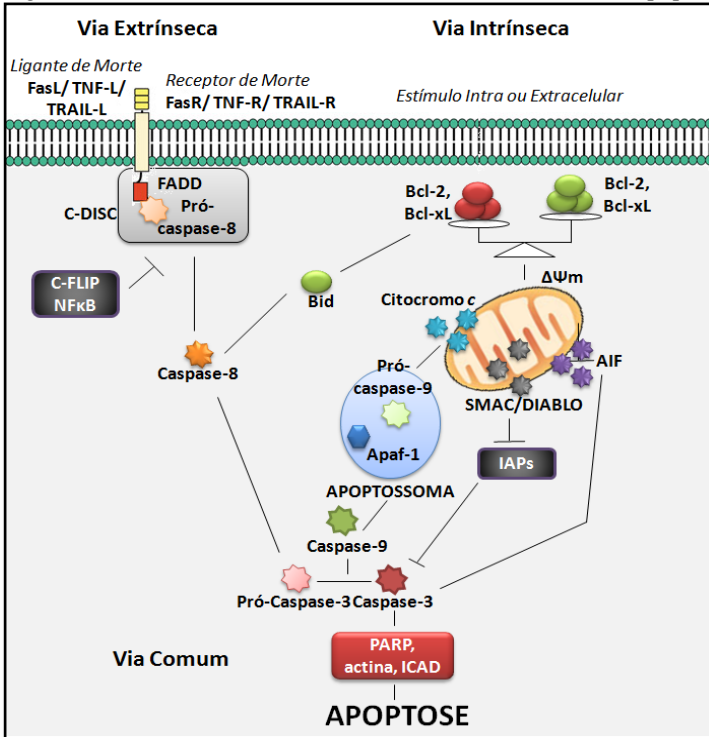
A apoptose é um tipo de morte celular programada que ocorre de forma natural durante toda a vida de um organismo (KERR; WYLLIE; CURRIE, 1972; LI; DEWSON, 2015). A capacidade de evitar a apoptose através da regulação positiva de proteínas antiapoptóticas ou da regulação negativa de proteínas pró-apoptóticas é um importante passo no desenvolvimento da carcinogênese e pode determinar a susceptibilidade do paciente às terapias quimioterápicas (MAHBUB et al., 2013).

A apoptose envolve alterações morfológicas características como picnose, resultante da condensação da cromatina, e diminuição do volume celular. A morfologia das organelas celulares é mantida, com exceção das mitocôndrias que são fragmentadas e passam a apresentar poros na membrana. Endonucleases ativas fragmentam o DNA celular

em fragmentos múltiplos de 180-200 pares de base (pb), os quais formam um padrão de quebra quando separados em gel de agarose (SAKAMOTO; TAKAMI, 2014, ZHANG et al., 2015). Finalmente, ocorre a formação de prolongamentos e invaginações na membrana plasmática, denominados *blebs*, que originam a separação dos fragmentos celulares em corpos apoptóticos. Essas estruturas são reconhecidas como alvos fagocitários e são fagocitadas por células do sistema imune, como os macrófagos, e degradadas nos fagolisossomas (GOLDAR et al., 2015, LI; DEWSON, 2015)

Os processos responsáveis pela regulação da apoptose envolvem duas vias principais: a via extrínseca ou via dos receptores de morte, iniciada pela superfamília de receptores de necrose tumoral (TNF); e a via intrínseca, ou mitocondrial, controlada pelos membros da família Bcl-2 (ZHANG et al., 2015, SAFTA et al., 2015) (Figura 9).

Figura 9 - Resumo das vias extrínseca, intrínseca e comum da apoptose.



Principais vias da apoptose: via extrínseca ou via dos receptores de morte, e via intrínseca ou mitocondrial. Fonte: MAIORAL, 2013.

### 3.6.4.1 Via Intrínseca da Apoptose

A mitocôndria, além de fornecer energia para a célula sob a forma de ATP, apresenta um papel central na produção de EROS e na indução da apoptose. A mitocôndria é uma organela intracelular formada por duas membranas: a membrana interna, que apresenta inúmeras invaginações e contém diversas proteínas envolvidas na respiração celular e na viabilidade celular, e a membrana externa. O espaço entre as duas membranas é controlado pelo potencial de membrana mitocondrial, simbolizado por  $\Delta\Psi_m$ , que é determinado pelo gradiente de prótons da cadeia respiratória e que permite a troca de metabólitos entre a matriz e o citosol (SONG et al., 2015).

Danos nas mitocôndrias levam à criação de um canal de alta condutância que leva ao descontrole da entrada de solutos para o interior da mitocôndria. O resultado é a dissipação do  $\Delta\Psi_m$ , o inchaço da matriz mitocondrial, a fragmentação mitocondrial, o aumento da permeabilização da membrana externa e o extravasamento do seu conteúdo. A liberação de proteínas apoptóticas, como citocromo *c*, SMAC, AIF, endonuclease G e pró-caspase-9, promovem a morte celular (POKORNÝ et al., 2012, GOLDAR et al., 2015).

A principal proteína mitocondrial envolvida na apoptose é o citocromo *c*, localizado no espaço entre as membranas interna e externa da mitocôndria onde funciona como transportador de elétrons na cadeia transportadora. Sua liberação pela mitocôndria está associada à diminuição da produção de ATP e ao estresse oxidativo (LI; DEWSON, 2015). A liberação de citocromo *c* induz a formação do apoptossoma, um complexo multimérico formado pelo fator ativador de apoptose 1 (Apaf-1) e pela pró-caspase-9. Um sítio da Apaf-1 se liga ao ATP, o que resulta na alteração conformacional necessária para ativar a caspase-9, por este motivo a participação do citocromo-*c* na apoptose, é dependente de ATP. A pró-caspase-9 é considerada a proteína iniciadora da via intrínseca, que, quando clivada, resulta na ativação das caspases efetoras -3 e -7 (ALLAN; CLARKE, 2009, GOLDAR et al., 2015).

Diversas outras proteínas liberadas pela mitocôndria apresentam atividades pró-apoptóticas independente das caspases. O AIF e a endonuclease G estão envolvidos na fragmentação do DNA e na perda do  $\Delta\Psi_m$ . Ambas as proteínas atuam independentemente da ativação de caspases e, após serem liberadas no citoplasma, são translocadas para o núcleo onde induzem a condensação da cromatina e a fragmentação do DNA. Também são capazes de induzir o aumento da

permeabilidade mitocondrial, ocasionando o extravasamento de mais citocromo *c* (YANG et al., 2016). Já a proteína SMAC promove a apoptose por inibir os inibidores endógenos das caspases (FULDA, 2009, BOSE; GRANT, 2015). Dentre esses inibidores encontram-se os membros da família de proteínas inibidoras da apoptose (IAPs) que incluem diversas proteínas, dentre elas a survivina, considerada uma proteína antiapoptótica devido à sua capacidade de inibir as caspases -9, -3 e -7. Essa proteína é superexpressa na maioria das neoplasias humanas e também está envolvida na resistência ao tratamento, sendo, por isso, associada a um pior prognóstico (PARK et al., 2011, ROY; KANWAR; KANWAR, 2015).

A liberação desses fatores pela mitocôndria é regulada por membros da família de proteínas Bcl-2. Os membros da família Bcl-2 são divididos em duas classes de moléculas que apresentam efeitos opostos: os membros antiapoptóticos como Bcl-2, Bcl-xL e Bcl-w e os membros pró-apoptóticos como Bax, Bak, Bid, Puma e Noxa. Diante de um sinal estimulador da apoptose, membros pró-apoptóticos da família Bcl-2 que, inicialmente, encontravam-se na sua forma inativa no citosol, sofrem mudanças conformacionais e são translocados para o interior da membrana mitocondrial externa. A oligomerização dessas proteínas induz a célula à apoptose por dois mecanismos distintos: a inibição das proteínas antiapoptóticas e a formação de poros na membrana mitocondrial, permeabilizando-a e permitindo a liberação dos fatores pró-apoptóticos para o citosol. As proteínas antiapoptóticas, por sua vez, podem sequestrar as proteínas pró-apoptóticas ou associar-se entre si, impedindo a formação dos poros (LI; DEWSON, 2015).

#### 3.6.4.2 Via Extrínseca

A via extrínseca da apoptose é iniciada com a transmissão de sinais extracelulares que ativam uma família de receptores localizados na membrana plasmática, conhecidos como receptores de morte. Os receptores de morte mais conhecidos são os pertencentes à família TNF, tais como: TNF-R, TRAIL-R (DR4 e DR5), DR3 (Apo-2), DR6 e FasR (Apo-1 ou CD95). Estes receptores são formados por um domínio citoplasmático, chamado de domínio de morte, o qual está envolvido nas interações proteicas e na propagação do sinal apoptótico, e um domínio extracelular rico em cisteína que se liga ao seu ligante específico (GOLDAR et al., 2015).

O FasR é o receptor de morte mais estudado na literatura. Quando estimulados pela ligação ao ligante Fas (FasL), os receptores

ativados levarão ao recrutamento de domínios de morte (DD) tais como FADD (*Fas-Associated via Death Domain*) ou TRADD (*Tumor Necrosis Factor Receptor-1-Associated Death Domain*), os quais, em conjunto com as caspases iniciadoras -8 e -10, formam o complexo sinalizador indutor de apoptose (DISC). O complexo DISC induz a clivagem da pró-caspase-8 e a liberação da sua forma ativa, caspase-8, a qual pode ativar diretamente as caspases efetoras -3 e -7, resultando em morte celular de forma totalmente independente da via mitocondrial. A caspase-8 também é capaz de clivar a proteína pró-apoptótica Bid, membro da família Bcl-2, o que leva a formação de um fragmento denominado Bid truncado (tBid), que aumenta a permeabilidade mitocondrial e a liberação dos fatores pró-apoptóticos pela mitocôndria, além de amplificar a ativação da caspase-8. Dessa forma, através da proteína Bid, é possível fazer uma conexão entre as duas vias do processo apoptótico (RÖDER; TRAUZOLD; KALTHOFF, 2011; LEE et al., 2012, VOLPE et al., 2016).

A via extrínseca pode ser inibida pela proteína c-FLIP e pelo fator de transcrição NFκB, os quais se ligam ao complexo sinalizador modulando-o e inativando-o. Outro mecanismo importante da regulação da morte celular mediada por FasR-FasL é o controle transcricional da expressão do gene FasL. De fato, enquanto FasR é expresso de forma constante em diferentes tipos celulares, a expressão de FasL é controlada por interações proteína-DNA específicas. Vários fatores reguladores da expressão do gene FasL foram identificados. A modulação desses fatores de transcrição é estritamente dependente do ambiente celular e são influenciados agentes que promovem a expressão de FasL, como o estresse citotóxico e danos ao DNA (VOLPE et al., 2016).

#### 3.6.4.3 Via Comum

A última etapa da cascata de apoptose envolve a ativação das caspases efetoras (caspase-3, -6 e -7), tanto pela caspase iniciadora da via extrínseca, caspase-8, quanto pela caspase iniciadora da via intrínseca, caspase-9 (GOLDAR et al., 2015). As caspases efetoras têm como alvo final a clivagem de proteínas como a PARP-1 e a ICAD/DFP45, que desencadeiam uma série de eventos proteolíticos que, eventualmente, levam à execução da morte celular. A PARP-1 é uma proteína nuclear ativada pela presença de dano ao DNA que tem como função aumentar a eficiência das vias de reparo. Assim, a clivagem e a inativação de PARP-1 pelas caspases efetoras aumenta a

eficiência dos tratamentos quimioterápicos por dificultar a remoção das lesões geradas por eles em células tumorais (HEGEDÜS; VIRÁG, 2014). Por outro lado, a clivagem e a inativação de ICAD-DFF45 possibilitam que CAD entre no núcleo e fragmente o DNA, provocando o característico padrão “em escada” visto nas células apoptóticas (FULDA, 2009, BOSE; GRANT, 2015, LI; DEWSON, 2015).

Até o presente momento, mais de 280 substratos para caspases foram identificados. A função exata de muitos deles não foi totalmente elucidada, mas, sabe-se que são proteínas envolvidas em diferentes processos celulares, tais como a reparação e a degradação do DNA, o bloqueio do ciclo celular, a formação do citoesqueleto e a transdução de sinais que originam os eventos responsáveis pela maioria das mudanças morfológicas pelas quais a apoptose é caracterizada (LI; DEWSON, 2015, WOO et al., 2017).

#### 3.6.4.4 Apoptose imunogênica

Apesar de ser muitas vezes tratada como um fenômeno uniforme, existem subtipos distintos de apoptose que, embora morfolologicamente similares, podem ser desencadeados por diferentes vias bioquímicas. Além disso, a aparente uniformidade da morte por apoptose pode ocultar aspectos funcionais heterogêneos, como, por exemplo, o reconhecimento ou não das células apoptóticas pelo sistema imune (GREEN et al., 2009).

Inicialmente a apoptose foi descrita como uma forma de morte celular diferente da necrose por ser não imunogênica, enquanto que a necrose estimularia uma resposta imune acentuada. Posteriormente essa ideia foi refutada por observações que mostram que certos tipos de apoptose podem ser imunogênicas. Como consequência, é possível encontrar células que sucumbiram à ativação de uma maquinaria molecular codificada geneticamente (ou seja, de uma maneira regulada) enquanto exibem uma morfologia típica de necrose, enquanto que células apoptóticas podem desencadear uma resposta imune específica ao antígeno (GALLUZZI et al., 2017).

Em situações fisiológicas, padrões moleculares específicos associados a microorganismos (MAMPs) são detectados por sensores que são expressos em uma variedade de células, incluindo monócitos, macrófagos, células dendríticas e outros componentes do sistema imune inato. Esses padrões funcionam como adjuvantes naturais e sua interação com os receptores de reconhecimento celulares não só estabelece uma primeira linha de defesa contra a infecção, mas também

gera condições ideais para o início da resposta imune antígeno-específica. De modo similar, os receptores de reconhecimento celulares também podem ser ativados por padrões moleculares associados a danos celulares (DAMPs) gerados por células em processo de morte que apresentam aumento da antigenicidade (GALLUZZI et al., 2017). A chamada “morte celular imunogênica” é capaz de converter as células tumorais mortas ou em processo de morte em uma “vacina” capaz de induzir imunidade antitumoral na ausência de qualquer adjuvante adicional (GARG et al., 2015). De fato, alguns agentes citotóxicos como, por exemplo, as antraciclina, podem fazer com que as células tumorais sofram uma forma imunogênica de apoptose. Outros estudos mostraram que os antígenos das células apoptóticas podem ser efetivamente apresentados de forma cruzada para células T citotóxicas e estimular uma resposta imune antitumoral eficaz mediada por linfócitos T (GARG et al., 2012, JACQUEMIN et al., 2015).

A apoptose imunogênica das células tumorais exhibe as principais características bioquímicas da apoptose “tradicional”, como a exposição de fosfatidilserina, ativação de caspases e despolarização mitocondrial (KEPP et al., 2009). No entanto, esse tipo de morte celular também parece ter outras propriedades importantes. Por exemplo, uma característica comum a todos os estímulos imunogênicos indutores de apoptose identificados até o momento é a indução de estresse no RE. Como consequência, ocorre a exposição dependente da fosforilação de eIF2 $\alpha$  de chaperonas do RE, tais como a calreticulina (CALR), que passa a ser expressa na superfície das células em processo de morte. Em alguns casos, além do estresse no RE, a produção de EROS foi considerada obrigatória para a iniciação da apoptose imunogênica porque a indução concomitante de estresse oxidativo e estresse no ER parece ser crucial para a liberação de precursores de sinalização de perigo que medeiam a emissão de DAMPs (GARG et al., 2014, XU et al., 2017). Além dessas características, é esperada a liberação de grandes quantidades de ATP para o meio extracelular (GREEN et al., 2009, GALLUZZI et al., 2017).

Assim, de acordo com a literatura, além das vias tradicionais existe, ainda, uma via adicional de morte celular por apoptose que envolve a citotoxicidade mediada por linfócitos T citotóxicos e células NK. Estes são agentes essenciais da resposta imune celular contra células-alvo danificadas física ou quimicamente. Após o reconhecimento inicial e a ligação às células malignas, os linfócitos T citotóxicos e as células NK induzem as células-alvo à apoptose principalmente através da liberação de grânulos citotóxicos. Os

grânulos citotóxicos contêm granulizinas e perforinas, duas proteínas formadoras de poros na membrana celular, e uma família de enzimas serina proteases denominadas granzimas. As granulizinas, encontradas exclusivamente em grânulos citotóxicos de origem humana, são responsáveis pela morte de uma grande variedade de bactérias Gram-positivas e Gram-negativas, fungos e células tumorais. Já as granzimas e perforinas são essenciais para a execução da morte celular. A via das perforinas/granzimas pode induzir a morte celular através da via dos receptores de morte (TNFR/TNF, Fas/FasL, TRAILR/TRAIL) e pode, assim como a via intrínseca e a via extrínseca, convergir para a via comum, com clivagem da caspase-3, o que culmina na apoptose (MARTINVALET; ZHU; LIEBERMAN, 2005; THIERY et al., 2011; WALCH et al.; 2014).

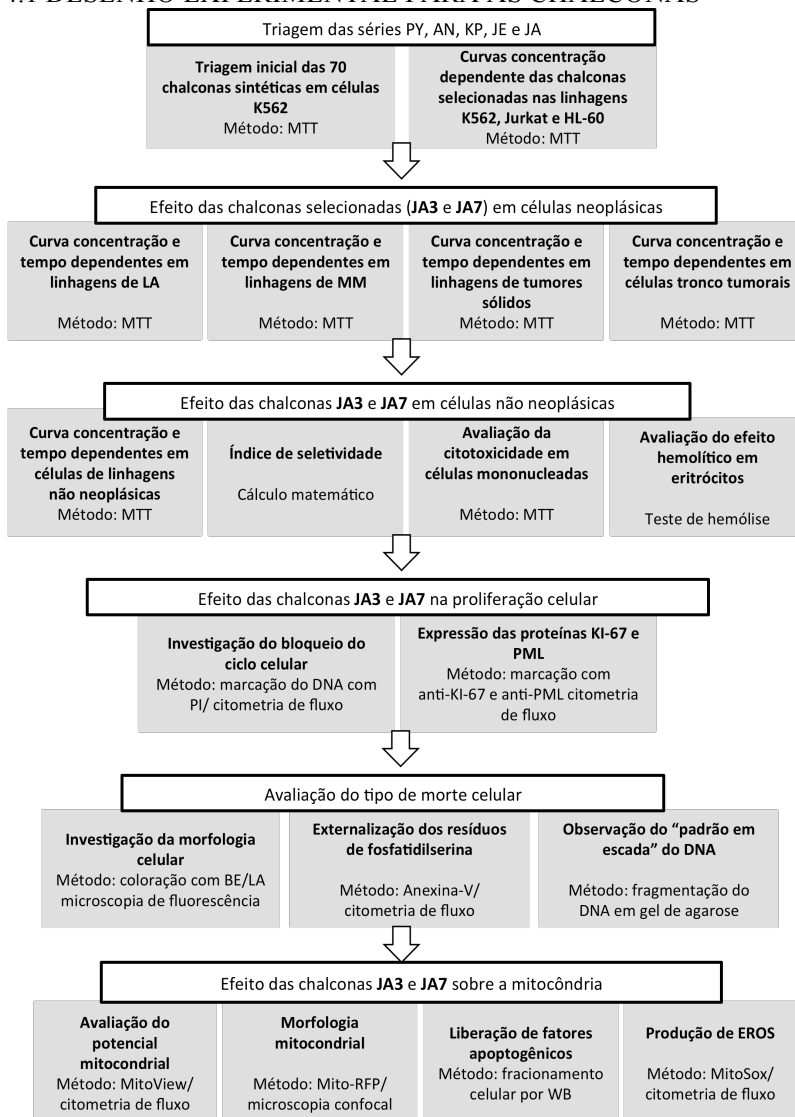
Dentre todas as granzimas, GzmA e GzmB são as mais abundantemente expressas. A GzmA induz a morte celular sem influência da superexpressão de Bcl-2, da inibição das caspases ou da despolarização da membrana mitocondrial, porém com as mesmas características morfológicas da apoptose. No entanto, a via mediada pela GzmA está altamente relacionada à produção de EROS (NILAND et al., 2010, SULLIVAN; CHANDEL, 2014). A GzmB é uma serina protease que inicia duas vias de morte distintas, uma de forma dependente e outra de forma independente de caspases. A GzmB pode induzir a ativação direta da caspase-3 efetora, desencadeando a apoptose dependente de caspases, ou pode clivar diretamente a proteína pró-apoptótica Bid que ativa a via mitocondrial, favorecendo a oligomerização Bax/Bak, a permeabilização da membrana mitocondrial externa, a liberação de citocromo *c* e a formação do apoptossoma. A GzmB também pode inativar substratos subsequentes, tais como ICAD, tubulina e PARP-1 e, dessa forma, induzir a morte celular independente de caspases (CHOWDHURY et al., 2006, NILAND et al., 2014, JACQUEMIN et al., 2014).

Assim, uma maneira através da qual se pode gerar uma potente resposta imune antitumoral é através do aumento da imunogenicidade das células neoplásicas. Isso pode ser atingido com o uso de abordagens terapêuticas capazes de gerar estresse no RE dependente da produção de EROS como resposta primária e pode ser uma via bastante desejada por novos compostos com potencial efeito antitumoral.

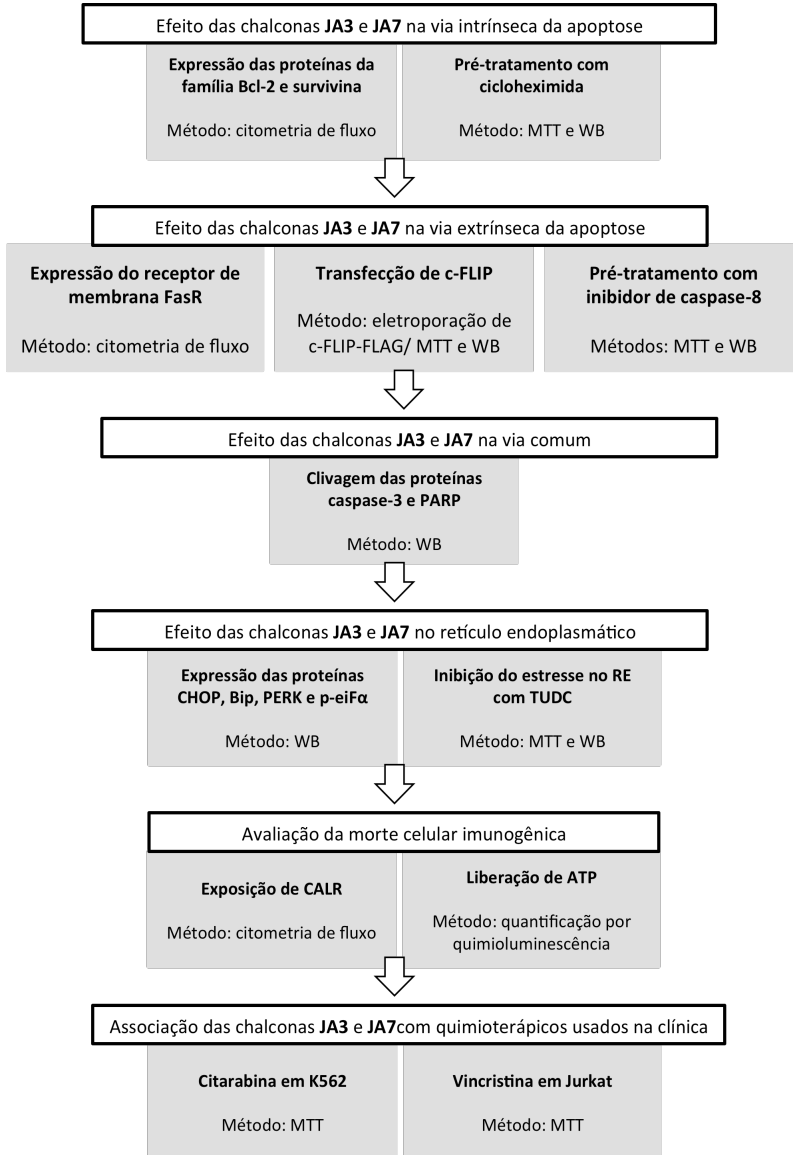


## 4 MATERIAIS E MÉTODOS

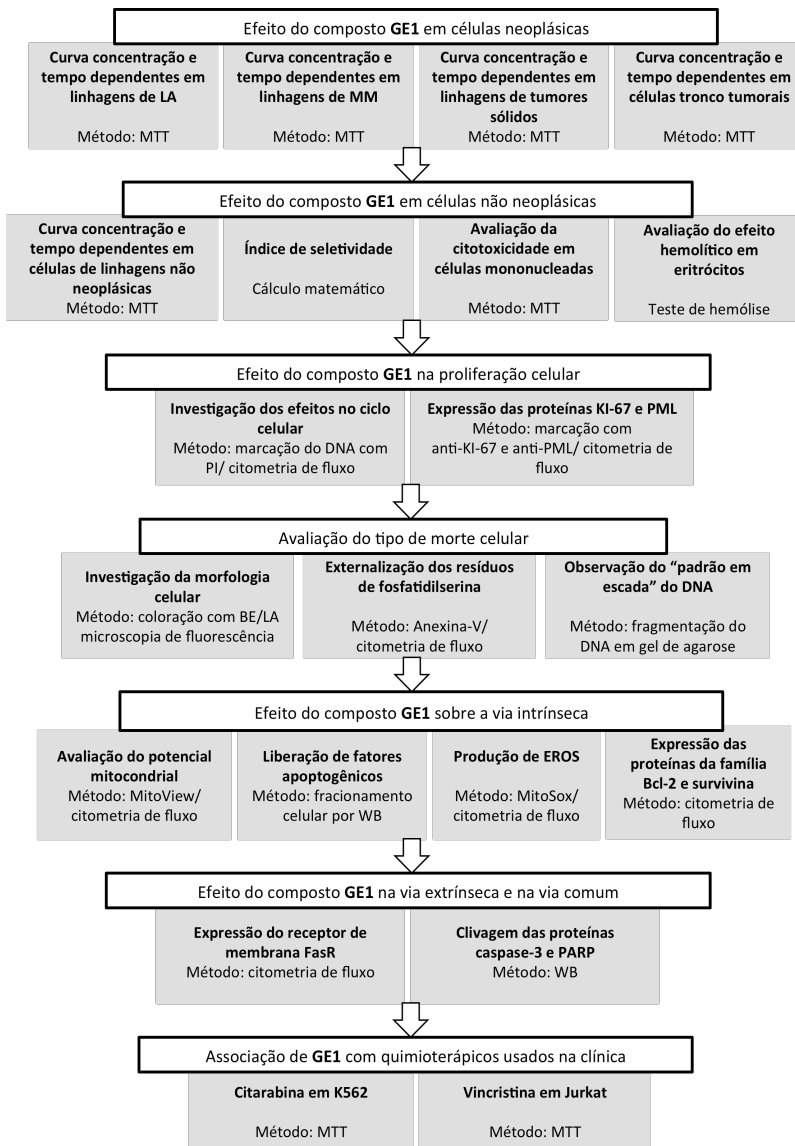
### 4.1 DESENHO EXPERIMENTAL PARA AS CHALCONAS



(continua)



## 4.2 DESENHO EXPERIMENTAL PARA O COMPOSTO GE1



#### 4.3 REAGENTES E ANTICORPOS

Os meios de cultura *Roswell Park Memorial Institute 1640* (RPMI), *Dulbecco Modified Eagles's Medium* (DMEM) e *Dulbecco's Modified Eagle Medium/Nutrient Mixture F-12* (DMEM/F12) foram adquiridos da Gibco<sup>®</sup>, Thermo Fischer, Massachusetts, EUA. O tampão RIPA (*RIPA Lysis and Extraction Buffer*), o kit para quantificação de proteínas *BCA Protein Assay Kit*, o kit para eletroporação (*Neon™ Transfection System*), os kits *MitoSox Red Molecular Probes<sup>®</sup>* e *ECL™ Prime Western Blotting System<sup>®</sup>*, o soro bovino fetal (SBF), a penicilina, a estreptomicina, o ácido N-[2-hidroxietil]piperazina-N'-[2-etanosulfônico] (HEPES), o ácido etilenodiamino tetra-acético (EDTA), o tampão fosfato (PBS) e a tripsina foram adquiridos da Thermo Fischer, Massachusetts, EUA. O kit para determinação de ATP (*ATP Determination kit*), a lipofectamina (*Lipofectamine 2000*), a L-glutamina, o β-mercaptoetanol, o suplemento B-27, o fator de crescimento fibroblástico (FGF) e o fator de crescimento epidermal (EGF), foram adquiridos da Invitrogen<sup>®</sup>, Califórnia, EUA. O brometo de 3-(4,5-dimetil-2-tiazolil)-2,5-difenil-2H-tetrazólio (MTT), o Ficoll-Hypaque (densidade 1.077 g/m3), o laranja de acridina (AO), o brometo de etídio (BE), a albumina bovina (BSA), o inibidor de proteases *cOmplete Mini, EDTA-free Protease Inhibitor Cocktail*, o tauroursodeoxicolato (TUDC), o paraformaldeído, o Triton X-100, o Tween-20, a sílica gel, a cicloheximida, a poliacrilamida, a digitonina e o G418 foram adquiridos da Sigma-Aldrich<sup>®</sup>, Missouri, EUA. O kit *MitoView 633* para avaliação do potencial mitocondrial foi adquirido da Biotium<sup>®</sup>, Califórnia, EUA. O kit comercial de extração de DNA *QIAamp DNA Mini Kit*, foi adquirido da QIAGEN<sup>®</sup>, Hilden, Alemanha. O *PI/RNASE Solution kit*, utilizado nos ensaios de avaliação do ciclo celular e o *Annexin V-FITC Apoptosis Detection kit* utilizado para avaliação da externalização de fosfatidilserina foram adquiridos da *Immunostep<sup>®</sup>*, Salamanca, Espanha. O *BD Cytotfix/Cytoperm kit*, utilizado para fixação e permeabilização celular nos experimentos de citometria de fluxo, foram adquiridos da BD Biosciences<sup>®</sup>, New Jersey, USA. O DRAQ7 foi adquirido da BioStatus<sup>®</sup>, Shepshed, Reino Unido e o mito-RFP (pDsRed2-Mito), da Clontech Laboratories, Califórnia, EUA. O dimetilsulfóxido (DMSO), o ácido clorídrico (HCl) PA, o álcool isopropílico PA, o ácido etílico 96% foram adquiridos da Merck<sup>®</sup>, Damstadt, Alemanha. A membrana de PDVF foi adquirida da Bio-Rad<sup>®</sup>, Califórnia, USA. O inibidor de caspase-8 Z-IETD-FMK foi

adquirido da Abcam<sup>®</sup>, Cambridge, UK. A citarabina foi adquirida da Accord Healthcare<sup>®</sup>, Middlesex, UK, e a vincristina da Libbs Pharmaceuticals<sup>®</sup>, SP, Brasil.

Os anticorpos utilizados para citometria de fluxo anti-Bax conjugado a PerCP, anti-FasR-PE, anti-AIF-FITC e anti-KI67-FITC foram adquiridos da Santa Cruz *Biotechnology*<sup>®</sup>, EUA. O anticorpo anti-Bcl-2-FITC foi adquirido da *Invitrogen*<sup>®</sup>, Califórnia, EUA, o anticorpo anti-survivina-PE foram adquiridos da BD Biosciences<sup>®</sup>, New Jersey, EUA. Os anticorpos primários utilizados para western blot (WB) anti-Tom40, anti-SMAC, anti-Bak, anti-Bax, anti-Bcl-2 e anti-Bcl-xL, anti-PARP, anti-PERK foram adquiridos da Santa Cruz *Biotechnology*<sup>®</sup>, Santa Cruz, USA. Os anticorpos anti-BiP, anti-CHOP, anti-eIF2 $\alpha$ , anti-p-eIF2 $\alpha$  e anti-p-PERK, anti-ciclina D, anti-Bid e anti-caspase-3 foram adquiridos da Cell Signaling<sup>®</sup>, Denver, USA. Anti-PML e anti-CALR foram adquiridos da StressGen *Biotechnologies*<sup>®</sup>, British Columbia, Canadá, anti-mouse-Alexa 555 da Molecular Probes<sup>®</sup>, Califórnia, USA, anti-FLAG da Sigma-Aldrich<sup>®</sup>, Missouri, EUA, anti-GAPDH da Abcam<sup>®</sup>, Cambridge, UK, anti-citocromo *c* da BD Biosciences<sup>®</sup>, New Jersey, USA e anti-endonuclease G da Novus Biological<sup>®</sup>, Littleton, USA. Os anticorpos secundários anti-rabbit IgG HRP, anti-mouse IgG HRP foram adquiridos da Sigma-Aldrich<sup>®</sup>, Missouri, USA, anti-rabbit-Alexa 647 da Molecular Probes<sup>®</sup>, Califórnia, USA, anti-goat IgG HRP (Santa Cruz *Biotechnology*<sup>®</sup>, Santa Cruz, USA).

## 4.4 COMPOSTOS INVESTIGADOS

### 4.4.1 Síntese química das chalconas

As 70 chalconas sintéticas investigadas no presente trabalho foram sintetizadas pela Dr<sup>a</sup>. Patrícia Devantier Neuenfeldt e pela Dr<sup>a</sup>. Louise Domeneghini Chiaradia-Delatorre, sob orientação do Prof. Dr. Ricardo José Nunes do Laboratório Estrutura e Atividade (LEAT) do Departamento de Química da UFSC.

Os reagentes utilizados foram obtidos comercialmente da Sigma-Aldrich<sup>®</sup> e os solventes da Vetec<sup>®</sup>. As chalconas foram preparadas por condensação aldólica utilizando KOH (50% p/v) como solvente sob condições básicas à temperatura ambiente (20 a 25°C) durante 24 h. Água destilada e 10% de HCl foram adicionados à reação para a precipitação total dos compostos, os quais foram obtidos por filtração a vácuo e posteriormente recristalizados em diclorometano e

hexano. As estruturas foram identificadas pelo ponto de fusão, espectroscopia de infravermelho, espectroscopia de ressonância magnética nuclear  $^1\text{H}$  e  $^{13}\text{C}$  e análise elementar.

Das 70 chalconas sintéticas investigadas, 15 são derivadas do aldeído do pireno (Série PY), 14 da acetofenona do antraceno (Série AN), 11 do aldeído do antraceno (Série KP), 16 da acetofenona bifênil (Série JE) e 14 do aldeído bifênil (Série JA) (Apêndice 1).

#### 4.4.2 Isolamento do acetato de miconidina (GE1)

O isolamento do composto **GE1** foi realizado a partir das partes aéreas de *E. hiemalis* coletadas em abril de 2014 em Porto Alegre (Rio Grande do Sul, Brasil). A identificação da planta foi realizada pelo Prof. Dr. João André Jarenkow (Departamento de Botânica, Universidade Federal do Rio Grande do Sul - UFRGS, Brasil) e uma exsicata (ICN 127910) foi depositada no Herbário Instituto de Ciências Naturais da UFRGS com o número ICN 127910 (ZATELLI, 2015).

As folhas frescas (355 g) e os botões florais (27 g) foram rasurados e submetidos ao procedimento de maceração com diclorometano (1,8 L e 0,25 L, respectivamente). Após sete dias, os extratos foram concentrados em evaporador rotatório sob pressão reduzida a 40 ° C, proporcionando 9,10 g e 0,49 g de extratos brutos de folhas e botões florais, respectivamente. Uma alíquota dos extratos foi submetida ao fracionamento cromatográfico por cromatografia líquida a vácuo utilizando-se sílica gel e um gradiente de solventes em ordem crescente de polaridade (hexano-clorofórmio-acetato de etila-metanol). Este procedimento originou 16 frações (A1-A16), dessas, na fração A8 foi identificado o composto puro de peso molecular de 252,136 g/mol **GE1** (acetato de miconidina). A identificação do composto isolado foi realizada por meio de técnicas espectroscópicas e espectrométricas e também pela comparação com a literatura. O composto **GE1** foi gentilmente cedido pelas alunas Gabriele Andressa Zatelli e Ana Cláudia Philippus, as quais são orientadas pela Prof. Dr<sup>a</sup>. Miriam de Barcellos Falkenberg do Departamento de Ciências Farmacêuticas da UFSC.

#### 4.5 LINHAGENS CELULARES E CULTIVO CELULAR

Seis linhagens celulares de LAs humanas foram incluídas no presente trabalho: K562 (LMC em fase blástica), Kasumi (LMA com t(8:21)(q22;q22), Jurkat e CEM (LLA de células T), HL-60 (LPA) e

U937 (leucemia monocítica aguda). Foram utilizadas ainda as seguintes linhagens de tumores sólidos, todas de origem humana: HT-29 (adenocarcinoma colorretal), MDA-MB-231 (adenocarcinoma de mama), SSC-25 (carcinoma de boca), A549 (carcinoma de pulmão), HeLa (adenocarcinoma de colo de útero) e U251 (glioblastoma astrocitoma). Também foram incluídas no estudo uma linhagem de mieloma múltiplo (MM) humano (MM-1S), uma linhagem de células-tronco de glioma (U251NS) e três linhagens de células não neoplásicas: MRC-5 (células pulmonares humanas) e L929 e NIH/3T3 (fibroblastos murinos).

As células K562 e Jurkat foram cedidas pelo Prof. Dr. Alberto Orfao, do *Centro de Investigación del Cáncer* da Universidade de Salamanca; a linhagem MM.1S foi cedida pela Dr<sup>a</sup>. Anamika Dhyani do Hemocentro da Universidade Estadual de Campinas; as células U251NS foram cedidas pelo Dr. Kaveh Samii, do *Département de Physiologie Cellulaire et Métabolisme* da Universidade de Genebra; e a linhagem L929 foi cedida pelo Departamento de Bioquímica e Biologia Molecular da Universidade Federal do Paraná. As demais células foram adquiridas do Banco de Células do Rio de Janeiro (BCRJ, Rio de Janeiro, RJ, Brasil) ou do *American Type Culture Collection* (ATCC, Rockville, MD, USA).

As linhagens de LA e de MM foram cultivadas em meio de cultura RPMI 1640, enquanto que as células de tumores sólidos foram cultivadas em meio DMEM, ambos suplementados com 10 % de SBF, 10.000 U/ml de penicilina, 10.000 µg/mL de estreptomicina e 10 mM de tampão HEPES, pH 7,4. A linhagem U251NS foi mantida em meio DMEM/F12 suplementado com 100 U/ml de penicilina, 100 µg/ml de estreptomicina, 6 mM de tampão HEPES, 1,6 mM de L-glutamina, 50 µM de β-mercaptoetanol, 10 ng/mL de suplemento B-27, 20 ng/mL de FGF, 20 ng/ml de EGF e 50 U/ml de heparina.

As células foram mantidas em frascos plásticos para cultura celular em estufa úmida a 37°C, com 5% CO<sub>2</sub>. Inicialmente as células foram semeadas a uma densidade de 1,0 x 10<sup>6</sup> células/frasco e repicadas a cada 48 h em cabine de segurança biológica. Para as células em suspensão (K562, Kasumi, Jurkat, CEM, HL-60, U937 e MM-1S), o meio de cultura contendo as células foi centrifugado a 264 x g por 5 minutos em temperatura ambiente. O sobrenadante foi descartado e o sedimento celular foi ressuspenso em 1,0 mL de meio RPMI. Já as células aderidas (HT-29, MDA-MB-231, SSC-25, A549, HeLa, U251, U251NS, MRC-5, L929 e NIH/3T3) foram primeiramente desprendidas das garrafas com 1,5 mL de uma solução de tripsina e EDTA 0,25 %.

Posteriormente foi utilizado 5 mL de meio de cultura contendo 10 % de SBF a fim de que a alfa 1-anti-tripsina contida no soro neutralizasse o efeito da tripsina. Após o deslocamento da camada celular, as células foram suspensas em meio DMEM ou DMEM/F12, centrifugadas (264 x g por 5 minutos) e o pellet foi ressuspensionado em novo meio de cultura para a realização da contagem celular. O número de células viáveis foi avaliado pelo método de exclusão do corante Azul de Trypan (0,5%) (TENNANT, 1964) e foram utilizadas nos experimentos somente as culturas com viabilidade celular superior a 95%.

#### 4.6 ENSAIOS DE VIABILIDADE CELULAR E DETERMINAÇÃO DAS CURVAS CONCENTRAÇÃO E TEMPO RESPOSTA

As chalconas sintéticas e o composto **GE1** foram dissolvidos em DMSO na concentração de 10 mM e armazenados a 4°C. Para obter as concentrações utilizadas nos experimentos, foram preparadas soluções intermediárias obtidas a partir das soluções estoque e diluídas em meio de cultura.

Inicialmente foi realizada a triagem das 70 chalconas na concentração de 100 µM em células K562 (50.000 células/poço) por 24 h a fim de avaliar seus potenciais efeitos citotóxicos. A viabilidade celular foi avaliada pelo ensaio colorimétrico do MTT. Este método consiste em medir indiretamente a viabilidade celular pela atividade enzimática mitocondrial de células vivas que reduzem o MTT de cor amarela ao seu derivado formazan de cor roxa (MOSMANN, 1983).

Após o tempo de incubação com os compostos, as placas foram centrifugadas a 264 x g por 5 minutos, o meio de cultura foi parcialmente removido e foi adicionado novo meio de cultura contendo 10% (v/v) de solução de MTT (5 mg/ml em PBS). Após 3 h de incubação a 37°C, as placas foram novamente centrifugadas e o sobrenadante removido. Os precipitados formados em cada poço foram dissolvidos com 100 µL de solução de álcool isopropílico/HCL 0,04 N e as placas foram mais uma vez centrifugadas para a remoção dos restos celulares. O sobrenadante foi transferido para outra placa, onde foi realizada a leitura das absorbâncias em espectrofotômetro *Microwell Systems* (Organon Teknika®, Bélgica) no comprimento de onda 540 nm. Foram utilizados dois controles, um de células sem tratamento, e outro acrescido do solvente (DMSO) ao meio de cultura na maior concentração utilizada no experimento. Todos os experimentos foram repetidos pelo menos três vezes de forma independente, os procedimentos de preparação das amostras foram executados em



condições estéreis e as placas de cultura foram mantidas em estufa nas condições descritas acima. A densidade óptica do grupo controle (células sem tratamento) foi considerada como 100% de células viáveis. Os valores de absorvância foram transformados em porcentagens de viabilidade em relação aos controles celulares.

As chalconas que apresentaram maior redução da viabilidade celular foram selecionadas para a realização de curvas concentração-e-tempo-resposta nas linhagens K562, Jurkat, U937, Kasumi, HL-60, CEM, MM-1S, HT-29, MDA-MB-231, SSC-25, A549, HeLa, U251, U251NS, MRC-5, L929 e NIH-3T3. O composto **GE1** foi avaliado sobre as linhagens K562, Jurkat, MM-1S, L929, HT-29, HeLa, U251 e U251NS. A quantidade de células utilizadas nos protocolos experimentais manteve a relação de  $5 \times 10^4$  células/poço para o tempo de tratamento de 24 h,  $2,5 \times 10^4$  células/poço para 48 h e  $1,25 \times 10^4$  células/poço para 72 h, em um volume de 200  $\mu$ L de meio de cultura. As concentrações das chalconas utilizadas nos experimentos variaram entre 1 e 100  $\mu$ M, enquanto que a concentração de **GE1** variou entre 1 e 50  $\mu$ M, em ambos os casos, nunca ultrapassando 2% (v/v) de DMSO e 10 % do volume total do poço.

A concentração inibitória 50 % ( $CI_{50}$ ) foi obtida a partir da análise de regressão linear dos gráficos plotados com os valores de porcentagem de viabilidade celular *versus* concentração, utilizando-se o *software* GraphPad Prism 6. A  $CI_{50}$  de 24 h calculada para cada um dos compostos selecionados foi utilizada nos demais ensaios.

#### 4.7 CÁLCULO DO ÍNDICE DE SELETIVIDADE (IS)

O IS é calculado pela razão entre a  $CI_{50}$  de células utilizadas como padrão de comparação e a  $CI_{50}$  de outra linhagem para a qual se deseja verificar se o composto é seletivo (MACHANA et al., 2011, DAHHAM et al., 2015). No presente estudo foram comparadas as  $CI_{50}$  de células de linhagem leucêmica com células não neoplásicas e também com células de tumores sólidos, segundo as seguintes equações (PEÑA-MORAN et al., 2016):

$$IS = \frac{CI_{50} \text{ linhagem não neoplásica}}{CI_{50} \text{ linhagem leucêmica}} \quad IS = \frac{CI_{50} \text{ linhagem de tumores sólidos}}{CI_{50} \text{ linhagem leucêmica}}$$

Sendo que:

$$\begin{aligned} IS \leq 5 & \text{ (baixa seletividade)} \\ 5 < IS < 10 & \text{ (moderada seletividade)} \\ IS \geq 10 & \text{ (alta seletividade)} \end{aligned}$$

## 4.8 AVALIAÇÃO DO EFEITO DOS COMPOSTOS EM CÉLULAS DE SP

As chalconas selecionadas e o composto **GE1** foram avaliados em células mononucleadas e em eritrócitos obtidos do SP de seis indivíduos saudáveis e não fumantes atendidos no Hospital Universitário Polydoro Ernani de São Thiago (Florianópolis, Brasil), onde assinaram o Termo de Consentimento Livre e Esclarecido (TCLE), conforme o Comitê de Ética de Pesquisa em Seres humanos da UFSC (CEPSH nº746.486/2014) (Apêndice 2). As amostras foram obtidas por punção venosa e processadas imediatamente após a coleta.

### 4.8.1 Obtenção das células mononucleadas de indivíduos saudáveis

As amostras sanguíneas foram coletadas com anticoagulante EDTA e diluídas em tampão PBS numa proporção de 1,0 mL de amostra para 1,0 mL de PBS. Em seguida, as amostras diluídas foram gentilmente colocadas sobre Ficoll-Hypaque (densidade 1.077 g/m<sup>3</sup>) na proporção 1:1 e centrifugada a 300 x g por 30 minutos. A interfase contendo as células mononucleadas foi transferida para um novo tubo cônico, e as mesmas foram ressuspensas em 10 mL de tampão PBS e centrifugadas a 200 xg por 10 minutos. Após a centrifugação, o sobrenadante foi descartado e as células foram novamente lavadas com PBS. Após a última lavagem, as células mononucleadas foram ressuspensas em 1,0 mL de meio RPMI 1640, o número de células viáveis foi avaliado pelo método de exclusão do corante Azul de Trypan (TENNANT, 1964) e foram utilizadas somente as amostras que apresentaram mais de 90% de viabilidade. As células mononucleadas foram plaqueadas na densidade de  $1,0 \times 10^6$  células/poço e incubadas com os compostos selecionados em concentrações múltiplas da  $CI_{50}$  de 24. Após 24 h de incubação, a viabilidade celular foi avaliada pelo método do MTT.

### 4.8.2 Teste de hemólise

O teste hemolítico tem por objetivo avaliar o potencial de um composto em causar lesões à membrana dos eritrócitos e, consequentemente, extravasamento do conteúdo celular (EVANS et al., 2013). O ensaio foi realizado em amostras de SP coletadas com citrato de sódio. O sangue foi centrifugado a 264 x g por 10 min no próprio tubo de coleta e o sobrenadante contendo plasma e leucócitos foi

descartado. O pellet contendo as hemácias foi lavado três vezes com solução salina (0.9 % de NaCl) e, em seguida, diluído a fim de obter a dispersão estoque de eritrócitos. A absorbância da dispersão estoque foi lida em espectrofotômetro a 540 nm e a diluição foi ajustada até obter-se um valor de absorbância entre 2.2 e 1.8 (teste de diluição). A um volume de 50 µl de dispersão de eritrócitos, foram adicionados: 950 µl de salina (controle negativo, 0% de lise), 950 µl de água destilada (controle positivo, 100% de lise) e 950 µl de solução salina contendo diferentes concentrações dos compostos analisados (sempre múltiplas da  $CI_{50}$ ). As amostras foram incubadas em termobloco sob agitação a 100 x g por 1h a 37 °C e, em seguida, centrifugadas a 500 x g por 5 minutos. O sobrenadante de cada tubo (100 µL) foi transferido para uma placa de 96 poços e a absorbância foi lida em espectrofotômetro (*Microwell Systems*, Organon Teknika®, Bélgica). Todos os ensaios foram realizados em triplicata. A taxa de hemólise foi calculada refletindo a quantidade de hemoglobina liberada no sobrenadante devido a ruptura dos eritrócitos pela seguinte equação (SAHU et al., 2017):

$$\text{Taxa de hemólise (\%)} = \frac{DO_t - OD_{cn}}{DO_{cp} - DO_{cn}} \times 100$$

Onde:  $D_t$ , abs amostra teste;  $D_{cn}$ , abs controle negativo;  $D_{cp}$ , abs controle positivo.

#### 4.9 AVALIAÇÃO DO CICLO CELULAR

Para avaliar os efeitos das chalconas selecionadas e do composto **GE1** nas fases do ciclo celular, as células K562 e Jurkat ( $1,0 \times 10^6$  células/poço) foram incubadas por 24 h com uma subconcentração de cada composto correspondente à metade da  $CI_{50}$  ( $1/2 CI_{50}$ ). Após esse período, as células foram lavadas com PBS e fixadas com etanol 70% durante 30 minutos a 4°C. Em seguida, as células foram lavadas com PBS contendo 2% de BSA para minimizar as reações inespecíficas. Por fim, adicionou-se ao sedimento celular 500 µL do “*PI/RNASE Solution kit*” com PI e RNase e as células foram mantidas no escuro por 15 minutos em temperatura ambiente, de acordo com as instruções do fabricante. As amostras foram adquiridas no citômetro de fluxo BD FACSCanto™ II (Becton Dickinson Immunocytometry Systems®) e analisadas no *software* WinMID versão 2.8. Foram adquiridos 20.000 eventos com *gate* no canal PE (510-595 nm) e os *doublets* foram retirados utilizando-se as características de *Forward Scatter* (FSC) *High* e *Side Scatter* (SSC) *Area* das células. O

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

#### 4.10 DETERMINAÇÃO DO TIPO DE MORTE CELULAR

A avaliação da morte celular induzida pelos compostos selecionados foi avaliada por três metodologias distintas: microscopia de fluorescência com BE e AO, marcação com Anexina V conjugada à FITC por citometria de fluxo e ensaio de fragmentação do DNA em gel de agarose. Em todos os ensaios, o controle negativo foi preparado com células sem tratamento e os experimentos foram repetidos pelo menos três vezes de forma independente.

##### 4.10.1 Avaliação das alterações morfológicas por microscopia de fluorescência com BE/AO

As células K562 e Jurkat ( $1,0 \times 10^6$  células/poço) foram tratadas com as chalconas selecionadas ou com o composto **GE1** nas respectivas  $CI_{50}$  de 24 h. Após 12 h de incubação, as células foram lavadas com PBS e o sedimento celular foi ressuscitado em 40  $\mu$ L de uma solução de BE (5  $\mu$ g/mL) e AO (10  $\mu$ g/mL) na proporção 1:1. Em seguida, 25  $\mu$ L da suspensão celular foram transferidas para uma lâmina de vidro e recobertas com lamínula. As lâminas foram observadas em microscópio de fluorescência (Olympus BX-FLA), utilizando-se a objetiva de 40x e os campos representativos foram fotografados (Olympus BX40, Japão).

##### 4.10.2 Avaliação da exposição dos resíduos de fosfatidilserina pelo método da Anexina V-FITC

As células K562 e Jurkat ( $1,0 \times 10^6$  células/poço) foram tratadas com as chalconas selecionadas ou com o composto **GE1** nas respectivas  $CI_{50}$  de 24 h. Após 12 h de tratamento, as células foram lavadas com PBS e foi utilizado o *Annexin V-FITC Apoptosis Detection kit* segundo as recomendações do fabricante. Resumidamente, após a lavagem com PBS, o *pellet* celular foi ressuscitado em 1,0 mL de tampão de anexina na diluição 1:10. Dessa suspensão foi retirada uma alíquota de 100  $\mu$ L, na qual foi adicionado 5  $\mu$ L de Anexina V-FITC. As amostras foram incubadas por 15 minutos no escuro em temperatura ambiente e, em seguida, foi adicionado 400  $\mu$ L de PBS para aquisição no citômetro de fluxo BD FACSCanto™ II (Becton

Dickinson Immunocytometry Systems<sup>®</sup>). Foram adquiridos 10.000 eventos e os *doublets* foram retirados utilizando-se as características de FSC *High* e SSC *Area*. Os resultados foram analisados no *software Infinicyt* (Cytognos<sup>®</sup>) versão 1.7.

#### 4.10.3 Fragmentação do DNA em gel de agarose

As células K562 e Jurkat ( $1,0 \times 10^6$  células/poço) foram tratadas com as chalconas selecionadas ou com **GE1** nas respectivas  $CI_{50}$  de 24 h. Após 24 h, a extração de DNA foi realizada utilizando-se o kit comercial de extração de DNA da QIAGEN<sup>®</sup> segundo as orientações do fabricante. As amostras de DNA extraídas foram transferidas para um microtubo livre de RNase e DNase e separadas por eletroforese em gel de agarose 2 %, corado com brometo de etídio (1  $\mu\text{g}/\text{mL}$ ). Por fim, os padrões de separação formados foram visualizados e fotografados sob iluminação UV de fotodocumentação de géis (DOC-PRINT<sup>®</sup>, Biosystems<sup>®</sup>).

#### 4.11 AVALIAÇÃO DO POTENCIAL MITOCONDRIAL

Para avaliar os efeitos das chalconas selecionadas e do composto **GE1** no potencial mitocondrial foi utilizado o *kit* MitoView 633 (Biotium<sup>®</sup>, EUA). Segundo o fabricante, o Mito View 633 é um corante fluorescente mitocondrial de coloração vermelha permeável à membrana plasmática que, em células viáveis, se acumula no interior das mitocôndrias devido à integridade do  $\Delta\Psi_m$  formando agregados fluorescentes. Quando sinais de morte alcançam a mitocôndria, a diminuição do  $\Delta\Psi_m$  resulta na perda de fluorescência devido ao extravasamento do corante. As células K562 e Jurkat ( $1,0 \times 10^6$  células/poço) foram incubadas com os compostos nas respectivas  $CI_{50}$  de 24 h por 12 h. Após esse período, as células foram lavadas com PBS, submetidas à centrifugação a 264 x g por 5 minutos e o sobrenadante foi descartado. Em seguida, foram adicionados sobre o sedimento celular 200  $\mu\text{L}$  da solução de Mito View 633 diluído 1:10.000 de acordo com as instruções do fabricante. As células foram incubadas por 30 minutos à temperatura ambiente (20 a 25°C) no escuro. Após esse período, as células foram novamente centrifugadas, o sobrenadante foi descartado e o sedimento foi ressuspensionado em 500  $\mu\text{L}$  de PBS. As amostras foram adquiridas no citômetro de fluxo BD FACSCanto<sup>™</sup> II (Becton Dickinson Immunocytometry Systems<sup>®</sup>) e avaliadas no *software Infinicyt* versão 1.7. Foram adquiridos 10.000 eventos e os

*doublets* foram retirados utilizando-se as características de FSC *High* e SSC *Area*.

#### 4.12 OBSERVAÇÃO DA MORFOLOGIA MITOCONDRIAL POR MICROSCOPIA CONFOCAL APÓS TRANSFEÇÃO DE MITO-RFP COM LIPOFECTAMINA

Para a observação da morfologia mitocondrial após o tratamento com os compostos selecionados, foram utilizadas células HeLa. Primeiramente, foi feita a transfecção das células com mito-RFP (pDsRed2-Mito, Clontech Laboratories<sup>®</sup>) utilizando-se como método de transfecção a lipofectamina. O mito-RFP é um vetor que expressa uma proteína fluorescente vermelha (RFP, do inglês *red fluorescent protein*) combinada a sequencia mitocondrial alvo da subunidade VIII da proteína citocromo c oxidase. A lipofectamina é um reagente de transfecção que contém subunidades lipídicas capazes de formar lipossomas em ambientes aquosos. Dessa forma, aprisiona no seu interior o vetor a ser transfectado. Assim, as células HeLa ( $5 \times 10^5$  células/ poço) foram transfectadas em meio de cultura sem SBF utilizando lipofectamina segundo as instruções do fabricante (3,75  $\mu\text{L}$  de lipofectamina/ 1,6  $\mu\text{L}$  de mito-RFP em 500  $\mu\text{L}$  de meio sem SBF). Após 24 h, as células transfectadas foram tripsinizadas, lavadas com PBS, plaqueadas ( $1 \times 10^6$  células/poço) sobre lamínulas em placas de 24 poços e incubadas com os compostos selecionados ( $\text{CI}_{50}$ ) por 24 h. No dia seguinte, as células foram fixadas com paraformaldeído e as lamínulas contendo as células foram montadas para visualização no microscópio confocal Zeiss LSM700 em objetiva de 63 x. Os resultados foram analisados pelo *software ImageJ*.

#### 4.13 AVALIAÇÃO DA PRODUÇÃO DE EROS

A produção de EROS foi avaliada pelo kit *MitoSox Red Molecular Probes*, que se baseia na oxidação do reagente MitoSox pelo radical superóxido produzindo fluorescência vermelha. As células K562 e Jurkat ( $1,0 \times 10^6$  células/poço) foram incubadas com os compostos selecionados nas respectivas  $\text{CI}_{50}$  por 12 h. Após o tratamento, as células foram centrifugadas e o sobrenadante foi removido a fim de deixar apenas 300  $\mu\text{L}$  de meio em cada tubo. Em seguida, 3  $\mu\text{L}$  de solução MitoSox foi adicionado em cada amostra, seguida de 10 minutos de incubação no escuro a temperatura ambiente. Finalmente, foi adicionado 1,7  $\mu\text{L}$  de DRAQ7, a fim de separar as células viáveis

das células em processo de morte. As análises foram realizadas no citômetro de fluxo *CyAn ADP Analyzer* (Beckman Coulter®) e analisadas no *software FlowJo*® versão 10. Foram adquiridos 10.000 eventos, os *doublets* foram retirados utilizando-se as características de *FSC High* e *SSC Area*.

#### 4.14 AVALIAÇÃO DA EXPRESSÃO DAS PROTEÍNAS BAX, BCL-2, FASR, AIF, SURVIVINA, KI-67 E PML POR CITOMETRIA DE FLUXO

As células K562 e Jurkat ( $1,0 \times 10^6$  células/poço) foram incubadas com as chalconas selecionadas e com o composto **GE1** nas suas respectivas  $CI_{50}$  de 24h por 12 h. Após este período, as células foram lavadas com PBS e permeabilizadas com 200  $\mu$ L do reagente *BD Fix/Perm* (BD Biosciences®) (exceto para a proteína de membrana FasR). Após 20 minutos de incubação a temperatura ambiente (20 a 25°C), as amostras foram submetidas a novas lavagens com PBS, o sobrenadante foi descartado e o sedimento celular foi ressuspensionado com 100  $\mu$ L de tampão de lavagem *Fix/Perm*. Em seguida, foram adicionados 5 $\mu$ L dos anticorpos monoclonais anti-Bcl-2-FITC, anti-survivina-PE, anti-Bax-PerCP, anti-FasR-PE, anti-AIF-FITC e anti-KI67-FITC (todos 1:2000) nas seguintes combinações (FITC/PE/PerCP): (FITC/--/PerCP), (FITC/PE/--) e (FITC/--/--). Após 15 minutos de incubação, as amostras foram novamente lavadas com PBS e o sedimento celular foi ressuspensionado em 500  $\mu$ L de PBS para a análise no citômetro de fluxo BD FACSCanto™ II (Becton Dickinson Immunocytometry Systems®). A avaliação foi realizada no *software Infinicyt* versão 1.7 e o controle negativo foi preparado com células sem tratamento.

Para a avaliação da expressão da proteína PML, as células K562 e Jurkat ( $1,0 \times 10^6$  células/poço), ambas expressando PML, foram incubadas com os compostos selecionados nas respectivas  $CI_{50}$  por 24 h. Após 20 minutos de fixação com 4% de paraformaldeído e duas lavagens com PBS, as amostras foram permeabilizadas com PBS 0.2% Triton X-100 por 5 minutos e novamente lavadas com PBS. As amostras foram incubadas por 20 minutos a 4°C com PBS contendo Anti-PML (1:1000). As células foram lavadas novamente com PBS e incubadas com o anticorpo anti-*mouse*-Alexa 555 (1:5000) por 20 minutos a 4°C. As amostras foram adquiridas no citômetro de fluxo Cyan Flow cytometer (Beckman Coulter®, Nyon, Suíça) e os dados foram analisados pelo *software FlowJo*® versão 10.

#### 4.15 AVALIAÇÃO DA EXPRESSÃO DAS PROTEÍNAS BAX, BAK, BCL-2, BCL-XL, CASPASE-3, PARP E BID POR WB

As células K562 e Jurkat ( $1,0 \times 10^6$  células/poço) foram incubadas com as chalconas selecionadas ou com **GE1** nas respectivas  $CI_{50}$  de 24 h. Após 24 h de incubação, as células foram centrifugadas, lavadas em tampão PBS e o sedimento celular foi ressuspensionado em 100  $\mu$ L de tampão de lise RIPA contendo um tablete de inibidor de proteases (cOmplete™, Mini, EDTA-free Protease Inhibitor Cocktail) para cada 10 mL de tampão. Em seguida, as amostras foram incubadas por 10 minutos em banho de gelo e posteriormente centrifugadas a  $10.000 \times g$  por 10 minutos para obtenção dos lisados celulares totais (LCT). A concentração total de proteínas foi determinada pelo *BCA Protein Assay Kit* segundo as instruções do fabricante. Este método baseia-se na redução do íon cobre  $Cu^{+2}$  para  $Cu^{+1}$  em condições alcalinas (reação de biureto), seguida pela formação de um complexo  $Cu^{+1}$  com o reagente ácido bicinonínico (BCA), o que leva ao desenvolvimento de cor roxa lida em espectrofotômetro a 562 nm e proporcional à quantidade de proteínas na amostra (SMITH et al., 1985). Aliquotas contendo 20  $\mu$ g de proteína foram fracionadas em gel de poliacrilamida (SDS-PAGE) nas concentrações de 10 % ou 15 %. Após a eletroforese, as amostras foram transferidas dos géis para membranas de PDVF. As membranas foram incubadas em 100 mM Tris, pH 7,5, 0,9% NaCl, 0,1% Tween 20 e 1 % BSA por 1 h antes da incubação com o anticorpo primário anti-Caspase 3 (8G10)m (1:1000), anti-Bid (1:500), anti-PARP (H-250) (1:500), anti-Bak (1:1000), anti-Bax (1:1000), anti-Bcl-2 (1:1000), anti-Bcl-xL (1:1000) e anti-GAPDH (1:2000) *overnight*. No dia seguinte, as membranas foram lavadas por 1 h em solução salina tamponada com Tris contendo 0,1 % de Tween 20, pH 7,5 (tampão TBST) e, em seguida, incubadas com os anticorpos secundários anti-rabbit IgG HRP, anti-mouse IgG HRP e anti-goat IgG HRP (todos 1:5000). As proteínas imunorreativas (bandas), foram reveladas pelo kit *ECL developing system* utilizando o leitor *PXi gel imaging system* (Syngene®) (NILAND et al., 2010, BEN SAFTA et al., 2015).

#### 4.16 FRACIONAMENTO CELULAR

As células K562 e Jurkat ( $1,0 \times 10^6$  células/poço) foram incubadas com os compostos selecionados em diferentes concentrações múltiplas da  $CI_{50}$ . Após 24 h, as células foram centrifugadas e lavadas



com tampão PBS para a retirada completa do meio de cultura. A fração citosólica (FC) foi obtida ressuspensando as células em 100  $\mu$ L de tampão de extração citosólico (70 mM KCl, 137 mM NaCl, 1.4 mM  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  pH 7.2, 4.3 mM  $\text{Na}_2\text{HPO}_4$ , 250 mM sucrose, 50  $\mu\text{g/ml}$  digitonina, inibidores de proteases) por 5 minutos em banho de gelo. Em seguida, as células foram centrifugadas a 1000 g x por 5 minutos e o sobrenadante contendo a FC foi transferido para um novo tubo. O sedimento celular foi ressuspensado em 100  $\mu$ L de tampão de extração mitocondrial (50mM Tris pH 7.4, 150mM NaCl, 2mM EDTA, 2mM EGTA, 0.22% Triton X-100, 0.3% NP-40, inibidores de protease), centrifugado por 10 minutos a 10,000 g x e o sobrenadante contendo a fração mitocondrial (FM) foi transferido para um novo tubo. A concentração de proteína em cada fração e a técnica de WB foram realizadas conforme descrito anteriormente. Foram utilizados os anticorpos primários anti-Tom40, anti-SMAC, anti-citocromo c, anti-endonuclease G e anti-GAPDH (todos 1:1000) e os anticorpos secundários anti-rabbit IgG, anti-mouse IgG e anti-goat IgG (todos 1:5000).

#### 4.17 PRÉ TRATAMENTO COM CICLOHEXIMIDA

A cicloheximida, produzida pela bactéria *Streptomyces griseus*, é um inibidor da síntese proteica de células eucarióticas. Seu efeito inibitório é reversível (para isso, é suficiente retirá-la do meio de cultura onde se encontram as células), e é baseado na sua capacidade de interferir na etapa de alongação na tradução de mRNA (JACQUEMIN et al., 2015). Considerando os seus efeitos tóxicos, inicialmente foi determinada a concentração de cicloheximida capaz de inibir a síntese de proteínas sem apresentar efeito citotóxico significativo para células de LA. Para isso, as células K562 e Jurkat ( $5,0 \times 10^4$  células/poço) foram incubadas com diferentes concentrações de cicloheximida (0, 1, 10, 25, 50, 100 and 200  $\mu\text{M}$ ) por 25 h e a viabilidade celular foi avaliada pelo método do MTT. Simultaneamente,  $1,0 \times 10^6$  células K562 e Jurkat foram incubadas com as mesmas concentrações de cicloheximida, os LCT foram obtidos com tampão RIPA e a inibição da proteína ciclina D1 foi avaliada por WB utilizando o anticorpo anti-ciclina D.

A concentração de 1  $\mu\text{M}$  de cicloheximida foi escolhida como sendo a menor concentração capaz de inibir a síntese de proteínas nas células K562 e Jurkat com o mínimo de efeito citotóxico às células. Assim, as células K562 e Jurkat foram incubadas com 1  $\mu\text{M}$  de

cicloheximida por 1 h e, então, tratadas com as chalconas selecionadas nas respectivas  $CI_{50}$  por 24 h. A viabilidade celular ( $5,0 \times 10^4$  células/poço) foi avaliada pelo método do MTT e a expressão de proteínas ( $1,0 \times 10^6$  células/poço) por WB.

#### 4.18 INIBIÇÃO DA VIA EXTRÍNSECA POR SUPEREXPRESSION DE C-FLIP

As células K562 e Jurkat foram transfectadas com c-FLIP ou com o respectivo vetor (controle) por eletroporação utilizando o *Neon electroporation system* (Invitrogen®). Resumidamente,  $1,0 \times 10^6$  células em tampão R foram eletroporadas utilizando-se pontas de 100  $\mu$ l com 10  $\mu$ g de plasmídeo controle (vetor) ou com plasmídeos que codificam c-FLIP-FLAG, ambos cedidos pelo Dr. Fabio Martinon da *Université de Lausanne*, Suíça. As células foram plaqueadas com 2 mL de meio RPMI e os parâmetros de eletroporação foram definidos como: 1250 V, 30 mA, 1 pulsos. Após a eletroporação, as células transfectadas foram selecionadas com o análogo de neomicina G418 (500  $\mu$ g/mL por um período de 1 semana) e o meio de cultura foi trocado a cada dois dias. A expressão de c-FLIP foi confirmada por WB utilizando o anticorpo anti-FLAG. As células K562 e Jurkat transfectadas com c-FLIP ( $5,0 \times 10^4$  células/poço para os ensaios de viabilidade celular e  $1 \times 10^6$  células/poço para os ensaios de WB) foram incubadas por 24 h com as chalconas selecionadas em diferentes concentrações. A viabilidade celular foi avaliada pelo ensaio MTT e a expressão de Bid, Bcl-2 Bcl-xL, Bax Bak e GAPDH foram avaliadas por WB.

#### 4.19 INIBIÇÃO DE CASPASE-8 COM O INIBIDOR Z-IETD-FMK

As células K562 e Jurkat ( $5,0 \times 10^4$  células/poço para os ensaios de viabilidade celular e  $1,0 \times 10^6$  células/poço para WB) foram pré-incubadas com 50  $\mu$ M do inibidor de caspase-8 Z-IETD-FMK (Abcam®) por 1 hora e então incubadas com as chalconas selecionadas nas respectivas  $CI_{50}$  de 24h por 24h. A viabilidade celular foi avaliada pelo método do MTT e a expressão das proteínas Bid, Bax, Bak, Bcl-2 e Bcl-xL foi avaliada por WB conforme descrito anteriormente.

#### 4.20 AVALIAÇÃO DA INDUÇÃO DE ESTRESSE NO RE

As células K562 e Jurkat ( $1,0 \times 10^6$  células/poço) foram incubadas com as chalconas selecionadas nas respectivas  $CI_{50}$  de 24 h

por 6, 18 e 24 h. Os LCT foram analisados por WB utilizando os anticorpos anti-BiP, anti-CHOP, anti-eIF2 $\alpha$ , anti-p-eIF2 $\alpha$  e anti-p-PERK, anti-PERK e anti-CALR (todos 1:1000). Como inibidor do estresse no RE, foi utilizado o composto TUDC. Para os ensaios de viabilidade celular pelo método do MTT, as células K562 e Jurkat ( $5,0 \times 10^4$  células/poço) foram pré-incubadas com 25  $\mu$ M e 50  $\mu$ M de TUDC por 1 h e, então, foram incubadas com as chalconas selecionadas nas respectivas CI<sub>50</sub> por 24 h. Para as análises por WB, as células K562 e Jurkat ( $1,0 \times 10^6$  células/poço) foram pré-incubadas com 25  $\mu$ M de TUDC por 1 h, e depois, incubadas com as chalconas (CI<sub>50</sub>) por 24 h. WB para Bip, CHOP e CALR foi realizado conforme descrito anteriormente.

#### 4.21 AVALIAÇÃO DA MORTE CELULAR IMONOGÊNICA

A liberação de ATP extracelular foi determinada pelo *ATP Determination kit* (Invitrogen<sup>®</sup>) segundo as recomendações do fabricante. Resumidamente, as células K562 e Jurkat ( $1,0 \times 10^6$  células/poço) foram incubadas com as chalconas selecionadas em diferentes concentrações ( $\frac{1}{2}$  IC<sub>50</sub>, IC<sub>50</sub> e 2x IC<sub>50</sub>) por 6 e 24h. Em seguida as células foram centrifugadas e 10  $\mu$ L do sobrenadante foi utilizado para medir a quantidade de ATP por quimioluminescência, utilizando o aparelho *Paradigm microplate reader* (Molecular Devices<sup>®</sup>). Células sem tratamento foram utilizadas como grupo controle.

A avaliação da exposição de CALR foi determinada por citometria de fluxo. As células K562 e Jurkat cells ( $1,0 \times 10^6$  células/poço) foram incubadas com as chalconas selecionadas nas suas respectivas CI<sub>50</sub> por 24 h. Em seguida, as amostras foram centrifugadas, lavadas com PBS e incubadas com anti-CALR (1:1000) por 20 minutos a 4°C. As células foram novamente lavadas em PBS e incubadas com anti-rabbit-Alexa 647 (1:5000) por 20 min a 4°C. As amostras foram adquiridas no citômetro de fluxo Cyan Flow cytometer (Beckman Coulter<sup>®</sup>, Nyon, Suíça) e os dados foram analisados pelo *software FlowJo*<sup>®</sup> versão 10.

#### 4.22 TRATAMENTO ASSOCIADO COM OS QUIMIOTERÁPICOS CITARABINA E VINCRISTINA

As células K562 ( $5,0 \times 10^4$  células/poço) foram incubadas com citarabina (2.000  $\mu$ M), um quimioterápico utilizado na clínica para

LMA. De forma similar, as células Jurkat ( $5 \times 10^4$  células/poço) foram incubadas com vincristina (200  $\mu\text{M}$ ), um quimioterápico utilizado para LLA. Nos dois experimentos, as células incubadas com os quimioterápicos foram incubadas na ausência e na presença dos compostos selecionados nas suas respectivas  $\text{CI}_{50}$  e em subconcentrações ( $1/2 \text{ CI}_{50}$ ). Células em tratamento foram consideradas como grupo controle e um grupo tratado apenas com os compostos foi incluído para fins comparativos. As células foram incubadas por 24 h a  $37^\circ\text{C}$  e a viabilidade celular foi avaliada pelo método do MTT. A viabilidade das células K562 tratadas apenas com citarabina foi comparada com as células tratadas com citarabina mais compostos e a viabilidade das células Jurkat tratadas apenas com vincristina foram comparadas com as células tratadas com vincristina mais compostos.

#### 4.23 ANÁLISE ESTATÍSTICA

Os resultados apresentados foram expressos como a média  $\pm$  erro-padrão da média (EPM) e cada experimento foi repetido, no mínimo, três vezes de forma independente. Em todas as análises foi adotado um nível de confiança de 95 %. Para a análise dos resultados e testes estatísticos foram utilizados os *softwares* GraphPad Prism 6 e SPSS IBM v.22.

A análise estatística foi realizada utilizando o teste *t* pareado ou análise de variância (ANOVA) *one way* e *two way*, complementada pelo teste *post-hoc* de Bonferroni ou Tukey. Em todas as análises foi adotado um nível de significância mínimo de 5% e as análises estatísticas foram realizadas no *software* GraphPad Prism 5.

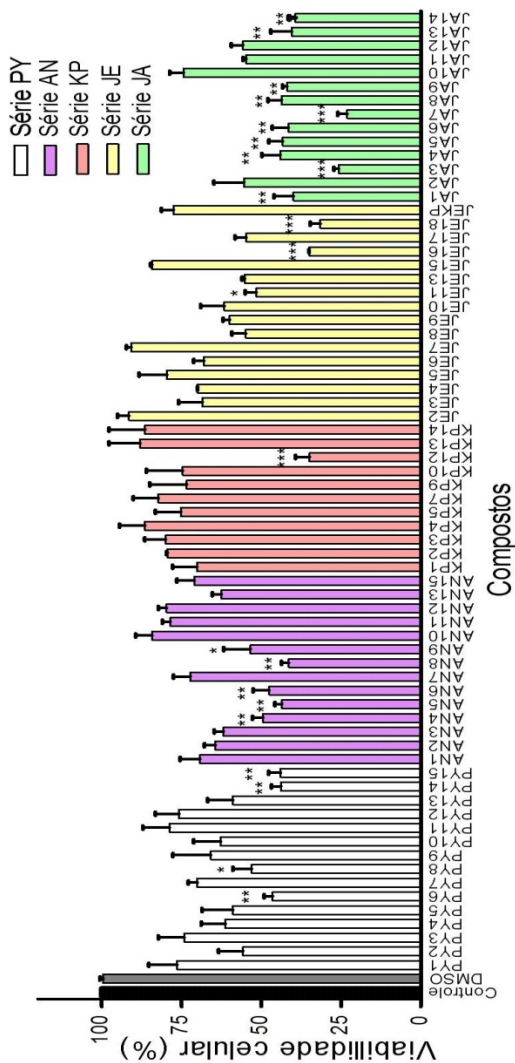
Os testes de citotoxicidade em células neoplásicas, células não neoplásicas e células mononucleadas de SP foram avaliados estatisticamente utilizando ANOVA *one way* ou *two way*, complementada pelo teste *post-hoc* de Bonferroni. Para o ensaio de hemólise, para a avaliação da externalização da fosfatidilserina, alteração do potencial mitocondrial, avaliação da expressão das proteínas pró e antiapoptóticas, de CALR e de PML, foram utilizados teste *t*, comparando cada ponto com o grupo controle. A análise estatística do ciclo celular, a avaliação da produção de EROS, os experimentos com cicloheximida, c-FLIP, TUDC e Z-IETD-FMK, a análise da produção de ATP e os tratamentos combinados com quimioterápicos foram realizadas por ANOVA *one way* seguida de Bonferroni ou Tukey.

## 5 RESULTADOS COM AS CHALCONAS SINTÉTICAS

### 5.1 TRIAGEM DAS CHALCONAS SINTÉTICAS

A fim de conduzir o estudo apenas com os compostos que demonstrassem potencial atividade citotóxica em células leucêmicas, inicialmente foi realizada a triagem das 70 chalconas sintéticas pertencentes às séries PY, AN, KP, JE e JA na linhagem K562. Como pode ser observado na Figura 10, as chalconas **KP12**, **JE16**, **JE18**, **JA3** e **JA7** foram as que apresentaram maior redução da viabilidade celular quando comparadas ao grupo controle (células sem tratamento). Em todos os ensaios de viabilidade celular utilizou-se um segundo grupo controle contendo 2 % de DMSO (concentração máxima do veículo no qual as chalconas foram diluídas), e não foi observada uma redução significativa na viabilidade celular quando comparado ao grupo sem tratamento.

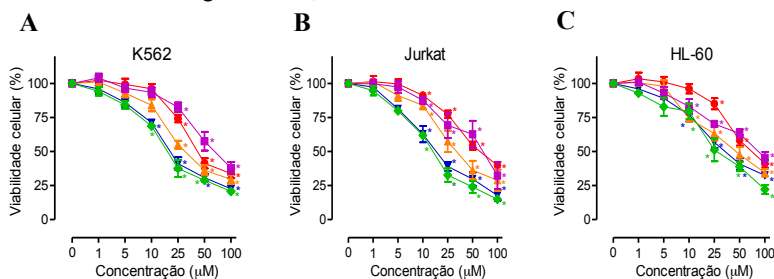
Figura 10 - Triagem das chalconas derivadas das séries PY, AN, KP, JE e JA.



As células K562 ( $5 \times 10^4$  células/poço) foram incubadas com as chalconas sintéticas na concentração de  $100 \mu\text{M}$  por 24 h. O grupo controle corresponde às células sem tratamento e o grupo DMSO corresponde à concentração máxima de solvente utilizada nos experimentos (2%). A viabilidade celular foi determinada pelo método do MTT. Cada ponto representa média  $\pm$  EPM de, pelo menos, três experimentos independentes. \*  $p \leq 0,05$ ; \*\*  $p \leq 0,01$ ; \*\*\*  $p \leq 0,001$  quando comparado ao grupo controle, ANOVA *one-way* seguida de teste *post-hoc* de Bonferroni.

As chalconas **KP12**, **JE16**, **JE18**, **JA3** e **JA7** foram selecionadas para serem avaliadas em diferentes concentrações (1, 5, 10, 25, 50 e 100  $\mu\text{M}$ ) nas linhagens K562 (LMA), Jurkat (LLA) e HL-60 (LPA) após 24 h de incubação. Como pode ser observado na Figura 11, as cinco chalconas foram citotóxicas para as três linhagens avaliadas, pois reduziram significativamente a viabilidade celular de forma dependente da concentração. Os valores de  $\text{CI}_{50}$  calculados para os cinco compostos estão demonstrados no Quadro 4. As chalconas **JA3** e **JA7** apresentaram maior redução da viabilidade celular e menores valores de  $\text{CI}_{50}$  quando comparadas às chalconas **KP12**, **JE16** e **JE18**. A chalcona **JA3** apresentou  $\text{CI}_{50}$  de 24 h de  $22,2 \pm 1,4 \mu\text{M}$  (K562),  $18,6 \pm 1,4 \mu\text{M}$  (Jurkat) e  $36,6 \pm 1,6 \mu\text{M}$  (HL-60), enquanto que a chalcona **JA7** apresentou valores ligeiramente mais baixos,  $20,4 \pm 1,1 \mu\text{M}$  (K562),  $15,9 \pm 0,5 \mu\text{M}$  (Jurkat) e  $29,8 \pm 1,5 \mu\text{M}$  (HL-60). Assim, optou-se por dar continuidade somente à investigação de **JA3** e **JA7**.

Figura 11 - Curvas concentração-resposta das chalconas KP12, JE16, JE18, JA3 e JA7 nas linhagens K562, Jurkat e HL-60.



As células K562 (A), Jurkat (B) e HL-60 (C) ( $5 \times 10^4$  células/poço) foram incubadas com as chalconas KP12, JE16, JE18, JA3 e JA7 em diferentes concentrações (1-100  $\mu\text{M}$ ) por 24 h. O grupo controle corresponde às células sem tratamento. A viabilidade celular foi determinada pelo método do MTT. Cada ponto representa média  $\pm$  EPM de, pelo menos, três experimentos independentes. \*  $p \leq 0,05$  quando comparado ao grupo controle. ANOVA *one-way* seguida de Bonferroni.

Quadro 4 - Valores de  $\text{CI}_{50}$  calculados nas células K562, Jurkat e HL60 após 24 h de incubação com as chalconas KP12, JE16, JE18, JA3 e JA7.

	$\text{CI}_{50}$ ( $\mu\text{M}$ )				
	KP12	JE16	JE18	JA3	JA7
<b>K562</b>	$55,6 \pm 1,7$	$76,8 \pm 1,9$	$35,9 \pm 1,6$	$22,2 \pm 1,4$	$20,4 \pm 1,1$
<b>Jurkat</b>	$71,0 \pm 1,5$	$63,9 \pm 1,8$	$30,1 \pm 1,4$	$18,6 \pm 1,4$	$15,9 \pm 0,5$
<b>HL-60</b>	$85,6 \pm 1,9$	$72,3 \pm 2,0$	$45,6 \pm 1,6$	$36,6 \pm 1,6$	$29,8 \pm 1,5$

Os valores de  $CI_{50}$  foram obtidos a partir da regressão linear das curvas concentração e tempo resposta e calculadas através do software GraphPad Prism 5.

## 5.2 INVESTIGAÇÃO DO EFEITO CITOTÓXICO DAS CHALCONAS JA3 E JA7 EM CÉLULAS NEOPLÁSICAS

### 5.2.1 Efeito citotóxico das chalconas JA3 e JA7 sobre células de linhagens de LA

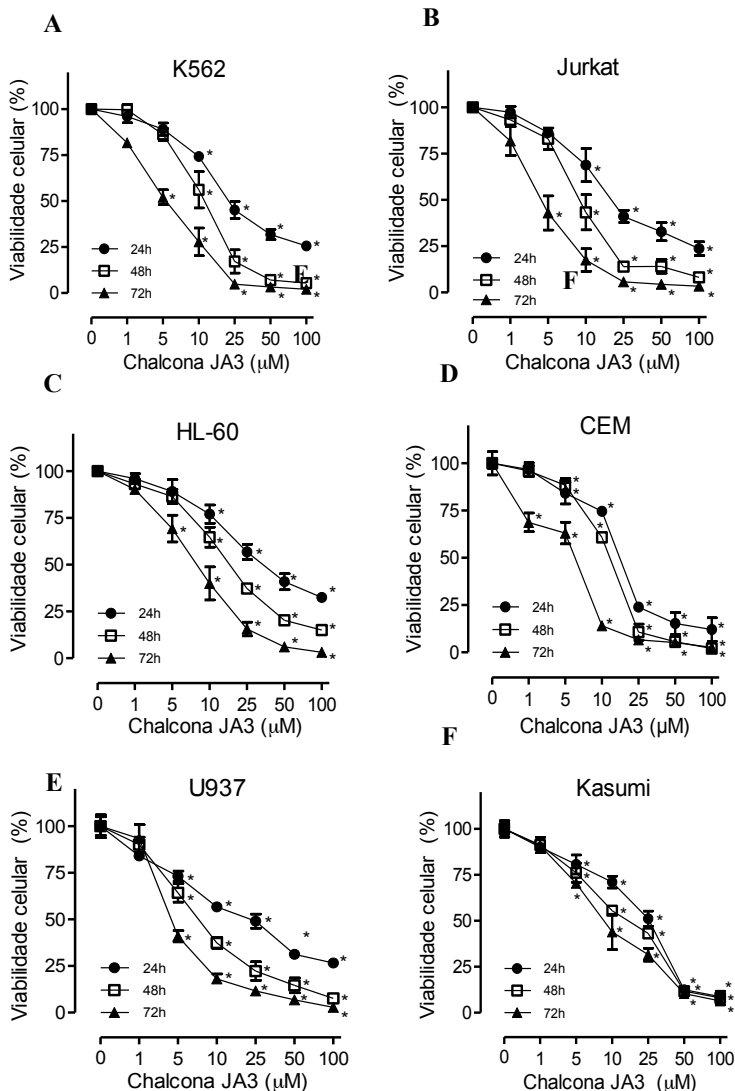
Considerado a heterogeneidade das LAs, o efeito citotóxico das chalconas **JA3** e **JA7** foi investigado em diferentes tempos e concentrações em seis linhagens leucêmicas (K562, Jurkat, HL-60, CEM, U937 e Kasumi). Como pode ser observado nas Figuras 12 e 13, os dois compostos reduziram significativamente a viabilidade celular das seis linhagens avaliadas de forma dependente da concentração e do tempo de incubação quando comparado ao o grupo controle.

A redução significativa da viabilidade celular em 24 h foi observada a partir de 10  $\mu\text{M}$  nas linhagens K562, Jurkat e HL-60 e a partir de 5  $\mu\text{M}$  nas linhagens CEM, U937 e Kasumi. Já em 72 h de incubação, o efeito citotóxico foi observado de forma significativa a partir de 1  $\mu\text{M}$  e 5  $\mu\text{M}$ , variando conforme o tipo celular. Para as seis linhagens de LA incluídas no presente estudo, o composto **JA3** apresentou  $CI_{50}$  que variou de  $3,2 \pm 0,5 \mu\text{M}$  em células Jurkat após 72 h de incubação a  $36,6 \pm 1,6 \mu\text{M}$  em células HL-60 após 24 h (Quadro 5, Figura 11). O composto **JA7** apresentou  $CI_{50}$  que variou de  $2,3 \pm 0,4 \mu\text{M}$  em células CEM após 72 h de incubação a  $29,8 \pm 1,5 \mu\text{M}$  em células HL-60 após 24h (Quadro 5, Figura 12).

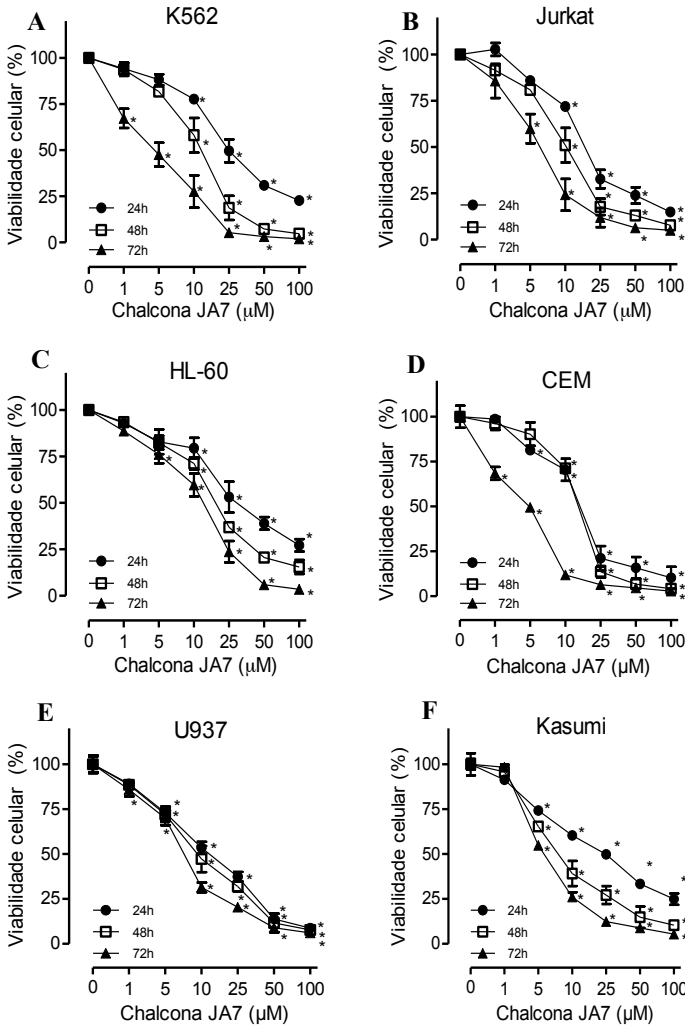
Apesar de a chalcona **JA7** apresentar valores de  $CI_{50}$  ligeiramente mais baixos quando comparados à chalcona **JA3**, não foi observada uma diferença significativa entre a capacidade dos dois compostos de reduzir a viabilidade de células de LA.



Figura 12 - Efeito citotóxico da chalcona JA3 sobre células de LA.



As células K562 (A), Jurkat (B), HL-60 (C), CEM (D), U937 (E) e Kasumi (F) ( $5 \times 10^4$  células/poço - 24 h,  $2,5 \times 10^4$  células/poço - 48 h e  $1,25 \times 10^4$  células/poço - 72 h) foram incubadas com a chalcona JA3 nas concentrações 1, 5, 10, 25, 50 e 100  $\mu\text{M}$  por 24, 48 e 72 h. Cada ponto representa média  $\pm$  EPM de três experimentos independentes. \* $p \leq 0,05$  em relação ao grupo controle (células sem tratamento). ANOVA *two-way* seguida de teste *post-hoc* de Bonferroni

Figura 13 – Efeito citotóxico da chalcona **JA7** sobre células de LA.

As células K562 (A), Jurkat (B), HL-60 (C), CEM (D), U937 (E) e Kasumi (F) ( $5 \times 10^4$  células/poço - 24 h,  $2,5 \times 10^4$  células/poço - 48 h e  $1,25 \times 10^4$  células/poço - 72 h) foram incubadas com a chalcona **JA7** nas concentrações 1, 5, 10, 25, 50 e 100  $\mu\text{M}$  por 24, 48 e 72 h. Cada ponto representa média  $\pm$  EPM de três experimentos independentes. \*  $p \leq 0,05$  em relação ao grupo controle (células sem tratamento). ANOVA *two-way* seguida de teste *post-hoc* de Bonferroni

Quadro 5 - Valores de  $CI_{50}$  calculados para JA3 e JA7 em linhagens de LA.

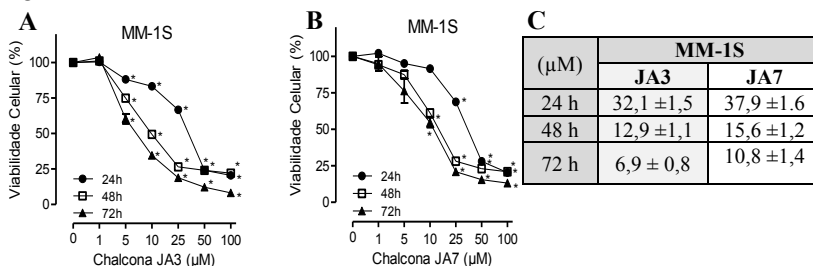
(μM)	K562		Jurkat		HL-60	
	JA3	JA7	JA3	JA7	JA3	JA7
24 h	22,2 ± 1,4	20,4 ± 1,1	18,6 ± 1,4	15,9 ± 0,5	36,6 ± 1,6	29,8 ± 1,5
48 h	11,2 ± 1,5	10,9 ± 1,0	9,4 ± 0,9	9,8 ± 1,0	17,5 ± 1,2	18,3 ± 1,3
72 h	3,9 ± 0,6	3,2 ± 0,5	3,2 ± 0,5	4,7 ± 0,7	7,3 ± 0,9	9,6 ± 1,0
(μM)	CEM		U937		Kasumi	
	JA3	JA7	JA3	JA7	JA3	JA7
24 h	15,5 ± 1,4	14,1 ± 1,2	16,4 ± 1,3	12,0 ± 1,1	17,3 ± 1,3	17,9 ± 1,4
48 h	11,2 ± 1,0	12,7 ± 1,1	13,4 ± 1,1	10,1 ± 1,0	7,5 ± 1,9	8,5 ± 0,9
72 h	3,9 ± 0,6	2,3 ± 0,4	9,8 ± 1,6	6,9 ± 1,8	3,7 ± 1,6	5,1 ± 1,7

Os valores de  $CI_{50}$  foram obtidos a partir da regressão linear das curvas concentração e tempo resposta e calculadas através do *software* GraphPad Prism 5.

### 5.2.2 Efeito citotóxico das chalconas JA3 e JA7 sobre células de linhagem de MM

O efeito das chalconas **JA3** e **JA7** sobre células de MM está demonstrado na Figura 14. Diferentemente do que havia sido observado nas linhagens de LA, o composto **JA3** apresentou valores de  $CI_{50}$  ligeiramente menores quando comparados ao composto **JA7**. Foi observada uma redução significativa na viabilidade celular a partir de 5 μM após o tratamento com **JA3**, com  $CI_{50}$  que variou de  $6,9 ± 0,8$  μM em 72 h a  $32,1 ± 1,5$  μM em 24 h. O composto **JA7** apresentou redução significativa na viabilidade celular somente a partir de 10 μM, com  $CI_{50}$  que variou de  $10,8 ± 1,4$  μM em 72 h a  $37,9 ± 1,6$  μM em 24 h.

Figura 14 - Efeito citotóxico das chalconas JA3 e JA7 sobre células de MM.



As células MM-1S ( $5 \times 10^4$  células/poço - 24 h,  $2,5 \times 10^4$  células/poço - 48 h e  $1,25 \times 10^4$  células/poço - 72 h) foram incubadas com as chalconas JA3 (A) e JA7 (B) nas concentrações 1, 5, 10, 25, 50 e 100 μM. A viabilidade celular foi avaliada pelo método do MTT. Cada ponto representa média ± EPM de três experimentos independentes. \*  $\leq 0,05$  quando comparado ao grupo controle, ANOVA *two-way* seguida de teste *post-hoc* de Bonferroni. (C) Os valores de  $CI_{50}$  foram obtidos a

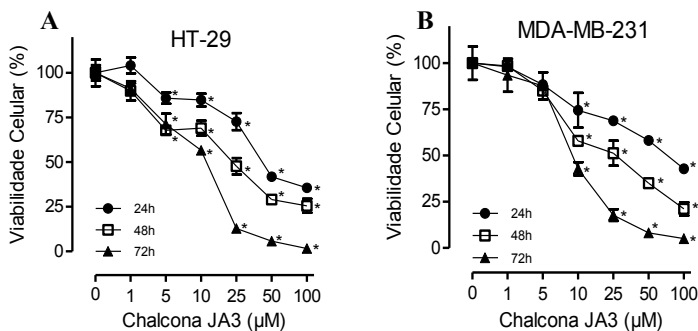
partir da regressão linear das curvas concentração e tempo resposta e calculadas através do *software* GraphPad Prism 5.

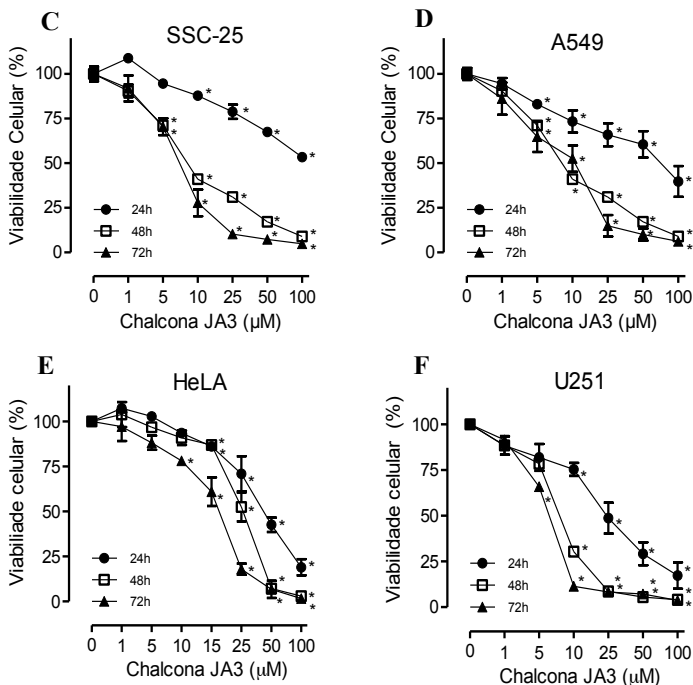
### 5.2.3 Efeito citotóxico das chalconas JA3 e JA7 sobre linhagens de tumores sólidos

Com o objetivo de verificar se o efeito citotóxico das chalconas **JA3** e **JA7** seria exclusivo para neoplasias hematológicas ou se seria observado também em tumores sólidos, os dois compostos foram avaliados nas linhagens HT-29, MDA-MB-231, SSC-25, A549, HeLa e U251. Como pode ser observado nas Figuras 15 e 16, as chalconas **JA3** e **JA7** reduziram a viabilidade celular das seis linhagens de tumores sólidos de forma dependente do tempo e da concentração, porém de forma menos intensa do que observado nos tumores hematológicos.

Após 24 h de incubação, o composto **JA3** mostrou-se ligeiramente mais citotóxico para a linhagem de carcinoma colorretal HT-29 ( $CI_{50}$  de  $49,2 \pm 1,6 \mu\text{M}$ ) e ligeiramente menos efetivo para a linhagem de carcinoma de pulmão A549 ( $CI_{50}$  de  $55,8 \pm 1,8 \mu\text{M}$ ), porém essa diferença parece diminuir com o aumento do tempo de incubação (Quadro 6). O composto **JA7**, em 24 h, apresentou maior citotoxicidade sobre a linhagem de adenocarcinoma de mama MDA-MB-231 ( $CI_{50}$  de  $28,6 \pm 1,5 \mu\text{M}$ ) e menor citotoxicidade sobre a linhagem e carcinoma de boca SSC-25 ( $CI_{50}$  de  $44,6 \pm 1,6 \mu\text{M}$ ). Em todas as seis linhagens avaliadas foi observada uma grande diferença na  $CI_{50}$  de 24 h entre os dois compostos e o **JA7** mostrou-se mais efetivo na redução da viabilidade de tumores sólidos.

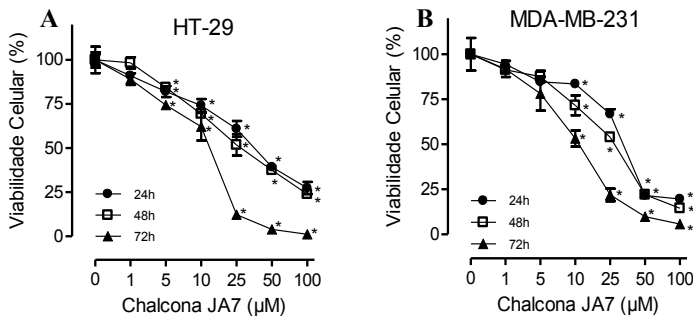
Figura 15 - Efeito citotóxico da chalcona JA3 em linhagens de tumores sólidos.

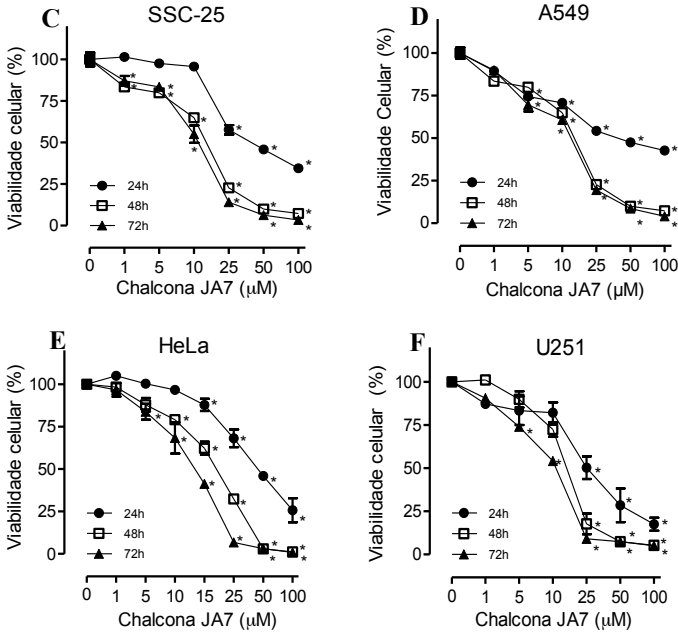




As células HT-29 (A), MDA-MB-231 (B), SSC-25 (C), A549 (D), HeLa (E) e U251 (F) ( $5 \times 10^4$  células/poço - 24 h,  $2,5 \times 10^4$  células/poço - 48 h e  $1,25 \times 10^4$  células/poço - 72 h) foram incubadas com a chalcona JA3 nas concentrações de 1, 5, 10, 25 e 50  $\mu\text{M}$  por 24, 48 e 72 h. Cada ponto representa média  $\pm$  EPM de três experimentos independentes. \*  $\leq 0,05$  quando comparado ao grupo controle, ANOVA *two-way* seguida de teste *post-hoc* de Bonferroni.

Figura 16 - Efeito citotóxico da chalcona JA7 em linhagens de tumores sólidos.





As células HT-29 (A), MDA-MB-231 (B), SSC-25 (C), A549 (D), HeLa (E) e U251 (F) ( $5 \times 10^4$  células/poço - 24 h,  $2,5 \times 10^4$  células/poço - 48 h e  $12,5 \times 10^3$  células/poço - 72 h) foram incubadas com a chalcona JA7 nas concentrações de 1, 5, 10, 25 e 50  $\mu\text{M}$  por 24, 48 e 72 h. Cada ponto representa média  $\pm$  EPM de três experimentos independentes. \*  $\leq 0,05$  quando comparado ao grupo controle, ANOVA *two-way* seguida de teste *post-hoc* de Bonferroni.

Quadro 6 - Valores de  $\text{CI}_{50}$  para JA3 e JA7 em linhagens de tumores sólidos.

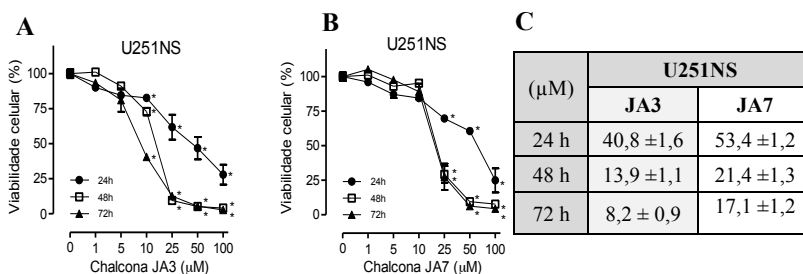
(μM)	HT-29		MDA-MB-231		SSC-25	
	JA3	JA7	JA3	JA7	JA3	JA7
24 h	49,2 $\pm$ 1,6	33,3 $\pm$ 1,5	51,1 $\pm$ 1,8	28,6 $\pm$ 1,5	55,2 $\pm$ 1,5	44,6 $\pm$ 1,6
48 h	20,5 $\pm$ 1,3	27,5 $\pm$ 1,4	23,9 $\pm$ 1,4	22,4 $\pm$ 1,4	9,2 $\pm$ 0,9	11,0 $\pm$ 1,0
72 h	8,5 $\pm$ 0,8	10,4 $\pm$ 1,1	8,9 $\pm$ 1,1	10,4 $\pm$ 1,0	6,1 $\pm$ 1,1	8,7 $\pm$ 0,9
(μM)	A549		HeLa		U251	
	JA3	JA7	JA3	JA7	JA3	JA7
24 h	55,8 $\pm$ 1,8	33,4 $\pm$ 1,5	54,9 $\pm$ 1,2	50,3 $\pm$ 1,1	23,5 $\pm$ 1,6	25,6 $\pm$ 1,4
48 h	9,6 $\pm$ 0,9	11,0 $\pm$ 1,0	17,2 $\pm$ 1,6	28,2 $\pm$ 0,7	6,4 $\pm$ 0,8	13,2 $\pm$ 1,1
72 h	8,1 $\pm$ 0,9	10,3 $\pm$ 1,0	10,7 $\pm$ 1,8	15,5 $\pm$ 0,4	4,6 $\pm$ 0,8	9,3 $\pm$ 1,0

Os valores de  $\text{CI}_{50}$  foram obtidos a partir da regressão linear das curvas concentração e tempo resposta e calculadas através do *software* GraphPad Prism 5.

### 5.2.3 Efeito citotóxico das chalconas JA3 e JA7 sobre células-tronco tumorais

O efeito citotóxico das chalconas **JA3** e **JA7** sobre células-tronco de glioma U251NS está demonstrado na Figura 17. Assim como observado para as demais linhagens tumorais, houve uma redução significativa na viabilidade celular de forma dependente do tempo e da concentração quando comparado ao grupo controle. Os valores de  $CI_{50}$  observados para a chalcona **JA3** variaram de  $8,2 \pm 0,9 \mu\text{M}$  a  $40,8 \pm 1,6 \mu\text{M}$ , enquanto que para a chalcona **JA7** variaram de  $17,1 \pm 1,2 \mu\text{M}$  a  $53,4 \pm 1,2 \mu\text{M}$ . Os valores e  $CI_{50}$  encontrados para a linhagem U251NS foram cerca de duas vezes maiores do que os encontrados para a linhagem U251, porém foram semelhantes aos obtidos em outras linhagens de tumores sólidos.

Figura 17 - Efeito citotóxico das chalconas JA3 e JA7 em células-tronco tumorais U251NS.



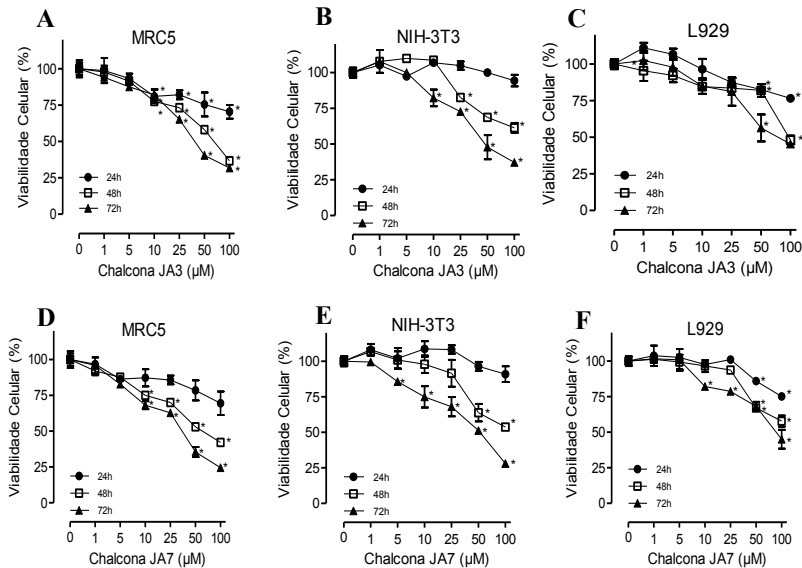
As células U251NS ( $5 \times 10^4$  células/poço - 24 h,  $2,5 \times 10^4$  células/poço - 48 h e  $1,25 \times 10^4$  células/poço - 72 h) foram incubadas com as chalconas JA3 (A) e JA7 (B) nas concentrações 1, 5, 10, 25, 50 e  $100 \mu\text{M}$ . A viabilidade celular foi avaliada pelo método do MTT. Cada ponto representa média  $\pm$  EPM de três experimentos independentes. \* $p \leq 0,05$  quando comparado ao grupo controle, ANOVA *two-way* seguida de teste *post-hoc* de Bonferroni. (C) Os valores de  $CI_{50}$  foram obtidos a partir da regressão linear das curvas concentração e tempo resposta e calculadas através do *software* GraphPad Prism 5.

## 5.3. INVESTIGAÇÃO DO EFEITO CITOTÓXICO DAS CHALCONAS JA3 E JA7 SOBRE CÉLULAS NÃO NEOPLÁSICAS

### 5.3.1 Efeito citotóxico das chalconas JA3 e JA7 sobre células de linhagens não neoplásicas

O efeito citotóxico das chalconas **JA3** e **JA7** foi avaliado em células pulmonares MRC-5 e em fibroblastos murinos L929 e NIH/3T3, utilizados como modelos de células não neoplásicas. Os resultados mostram que as chalconas **JA3** e **JA7** não foram citotóxicas para as linhagens L929 e NIH/3T3 em 24 h e 48 h de incubação, com  $CI_{50}$  superior a 100  $\mu$ M (Figura 18). Mesmo após 72 h e incubação, os valores de  $CI_{50}$  encontrados são muito superiores aos obtidos em células tumorais no mesmo período de tempo. Os compostos também não apresentaram citotoxicidade significativa em 24 h nas células MRC-5 ( $CI_{50} > 100 \mu$ M) e, após 48 h e 72 h, os valores de  $CI_{50}$  são muito superiores às células de tumor de pulmão A549.

Figura 18 - Efeito citotóxico das chalconas **JA3** e **JA7** em células de linhagens não neoplásicas.



As células MRC5 (A, D), NIH/3T3, (B, E) e L929 (C, F) ( $5 \times 10^4$  células/poço em 24 h e  $2,5 \times 10^4$  células/poço em 48 h e  $1,25 \times 10^4$  células/poço – 72 h) foram incubadas com as chalconas JA3 (A-C) e JA7 (D-F) nas concentrações 1, 5, 10, 25 e 50  $\mu$ M. A viabilidade celular foi avaliada pelo método do MTT. Cada ponto do gráfico representa média  $\pm$  EPM de três experimentos independentes. \*  $p \leq 0,05$  quando comparado ao grupo controle, ANOVA *two-way* seguida de teste *post-hoc* de Bonferroni.



Quadro 7 - Valores de  $CI_{50}$  calculados para as chalconas JA3 e JA7 em linhagens não neoplásicas.

(μM)	MRC-5		L929		NIH-3T3	
	JA3	JA7	JA3	JA7	JA3	JA7
<b>24 h</b>	> 100	> 100	> 100	> 100	> 100	> 100
<b>48 h</b>	70,3 ± 1,8	67,9 ± 1,8	> 100	> 100	> 100	> 100
<b>72 h</b>	41,4 ± 1,6	28,2 ± 1,4	78,8 ± 1,9	90,0 ± 1,9	53,9 ± 1,7	43,5 ± 1,6

Os valores de  $CI_{50}$  foram obtidos a partir da regressão linear das curvas concentração e tempo resposta e calculadas através do *software* GraphPad Prism 5.

### 5.3.2 Cálculo do Índice de Seletividade (IS)

O IS das chalconas **JA3** e **JA7** foi obtido dividindo-se a  $CI_{50}$  de 24 h das linhagens não neoplásicas MRC-5, L929 e NIH-3T3 pela  $CI_{50}$  de 24 h das linhagens de LA K562, Jurkat, CEM, U937 e Kasumi. Como pode ser observado no Quadro 8, os dois compostos foram altamente seletivos para células de LA, com IS superior a 10.

A fim de verificar se as chalconas seriam seletivas para células de LA em relação às células de tumores sólidos, a mesma comparação foi feita entre as linhagens HT-29, MDA-MB, SSC-25, A549, HeLa e U251 e as células K562, Jurkat, CEM, U937 e Kasumi. Os dois compostos apresentaram baixa seletividade para LAs quando comparados aos tumores sólidos ( $IS < 5$ ) (Quadro 8). Por fim, foi calculado o IS entre as linhagem U251NS e U251 e foram encontrados valores de 1,7 e 2,1 para as chalconas **JA3** e **JA7**, respectivamente, o que também indica baixa seletividade.

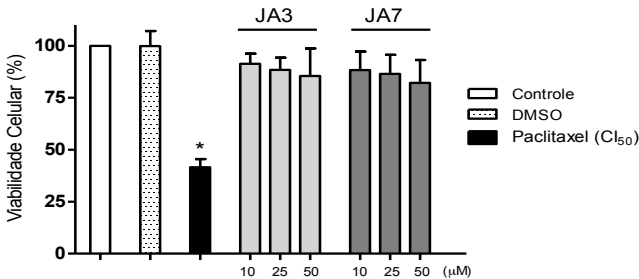
Quadro 8 - IS das chalconas **JA3** e **JA7**.

IS (24h) JA3	HT-29	MDA-MB	SSC-25	A549	HeLa	U251	MRC-5	L929	NIH
K562	2,2	2,3	2,5	2,5	2,5	1,1	> 10	> 10	> 10
Jurkat	2,6	2,7	3,0	3,0	3,0	1,2	> 10	> 10	> 10
CEM	2,9	3,3	3,6	3,6	3,5	1,5	> 10	> 10	> 10
U937	2,8	3,1	3,4	3,4	3,3	1,4	> 10	> 10	> 10
Kasumi	2,6	2,9	3,2	3,2	3,2	1,4	> 10	> 10	> 10
IS (24h) JA7	HT-29	MDA-MB	SSC-25	A549	HeLa	U251	MRC-5	L929	NIH
K562	1,6	1,4	2,2	1,6	2,5	1,3	> 10	> 10	> 10
Jurkat	2,1	1,8	2,8	2,1	3,2	1,6	> 10	> 10	> 10
CEM	2,4	2,0	3,2	2,4	3,6	1,8	> 10	> 10	> 10
U937	2,8	2,4	3,7	2,8	4,2	2,1	> 10	> 10	> 10
Kasumi	1,9	1,6	2,5	1,9	2,1	1,4	> 10	> 10	> 10

### 5.3.3 Efeito citotóxico das chalconas JA3 e JA7 em células mononucleadas de SP

O efeito citotóxico das chalconas **JA3** e **JA7** foi avaliado sobre células mononucleadas de SP como um segundo modelo de células não neoplásicas. Como pode ser observado na Figura 19, as duas chalconas não reduziram significativamente a viabilidade celular dessas células. Como controle positivo, as células mononucleadas foram incubadas com paclitaxel ( $CI_{50}$ ), o qual apresentou redução significativa na viabilidade celular em relação ao grupo controle (viabilidade de 41,5%). A viabilidade observada após 24h de tratamento com a chalcona **JA3** foi de  $91,3 \pm 4,8 \%$ ,  $88,4 \pm 5,9\%$  e  $85,5 \pm 13,3 \%$  nas concentrações de  $10 \mu\text{M}$ ,  $25 \mu\text{M}$  e  $50 \mu\text{M}$ , respectivamente. Já para a chalcona **JA7**, a viabilidade encontrada foi de  $88,4 \pm 8,9 \%$ ,  $86,5 \pm 9,2 \%$  e  $82,2 \pm 10,9\%$  para as mesmas concentrações. O veículo DMSO, na máxima concentração utilizada nos experimentos, apresentou viabilidade de  $99,9 \pm 7,2 \%$ .

Figura 19 - Efeito citotóxico de JA3 e JA7 sobre células mononucleadas.



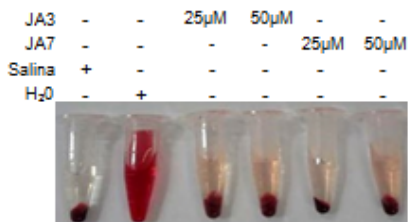
As células mononucleadas de SP ( $1,0 \times 10^6$  células/poço) foram incubadas com as chalconas JA3 e JA7 nas concentrações de 10, 25 e 50  $\mu\text{M}$  por 24 h. A viabilidade celular foi avaliada pelo método do MTT. A densidade óptica do grupo controle foi definida como 100% de viabilidade celular, o paclitaxel ( $CI_{50}$ ) foi utilizado como controle positivo e o grupo tratado com DMSO foi realizado na concentração máxima de solvente utilizada nos experimentos. \*  $p \leq 0,05$  quando comparado ao grupo controle, ANOVA *one-way* seguida de teste *post-hoc* de Tukey.

### 5.3.4 Efeito das chalconas JA3 e JA7 sobre eritrócitos de SP

O efeito das chalconas **JA3** e **JA7** foi avaliado nas concentrações de 25  $\mu\text{M}$  e 50  $\mu\text{M}$  sobre eritrócitos obtidos do SP de

voluntários saudáveis. Como pode ser observado na Figura 20, os dois compostos não causaram hemólise significativa no modelo utilizado. A taxa de hemólise para a chalcona **JA3** foi de  $1,6 \pm 0,2$  % (25  $\mu$ M) e  $3,0 \pm 0,8$  % (50  $\mu$ M), enquanto que para a chalcona **JA7** foi de  $1,4 \pm 0,1$  % (25  $\mu$ M) e  $4,0 \pm 0,5$  % (50  $\mu$ M), quando comparadas ao controle positivo (considerado como 100% de hemólise).

Figura 20 - Efeito das chalconas JA3 e JA7 sobre eritrócitos de SP.



As amostras de SP foram coletadas em tubo de citrato e a solução de hemácias foi preparada conforme o protocolo experimental. Os ensaios foram realizados em triplicata, com pelo menos três amostras coletadas de diferentes indivíduos. \*  $p \leq 0,05$  quando comparado ao controle positivo (100% de hemólise), teste *t* de Student.

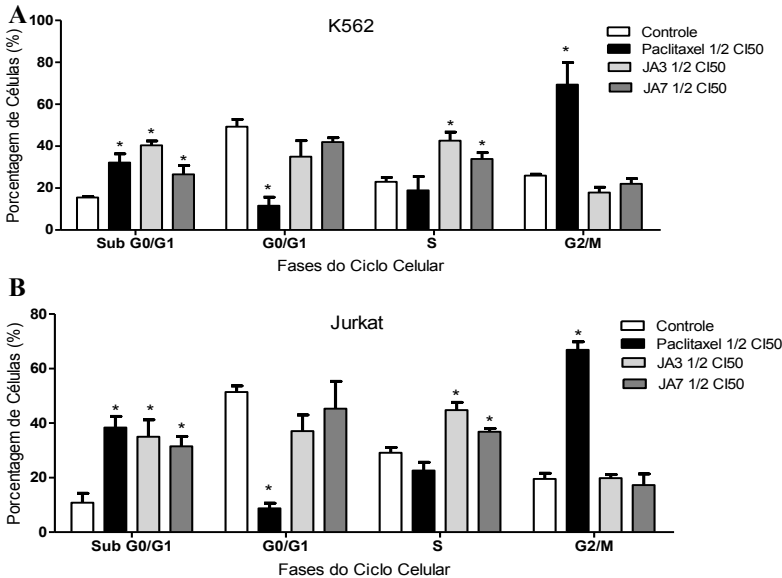
## 5.4 INVESTIGAÇÃO DO EFEITO DAS CHALCONAS JA3 E JA7 SOBRE O CICLO CELULAR DE CÉLULAS K562 E JURKAT

### 5.4.1 Efeito das chalconas JA3 e JA7 sobre as fases do ciclo celular

O efeito das chalconas **JA3** e **JA7** na progressão do ciclo celular das linhagens K562 e Jurkat foi avaliado após 24 h de incubação com uma subconcentração dos compostos (1/2  $CI_{50}$ ). Em comparação com o grupo controle, as chalconas **JA3** e **JA7** causaram um aumento significativo na proporção de células na fase sub G0/G1 nas duas linhagens celulares, o que confirma o aumento da morte celular induzida por esses compostos (Figura 21, Quadro 9).

As chalconas **JA3** e **JA7** bloquearam a fase S do ciclo celular das linhagens K562 e Jurkat, refletido pelo aumento significativo da porcentagem de células nessa fase do ciclo. Na linhagem K562, a porcentagem de células na fase S passou de  $22,0 \pm 4,2$  % no grupo controle para  $45,9 \pm 4,4$  % (**JA3**, 1/2  $CI_{50}$ ) e  $35,4 \pm 3,4$  % (**JA7** 1/2  $CI_{50}$ ), enquanto que na linhagem Jurkat, a porcentagem passou de  $29,1 \pm 2,0$  % na fase S do grupo controle para  $45,9 \pm 5,7$  % (**JA3**, 1/2  $CI_{50}$ ) e  $39,3 \pm 6,1$  % (**JA7** 1/2  $CI_{50}$ ). Conforme esperado, o paclitaxel, utilizado como controle positivo, bloqueou o ciclo celular na fase G2/M.

Figura 21 - Efeito de JA3 e JA7 no ciclo celular de células K562 e Jurkat.



As células K562 (A) e Jurkat (B) ( $1 \times 10^6$  células/poço) foram incubadas com as chalconas JA3 e JA7 na  $\frac{1}{2}$  CI<sub>50</sub> por 24 h. O grupo controle corresponde às células sem tratamento e o paclitaxel foi utilizado como controle positivo de bloqueio do ciclo celular. As fases estão representadas por G0/G1, S e G2/M e também foi representada a fase Sub G0/G1 (células mortas). As análises foram realizadas no citômetro de fluxo BD FACSCanto™ II e avaliadas pelo *software* WinMID versão 2.8. Cada ponto representa a média  $\pm$  EPM de pelo menos três experimentos independentes. \*  $p \leq 0,05$  em relação ao grupo controle, ANOVA *one-way* seguida de teste *post-hoc* de Bonferroni.

Quadro 9 - Efeito das chalconas JA3 e JA7 sobre as fases do ciclo celular de células K562 e Jurkat.

<b>K562</b>	<b>G0/G1 (%)</b>	<b>S (%)</b>	<b>G2/M (%)</b>	<b>Sub G0/G1 %</b>
<b>Controle</b>	50,6 $\pm$ 3,4	22,0 $\pm$ 4,2	27,4 $\pm$ 1,0	15,5 $\pm$ 1,4
<b>Tx <math>\frac{1}{2}</math> CI50</b>	11,6 $\pm$ 4,1*	18,9 $\pm$ 6,6	69,5 $\pm$ 9,6*	32,4 $\pm$ 4,6*
<b>JA3 <math>\frac{1}{2}</math> CI50</b>	34,9 $\pm$ 7,4	46,9 $\pm$ 4,4*	18,2 $\pm$ 1,3	40,3 $\pm$ 4,0*
<b>JA7 <math>\frac{1}{2}</math> CI50</b>	42,2 $\pm$ 4,2	35,4 $\pm$ 3,4*	22,4 $\pm$ 4,5	26,8 $\pm$ 5,3*
<b>Jurkat</b>	<b>G0/G1 (%)</b>	<b>S (%)</b>	<b>G2/M (%)</b>	<b>Sub G0/G1 %</b>
<b>Controle</b>	51,4 $\pm$ 2,2	29,1 $\pm$ 2,0	19,5 $\pm$ 2,1	10,8 $\pm$ 3,4
<b>Tx <math>\frac{1}{2}</math> CI50</b>	9,7 $\pm$ 1,9*	23,5 $\pm$ 3,0	66,8 $\pm$ 2,9*	38,4 $\pm$ 4,1*
<b>JA3 <math>\frac{1}{2}</math> CI50</b>	36,1 $\pm$ 5,9*	45,9 $\pm$ 5,7*	18,0 $\pm$ 1,3	35,0 $\pm$ 6,2*
<b>JA7 <math>\frac{1}{2}</math> CI50</b>	44,1 $\pm$ 8,2	39,3 $\pm$ 6,1*	16,6 $\pm$ 4,0	31,5 $\pm$ 3,6*

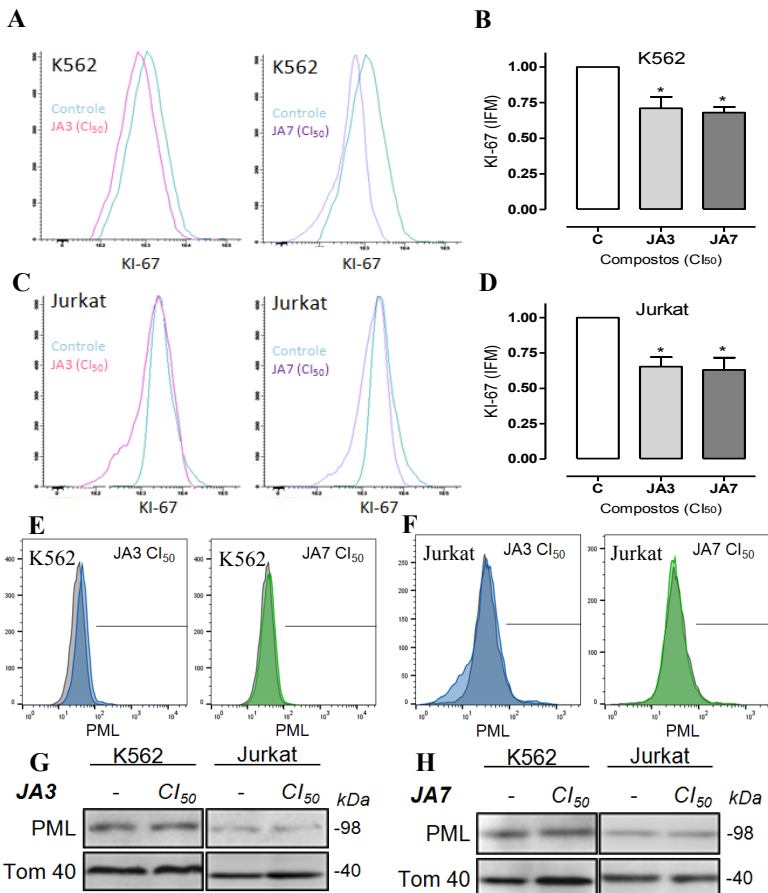
\*  $p \leq 0,05$  em relação ao grupo controle, ANOVA *one-way* seguida de teste *post-hoc* de Bonferroni.

### 5.4.2 Efeito das chalconas JA3 e JA7 sobre a expressão das proteínas KI-67 e PML

As chalconas **JA3** and **JA7** reduziram a expressão do marcador de proliferação celular KI-67 nas linhagens K562 e Jurkat (Figura 22 A-D). A IFM do grupo controle foi considerada como 1. Na linhagem K562, a IFM encontrada foi de  $0,71 \pm 0,08$  para o composto **JA3** e  $0,68 \pm 0,04$  para o composto **JA7**, enquanto que na linhagem Jurkat, a IFM foi de  $0,65 \pm 0,07$  para **JA3** e  $0,63 \pm 0,09$  para **JA7**.

Conforme demonstrado na Figura 22 E-H, não foi observada diferença significativa na expressão da proteína PML após o tratamento com as chalconas **JA3** e **JA7**.

Figura 22 - Efeito de **JA3** e **JA7** na expressão das proteínas KI-67 e PML.

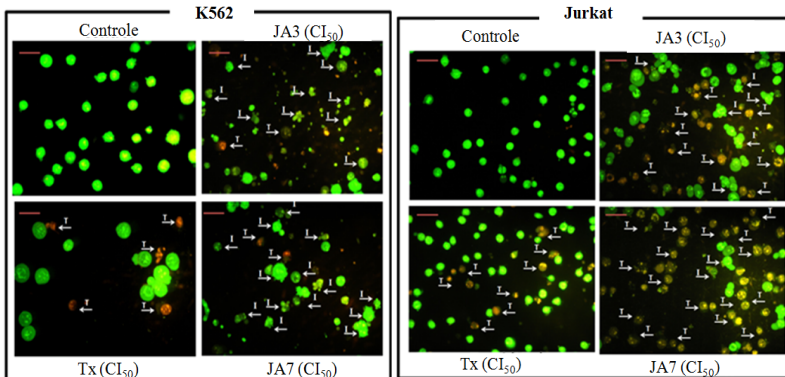


As células K562 e Jurkat ( $1 \times 10^6$  células/mL), foram incubadas por 12 h na ausência, grupo controle (C), e na presença das chalconas JA3 e JA7 nas  $CI_{50}$  de 24 h. (A-D) A IFM das células K562 (A-B) e Jurkat (C-D) foi determinada após a marcação com anti-KI-67, análise no citômetro de fluxo BD FACSCanto™ II e avaliação pelo *software Infinicyt* versão 1.7. (E-F) A IFM das células K562 (E) e Jurkat (F) foi determinada após a marcação com anti-PML, análise no citômetro de fluxo Cyan Flow e avaliação pelo *software FlowJo*. Os resultados representam a média  $\pm$  EPM de, pelo menos, três experimentos independentes. \*  $p \leq 0.05$  em relação ao grupo controle, teste *t* de Student. (G e H) A expressão de PML por WB foi realizada após 24 h de incubação com JA3 e JA7. Tom40 foi utilizado como controle da reação. As imagens são representativas de, pelo menos, três experimentos independentes.

## 5.5 INVESTIGAÇÃO DO EFEITO DAS CHALCONAS JA3 E JA7 NA INDUÇÃO DA APOPTOSE NAS LINHAGENS K562 E JURKAT

Para avaliar se a morte celular induzida por **JA3** e **JA7** em células K562 e Jurkat apresentava características morfológicas sugestivas de apoptose, foi realizada a observação celular por microscopia de fluorescência após coloração com BE/AO (Figura 23). Após 12 h, as células viáveis apresentaram tamanho e coloração verde uniformes. Já as células incubadas com as chalconas apresentaram características morfológicas típicas de células em apoptose inicial e tardia, como redução do volume celular (células visualmente menores quando comparadas ao grupo controle), picnose, formação de *blebs* e corpos apoptóticos e perda de integridade da membrana plasmática (indicada pela fluorescência alaranjada). O paclitaxel foi utilizado como controle de morte.

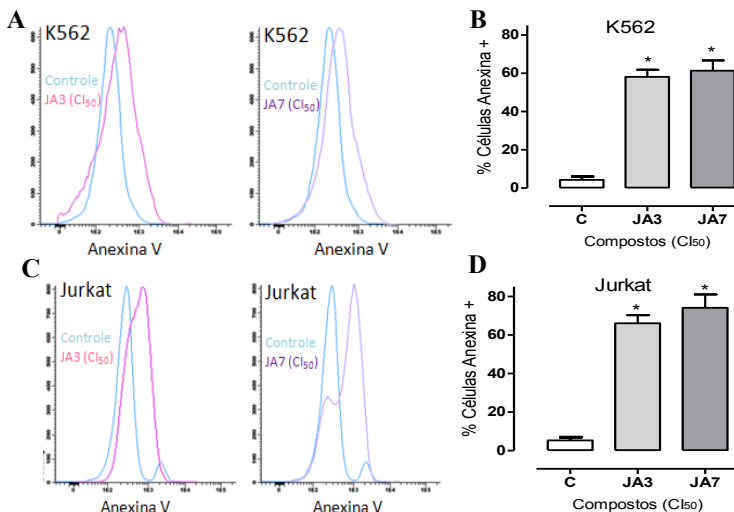
Figura 23 - Avaliação morfológica das células K562 e Jurkat após tratamento com as chalconas JA3 e JA7.



As células K562 e Jurkat ( $1 \times 10^6$  células/poço) foram incubadas com as chalconas JA3 e JA7 nas suas respectivas  $CI_{50}$  de 24 h por 12 h e então coradas com uma solução 1:1 de BE/AO. Os grupos controle correspondem à células sem tratamento. O paclitaxel (Tx) ( $CI_{50}$ ) foi utilizado como controle de morte. As células foram observadas em microscópio de fluorescência (Olympus BX41) na magnitude de 40 x e campos representativos foram fotografados com câmera digital. Barras correspondem a 10  $\mu$ m. Setas indicam células em apoptose inicial (I) ou tardia (T). As imagens são representativas de pelo menos dois experimentos independentes.

A quantificação da exposição dos resíduos de fosfatidilserina, evento inicial da apoptose, foi realizada em células K562 e Jurkat incubadas com as chalconas **JA3** e **JA7** por 12 h. Como pode ser observado na Figura 24, os dois compostos aumentaram significativamente a porcentagem de células positivas para Anexina V quando comparado ao grupo controle. Nas células K562, o grupo controle apresentou  $4,3 \pm 1,4$  % de células positivas para Anexina V, enquanto que os grupos com **JA3** e **JA7** apresentaram  $58,1 \pm 3,8$  % e  $61,4 \pm 5,3$  % de células positivas, respectivamente. Nas células Jurkat, o grupo controle apresentou  $5,3 \pm 1,7$  % de células positivas para Anexina V, enquanto que os grupos com **JA3** e **JA7** apresentaram  $66,0 \pm 4,2$  % e  $74,1 \pm 8,9$  % de células positivas, respectivamente.

Figura 24 - Efeito das chalconas JA3 e JA7 na exposição dos resíduos de fosfatidilserina em células K562 e Jurkat pelo método da Anexina V-FITC.

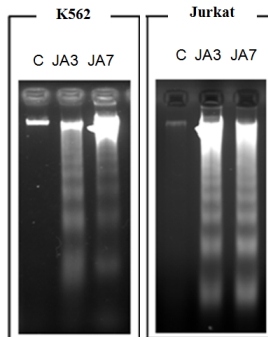


As células K562 (A-B) e Jurkat (C-D) ( $1 \times 10^6$  células/poço), foram incubadas por 12 h na ausência, grupo controle (C), e na presença das chalconas **JA3** e **JA7** nas

respectivas  $CI_{50}$  de 24h. A exposição dos resíduos de fosfatidilserina foi determinada pela marcação com Anexina V-FITC. As análises foram realizadas no citômetro de fluxo BD FACSCanto™ II e avaliadas pelo *software Infinicyt* versão 1.7. Os resultados representam a média  $\pm$  EPM de três experimentos independentes. \* $p \leq 0,05$  quando comparado ao grupo controle, teste *t* de Student.

A apoptose induzida pelas chalconas **JA3** e **JA7** foi confirmada pelo método de fragmentação do DNA em gel de agarose. Na Figura 25 é possível observar o padrão de fragmentação “em escada” característico de células em apoptose tardia, nos grupos incubados com as chalconas, o que não pode ser observado nos grupos controle.

Figura 25 - Efeito das chalconas JA3 e JA7 na fragmentação do DNA de células K562 e Jurkat.



As células K562 e Jurkat ( $5 \times 10^6$  células/poço) foram incubadas com as chalconas JA3 e JA7 nas suas respectivas  $CI_{50}$  por 24 h. Os grupos controle representam as células sem tratamento. A extração do DNA foi realizada com kit comercial de extração (QIAGEN®) e o DNA das amostras foi separado por eletroforese em gel de agarose 2%. As imagens são representativas de pelo menos três experimentos independentes.

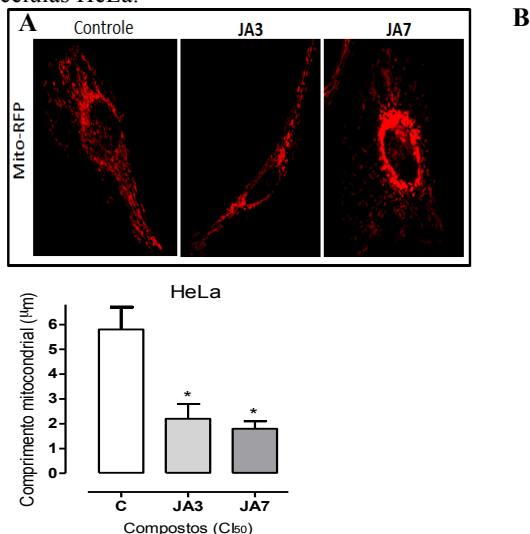
## 5.6 INVESTIGAÇÃO DO EFEITO DAS CHALCONAS JA3 E JA7 NAS MITOCÔNDRIAS DE CÉLULAS K562 E JURKAT

O efeito das chalconas **JA3** e **JA7** foi inicialmente avaliado sobre a fragmentação mitocondrial de células HeLa transfectadas com Mito-RFP por microscopia confocal. A Figura 26 mostra que o grupo controle apresenta mitocôndrias com formato fino e alongado, condizente com células viáveis. Já as células incubadas com os compostos apresentaram mitocôndrias fragmentadas, em formatos significativamente menores e pontilhados. As mitocôndrias do grupo controle apresentaram comprimento médio de  $5,8 \pm 0,9 \mu\text{m}$ , enquanto



que as células incubadas com as chalconas **JA3** e **JA7** apresentaram comprimento médio de  $2,2 \pm 0,8 \mu\text{m}$  e  $1,8 \pm 0,3 \mu\text{m}$ , respectivamente.

Figura 26 - Efeito das chalconas **JA3** e **JA7** no comprimento mitocondrial de células HeLa.



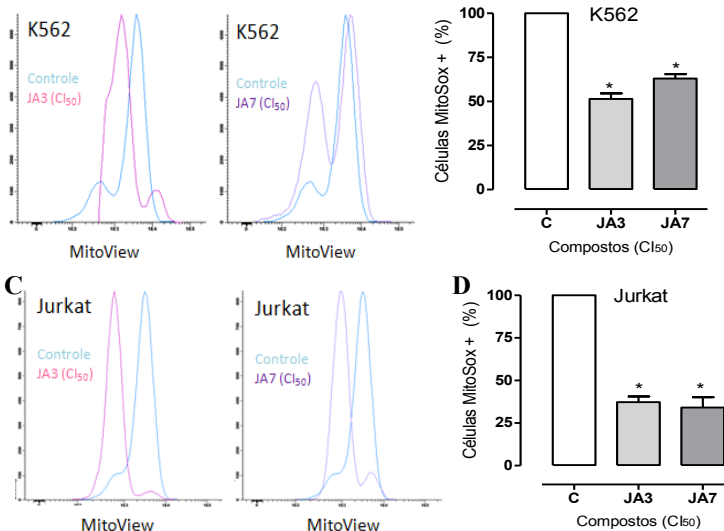
Células HeLa (A) transfectadas com Mito-RFP ( $5 \times 10^5$  células/poço), foram incubadas por 24 h na ausência, grupo controle, e na presença das chalconas **JA3** e **JA7** (CI<sub>50</sub>) e então visualizadas no microscópio confocal Zeiss LSM700 em objetiva de 63x. As imagens são representativas de três experimentos independentes. (B) Avaliação do comprimento mitocondrial na presença e na ausência das chalconas **JA3** e **JA7** através do *software ImageJ*. Para a quantificação foram analisadas 20 mitocôndrias de, pelo menos, 10 células diferentes do grupo controle e dos grupos com tratamento. \*  $p \leq 0,05$  em relação ao grupo controle usando teste *t* de Student.

Em seguida foi avaliado o efeito das chalconas **JA3** e **JA7** no  $\Delta\psi\text{m}$  das células K562 e Jurkat. O grupo controle foi considerado como tendo 100 % de células com  $\Delta\psi\text{m}$  intacto. Como pode ser observado na Figura 27, o tratamento com as chalconas **JA3** e **JA7** reduziu significativamente o número de células com  $\Delta\psi\text{m}$  íntegro para  $51,4 \pm 3,2 \%$  e  $63,0 \pm 2,5 \%$ , respectivamente na linhagem K562. Já na linhagem Jurkat, houve uma redução para  $37,3 \pm 3,3 \%$  (**JA3**) e  $34,1 \pm 6,0 \%$  (**JA7**) de células com  $\Delta\psi\text{m}$  íntegro.

Figura 27 - Efeito de **JA3** e **JA7** sobre o  $\Delta\psi\text{m}$  de células K562 e Jurkat.

**A**

**B**

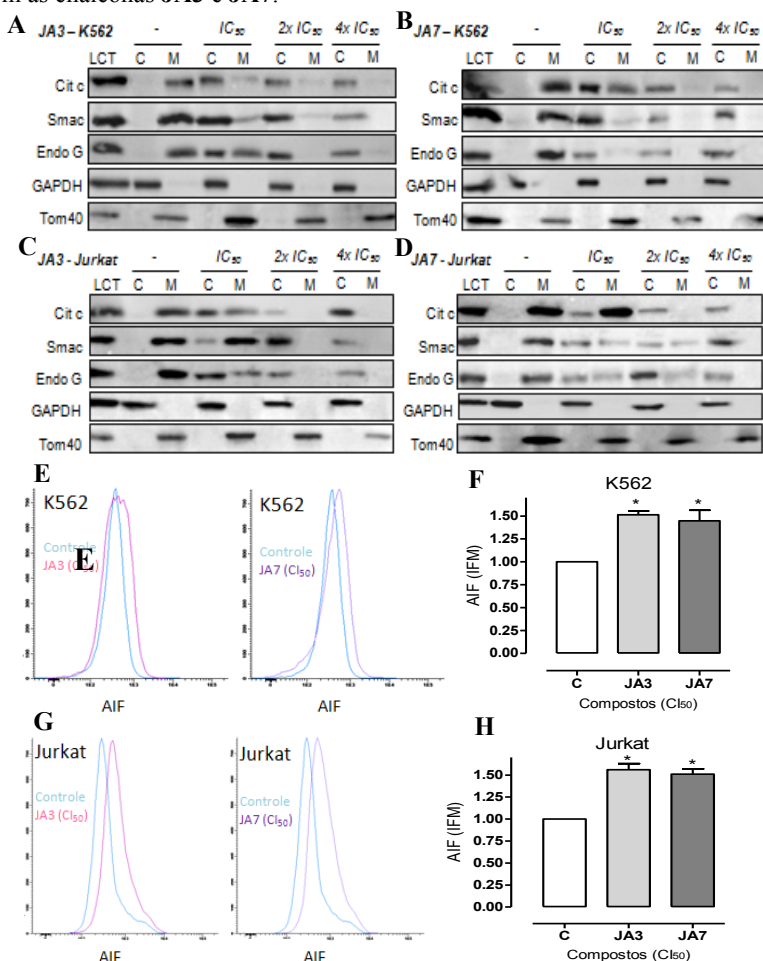


As células K562 (A-B) e Jurkat (C-D) ( $1 \times 10^6$  células/poço), foram incubadas por 12 h na ausência, grupo controle (C), e na presença das chalconas **JA3** e **JA7** nas respectivas  $CI_{50}$ . A porcentagem de células com  $\Delta\psi_m$  íntegro foi determinada pelo *kit* MitoView 633. As análises foram realizadas no citômetro de fluxoBD FACSCanto™ II e avaliadas pelo *software* Infinicyt versão 1.7. Os resultados representam a média  $\pm$  EPM de três experimentos independentes. \*  $p \leq 0.05$  em relação ao grupo controle usando teste *t* de Student.

### 5.6.1 Efeito das chalconas **JA3** e **JA7** sobre a liberação de fatores apoptóticos pela mitocôndria

Após a incubação com as chalconas **JA3** e **JA7**, foi observado, em células K562 e Jurkat, a liberação das proteínas pró-apoptóticas citocromo *c*, endonuclease G e Smac da mitocôndria para o citosol de maneira dependente da concentração (Figura 28 A-D). A expressão dessas proteínas, observada na fração mitocondrial (M) nos grupos controle, passou a ser observada na fração citosólica (C) após o tratamento com os compostos. Além disso, como demonstrado na Figura 28 E-H, a incubação com as chalcona **JA3** e **JA7** resultou em um aumento da expressão de AIF nas linhagens K562 e Jurkat. A IFM do grupo controle foi considerada como 1. Com as chalconas, a IFM passou a  $1,51 \pm 0,42$  (**JA3**) e  $1,45 \pm 0,11$  (**JA7**) na linhagem K562 e  $1,56 \pm 0,07$  (**JA3**) e  $1,51 \pm 0,06$  (**JA7**) na linhagem Jurkat.

Figura 28 - Liberação de fatores apoptóticos pela mitocôndria após incubação com as chalconas JA3 e JA7.



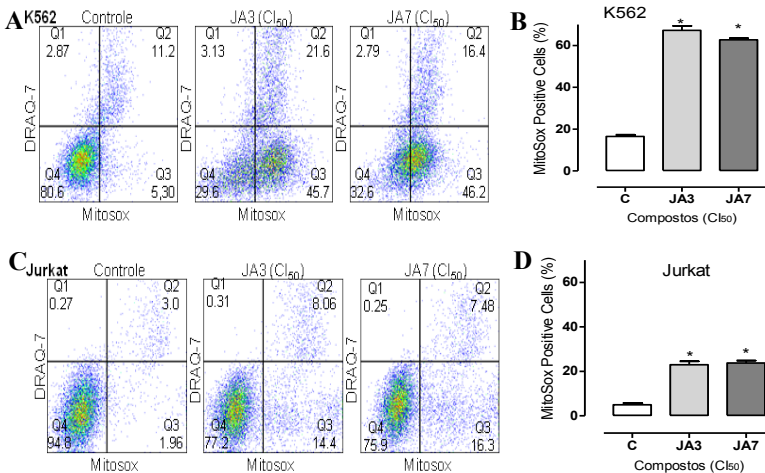
(A-D) As células K562 (A-B) e Jurkat (C-D) ( $1 \times 10^6$  células/poço) foram incubadas por 24h com JA3 (A,C) ou JA7 (B,D) nas respectivas  $CI_{50}$  antes do fracionamento celular em frações citosólica (C) e mitocondrial (M). Os LCT foram incluídos como controle. As frações foram analisadas por WB para avaliar a expressão das proteínas apoptóticas citocromo c, Smac e endonuclease G. GAPDH e Tom40 foram utilizados como controles para as frações citosólica e mitocondrial, respectivamente. (E-H) As células K562 (E-F) e Jurkat (G-H) ( $1 \times 10^6$  células/poço) foram incubadas com JA3 ou JA7 ( $CI_{50}$ ) por 12 h e depois incubadas com anti-AIF. As análises foram realizadas no citômetro de fluxo BD FACSCanto™ II e avaliadas pelo software *Infinicyt* versão 1.7. Os resultados representam a média  $\pm$  EPM de

três experiências independentes. \*  $p \leq 0,05$  em relação aos grupos controle usando teste *t* de Student.

### 5.6.2 Efeito das chalconas JA3 e JA7 sobre a produção de EROS

Conforme observado na Figura 29, as células K562 e Jurkat incubadas com as chalconas JA3 e JA7 aumentaram a produção de EROS. Na linhagem K562, o grupo controle apresentou  $16,5 \pm 0,6$  % de células positivas para EROS, enquanto que as células incubadas com JA3 e JA7 apresentaram  $67,3 \pm 2,1$  % e  $62,6 \pm 0,8$  % de células positivas, respectivamente. Já na linhagem Jurkat, o aumento foi menos expressivo: o grupo controle apresentou  $4,9 \pm 0,6$  % de células positivas para EROS, enquanto que as células incubadas com JA3 e JA7 apresentaram  $22,9 \pm 1,6$  % e  $23,8 \pm 1,1$  % de células positivas, respectivamente.

Figura 29 - Efeito das chalconas JA3 and JA7 na produção de EROS.



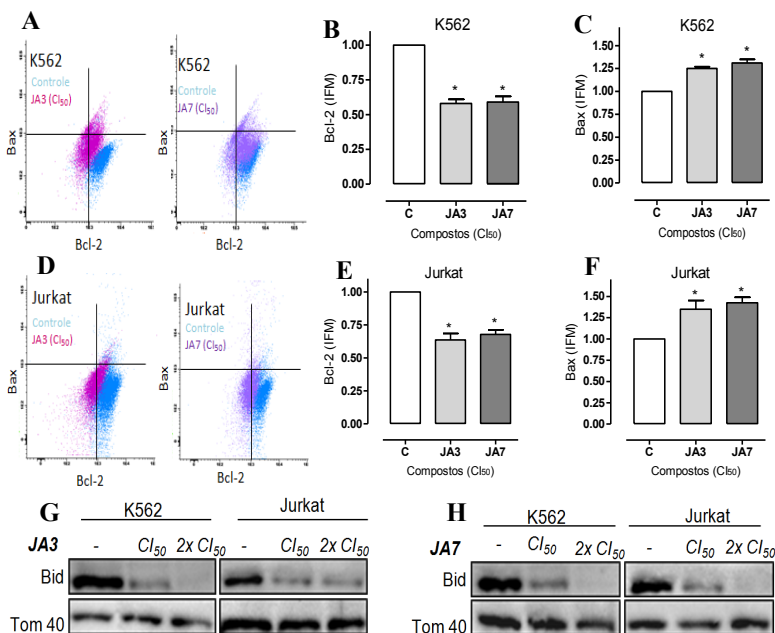
As células K562 (A-B) e Jurkat (C-D) ( $1 \times 10^6$  células/poço) foram incubadas durante 18 h na ausência e na presença das chalconas JA3 e JA7 (CI<sub>50</sub>) antes da marcação com MitoSox Red e DRAQ-7. As análises foram realizadas no citômetro de fluxo Cyan Flow e avaliadas pelo *software* FlowJo. As figuras representam, pelo menos, três experiências independentes e os resultados correspondem a média  $\pm$  EPM. \*  $p \leq 0,05$  em relação aos grupos controle usando teste *t* de Student.

## 5.7 INVESTIGAÇÃO DO EFEITO DAS CHALCONAS JA3 E JA7 NA EXPRESSÃO DE PROTEÍNAS DA FAMÍLIA BCL-2 EM CÉLULAS K562 E JURKAT

Como os resultados mostraram que as chalconas **JA3** e **JA7** causam danos mitocondriais em células K562 e Jurkat, optou-se por verificar se os compostos teriam efeito sobre outras proteínas da via intrínseca.

Conforme demonstrado na Figura 30 A-F, a IFM dos grupos controle foi considerada como 1. A chalcona **JA3** causou diminuição da expressão da proteína anti-apoptótica Bcl-2 ( $IFM_{K562} = 0,58 \pm 0,03$ ,  $IFM_{Jurkat} = 0,64 \pm 0,05$ ) e aumento da expressão da proteína pró-apoptótica Bax ( $IFM_{K562} = 1,25 \pm 0,02$ ,  $IFM_{Jurkat} = 1,35 \pm 0,10$ ). De maneira similar, a chalcona **JA7** diminuiu a expressão de Bcl-2 ( $IFM_{K562} = 0,59 \pm 0,04$ ,  $IFM_{Jurkat} = 0,68 \pm 0,03$ ) e aumentou a expressão de Bax ( $IFM_{K562} = 1,31 \pm 0,04$ ,  $IFM_{Jurkat} = 1,42 \pm 0,06$ ). Além disso, como pode ser observado na Figura 30 G-H, os dois compostos causaram a clivagem da proteína Bid nas células K562 e Jurkat.

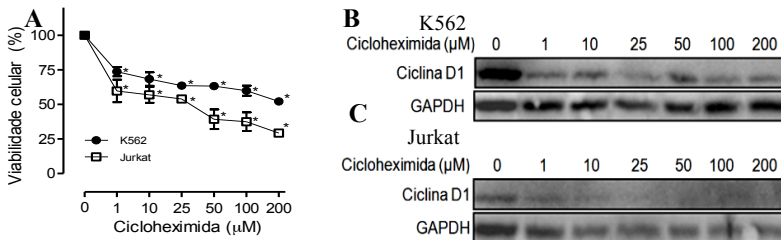
Figura 30 - Efeito das chalconas JA3 e JA7 na expressão das proteínas Bcl-2, Bax e Bid



(A-F) As células K562 (A-C) e Jurkat (D-F) ( $1 \times 10^6$  células/poço), foram incubadas por 12 h na ausência, grupo controle (C), e na presença das chalconas **JA3** e **JA7** nas  $CI_{50}$  de 24 h. A IFM foi determinada após a marcação com os anticorpos anti-Bcl-2 e anti-Bax. Os resultados representam a média  $\pm$  EPM de, pelo menos, três experimentos independentes. As análises foram realizadas no citômetro de fluxo BD FACSCanto™ II e avaliadas pelo *software Infinicyt* versão 1.7. \*  $p \leq 0.05$  em relação ao grupo controle usando teste *t* de Student. (G-H) As células K562 e Jurkat ( $1 \times 10^6$  células/poço) foram incubadas por 24 h na ausência e na presença das chalconas **JA3** e **JA7** na  $CI_{50}$  e no dobro da  $CI_{50}$ , e a expressão da proteína Bid foi avaliada por WB.

Na sequência, foi investigado se o efeito citotóxico das chalconas **JA3** e **JA7** envolvia a síntese de proteínas *de novo*. Para analisar esta hipótese, as células K562 e Jurkat foram pré-incubadas por 1h com uma concentração subletal de cicloheximida suficiente para inibir a tradução de proteínas. A concentração escolhida foi de  $1 \mu\text{M}$ , pois foi a concentração que causou a menor redução da viabilidade celular em células K562 e Jurkat (Figura 31 A), porém foi capaz de inibir a síntese de ciclina D1, utilizada como controle (Figura 31 B).

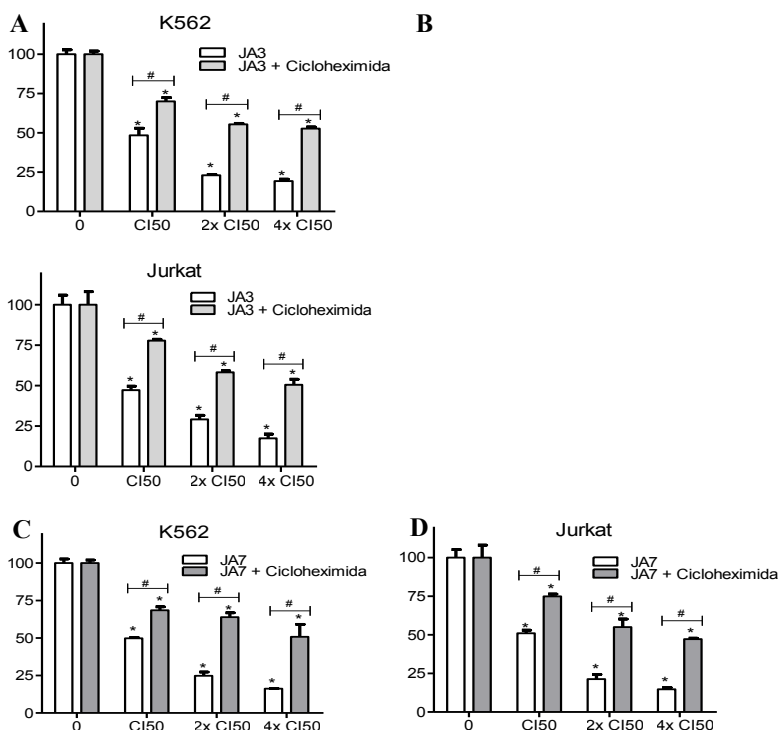
Figura 31 - Efeito da cicloheximida na viabilidade celular e na expressão de ciclina D1 em células K562 e Jurkat.



(A) As células K562 e Jurkat ( $5 \times 10^4$  células/poço) foram incubadas com cicloheximida (1 - 200  $\mu\text{M}$ ) durante 25 h e a viabilidade celular foi avaliada pelo método do MTT. O grupo controle foi considerado como 100% viabilidade celular. \*  $p \leq 0,05$  em relação ao grupo controle, ANOVA *one-way* seguida de teste *post-hoc* de Bonferroni. (B-C) LCT das células K562 (B) e Jurkat (C) tratadas com cicloheximida e incubadas com anti-ciclina D1.

Como pode ser observado na Figura 32, as células K562 e Jurkat pré-incubadas com  $1 \mu\text{M}$  de cicloheximida e então incubadas com **JA3** e **JA7**, apresentaram maior percentual de células viáveis quando comparado às células sem cicloheximida, o que indica uma proteção parcial da citotoxicidade induzida pelos compostos.

Figura 32 - Efeito da pré-incubação com cicloheximida na viabilidade celular.

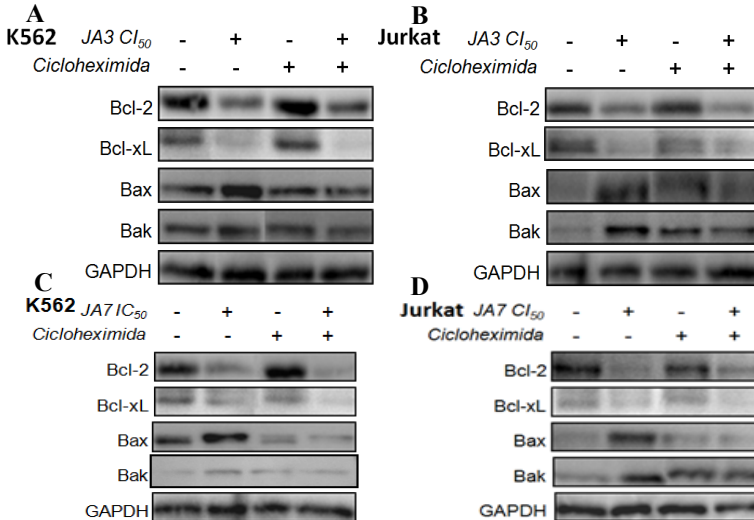


As células K562 (A, C) e Jurkat (B, D) ( $5 \times 10^4$  células/poço) foram pré-incubadas na presença e na ausência de  $1 \mu\text{M}$  de cicloheximida e, em seguida, incubadas com as chalconas JA3 (A-B) ou JA7 (C-D) em diferentes concentrações por 24 h. A viabilidade celular foi avaliada pelo método do MTT. Os grupos cinza e branco, que refletem as células pré-incubadas com cicloheximida e as células sem cicloheximida, respectivamente, foram comparados entre si. Cada ponto do gráfico representa média  $\pm$  EPM de três experimentos independentes. \*  $p \leq 0,05$  em relação aos grupos controle, ANOVA *two-way* seguida de teste *post-hoc* de Bonferroni.

Foi investigado também se a pré-incubação com cicloheximida alteraria a expressão das proteínas pró-apoptóticas da família Bcl-2 Bax e Bak. Como pode ser observado na Figura 33, o aumento da expressão das proteínas Bax e Bak nas células K562 e Jurkat pelas chalconas **JA3** e **JA7** foi inibido pela pré-incubação com cicloheximida. Na mesma figura, é possível observar que, como esperado, o uso de cicloheximida não teve efeito sobre a redução da expressão das proteínas anti-apoptóticas Bcl-2 e Bcl-xL. Em conjunto, esses resultados demonstram que as chalconas **JA3** e **JA7** desregulam o equilíbrio entre os membros

antiapoptóticos e pró-apoptóticos da família Bcl-2, o que induz dano mitocondrial e leva as células de LA à morte celular por apoptose.

Figura 33 - Efeito das chalconas JA3 e JA7 na expressão das proteínas Bcl-2, Bcl-xL, Bax e Bak com a sem pré-incubação com cicloheximida.



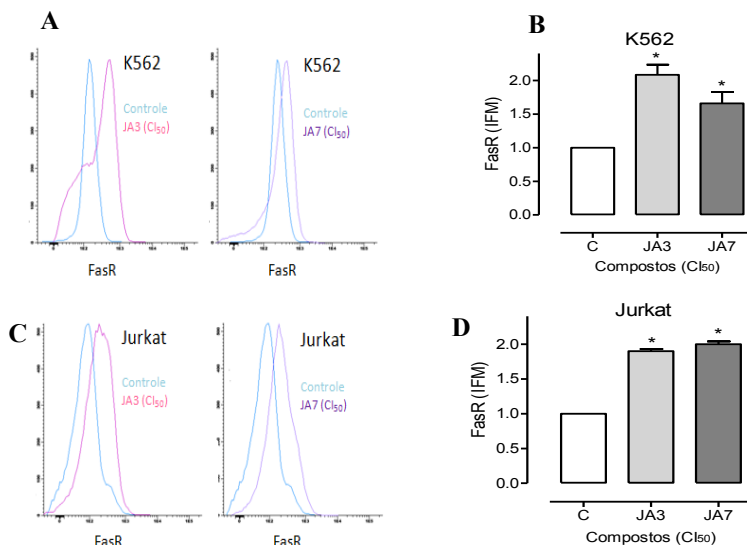
As células K562 (A, C) e Jurkat (B, D) ( $1 \times 10^6$  células/poço) foram pré-incubadas na presença e na ausência de  $1 \mu\text{M}$  de cicloheximida e, em seguida, incubadas por 24 h com JA3 ou JA7 ( $CI_{50}$ ). A expressão de Bcl-2, Bcl-xL, Bax e Bak foi analisada por WB. GAPDH foi utilizado como controle. As imagens são representativas de, pelo menos, três experimentos independentes.

## 5.8 INVESTIGAÇÃO DO EFEITO DAS CHALCONAS JA3 E JA7 NA VIA EXTRÍNSECA DA APOPTOSE EM CÉLULAS K562 E JURKAT

Como pode ser observado na Figura 34, as chalconas **JA3** e **JA7** aumentaram significativamente a expressão do receptor Fas nas células K562 e Jurkat após 12 horas de incubação. Considerando que a IFM dos grupos controle foi considerada como 1, o composto **JA3** aumentou a IFM de FasR para  $2,08 \pm 0,15$  em células K562 e  $1,99 \pm 0,03$  em células Jurkat. De maneira similar, a chalcona **JA7** aumentou a IFM de FasR para  $1,66 \pm 0,17$  em células K562 e  $2,00 \pm 0,04$  em células Jurkat.



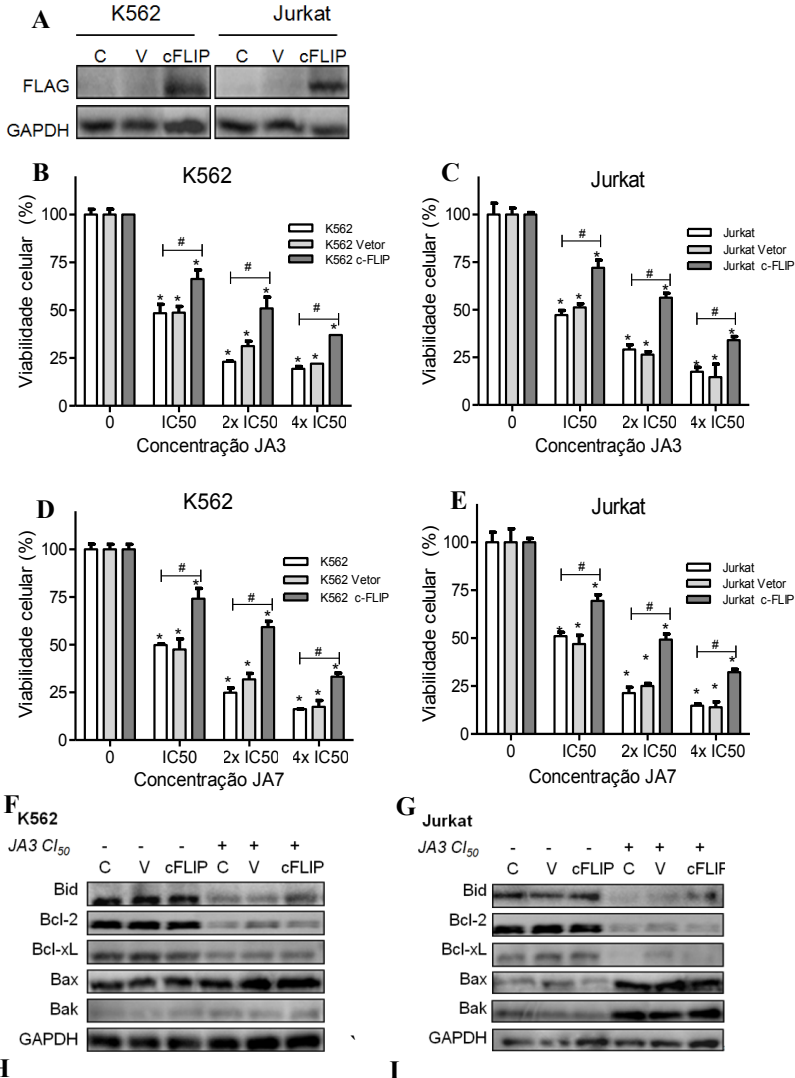
Figura 34 - Efeito das chalconas JA3 e JA7 na expressão do receptor FasR.

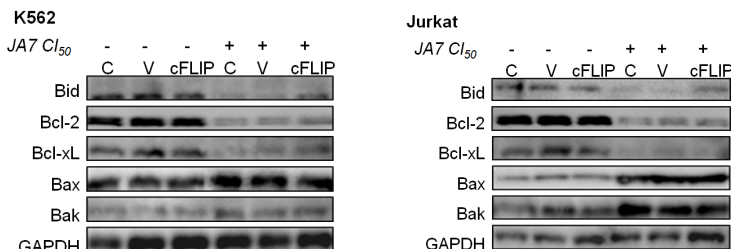


As células K562 (A-B) e Jurkat (C-D) ( $1 \times 10^6$  células/poço), foram incubadas por 12 h na ausência, grupo controle (C), e na presença das chalconas **JA3** e **JA7** nas CI<sub>50</sub> de 24 h. A IFM foi determinada após a marcação com o anticorpo anti-FasR. Os resultados representam a média  $\pm$  EPM de, pelo menos, três experimentos independentes. As análises foram realizadas no citômetro de fluxo BD FACSCanto™ II e avaliadas pelo *software Infinicyt* versão 1.7. \*  $p \leq 0,05$  em relação aos grupos controle, teste *t* de Student.

Como o tratamento com **JA3** e **JA7** levou ao aumento da expressão de FasR e à clivagem de Bid, isso sugere que a via extrínseca também pode estar envolvida na apoptose induzida pelas chalconas. Assim, foi investigado se a inibição da via FasR poderia proteger a viabilidade celular após a incubação com **JA3** e **JA7**. Para isso, as células K562 foram transfectadas com c-FLIP-FLAG, como demonstrado na Figura 35, Painel A. De fato, a superexpressão de c-FLIP protegeu as células K562 e Jurkat da morte celular mediada pelas chalconas **JA3** e **JA7** (Figura 35, Painel B-E, Quadro 10). Além disso, a superexpressão de c-FLIP também inibiu a clivagem de Bid mediada por **JA3** e **JA7**, mas não afetou a modulação negativa da expressão das proteínas antiapoptóticas Bcl-2 e Bcl-xL ou a modulação positiva da expressão das proteínas pró-apoptóticas Bax e Bak resultante do tratamento com as chalconas.

Figura 35 - Efeito das chalconas JA3 e JA7 em células K562 e Jurkat transfectadas com c-FLIP-FLAG.





(A) Expressão de cFLIP por WB em células K562 e Jurkat ( $1 \times 10^6$  células/poço) transfetadas ou não com cFLIP-FLAG. (B-I) As células K562 (B,D,F,H) e Jurkat (C,E,G,I) superexpressas ou não com c-FLIP-Flag foram incubadas com JA3 e JA7 em diferentes concentrações por 24 h antes da determinação da viabilidade celular pelo método do MTT ( $5 \times 10^4$  células/poço) (B-E) e análise por WB da expressão das proteínas Bid, Bcl-2, Bcl-xL, Bax e Bak ( $1 \times 10^6$  células/poço) (F-I). Os resultados representam a média  $\pm$  EPM de, pelo menos, três experimentos independentes. \*  $p \leq 0,05$  em relação aos grupos controle, #  $p \leq 0,05$  em relação ao grupo não transfetado, ANOVA *two-way* seguida de teste *post-hoc* de Bonferroni.

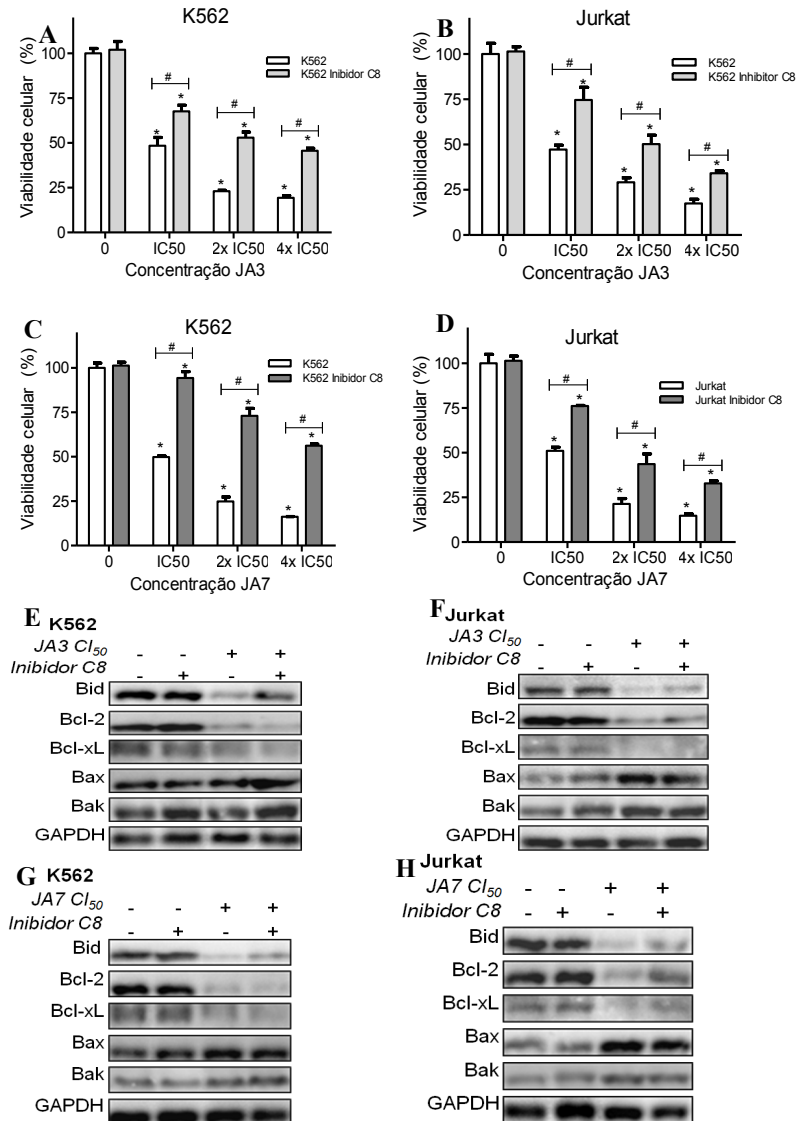
Quadro 10 - Viabilidade das células K562 e Jurkat transfetadas com cFLIP.

Chalcona	K562 JA3			Jurkat JA3		
	Controle	Vetor	c-FLIP	Controle	Vetor	c-FLIP
0	100 $\pm$ 2,8	100 $\pm$ 2,8	100 $\pm$ 1,7	100 $\pm$ 5,9	100 $\pm$ 3,4	100 $\pm$ 1,0
CI <sub>50</sub>	48,5 $\pm$ 4,6	48,7 $\pm$ 3,2	66,3 $\pm$ 4,7	47,3 $\pm$ 2,3	51,2 $\pm$ 1,9	72,1 $\pm$ 4,0
2x CI <sub>50</sub>	23,1 $\pm$ 0,4	31,2 $\pm$ 2,5	50,9 $\pm$ 5,9	29,2 $\pm$ 2,4	26,5 $\pm$ 1,5	56,4 $\pm$ 2,2
4x CI <sub>50</sub>	19,4 $\pm$ 1,2	22,0 $\pm$ 0,9	37,0 $\pm$ 3,4	17,5 $\pm$ 2,6	14,7 $\pm$ 6,8	34,1 $\pm$ 1,8
Chalcona	K562 JA7			Jurkat JA7		
	Controle	Vetor	c-FLIP	Controle	Vetor	c-FLIP
0	100 $\pm$ 2,8	100 $\pm$ 2,7	100 $\pm$ 2,7	100 $\pm$ 5,2	100 $\pm$ 7,0	100 $\pm$ 2,1
IC <sub>50</sub>	49,8 $\pm$ 0,6	47,6 $\pm$ 5,4	74,2 $\pm$ 5,4	51,1 $\pm$ 2,0	46,9 $\pm$ 4,4	69,4 $\pm$ 3,2
2x IC <sub>50</sub>	24,9 $\pm$ 2,5	31,8 $\pm$ 3,1	59,2 $\pm$ 3,1	21,4 $\pm$ 2,9	25,0 $\pm$ 1,3	49,2 $\pm$ 2,9
4x IC <sub>50</sub>	16,2 $\pm$ 0,1	17,5 $\pm$ 3,3	33,2 $\pm$ 1,9	14,8 $\pm$ 1,0	13,9 $\pm$ 2,8	32,2 $\pm$ 1,6

As células K562 e Jurkat ( $5 \times 10^4$  células/poço) transfetadas ou não com cFLIP-FLAG foram incubadas com JA3 ou JA7 em diferentes concentrações por 24 h e a viabilidade celular foi avaliada por MTT.

De maneira semelhante, o inibidor específico da caspase-8 Z-IETDF-MK resgatou a viabilidade celular após o tratamento com **JA3** e **JA7** (Figura 36) e também protegeu as células da clivagem de Bid. Porém, não teve nenhum efeito sobre a modulação da expressão das proteínas Bcl-2, Bcl-xL, Bax e Bak. Os resultados indicam que as chalconas **JA3** e **JA7** ativam a via do receptor de morte FasR, o que leva à ativação de caspase-8, à clivagem de Bid e à ativação da via mitocondrial, e que essa via é necessária para o efeito citotóxico induzido pelos compostos.

Figura 36 - Efeito das chalconas JA3 e JA7 em células K562 e Jurkat pré-incubadas com inibidor de caspase-8.



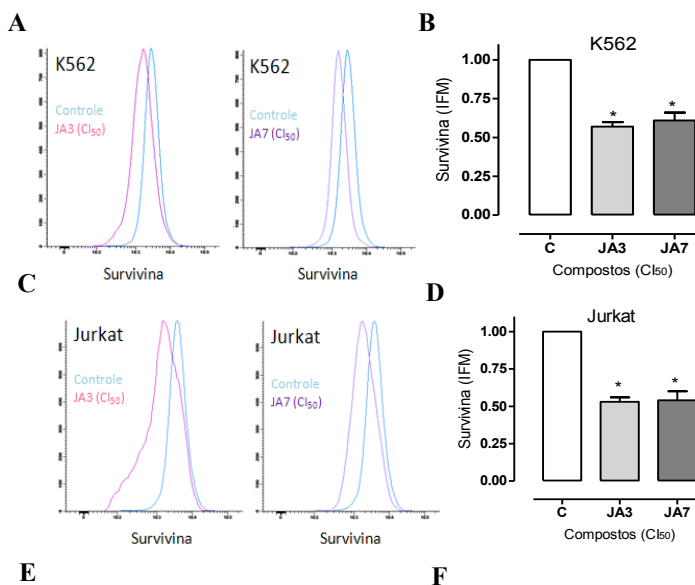
As células K562 (A,C,E,G) e Jurkat (C,E,F,H) foram pré-incubadas com o inibidor de caspase-8 Z-IETDF-MK por 1 h e então incubadas com JA3 e JA7 em diferentes concentrações por 24 h antes da determinação da viabilidade celular pelo método do

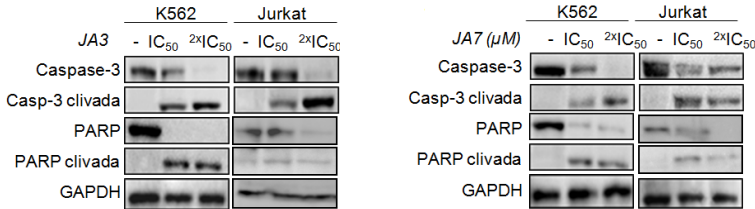
MTT ( $5 \times 10^4$  células/poço) (A-D e análise por WB da expressão das proteínas Bid, Bcl-2, Bcl-xL, Bax e Bak ( $1 \times 10^6$  células/poço) (E-H). Os resultados representam a média  $\pm$  EPM de, pelo menos, três experimentos independentes. \*  $p \leq 0,05$  em relação aos grupos controle, #  $p \leq 0,05$  em relação ao grupo sem inibidor, ANOVA *two-way* seguida de teste *post-hoc* de Bonferroni.

## 5.9 INVESTIGAÇÃO DO EFEITO DAS CHALCONAS JA3 E JA7 NA VIA COMUM DA APOPTOSE EM CÉLULAS K562 E JURKAT

Conforme demonstrado na Figura 37, as chalconas **JA3** e **JA7** diminuíram significativamente a expressão da proteína anti-apoptótica survivina em células K562 ( $IFM_{JA3} = 0,57 \pm 0,02$ ,  $IFM_{JA7} = 0,61 \pm 0,05$ ) e Jurkat ( $IFM_{JA3} = 0,53 \pm 0,03$ ,  $IFM_{JA7} = 0,54 \pm 0,06$ ) em relação ao grupo controle ( $IFM_{controle} = 1$ ). Além disso, os dois compostos levaram ao aumento da expressão das proteínas caspase-3 e PARP clivadas, o que confirma a execução da morte por apoptose.

Figura 37 - Efeito das chalconas JA3 e JA7 na expressão das proteínas survivina, caspase-3 e PARP.



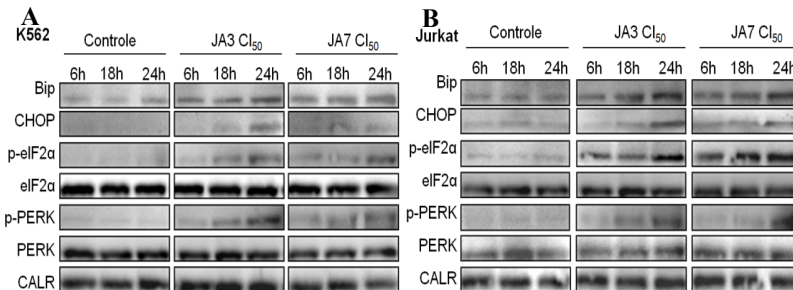


(A-D) As células K562 (A,B) e Jurkat (C,D) ( $1 \times 10^6$  células/poço), foram incubadas por 12 h na ausência, grupo controle (C), e na presença das chalconas **JA3** e **JA7** nas  $CI_{50}$  de 24 h. A IFM foi determinada após a marcação com o anticorpo anti-survivina. Os resultados representam a média  $\pm$  EPM de, pelo menos, três experimentos independentes. As análises foram realizadas no citômetro de fluxo BD FACSCanto™ II e avaliadas pelo *software* *Infinicyt* versão 1.7. \*  $p \leq 0,05$  em relação aos grupos controle, teste *t* de Student. (E-F) As células K562 e Jurkat ( $1 \times 10^6$  células/poço) foram incubadas por 24 h na ausência e na presença de **JA3** (E) e **JA7** (F) antes da análise por WB da expressão de caspase-3, caspase-3 clivada, PARP e PARP clivada. As imagens são representativas de pelo menos três experimentos independentes.

## 5.10 ENVOLVIMENTO DO EFEITO DAS CHALCONAS JA3 E JA7 NO ESTRESSE DO RE EM CÉLULAS K562 E JURKAT

A incubação das células K562 e Jurkat com **JA3** e **JA7** resultou em um aumento na expressão de Bip, CHOP, p-eIF2 $\alpha$  e p-PERK, marcadores de estresse do RE, de forma dependente do tempo. Os resultados foram observados a partir de 6 h de incubação com as chalcona e foram mais expressivos após 24 h (Figura 38).

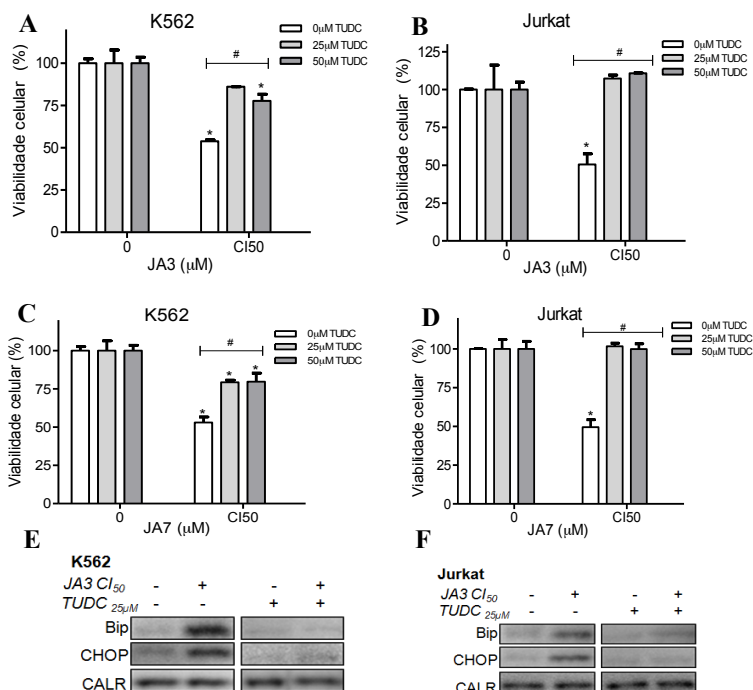
Figura 38 - Efeito das chalconas JA3 e JA7 no estresse do RE.

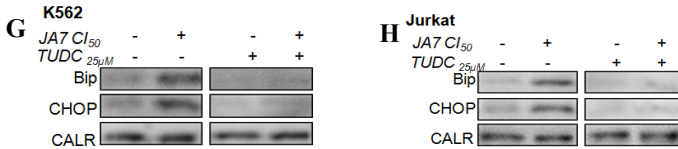


As células K562 (A) e Jurkat (B) ( $1 \times 10^6$  células/poço) foram incubadas na ausência (grupo controle) e na presença de JA3 ou JA7 ( $CI_{50}$ ). Os LCT foram analisados por WB para a expressão de Bip, CHOP, eIF2 $\alpha$ , p-eIF2 $\alpha$ , PERK e p-PERK. CALR foi utilizado como controle de carregamento. As imagens são representativas de, pelo menos, três experimentos independentes.

A fim de se avaliar a importância do estresse no RE na morte celular induzida pelas chalconas **JA3** e **JA7**, as células K562 e Jurkat foram pré-incubadas com TUDC, um potente inibidor do estresse no RE. Como mostra a Figura 39 A-D, o uso de TUDC protegeu as células de LA da morte celular mediada por **JA3** e **JA7**. Nessa condição, a expressão aumentada das proteínas envolvidas no estresse no RE Bip e CHOP foi inibida (Figura 38 E-H). Juntos, esses resultados mostram que o efeito citotóxico causado pelas chalconas estudadas envolve o estresse no RE.

Figura 39 - Efeito das chalconas JA3 e JA7 no estresse do RE após pré-tratamento com TUDC.





As células K562 (A, C, E, G) e Jurkat (B, D, F, H) foram pré-incubadas por 24h com o inibidor TUDC e, no dia seguinte, incubadas com JA3 e JA7 (CI<sub>50</sub>). A viabilidade celular foi avaliada com  $5 \times 10^4$  células/poço pelo método do MTT (A-D) e a expressão dos marcadores de estresse no RE Bip e CHOP foi avaliada por WB (E-H) com  $1 \times 10^6$  células/poço. As imagens são representativas de pelo menos três experimentos independentes. \*  $p \leq 0,05$  em relação aos grupos controle, #  $p \leq 0,05$  em relação ao grupo sem inibidor, ANOVA *two-way* seguida de teste *post-hoc* de Bonferroni.

## 5.11 INVESTIGAÇÃO DO EFEITO DAS CHALCONAS JA3 E JA7 NA MORTE CELULAR IMUNOGÊNICA EM CÉLULAS K562 E JURKAT

Como o estresse no ER está envolvido na morte celular induzida por **JA3** e **JA7**, decidiu-se investigar se a citotoxicidade mediada por esses compostos é acompanhada de marcadores de morte celular imunogênica. De fato, após 6 h de incubação com as chalconas houve uma liberação significativa de ATP no sobrenadante de células K562 e Jurkat de forma dependente da concentração. Os resultados mais significativos foram observados na CI<sub>50</sub> dos dois compostos (Figura 40 A-B).

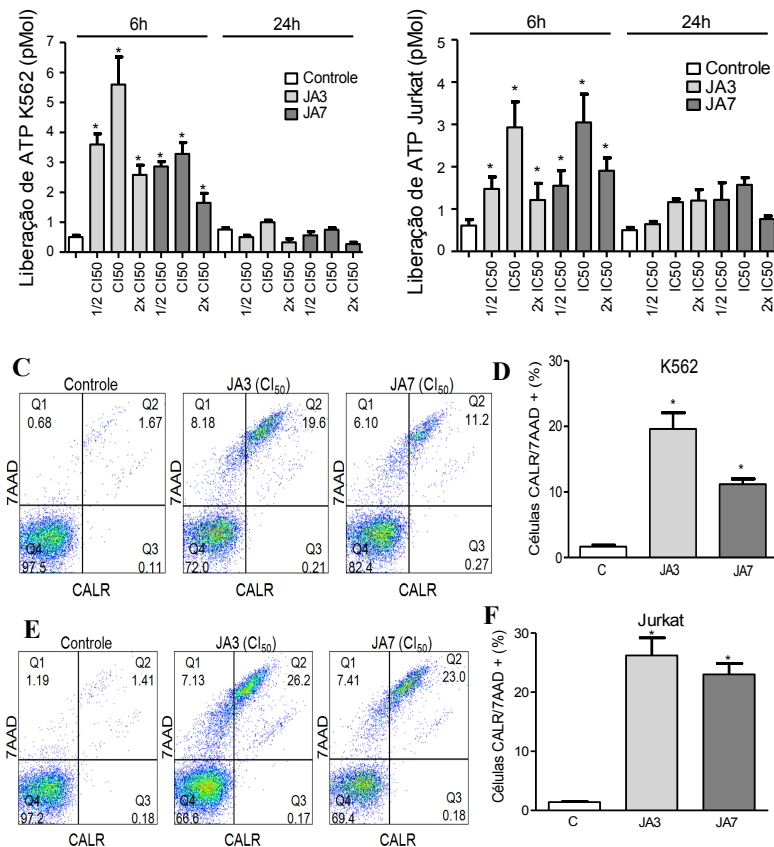
Além disso, as duas chalconas também induziram a exposição de CALR na superfície celular. Na linhagem K562, a porcentagem de células positivas para CALR passou de  $1,7 \pm 0,2$  % no grupo controle para  $19,6 \pm 2,5$  % no grupo tratado com **JA3** e  $11,2 \pm 0,8$  % no grupo tratado com **JA7**. Já na linhagem Jurkat, a porcentagem de células positivas para CALR passou de  $1,4 \pm 0,1$  % no grupo controle para  $26,2 \pm 2,9$  % no grupo tratado com **JA3** e  $23,0 \pm 1,9$  % no grupo tratado com **JA7** (Figura 40 C-F).

Figura 40 - Efeito das chalconas JA3 e JA7 na liberação de ATP e na exposição de CALR em células K562 e Jurkat.

A

B





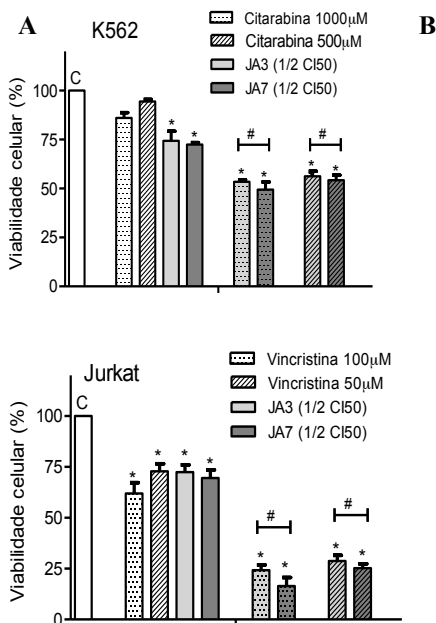
(A-B) As células K562 (A) e Jurkat (B)  $5 \times 10^4$  células/poço foram incubadas com as chalconas JA3 e JA7 em diferentes concentrações por 6h e por 24h. O sobrenadante de cada grupo foi utilizado para avaliar a quantidade de ATP liberada através de kit comercial segundo as instruções do fabricante. (C-F) As células K562 (C,D) e Jurkat (E,F)  $1 \times 10^6$  células/poço foram incubadas com as chalconas (CI<sub>50</sub>) por 12h, marcadas com anti-CALR e 7AAD. As análises foram realizadas no citômetro de fluxo Cyan Flow e avaliadas pelo *software* FlowJo. As imagens representam, pelo menos, três experimentos independentes e os resultados correspondem a média  $\pm$  EPM. \*  $p \leq 0,05$  em relação aos grupos controle, ANOVA *two-way* seguida de teste *post-hoc* de Bonferroni ou teste *t* de Student.

## 5.12 EFEITO DA ASSOCIAÇÃO DAS CHALCONAS JA3 E JA7 COM OS QUIMIOTERÁPICOS CITARABINA E VINCRISTINA NA MORTE DAS CÉLULAS K562 E JURKAT

Como demonstrado na Figura 41, a incubação das células K562 com citarabina (500  $\mu\text{M}$  e 1000  $\mu\text{M}$ ) não reduziu a viabilidade das células K562 quando comparado ao grupo controle. Já a incubação de K562 com citarabina mais uma subconcentração de **JA3** reduziu significativamente a viabilidade celular para  $56,2 \pm 2,7$  % (500  $\mu\text{M}$ ) e  $53,4 \pm 1,0$  % (1000  $\mu\text{M}$ ), enquanto que a incubação com citarabina mais uma subdose de **JA7** reduziu para  $54,2 \pm 2,7$  % (500  $\mu\text{M}$ ) e  $48,5 \pm 3,9$  % (1000  $\mu\text{M}$ ).

A incubação das células Jurkat com vincristina (50  $\mu\text{M}$  e 100  $\mu\text{M}$ ) reduziu significativamente a viabilidade celular para  $72,8 \pm 3,7$  % (50  $\mu\text{M}$ ) e  $61,9 \pm 5,3$  % (100  $\mu\text{M}$ ). Quando as células foram incubadas simultaneamente com vincristina e uma subdose de **JA3**, a viabilidade celular foi drasticamente reduzida para  $28,7 \pm 2,8$  % (50  $\mu\text{M}$ ) e  $24,2 \pm 2,6$  % (100  $\mu\text{M}$ ). De modo semelhante, a incubação das células Jurkat com vincristina e uma subconcentração de **JA7** reduziu a viabilidade para  $25,2 \pm 2,1$  % (50  $\mu\text{M}$ ) e  $16,4 \pm 4,2$  % (100  $\mu\text{M}$ ). Em ambos os casos, foi observado uma diferença significativa entre a terapia combinada (citarabina + **JA3** ou **JA7** e vincristina + **JA3** ou **JA7**) e os tratamentos isolados (apenas citarabina e apenas com a subconcentração das chalconas).

Figura 41 - Efeito das chalconas JA3 e JA7 em associação com citarabina e vincristina.



As células K562 (A) e Jurkat (B) ( $5 \times 10^4$  células/poço) foram incubadas com citarabina (K562) e vincristina (Jurkat) em diferentes concentrações, com as chalconas JA3 e JA7 (1/2 CI<sub>50</sub>) e com combinações dos quimioterápicos com as chalconas por 24 h. As células não tratadas foram consideradas como 100 % de viabilidade celular. \*  $p \leq 0,05$  em relação aos grupos controle, #  $p \leq 0,05$  quando comparados a citarabina ou vincristina isoladamente, ANOVA two-way seguida de teste post-hoc de Bonferroni.

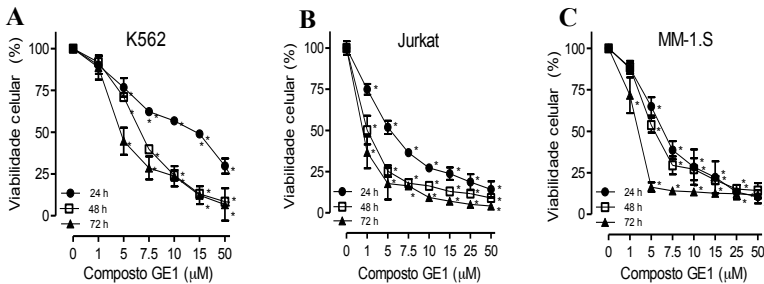
## 6 RESULTADOS COM O COMPOSTO GE1 (ACETATO DE MICONIDINA)

### 6.1 EFEITO CITOTÓXICO DE GE1 SOBRE CÉLULAS DE NEOPLASIAS HEMATOLÓGICAS

O efeito citotóxico de **GE1** foi investigado em células de LMA K562 e de LLA Jurkat (Figura 42 A-B). Os resultados demonstram que esse composto é altamente citotóxico para as duas linhagens leucêmicas avaliadas, principalmente para a linhagem Jurkat, onde foi observada uma diferença significativa em relação ao grupo controle a partir de 1  $\mu\text{M}$ . Os valores de  $\text{CI}_{50}$  para as células K562 variaram de  $3,6 \pm 0,3 \mu\text{M}$  em 72 h a  $11,7 \pm 0,4 \mu\text{M}$  em 24 h, e, para as células Jurkat, de  $0,25 \pm 0,01 \mu\text{M}$  em 72 h a  $4,7 \pm 0,3 \mu\text{M}$  em 24 h (Quadro 11).

O composto **GE1** também reduziu a viabilidade celular da linhagem de MM MM-1S de forma dependente da concentração e do tempo de incubação. A redução significativa foi observada a partir de 5  $\mu\text{M}$  em 24 h e de 1  $\mu\text{M}$  em 48 e 72 h. Os valores de  $\text{CI}_{50}$  variaram de  $1,7 \pm 0,3 \mu\text{M}$  em 72h a  $5,2 \pm 0,4 \mu\text{M}$  em 24 h.

Figura 42 - Efeito citotóxico de **GE1** sobre as células K562, Jurkat e MM-1.S



As células K562 (A), Jurkat (B) e MM-1.S (C) ( $5 \times 10^4$  células/poço - 24 h,  $2,5 \times 10^4$  células/poço - 48 h e  $1,25 \times 10^4$  células/poço - 72 h) foram incubadas com **GE1** em diferentes concentrações por 24 h, 48 h, e 72 h. O grupo controle (células sem tratamento) foi considerado como sendo 100% de viabilidade celular e a avaliação do resultado foi realizada pelo método do MTT. Cada ponto representa média  $\pm$  EPM de três experimentos independentes. \* $p \leq 0,05$  em relação ao grupo controle (células sem tratamento). ANOVA *one-way* seguida de teste de Bonferroni.

Quadro 11 - Valores de  $CI_{50}$  calculados para GE1 em diferentes linhagens tumorais.

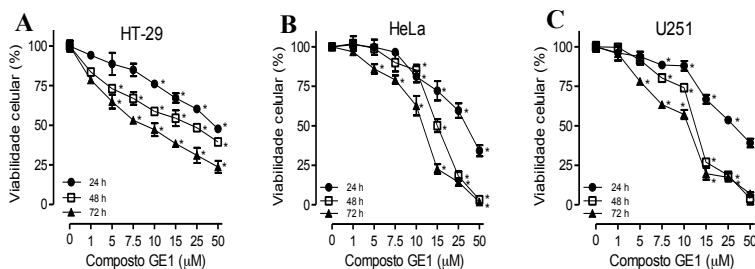
$IC_{50}$	K562	Jurkat	MM-1.S	HT-29	HeLa	U251
24 h	11,7 ± 0,4	4,7 ± 0,3	5,2 ± 0,3	37,6 ± 1,6	39,8 ± 1,5	35,2 ± 1,5
48 h	5,3 ± 0,3	0,9 ± 0,1	4,3 ± 0,2	17,7 ± 1,8	18,6 ± 1,2	11,2 ± 1,5
72 h	3,6 ± 0,3	0,25 ± 0,01	1,7 ± 0,3	9,4 ± 0,9	10,7 ± 1,3	9,3 ± 0,9

Os valores de  $CI_{50}$  foram obtidos a partir da regressão linear das curvas concentração e tempo resposta e calculadas através do *software* GraphPad Prism 5.

## 6.2 EFEITO CITOTÓXICO DO COMPOSTO GE1 SOBRE CÉLULAS DE TUMORES SÓLIDOS

Como pode ser observado na Figura 43, o composto **GE1** diminuiu a viabilidade celular das linhagens HT-29, HeLa e U251 de forma dependente do tempo e da concentração, porém de forma menos efetiva do que nas linhagens de LMA, LLA e MM. A  $CI_{50}$  variou de  $9,4 \pm 0,9 \mu\text{M}$  a  $37,6 \pm 1,6 \mu\text{M}$  na linhagem HT-29, de  $10,7 \pm 1,3 \mu\text{M}$  a  $39,8 \pm 1,5 \mu\text{M}$  na linhagem HeLa e de  $9,3 \pm 0,9 \mu\text{M}$  a  $35,2 \pm 1,5 \mu\text{M}$  na linhagem U251 (Quadro 11).

Figura 43 - Efeito citotóxico de GE1 sobre as células HT-29, HeLa e U251

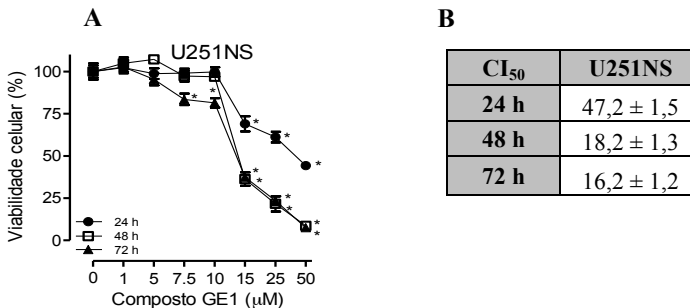


As células HT-29 (A), HeLa (B) e U251 (C) ( $5 \times 10^4$  células/poço - 24 h,  $2,5 \times 10^4$  células/poço - 48 h e  $1,25 \times 10^4$  células/poço - 72 h) foram incubadas com **GE1** em diferentes concentrações por 24 h, 48 h, e 72 h. O grupo controle (células sem tratamento) foi considerado como sendo 100% de viabilidade celular e a avaliação do resultado foi realizada pelo método do MTT. Cada ponto representa média ± EPM de três experimentos independentes. \* $p \leq 0,05$  em relação ao grupo controle (células sem tratamento). ANOVA *two-way* seguida de teste de Bonferroni.

### 6.3 EFEITO CITOTÓXICO DO COMPOSTO **GE1** SOBRE CÉLULAS-TRONCO TUMORAIS

O efeito de **GE1** sobre a linhagem de células-tronco tumorais U251NS foi demonstrado na Figura 44. Assim como observado para as demais linhagens tumorais, houve uma redução significativa na viabilidade celular de forma dependente do tempo e da concentração quando comparado ao grupo controle. Os valores de  $CI_{50}$  variaram de  $16,2 \pm 1,2 \mu\text{M}$  a  $47,2 \pm 1,5 \mu\text{M}$  em 72 h e 24 h, respectivamente.

Figura 44 - Efeito citotóxico do composto **GE1** sobre as células U251NS



As células U251NS (A) ( $5 \times 10^4$  células/poço - 24 h,  $2,5 \times 10^4$  células/poço - 48 h e  $1,25 \times 10^4$  células/poço - 72 h) foram incubadas com **GE1** em diferentes concentrações por 24 h, 48 h, e 72 h. O grupo controle (células sem tratamento) foi considerado como sendo 100% de viabilidade celular e a avaliação do resultado foi realizada pelo método do MTT. Cada ponto representa média  $\pm$  EPM de três experimentos independentes. Os valores de  $CI_{50}$  (B) foram obtidos a partir da regressão linear das curvas concentração e tempo resposta e calculadas através do *software* GraphPad Prism 5. \* $p \leq 0,05$  em relação ao grupo controle (células sem tratamento). ANOVA *one-way* seguida de teste *post-hoc* de Bonferroni

### 6.4 EFEITO CITOTÓXICO DO COMPOSTO **GE1** SOBRE CÉLULAS NÃO NEOPLÁSICAS

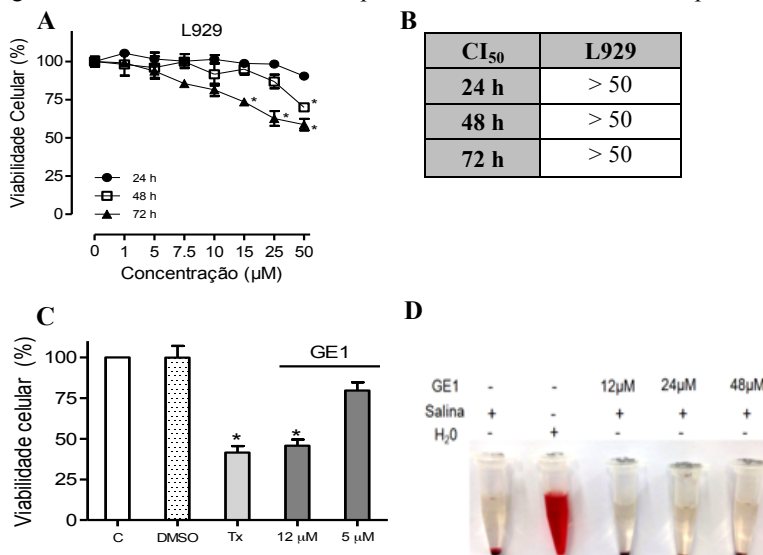
O composto **GE1** não reduziu de forma significativa a viabilidade celular da linhagem de fibroblastos L929 (Figura 45 A-B). As  $CI_{50}$  encontradas em 24, 48 e 72 h foram superiores a  $50 \mu\text{M}$ , maior do que os valores obtidos em células leucêmicas.

Quando o composto foi avaliado em células mononucleadas de indivíduos saudáveis em uma concentração próxima da  $CI_{50}$  de 24 h encontrada na linhagem K562 ( $12 \mu\text{M}$ ), foi observada uma diferença

significativa na viabilidade celular ( $45,7 \pm 3,8$  %) quando comparado ao grupo controle (100 %). O valor encontrado foi bastante semelhante ao do paclitaxel na sua  $CI_{50}$  ( $41,5 \pm 4,0$  %). Porém, quando **GE1** foi utilizado em uma  $CI_{50}$  de 24 h próxima da linhagem Jurkat ( $5 \mu\text{M}$ ), não foi encontrada diferença significativa em relação ao grupo controle (Figura 45 C).

Além disso, o composto **GE1** não induziu hemólise significativa em eritrócitos isolados de indivíduos saudáveis, mesmo em concentrações três vezes maiores do que a  $CI_{50}$  da linhagem K562. As porcentagens de hemólise foram  $1,2 \pm 0,2$  % ( $12 \mu\text{M}$ ),  $1,6 \pm 0,1$  % ( $24 \mu\text{M}$ ) e  $1,7 \pm 0,1$  % ( $36 \mu\text{M}$ ), quando comparadas ao controle positivo, considerado como 100 % de hemólise.

Figura 45 - Efeito citotóxico do composto **GE1** sobre células não neoplásicas.



(A) As células L929 ( $5 \times 10^4$  células/poço - 24 h,  $2,5 \times 10^4$  células/poço - 48 h e  $1,25 \times 10^4$  células/poço - 72 h) foram incubadas com **GE1** em diferentes concentrações por 24 h, 48 h, e 72 h. O grupo controle (células sem tratamento) foi considerado como sendo 100% de viabilidade celular. (B) Os valores de  $CI_{50}$  foram obtidos a partir da regressão linear das curvas concentração e tempo resposta e calculadas através do *software* GraphPad Prism 5. (C) As células mononucleadas ( $1,0 \times 10^6$  células/poço) foram incubadas com **GE1**, com o veículo DMSO ou com paclitaxel (Tx - $10 \mu\text{M}$ ) e a viabilidade celular foi avaliada pelo método do MTT. (D) Eritrócitos saudáveis foram incubados com **GE1**, com salina (controle negativo, 0 % de hemólise) e com água destilada (controle positivo, 100 % de hemólise). \*  $p \leq$

0,05 em relação ao grupo controle. ANOVA *one-way* e *two-way* seguida de teste *post-hoc* de Bonferroni

## 6.5 IS EM RELAÇÃO A CÉLULAS DE LA

O composto **GE1** foi altamente seletivo para as linhagens de LA K562 e Jurkat quando comparado à linhagem não neoplásica L929, com IS superior a 10 (Quadro 12). Quando a comparação foi realizada com as células de tumores sólidos HT-29, HeLa e U251 e com a célula tronco tumoral U251NS, foi observada uma baixa seletividade em relação a linhagem de LMA K562 ( $IS \leq 5$ ) e uma seletividade moderada em relação a linhagem de LLA Jurkat ( $5 < IS < 10$ ).

Por fim, foi realizada a comparação dos valores de  $CI_{50}$  entre as linhagens U251NS e U251 e foi encontrado IS de 1,3, o que indica baixa seletividade.

Quadro 12 - Índice de seletividade para o composto GE1.

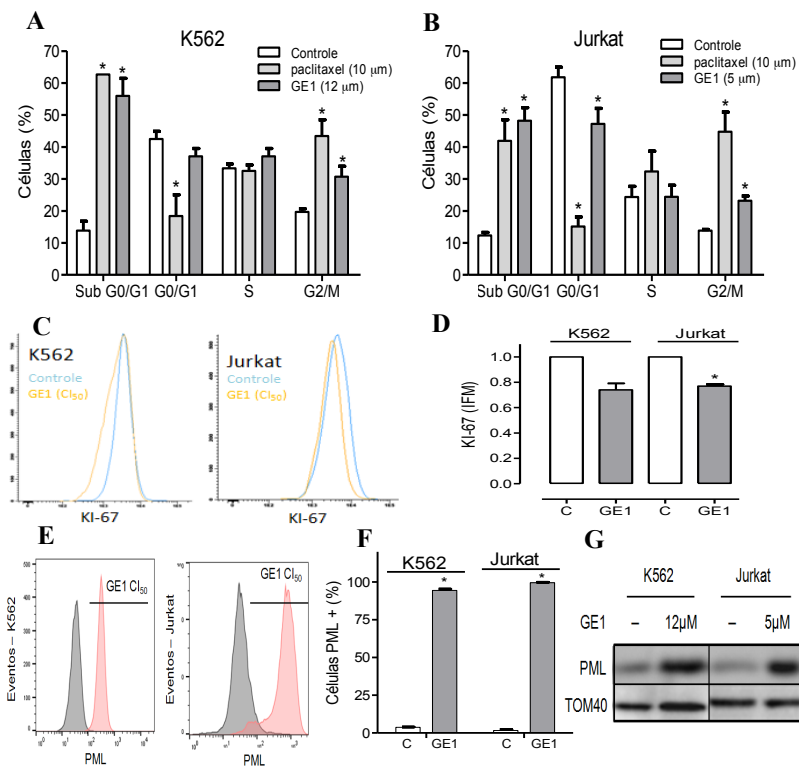
IS (24h)	HT-29	HeLa	U251	U251NS	L929
<b>K562</b>	3,2	3,4	3,0	4,0	> 10
<b>Jurkat</b>	8,0	8,5	7,5	10,0	> 10

## 6.5 EFEITO DO COMPOSTO GE1 NO CICLO CELULAR DE CÉLULAS K562 E JURKAT

Como pode ser observado na Figura 46 A-B, o composto **GE1** causou um acúmulo significativo de células K562 e Jurkat na fase sub-G0 / G1 (K562 =  $55,9 \pm 5,5$  %; Jurkat  $48,2 \pm 4,1$  %) quando comparado aos respectivos grupos controle (K562 =  $13,9 \pm 2,9$  %; Jurkat  $12,3 \pm 1,0$  %). Além disso, o composto bloqueou a fase G2/M das células K562 e Jurkat, como demonstrado pelo aumento significativo na porcentagem de células nesta fase do ciclo celular (aumento de 56 % e 68 % para K562 e Jurkat, respectivamente) quando comparado aos respectivos grupos controle.

O composto **GE1** também reduziu significativamente a expressão do marcador de proliferação celular KI-67 em células K562 (IFM =  $0,74 \pm 0,05$ ) e Jurkat (IFM =  $0,77 \pm 0,01$ ) (IFM<sub>controle</sub> = 1) (Figura 46 C-D) e aumentou a expressão da proteína PML tanto em células K562 (90%) quanto em células Jurkat (97,9%) quando comparadas aos respectivos grupos controle (K562: 3,8%, Jurkat: 1,6%) (Figura 46 E-F). O aumento da expressão de PML foi confirmado por WB (Figura 46 G).



Figura 46 - Efeito de **GE1** no ciclo celular das células de LA K562 e Jurkat.

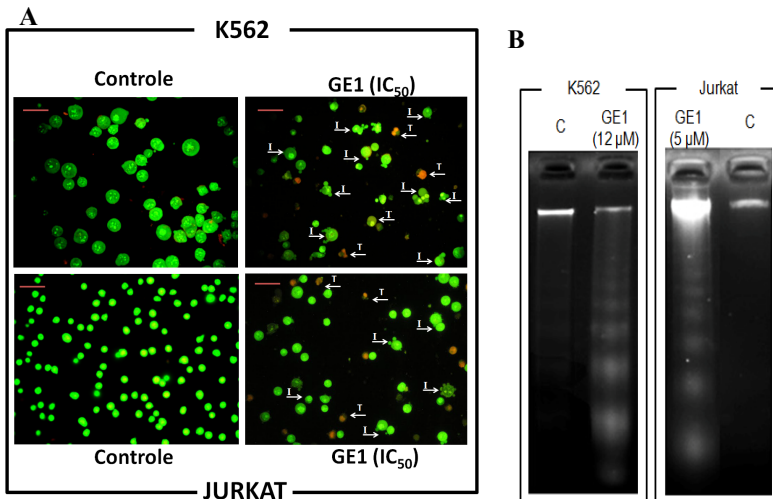
(A-B) As células K562 (A) e Jurkat (B) ( $1 \times 10^6$  células/poço) foram incubadas com **GE1** na  $\frac{1}{2}$  CI<sub>50</sub> por 24 h. O grupo controle corresponde às células sem tratamento e o paclitaxel foi utilizado como controle de morte. As fases do ciclo celular estão representadas por G0/G1, S e G2/M, e foi representada, também, a fase Sub G0/G1. (C-D) A expressão de KI-67 foi observada em células K562 e Jurkat ( $1 \times 10^6$  células/poço) após 12 h de incubação com **GE1** (CI<sub>50</sub>) e posterior marcação com anti-KI-67. As análises foram realizadas no citômetro de fluxo BD FACSCanto™ II e avaliadas pelo *software* WinMID versão 2.8. (E-F) As células K562 e Jurkat ( $1 \times 10^6$  células/poço) incubadas com **GE1** por 18 h foram marcadas com anti-PML, analisadas no citômetro de fluxo *Cyan Flow* e as células positivas para PML foram quantificadas pelo *software* FloJow. (G). Os LCT de células K562 e Jurkat ( $1 \times 10^6$  células/poço) foram analisados por WB para a expressão de PML. TOM40 foi utilizado como controle de carregamento. Cada ponto representa a média  $\pm$  EPM de pelo menos três experimentos independentes. \*  $p \leq 0,05$  em relação ao grupo controle, teste *t* de Student ou ANOVA *one-way* seguida de Bonferroni.

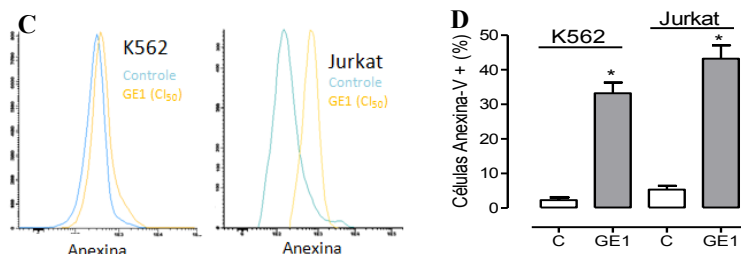
## 6.6 EFEITO DO COMPOSTO **GE1** NA INDUÇÃO DA APOPTOSE EM CÉLULAS K562 E JURKAT

Para avaliar se a morte celular induzida pelo composto **GE1** em células K562 e Jurkat apresentava características morfológicas sugestivas de apoptose, foi realizada a observação celular por microscopia de fluorescência após coloração com BE/AO. Após 12 h de incubação com **GE1** ( $IC_{50}$ ), as duas linhagens celulares demonstraram características morfológicas típicas de células em apoptose inicial (I) e tardia (T), indicadas na Figura 47 A pelas setas brancas. Os núcleos das células tratadas com os compostos mostraram-se mais condensados, indicando picnose, e é possível observar perda de integridade da membrana plasmática.

A morte celular por apoptose foi confirmada pela visualização do padrão de fragmentação “em escada” do DNA, característico de células em apoptose (Figura 47 B). Por fim, as células apoptóticas foram quantificadas pela exposição dos resíduos de fosfatidilserina. As células K562 passaram de  $2,3 \pm 0,8$  % de células positivas para anexina no grupo controle para  $33,2 \pm 3,1$  % após a incubação com **GE1** (Figura 47 C-D). De modo semelhante, as células Jurkat passaram de  $5,3 \pm 1,1$  % de células positivas para anexina no grupo controle para  $43,2 \pm 3,9$  % após a incubação com o composto.

Figura 47 - Efeito do composto **GE1** na indução de morte celular por apoptose.



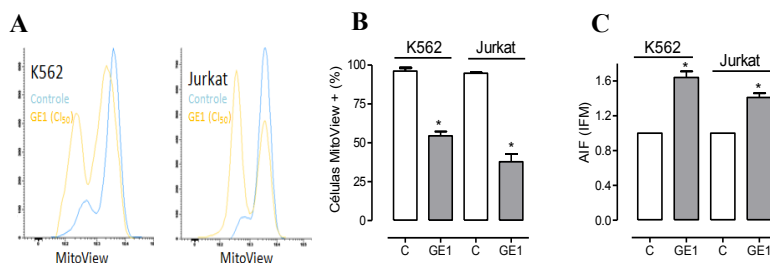


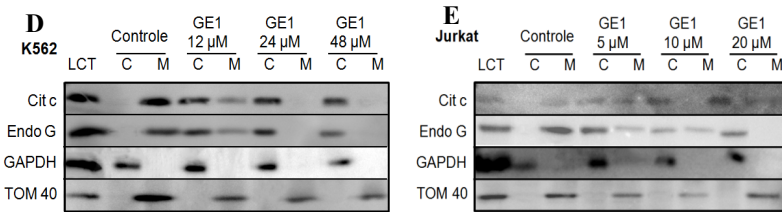
(A) As células K562 e Jurkat ( $1 \times 10^6$  células/poço) incubadas com **GE1** (CI<sub>50</sub>) por 12 h foram coradas com BE/AO e observadas em microscópio de fluorescência. As células apoptóticas estão indicadas pelas setas brancas. (B) As células K562 e Jurkat ( $5 \times 10^6$  células/poço) foram incubadas com **GE1** (CI<sub>50</sub>) por 24 h e a fragmentação do DNA foi observada em gel de agarose. (C) As células K562 e Jurkat ( $1 \times 10^6$  células/poço) foram incubadas durante 12 h na ausência, grupo controle (C) e na presença de **GE1** (CI<sub>50</sub>) e as células positivas para Annexin-V foram quantificadas por citometria de fluxo (D). Cada ponto e/ou imagem representa a média  $\pm$  SEM de pelo menos três experimentos independentes. \*  $p < 0,05$  quando comparado ao grupo controle, teste *t* de Student.

## 6.7 EFEITO DO COMPOSTO **GE1** NAS MITOCÔNDRIAS DE CÉLULAS K562 E JURKAT

Conforme mostrado na Figura 48, o tratamento com **GE1** reduziu significativamente o número de células K562 e Jurkat com  $\Delta\Psi_m$  intacto para 41,6 % e 57,0 %, respectivamente, quando comparado aos respectivos grupos controle (100%). Além disso, o composto levou à liberação das proteínas apoptóticas citocromo *c*, endonuclease G e AIF das mitocôndrias para o citosol (Figura 47 D-E). A IFM das células K562 e Jurkat marcadas com anti-AIF passou de 1 nos grupos controle para  $1,64 \pm 0,07$  e  $1,41 \pm 0,05$ , respectivamente, após o tratamento com **GE1**.

Figura 48 - Efeito do composto GE1 na mitocôndria das células K562 e Jurkat.



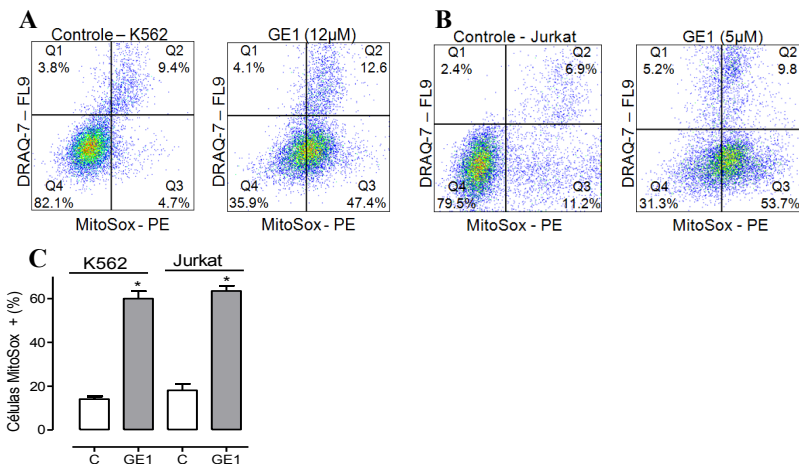


(A-C) As células K562 e Jurkat ( $1 \times 10^6$  células/poço) foram incubadas durante 12 h na ausência, grupo controle (C), ou na presença de **GE1** ( $CI_{50}$ ) e, posteriormente, marcadas com MitoView (A-B) ou anti-AIF-FITC (C). Os resultados representam a média  $\pm$  EPM de três experimentos independentes. \*  $p < 0,05$  quando comparado ao grupo controle usando teste *t* de Student. (D-E) Após 24 h de incubação com **GE1** em diferentes concentrações, as frações citosólica (C) e mitocondrial (M) das células K562 (D) e Jurkat (E) foram separadas e a expressão das proteínas citocromo c e endonuclease G foi avaliada por WB. GAPDH e Tom40 foram utilizados como controle das frações C e M, respectivamente.

## 6.8 EFEITO DO COMPOSTO **GE1** NA PRODUÇÃO DE EROS EM CÉLULAS K562 E JURKAT

O composto **GE1** aumentou a produção de EROS por células K562 ( $60,0 \pm 3,4\%$ ) e Jurkat ( $63,5 \pm 2,3\%$ ) quando comparado aos respectivos grupos controle (K562 =  $14,1 \pm 1,3\%$  e Jurkat =  $18,1 \pm 2,9\%$ ), conforme refletido pela porcentagem de células MitoSox positivas (Figura 49).

Figura 49 - Efeito do composto **GE1** na produção de EROS.



As células K562 (A) e Jurkat (B) ( $1 \times 10^6$  células/poço) foram incubadas durante 18 h na ausência (grupo controle) e na presença de **GE1**( $CI_{50}$ ) antes da marcação com MitoSox Red e DRAQ-7. As análises foram realizadas no citômetro de fluxo Cyan Flow e avaliadas pelo *software* FlowJo (C). As imagens representam, pelo menos, três experimentos independentes e os resultados correspondem a média  $\pm$  EPM. \*  $p \leq 0,05$  em relação aos grupos controle usando teste *t* de Student.

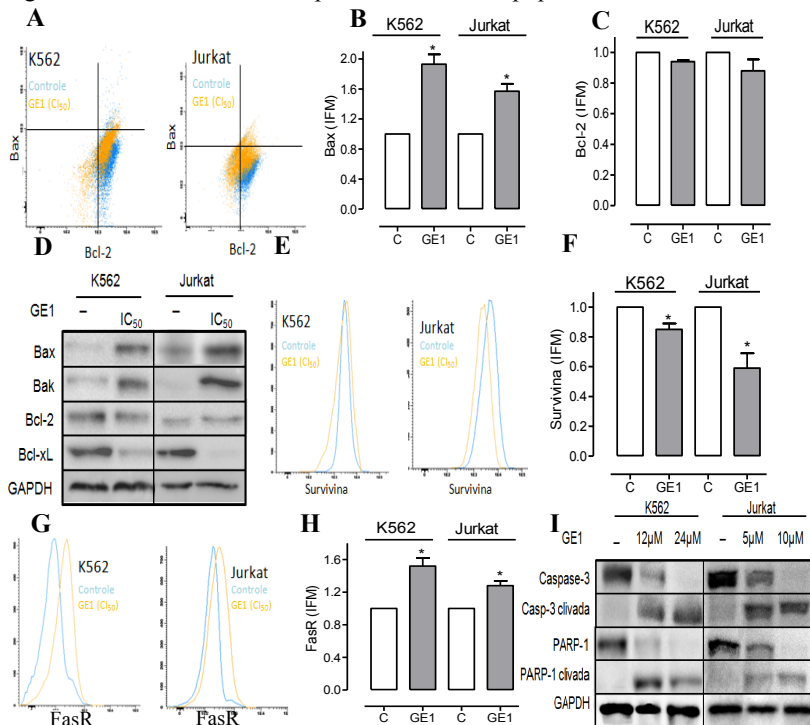
## 6.9 EFEITO DO COMPOSTO **GE1** NAS VIAS DE APOPTOSE EM CÉLULAS K562 E JURKAT

A incubação com o composto **GE1** por 12 h levou a um aumento significativo na expressão da proteína pró-apoptótica Bax tanto em células K562 (IFM =  $1,9 \pm 0,1$ ) quanto em células Jurkat (IFM =  $1,6 \pm 0,1$ ) quando comparadas aos controles (IFM = 1) (Figura 49 A-B). Porém não foi observada diferença significativa na expressão da proteína antiapoptótica Bcl-2 (Figura 50 A,C). A análise por WB confirmou o aumento da expressão de Bax, e também mostrou um aumento visível da proteína pró-apoptótica Bak em ambas as linhagens celulares incubadas com **GE1** por 24 h (Figura 50 D). Após 24 h, foi observada também uma diminuição na expressão de Bcl-2 na linhagem K562 e de Bcl-xL nas duas linhagens celulares. O composto **GE1** também diminuiu a expressão da proteína antiapoptótica survivina em células K562 (IFM =  $0,85 \pm 0,1$ ) e Jurkat (IFM =  $0,6 \pm 0,1$ ) quando comparado aos grupos controle (IFM = 1) (Figura 50 E-F)

O efeito de **GE1** no receptor Fas mostrou um aumento significativo na sua expressão, tanto na linhagem K562 (IFM =  $1,5 \pm 0,1$ ) quanto na linhagem Jurkat (IFM =  $1,3 \pm 0,1$ ) em relação aos grupos controle (IFM = 1) (Figura 50 G-H).

Finalmente, como pode ser observado na Figura 50 I, a modulação das proteínas da via intrínseca e da via extrínseca levou a um aumento na clivagem das proteínas PARP e caspase-3, mostrando a ativação da via comum da apoptose.

Figura 50 - Efeito de GE1 em proteínas das vias apoptóticas.



(A-I) As células K562 e Jurkat ( $1 \times 10^6$  células/poço) foram incubadas durante 12 h (citometria de fluxo) ou 24 h (WB) na ausência e na presença de GE1 (CI<sub>50</sub>). (A-C, E-H) As células foram marcadas com anti-Bax-PerCP (A,B), anti-Bcl-2-FITC (A,C), anti-survivina-PE (E-F) e anti-FasR-PE (G-H) e analisados por citometria de fluxo. (D, I) As amostras de LCT foram separadas por WB e marcadas com anti-Bax, anti-Bak, anti-Bcl-2, anti-Bcl-xL, anti-caspase-3 e anti-PARP. GAPDH foi utilizado como controle. As imagens representam, pelo menos, três experimentos independentes e os resultados correspondem a média  $\pm$  EPM. \*  $p \leq 0,05$  em relação aos grupos controle usando teste *t* de Student.

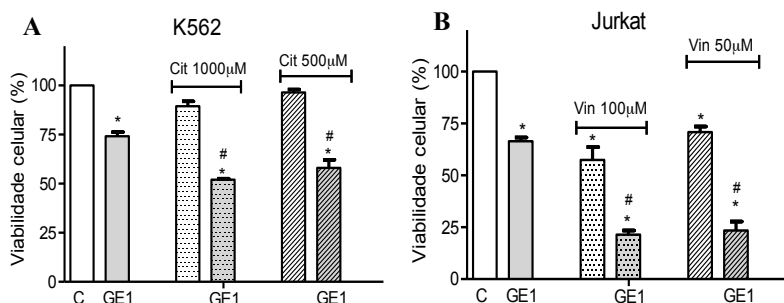
## 6.10 EFEITO DA ASSOCIAÇÃO DO COMPOSTO GE1 COM OS QUIMIOTERÁPICOS CITARABINA E VINCRISTINA

Como pode ser observado na Figura 51 A, a incubação das células K562 com citarabina (500  $\mu$ M e 1000  $\mu$ M) não reduziu a viabilidade celular quando comparado ao grupo controle. Já a incubação de K562 com citarabina mais uma subconcentração de GE1 (1/2 CI<sub>50</sub>) reduziu significativamente a viabilidade celular para  $58,0 \pm 4,1$  % (500

$\mu\text{M}$ ) e  $52,1 \pm 0,4 \%$  ( $1000 \mu\text{M}$ ) em relação ao grupo controle (100 % de viabilidade).

A incubação das células Jurkat com vincristina ( $50 \mu\text{M}$  e  $100 \mu\text{M}$ ) (Figura 51 B) reduziu significativamente a viabilidade das células para  $70,9 \pm 2,7 \%$  ( $50 \mu\text{M}$ ) e  $57,5 \pm 6,1 \%$  ( $100 \mu\text{M}$ ) em relação ao controle. Quando as células foram incubadas com vincristina mais uma subconcentração de **GE1**, a viabilidade foi reduzida para  $23,4 \pm 4,3 \%$  ( $50 \mu\text{M}$ ) e  $21,4 \pm 2,1 \%$  ( $100 \mu\text{M}$ ). Em ambas as linhagens celulares, foi observada uma diferença significativa entre as terapias combinadas (citarabina + **GE1**) ou (vincristina + **GE1**) e os tratamentos isolados (apenas com citarabina ou vincristina ou **GE1**).

Figura 51 - Efeito da associação do composto **GE1** com os quimioterápicos citarabina e vincristina na morte das células K562 e Jurkat.



As células K562 (A) e Jurkat (B) ( $5 \times 10^4$  células/poço) foram incubadas com citarabina (K562) e vincristina (Jurkat) em diferentes concentrações, com o composto **GE1** ( $1/2 \text{ CI}_{50}$ ) e com combinações dos quimioterápicos com **GE1** por 24 h. As células não tratadas foram consideradas como 100 % de viabilidade celular. \*  $p \leq 0,05$  em relação aos grupos controle, #  $p \leq 0,05$  quando comparados a citarabina ou vincristina isoladamente, ANOVA *one-way* seguida de teste *post-hoc* de Bonferroni.

## 7 DISCUSSÃO

Nas últimas décadas houve um aumento considerável na quantidade e na qualidade de informações a respeito das neoplasias malignas, incluindo as neoplasias hematológicas. Um maior entendimento da fisiopatologia e dos mecanismos celulares e moleculares envolvidos na leucemogênese e o surgimento de novas estratégias terapêuticas trazem esperança para milhares de novos pacientes diagnosticados com leucemia todos os anos (VASEKAR et al., 2015, SAULTZ.; GARZON, 2016). Em contrapartida, apesar dos diversos esquemas terapêuticos utilizados para cada subtipo de LA, os quimioterápicos disponíveis atualmente estão associados a altas taxas de morbidade e mortalidade e a maioria dos pacientes recidiva e vai a óbito pouco tempo após o diagnóstico (HOIJAT-FARSANGI, 2015, MOSNA; CAPELLI; GOTTARDI, 2017). Considerando o prognóstico desfavorável das LAs e a toxicidade pouco seletiva dos quimioterápicos atuais, a busca por novos compostos antileucêmicos permanece um alvo a ser alcançado pela comunidade científica (FUSO et al., 2016, TAN; DUNCAN; SLAWSON, 2017, WIMAN; ZHIVOTOVSKY, 2017). Nesse sentido, o objetivo deste trabalho foi investigar o efeito citotóxico de novos compostos de origem natural e sintética sobre células leucêmicas visando aqueles que induzam morte celular programada sem apresentar citotoxicidade significativa sobre células não neoplásicas.

As chalconas são compostos fenólicos de origem natural que têm sido descritos na literatura em conjunto com os seus derivados sintéticos pelas suas diversas propriedades terapêuticas (PASSALACQUA et al., 2015, DÍAZ-TIELAS et al., 2016, KHAN, 2017, PATIL et al., 2017, SINGH et al., 2017). Estudos anteriores realizados no LOEH demonstraram os efeitos citotóxicos das chalconas **A1** e **A23**, derivadas do 1-naftaldeído e do 2-naftaldeído, sobre células de leucemias humanas (MAIORAL et al., 2013, MAIORAL et al., 2016, MAIORAL et al., 2017). Posteriormente, foram sintetizadas 70 novas chalconas derivadas do aldeído pireno, da acetofenona do antraceno, do aldeído do antraceno, da acetofenona bifênil e do aldeído bifênil.

A triagem das 70 chalconas sintéticas foi inicialmente realizada em células K562. Atualmente, apenas 5 % dos compostos investigados como possíveis agentes antitumorais atingem a fase de ensaios clínicos. O objetivo dos ensaios de triagem *in vitro* é identificar substâncias que possuam efeitos antitumorais combinados a outros



critérios capazes de definir quais compostos podem progredir para o próximo estágio no programa de desenvolvimento de novos fármacos. O sistema de triagem ideal deve ser simples, rápido e de baixo custo, com uma ótima previsibilidade da farmacodinâmica. Assim, os ensaios de avaliação da citotoxicidade em células de linhagem permitem avaliar os efeitos tóxicos ou antiproliferativos da substância a ser analisada em diversos tempos e/ou concentrações a fim de calcular suas  $CI_{50}$  (KUMAR; BAJAJ; BODLA, 2016). A linhagem K562 foi selecionada para a realização da primeira triagem por ser considerada um modelo celular resistente. Ela foi originalmente obtida a partir da amostra de um paciente com LMA secundária a LMC (LMC em crise blástica BCR/ABL positiva), uma doença cujo prognóstico é bastante desfavorável e que está associada a uma grande resistência ao tratamento (ARYA et al., 2017, MATTE-MARTONE et al., 2017).

Do total de compostos analisados, as chalconas **KP12**, **JE16**, **JE18**, **JA3** e **JA7** foram as que apresentaram maior redução da viabilidade celular quando comparados ao grupo controle (Figura 10) e foram, portanto, selecionados para a realização de curvas concentração-resposta nas linhagens K562, Jurkat e HL-60, escolhidas por serem modelos de LMA, LLA e LPA, respectivamente. Conforme observado na Figura 11 e no Quadro 4, as cinco chalconas foram significativamente citotóxicas para as células avaliadas. Porém, segundo Burger e Fiebig (2014), compostos com  $CI_{50}$  maior do que 30  $\mu$ M são considerados inativos, por isso, como os compostos **KP12**, **JE16** e **JE18** apresentaram valores de  $CI_{50}$  acima desse valor, optou-se por dar continuidade somente à investigação das chalconas mais citotóxicas, **JA3** e **JA7**.

A diferença entre a intensidade de citotoxicidade de diferentes compostos pode estar relacionada com a sua estrutura química. Segundo a literatura, o efeito citotóxico de um composto varia segundo o tamanho dos anéis e a presença e posição de determinados substituintes (ROZMER et al., 2014). O efeito antitumoral das chalconas parece estar relacionado, principalmente, a três estratégias estruturais: a manipulação estrutural de ambos os anéis arilos (A e B), a substituição dos anéis arilos por grupamentos heteroarilos e a hibridação molecular através da conjugação com grupamentos farmacologicamente interessantes para o aprimoramento das propriedades terapêuticas (DAS; MANNA, 2016). Várias substituições em ambos os anéis arilos parecem influenciar a atividade antitumoral das chalconas. Quando observamos a estrutura química dos compostos avaliados no presente estudo (Apêndice 1), é possível perceber que os dois mais ativos, **JA3** e

**JA7**, apresentam um radical fenil no anel B, o que parece ser uma característica importante para a sua atividade. As chalconas **JE16** e **JE18** também possuem um radical fenil, porém no anel A, e, apesar de terem sido mais citotóxicas do que os compostos das séries pireno e antraceno, não foram tão efetivos quanto **JA3** e **JA7**. Isso sugere que o tipo de grupamento e sua posição no anel B influenciam a atividade antitumoral das chalconas.

Da mesma forma, os substituintes no anel A também desempenham um papel importante. Além do grupamento fenil no anel B, ambos os compostos selecionados possuem grupamentos metoxilados no anel A. Podemos observar que pelo menos duas metoxilas no anel A são exigidas para que o composto possua atividade citotóxica. Além disso, os compostos que apresentam metoxilas no anel A (**JA3** e **JA7**) são mais ativos que os compostos inversos (**JE16** e **JE18**). A presença de todos os outros substituintes como Cl, NO<sub>2</sub>, OH e metilenodioxifenil resultaram em moléculas menos ativas. Dentre as duas chalconas selecionadas, o composto **JA7** apresentou valores de CI<sub>50</sub> ligeiramente menores do que os do composto **JA3**. Isso sugere que as chalconas que contem três metoxilas causaram um efeito citotóxico maior do que as chalconas contendo duas metoxilas. Assim, é possível sugerir que a atividade das chalconas parece estar relacionada à adição de grupamentos funcionais em ambos os anéis arilo, sendo que a presença de grupamentos favoráveis apenas no anel A ou no anel B não é suficiente para melhorar a atividade citotóxica, conforme observado nos compostos não ativos. Essa atividade parece estar associada ao grupo metoxila em posições específicas no anel A que permitem maior funcionalidade, o que confere maior atividade à estrutura. De fato, diversos estudos sugerem que a atividade antitumoral das chalconas e seus derivados sintéticos estão altamente relacionados ao padrão da substituição aromática, sendo que as chalconas metoxiladas costumam apresentar maior atividade (LETAFAAT et al., 2013, ORLIKOVA et al., 2014, DAS; MANNA, 2016).

Como visto anteriormente, as leucemias são consideradas doenças heterogêneas e ensaios *in vitro* exigem a investigação do maior número possível de linhagens celulares (KUMAR; BAJAJ; BODLA, 2016). Por isso, o efeito citotóxico das chalconas **JA3** e **JA7** em função do tempo e da concentração foi avaliado em seis linhagens de LA: K562 (LMA), Jurkat (LLA), HL-60 (LPA), U937 (leucemia monocítica aguda), Kasumi (LMA) e CEM (LLA). Os dois compostos mostraram-se bastante citotóxicos para essas linhagens e a morte celular ocorreu de forma dependente da concentração e do período de incubação (Figuras

12 e 13). A  $CI_{50}$  de 24 h ficou abaixo de 20  $\mu\text{M}$  para quatro das seis linhagens avaliadas (Jurkat, CEM, U937 e Kasumi) e somente o composto **JA3** na linhagem HL-60 apresentou  $CI_{50}$  superior a 30  $\mu\text{M}$  (Quadro 5).

Diversos trabalhos na literatura avaliam o efeito citotóxico de chalconas em células de LA. Em um estudo realizado na linhagem K562 foi encontrado valores de  $CI_{50}$  entre  $2,8 \pm 1,1 \mu\text{M}$  e  $31,6 \pm 6,6 \mu\text{M}$  após 48 h de incubação, porém não foi relatado o número de células utilizadas nos experimentos (WANG et al., 2015). Nessa mesma linhagem, Vitorovic-Todorovic (2013) investigou o efeito citotóxico de 29 derivados sintéticos de chalconas e obteve valores de  $CI_{50}$  abaixo de 6  $\mu\text{M}$  após 72 h de incubação, ou seja, semelhante aos valores obtidos no presente trabalho. Letafat e colaboradores (2013) investigaram o efeito de seis chalconas sintéticas em células K562 (50.000 células/poço) em 24 h e relataram valores entre  $1,8 \pm 1,3 \mu\text{M}$  e  $22,7 \pm 13,7 \mu\text{M}$ , enquanto que Teng e colaboradores (2017) relataram uma  $CI_{50}$  de 3,98  $\mu\text{M}$  para um derivado de chalcona após 48 h de incubação em células K562 (50.000 células/poço). Um estudo envolvendo a citotoxicidade de cromononas sobre células K562 (10.000 células/poço) obteve uma  $CI_{50}$  de 38,8  $\mu\text{M}$  após 24h de incubação com o composto mais efetivo (ARYAPOUR et al., 2012). Este valor foi superior ao encontrado para os compostos **JA3** ( $22,2 \pm 1,4 \mu\text{M}$ ) e **JA7** ( $20,4 \pm 1,1 \mu\text{M}$ ). No entanto, levando em consideração que o número de células utilizadas no presente trabalho foi cinco vezes maior, os compostos estudados são mais citotóxicos do que os descritos na literatura.

Em 2014, Rozmer e colaboradores relataram os efeitos de uma chalcona cíclica sobre células Jurkat (50.000 células/poço) e obtiveram uma  $CI_{50}$  em 24 h de 23,3  $\mu\text{M}$ , semelhante às condições e aos valores encontrados para os compostos **JA3** ( $18,6 \pm 1,4 \mu\text{M}$ ) e **JA7** ( $15,9 \pm 0,5 \mu\text{M}$ ). Outro estudo com cinco trimetilchalconas sintéticas (SALUM et al., 2013) encontrou valores de  $CI_{50}$  entre  $0,5 \pm 0,15 \mu\text{M}$  e  $30,0 \pm 0,8 \mu\text{M}$  em 24 h, no entanto, o número de células foi de 30.000 por poço, bem abaixo das 50.000 células/poço utilizadas no presente estudo. De forma semelhante, Janka e colaboradores (2015) relataram uma  $CI_{50}$  de 2,97  $\mu\text{M}$  para uma ferrocenil-chalcona após 72 h de incubação em células Jurkat, porém o número de células utilizadas, 8.000/ poço, foi inferior ao utilizado no presente trabalho (12.500 células/poço para 72 h).

Nos últimos cinco anos foi encontrado apenas um estudo envolvendo o efeito citotóxico de chalconas em células U937. Orlikova

e colaboradores (2014) estudaram uma série de metilenodióxi chalconas e relataram o seu efeito citotóxico sobre células U937 a partir de 20  $\mu\text{M}$ . Uma das chalconas estudadas inibiu em 41 % a proliferação celular na concentração de 30  $\mu\text{M}$  em 72 h de incubação, porém o número de células utilizadas não foi relatado. Outro estudo relatou o efeito citotóxico de dois derivados de chalconas dimetoxiladas em células CEM (20.000 células/ poço) e encontrou valores de  $\text{CI}_{50}$  abaixo de 20  $\mu\text{M}$  (NKUÉTÉ et al., 2015), ou seja, semelhante aos valores obtidos com os compostos **JA3** e **JA7** em 24 h. No entanto, o trabalho descrito na literatura realizou seus experimentos após 72 h de incubação. Os valores de  $\text{CI}_{50}$  de 72 h encontrados no presente trabalho foram de  $3,9 \pm 0,6 \mu\text{M}$  para a chalcona **JA3** e de  $2,3 \pm 0,4 \mu\text{M}$  para a chalcona **JA7**, o que indica uma maior efetividade desses compostos. Zhang e colaboradores (2015) relataram o efeito de cinco chalconas naturais e sintéticas sobre células HL-60 após 72 h de incubação e os valores de  $\text{CI}_{50}$  encontrados ficaram entre  $1,6 \pm 0,5 \mu\text{M}$  e  $6,5 \pm 1,0 \mu\text{M}$ . Porém como o número de células utilizadas (5.000 células/poço) foi pequeno, torna-se difícil a comparação com os valores encontrados no presente trabalho. Por fim, o único trabalho recente envolvendo chalconas na linhagem Kasumi (MAIORAL et al., 2017) encontrou valores de  $\text{CI}_{50}$  entre  $3,28 \pm 1,51 \mu\text{M}$  e  $16,83 \pm 1,23 \mu\text{M}$  para uma naftilchalcona semelhante aos compostos **JA3** e **JA7**.

Apesar de a literatura muitas vezes relatar valores mais baixos de  $\text{CI}_{50}$ , é preciso considerar também o número de células utilizadas e os diferentes tempos de incubação. Quanto menor a densidade de células por poço e quanto mais tempo o composto ficar em contato com as células, aumentando o tempo de exposição, maior será sua eficiência em induzir a morte celular, o que justificaria alguns dos valores baixos de  $\text{CI}_{50}$  encontrados na literatura. Os diferentes valores de  $\text{CI}_{50}$  encontrados para cada linhagem celular podem ser explicados pelas particularidades de cada subtipo de leucemia aguda. Por exemplo, os diferentes resultados obtidos nas linhagens K562 e Kasumi, ambas modelos de LMA. A linhagem K562, conforme mencionado anteriormente, costuma ser mais resistente a quimioterápicos, pois foi originada de um caso de LMC em fase blástica, e é sabido que essa leucemia tende a ser mais agressiva e menos responsiva ao tratamento. O tratamento de pacientes com LMC em fase crônica com Imatinib atinge resposta citogenética completa em 70-90% dos casos, com sobrevida de 5 anos entre 80-95 % (SWERDLOW et al., 2008), enquanto que o tratamento de pacientes com LMC em fase blástica com o mesmo fármaco, atinge resposta citogenética completa em apenas 15

% dos casos, com sobrevida de 1 ano entre 25 – 30 % (HEHLMANN; SAUSSELE, 2008). Em comparação a K562, a linhagem Kasumi foi mais sensível aos efeitos das chalconas **JA3** e **JA7**. Essa linhagem foi originada de um caso de LMA com t(8:21) (q21;q22), a qual é uma LMA de bom prognóstico, o que pode justificar os valores mais baixos de  $CI_{50}$  encontrados para esta linhagem.

Posteriormente foi analisado o efeito citotóxico das chalconas **JA3** e **JA7** sobre um modelo de neoplasia de células hematopoéticas mais maduras. O MM é uma desordem maligna de células B maduras caracterizada pela proliferação e acúmulo de células plasmocitárias malignas na MO e pela presença de proteínas monoclonais no soro e na urina. É uma doença resistente e que permanece incurável nos dias de hoje (USMANI et al., 2015). As chalconas **JA3** e **JA7** reduziram a viabilidade celular de células MM-1S de forma dependente do tempo e da concentração, apesar de apresentarem valores de  $CI_{50}$  ligeiramente mais altos do que os encontrados nas linhagens de LA (Figura 14). Nenhum estudo foi encontrado envolvendo o efeito citotóxico de chalconas sobre células MM-1S e poucos em outras linhagens de MM. Um estudo realizado em 2012 investigou o efeito de uma chalcona natural isolada de *Psoralea corylifolia* L. sobre células H929 e relatou uma  $CI_{50}$  de 20  $\mu$ M após 48 h de incubação (ZHAO et al., 2012). Esse valor é superior aos observados para os compostos **JA3** e **JA7** no mesmo tempo de incubação ( $12,9 \pm 1,1 \mu$ M e  $15,6 \pm 1,2 \mu$ M, respectivamente). Porém, o número de células não foi relatado no estudo da literatura e as linhagens celulares utilizadas foram diferentes, por isso a comparação com o presente trabalho fica prejudicada.

O pequeno número de estudos envolvendo a citotoxicidade das chalconas em outras linhagens de neoplasias hematológicas e o conhecimento de que essas são doenças heterogêneas que respondem ao tratamento de forma distinta, indicam a importância da avaliação de novos compostos em diferentes modelos celulares. A investigação dos compostos **JA3** e **JA7** nas linhagens K562, Jurkat, U937, Kasumi, CEM e MM-1S nos permite sugerir que ambos os compostos apresentam resultados promissores em relação ao efeito citotóxico sobre diferentes subtipos de LA e também sobre células de MM.

Os tumores hematológicos se diferenciam dos tumores sólidos por apresentarem diferenças em suas origens histológicas, nas características patogênicas e no comportamento clínico, e, por isso, são abordados de forma diferente das demais neoplasias (KRUG et al., 2011). Assim, com o objetivo de verificar a citotoxicidade das chalconas **JA3** e **JA7** em tumores não hematológicos, seus efeitos

foram avaliados nas linhagens de carcinoma colorretal HT-29, adenocarcinoma de mama MDA-MB-231, carcinoma de boca SSC-25, carcinoma de pulmão A549, adenocarcinoma de cólon HeLa e glioblastoma astrocitoma U251. Como pode ser observado nas Figuras 15 e 16, as chalconas selecionadas apresentaram citotoxicidade significativa sobre as seis linhagens de tumores sólidos de forma dependente do tempo e da concentração. No entanto, os valores de  $CI_{50}$  encontrados foram mais altos quando comparados aos encontrados para as células de LAs (Quadro 6). O composto **JA3** apresentou  $CI_{50}$  em torno de 50  $\mu\text{M}$  após 24 h de tratamento. A única exceção foi na linhagem U251, na qual foi encontrada uma  $CI_{50}$  de  $23,5 \pm 1,6 \mu\text{M}$ , ou seja, menos da metade da  $CI_{50}$  encontrada para as demais linhagens de tumores sólidos. A chalcona **JA7** foi mais citotóxica do que a chalcona **JA3** nas linhagens de tumores sólidos, com  $CI_{50}$  de 24 h em torno de 30  $\mu\text{M}$ . As exceções foram as linhagens SSC-25 e HeLa, nas quais foram encontradas  $CI_{50}$  acima de 40  $\mu\text{M}$ .

Os tumores sólidos, em geral, apresentam outros desafios na utilização de agentes quimioterápicos quando comparados aos tumores hematológicos. Dentre eles, destaca-se a dificuldade de penetração do fármaco na massa tumoral e a sua distribuição não uniforme pela massa celular. A efetividade do tratamento de um quimioterápico em tumores sólidos está relacionada ao acesso desse a todas as células tumorais em concentrações suficientes para induzir a morte celular. No entanto, como a vascularização destes tumores costuma ser deficiente, o fluxo sanguíneo variável e as distâncias intercapilares maiores em relação aos tecidos normais, a efetividade do tratamento é prejudicada (CHIZUKA et al., 2006). Por mais que isso não seja observado em ensaios *in vitro*, é sabido que estes desafios terão que ser enfrentados por novos quimioterápicos que atingirem a etapa de ensaios clínicos. Segundo a literatura, uma melhora temporária na vascularização sanguínea tumoral poderia melhorar a quimioterapia (GAVHANE et al., 2011). Assim, o tratamento de tumores sólidos com novos compostos citotóxicos permanece um campo a ser estudado e os efeitos das chalconas na vascularização desses tumores pode ser um novo alvo a ser investigado em estudos *in vivo*.

Considerando a importância de compostos de origem natural no tratamento das neoplasias malignas e, especificamente, das LAs, o presente trabalho também investigou os efeitos citotóxicos do composto **GE1**, uma quinona isolada de *E. hiemalis* sobre diversas linhagens celulares. As quinonas são substâncias amplamente descritas na literatura por exibirem um promissor potencial como novos fármacos

antineoplásicos (RAJENDRAN, 2016), no entanto não existem estudos investigando a atividade antitumoral e antileucêmica do acetato de miconidina.

O efeito citotóxico do composto **GE1** foi avaliado nas linhagens de LA K562 (LMA) e Jurkat (LLA) (Figura 42 A-B). Os valores de  $CI_{50}$  foram bastante baixos, mesmo em comparação aos das chalconas **JA3** e **JA7**:  $11,7 \pm 0,4 \mu\text{M}$  para a linhagem K562 e  $4,7 \pm 0,3 \mu\text{M}$  para a Jurkat (Quadro 11). De fato, o valor obtido nas células K562 está próximo da  $CI_{50}$  obtida nas mesmas condições com o paclitaxel, um quimioterápico já utilizado na clínica:  $9,1 \pm 1,2 \mu\text{M}$ . Nas células Jurkat, a  $CI_{50}$  encontrada foi cerca da metade da obtida com paclitaxel ( $8,2 \pm 1,1 \mu\text{M}$ ). Resultados semelhantes foram obtidos com a linhagem MM.1S ( $CI_{50}$  de 24 h de  $5,2 \pm 0,3 \mu\text{M}$ ), mostrando que o composto também é efetivo para células de MM (Figura 42 C e Quadro 11). A efetividade do composto **GE1** fica ainda mais evidente após 72 h de tratamento, com valores de  $CI_{50}$  de  $3,6 \pm 0,3 \mu\text{M}$  (K562),  $0,25 \pm 0,01 \mu\text{M}$  (Jurkat) e  $1,7 \pm 0,4 \mu\text{M}$  (MM.1S).

O efeito citotóxico do composto **GE1** também foi avaliado nas linhagens de tumores sólidos HT-29, HeLa e U251 (Figura 43). Os valores de  $CI_{50}$  ficaram em torno de  $35 \mu\text{M}$  após 24 h de incubação e  $10 \mu\text{M}$  após 72 h (Quadro 11), semelhante aos resultados relatados para a chalcona **JA7**. Porém a diferença encontrada entre as  $CI_{50}$  calculadas em linhagens de neoplasias hematológicas e de tumores sólidos foi maior entre o composto **GE1** do que entre as chalconas **JA3** e **JA7**, o que sugere que o composto natural é mais seletivo para neoplasias hematológicas em detrimento a tumores sólidos do que as chalconas selecionadas.

Não foram encontrados estudos dos últimos cinco anos relatando o efeito do acetato de miconidina em nenhuma das linhagens incluídas no presente estudo. No entanto, em 2013, Mahbub e colaboradores relataram o efeito citotóxico de uma antraquinona nas linhagens K562 e Jurkat. Os valores de  $CI_{50}$  de 24 h foram superiores aos encontrados no presente trabalho,  $9 \mu\text{M}$  para a linhagem Jurkat e  $13 \mu\text{M}$  para a K562. A diferença fica ainda mais evidente se levarmos em consideração o número de células utilizadas no experimento, 25.000 células por poço no estudo da literatura, ou seja, metade das células utilizadas no presente trabalho. Em 2017, He e colaboradores relataram a  $CI_{50}$  de cinco quinonas/hidroquinonas em células K562, as quais variaram entre  $0,55 \mu\text{M}$  e  $>50 \mu\text{M}$ , porém as condições dos experimentos (tempo de incubação e número de células) não foram relatadas. Um único estudo recente investigou o efeito citotóxico de

quinonas sobre células de MM (LIN et al., 2012), porém a linhagem utilizada, o número de células e o tempo de incubação foram diferentes daqueles utilizados no presente estudo, o que compromete a comparação dos resultados obtidos. No entanto, os resultados demonstrados no presente trabalho indicam que o composto **GE1**, assim como as chalconas **JA3** e **JA7**, é citotóxico para diferentes linhagens de neoplasias hematológicas, incluindo LMA, LLA e MM.

Segundo a literatura, as LAs, semelhante a outras neoplasias malignas, são formadas por uma mistura heterogênea de células-tronco tumorais e células ligeiramente diferenciadas (LANG et al., 2015). Como não foi possível obter células-tronco leucêmicas para avaliar o efeito dos compostos selecionados, utilizou-se um modelo de células-tronco de glioma. Interessantemente, como pode ser observado nas Figuras 17 e 44, os compostos **JA3**, **JA7** e **GE1** também foram citotóxicos para a linhagem U251NS. De fato, foi encontrada uma baixa seletividade entre as linhagens U251 e U251NS, o que indica que a magnitude do efeito citotóxico dos três compostos é semelhante entre as células de glioma e as células-tronco de glioma. Este resultado é importante porque as células-tronco tumorais são geralmente mais resistentes à apoptose do que as células não neoplásicas e também altamente tumorigênicas. Além disso, na clínica, a remissão completa e a cura a longo prazo só podem ser alcançadas quando essas células-tronco tumorais são eliminadas, pois elas estão associadas à doença residual mínima e a um pior prognóstico (MARIANI; CALABRETTA, 2014, REINISCH et al., 2015; TAKEBE et al., 2015, LANG et al., 2015). Considerando que as células-tronco tumorais apresentam características semelhantes entre si, o fato de **JA3**, **JA7** e **GE1** terem sido citotóxicos para células-tronco de glioma sugere que um efeito semelhante também pode ser observado em células de LA. Mais estudos são necessários para confirmar se a citotoxicidade observada em células U251NS também seria semelhante em células-tronco leucêmicas.

O interesse por um novo composto para o tratamento das LAs baseia-se não apenas em sua capacidade de induzir as células tumorais à morte, mas também na sua seletividade, de forma a afetar minimamente as células não neoplásicas (HOIJAT-FARSANGI, 2015; SURYADEYARA et al., 2015). A não citotoxicidade para células não neoplásicas sugere uma possível diminuição dos efeitos adversos normalmente relacionados à morbidade e mortalidade sofrida pelos pacientes que fazem uso dos tratamentos convencionais para LA, mesmo aqueles envolvendo quimioterápicos com baixos valores de  $CI_{50}$



(BOSE; GRANT, 2015; HOIJAT-FARSANGI, 2015; VASEKAR et al., 2015). Assim, com o objetivo de avaliar a toxicidade das chalconas **JA3** e **JA7** e do composto **GE1** em modelos não neoplásicas, os mesmos foram avaliados sobre células de linhagem não neoplásicas e sobre células de SP obtidas de voluntários saudáveis.

Os compostos **JA3**, **JA7** e **GE1** não reduziram significativamente a viabilidade celular da linhagem de fibroblastos L929 em nenhum dos tempos avaliados (Figura 18 C-F, Quadro 7 e Figura 45 A-B) e, segundo o IS, foram altamente seletivos para células leucêmicas (Quadros 8 e 12). Segundo a literatura, a eficiência de um composto em induzir morte celular em uma determinada linhagem e não ser citotóxico para outro tipo celular é denominado IS (MACHANA et al., 2011, DAHHAM et al., 2015). O cálculo do IS é essencial na investigação de novos fármacos e deve sempre ser realizado antes de estudos clínicos de fase 1. Quando comparado a células não neoplásicas, quanto mais elevado o valor de SI encontrado, maior a seletividade do composto para células tumorais e menor a sua citotoxicidade sobre células normais. Alguns trabalhos encontrados na literatura sugerem uma alta seletividade para células tumorais quando o IS é superior a 2 ou 3 (AWANG et al, 2014; DAHHAM et al., 2015). No entanto, alguns estudos sugerem valores mais altos, superiores a 7 ou 10. Assim, optou-se por considerar, no presente trabalho, uma alta seletividade a partir de IS de 10, moderada seletividade entre 5 e 10 e baixa seletividade abaixo de 5. O IS encontrado para os três compostos comparando a linhagem L929 com as linhagens de LA foi superior a 10, o que indica que os compostos **JA3**, **JA7** e **GE1** são pelo menos 10 vezes mais citotóxicos para células de LA do que para células não neoplásicas (Quadros 8 e 12). O efeito citotóxico das chalconas **JA3** e **JA7** foi avaliado ainda nas linhagens de fibroblasto NIH e em células pulmonares MRC5, e também não foi observada citotoxicidade significativa (Figura 18 A-B, D-E). O IS foi superior a 10 para a linhagem NIH e cerca de 7 para a linhagem MRC (Quadro 8).

A investigação da citotoxicidade dos compostos **JA3**, **JA7** e **GE1** sobre células mononucleadas de indivíduos saudáveis mostrou que as chalconas **JA3** e **JA7** não reduziram a viabilidade celular de forma significativa mesmo em concentrações muito superiores as das  $CI_{50}$  em células K562 e Jurkat (50  $\mu$ M) (Figura 19). Para fins de comparação, o paclitaxel, apesar de ter valores de  $CI_{50}$  mais baixos nas células leucêmicas, mostrou-se significativamente mais citotóxico sobre células mononucleadas, o que sugere uma menor seletividade deste fármaco em células não neoplásicas. O composto **GE1**, na concentração de 12  $\mu$ M

(próxima a  $CI_{50}$  de 24 h na linhagem K562), reduziu de forma significativa a viabilidade celular de mononucleados saudáveis de forma semelhante ao paclitaxel,  $45,7 \pm 3,8 \mu\text{M}$  (Figura 45 C). Porém, na concentração de  $5 \mu\text{M}$ , semelhante a  $CI_{50}$  de 24 h em células Jurkat e MM.1S e de 48 h em células K562, a redução da viabilidade celular não foi significativa.

O efeito dos compostos **JA3**, **JA7** e **GE1** sobre eritrócitos saudáveis foi avaliado pelo teste de hemólise. O teste de hemólise é um ensaio sensível que desempenha um papel importante na avaliação da biossegurança para o paciente com a administração de medicamento por via endovenosa, a qual é uma preocupação crítica para o uso *in vivo* de novos compostos (POPESCU et al., 2017). A avaliação da estabilidade da membrana eritrocitária é um bom indicador dos danos provocados por novos compostos e, por isso, é um teste de triagem útil em estudos de citotoxicidade. Um agente quimioterápico que induz a lise de eritrócitos, por maior que seja a sua efetividade, tem a sua aplicação terapêutica comprometida (MOCAN, 2013). Por esses motivos, a capacidade de um composto em induzir hemólise *in vitro* é um parâmetro essencial para avaliar a segurança de qualquer composto que entre em contato com SP (CHEN et al., 2016).

Diversos autores relatam a baixa capacidade hemolítica das chalconas. Sashidhara e colaboradores (2015) mostraram o efeito não citotóxico e não hemolítico de uma chalcona híbrida em células de mamíferos. Outro estudo investigou o efeito antimalária de uma série de derivados de chalconas, e mostrou que o composto mais efetivo possuía uma capacidade hemolítica de apenas 3,2 % quando comparado ao grupo controle (INSUASTY et al., 2013). De forma semelhante, a literatura relata que as quinonas são fracamente hemolíticas (LUPESCU et al., 2014). Nosso estudo demonstrou que o controle positivo induziu uma hemólise maciça (~ 100%), enquanto que os compostos **JA3**, **JA7** e **GE1** induziram lise de eritrócitos de modo semelhante ao controle negativo, mesmo em concentrações duas a três vezes superiores à  $CI_{50}$  (Figuras 20 e 45 D). Apesar de ser um ensaio preliminar, esse resultado sugere que os compostos avaliados possuem baixa toxicidade por não causar danos às membranas eritrocitárias e, dessa forma, poderiam ser administrados por via endovenosa.

O interesse por um novo composto para o tratamento das neoplasias hematológicas é baseado, principalmente, na sua seletividade e também na sua capacidade de inibir a proliferação celular, interromper o ciclo celular e induzir a morte celular programada (FUSO et al., 2016, SIEGEL; MILLER; JEMAL, 2016, TAN; DUNCAN;

SLAWSON, 2017, WIMAN; ZHIVOTOVSKY, 2017). O estudo desses fatores, bem como das respostas celulares envolvidas nos mesmos, são altamente desejados na investigação da atividade de novos compostos (BOSE; GRANT, 2015, ZHANG et al., 2015). Diante dessa perspectiva e considerando que os compostos **JA3**, **JA7** e **GE1** apresentaram citotoxicidade significativa sobre linhagens de LA, de MM, de tumores sólidos e de células-tronco tumorais sem apresentar toxicidade expressiva em modelos não neoplásicos, os três compostos foram considerados promissores e, na sequência da investigação, foi avaliado os seus efeitos no ciclo celular e na indução da morte celular por apoptose.

Segundo a literatura, as chalconas sintéticas e os seus derivados costumam bloquear o ciclo celular de células tumorais em diferentes fases do ciclo celular. Em geral, as chalconas interferem na dinâmica dos microtúbulos, impedindo a formação do fuso mitótico na fase G2/M devido à sua capacidade de se ligar à tubulina. Essa atividade antimitótica das chalconas foi relatada em células de leucemia (PEDRINI et al., 2010, MAIORAL et al., 2017, JORAY et al., 2015), carcinoma renal (LI et al., 2015), carcinoma de cólon (FONSECA et al., 2015), carcinoma de pulmão (HUANG et al., 2017) e adenocarcinoma de mama (MDA-MB-231) (ABU et al., 2014) e parece estar altamente relacionada a presença de substituintes metoxi. Outros estudos mostram que as chalconas e seus derivados bloqueiam a fase S do ciclo celular, provavelmente devido a ativação de proteínas que inibem a síntese do DNA ou que induzem a degradação do mesmo (YONG; ABD MALEK, 2015).

No presente trabalho avaliou-se o efeito das chalconas **JA3** e **JA7** no ciclo celular das células K562 e Jurkat, selecionadas por serem modelos de LMA e LLA, respectivamente. O tempo utilizado nos experimentos (24 h) respeitou o tempo de ciclagem das duas linhagens para garantir que todas as células passariam por cada uma das fases do ciclo celular. No entanto, foi observado que, nesse período, o tratamento com as  $CI_{50}$  dos compostos aumentou a proporção de células na fase sub-G0/G1 (células em apoptose/ necrose) em mais de 50 % (chegando a mais de 80 % na linhagem K562), o que tornou muito pequeno o número de células dentro do ciclo celular. Assim, para manter o experimento no tempo de ciclagem das células, foi utilizada uma concentração que correspondesse à metade da  $CI_{50}$  (Figura 21 e Figura 46 A-B). Como controle dos experimentos foi utilizado o fármaco paclitaxel, o qual, conforme descrito na literatura

(LINDENBLATT et al., 2014), bloqueou significativamente a fase G2/M.

De acordo com o Quadro 9, as chalconas **JA3** e **JA7** aumentaram significativamente a proporção de células K562 e Jurkat na fase sub G0/G1, confirmando os resultados mostrados anteriormente de que o composto induz morte celular em linhagens leucêmicas. Além disso, **JA3** e **JA7** bloquearam o ciclo celular das duas linhagens avaliadas na fase S, refletido pelo aumento significativo da porcentagem de células nesta fase em relação ao controle (Figura 21 e Quadro 9). Os mecanismos envolvendo o bloqueio celular na fase S não são conclusivos até o presente momento, mas estudos indicam que ocorre devido à supressão das fases de iniciação e alongação da replicação do DNA, o que impede a replicação do material nuclear (YONG; ABD MALEK, 2015). Hu e colaboradores (2015) mostraram que fármacos podem bloquear a fase S pela modulação da expressão das ciclinas A2 e E1. A concentração de ciclinas é variável durante o ciclo celular, mas sua presença é necessária para a ativação das proteínas cinases CDKs, as quais, quando ativadas, promovem a passagem das células para a fase seguinte do ciclo celular. A progressão da fase G1 para a fase S é controlada pela CDK2, que é ativada pelas ciclinas A2 e E1 (Figura 8). O estudo mostrou que o bloqueio da fase S está associado a diminuição da expressão destas ciclinas e, conseqüentemente, da expressão de CDK2. De fato, Phang e colaboradores (2016) relataram uma diminuição significativa na expressão de CDK2 e CDK4 em células bloqueadas na fase S após incubação com uma chalcona natural, porém não observou alterações na expressão de ciclina E1. Outro estudo recente relata que o bloqueio da fase S está associado não apenas a diminuição das concentrações de ciclina A e E e de CDK2, mas também da modulação dos genes p21 e p27. Esses genes traduzem as proteínas p21 e p27 que são inibidores de CDKs e interagem principalmente com a CDK2 (YADAV et al., 2015).

O bloqueio da fase S do ciclo celular é uma importante estratégia terapêutica para o tratamento das LAs, pois bloqueia a divisão celular da população de blastos leucêmicos em rápida divisão (SCHNERCH et al., 2012, PHANG et al., 2016). Os quimioterápicos camptotecina e o topotecano são exemplos de fármacos que induzem rupturas na cadeia de DNA associadas à fase S e, com isso, reduzem a síntese de DNA em células tumorais (YONG; HO; MALEK, 2015). Assim, o bloqueio da fase S pode ser um evento desejado em potenciais novos fármacos antileucêmicos.

Conforme demonstrado na Figura 46 A-B, o composto **GE1** aumentou significativamente a proporção de células K562 e Jurkat na fase sub-G0/G1, semelhante ao efeito observado por Efferth et al. (1996) em células de LA KG-1a. Além disso, **GE1** bloqueou o ciclo celular das células K562 e Jurkat na fase G2/M. Segundo a literatura, a exposição à hidroquinonas está relacionada a um aumento na produção de EROS e também ao bloqueio celular na fase G2/M, um efeito atribuído, principalmente, à interrupção da montagem dos microtúbulos (COULTER; O'DRISCOLL; BRESSLER, 2013). O uso de agentes estabilizadores de microtúbulos é uma estratégia promissora para a terapia antileucêmica. Os agentes que interferem com a função da tubulina, como, por exemplo, o paclitaxel, tem um amplo espectro antitumoral e representam uma das classes mais significativas de agentes quimioterápicos. Apesar de possuírem diferentes mecanismos de ação, conforme definido pelos locais de ligação da tubulina e o efeito sobre os microtúbulos, o resultado final costuma ser a parada do ciclo celular na fase G2/M e a morte celular pela via mitocondrial da apoptose. Recentemente, alguns desses agentes provaram ser multi-inibidores, pois visam simultaneamente as vias PI3K-Akt-mTOR e o citoesqueleto. Além disso, alguns demonstraram possuir propriedades antiangiogênicas semelhantes às dos compostos naturais combretastatina-A4 e vincristina (PEDRINI et al., 2010, ARYAPOUR et al., 2012, VITOROVIC-TODOROIC et al., 2013, HU et al., 2015, DUNCAN; SLAWSON, 2017, WIMAN; ZHIVOTOVSKY, 2017). Futuramente pretende-se investigar o efeito dos três compostos sobre as ciclinas e CDKs envolvidas em cada bloqueio do ciclo celular, bem como avaliar o efeito do composto **GE1** no citoesqueleto.

A regulação da progressão do ciclo celular está intimamente relacionada a proliferação celular. A desregulação do ciclo celular é uma das características da tumorigênese e contribui para a proliferação descontrolada das células malignas (PHANG et al., 2016). Os compostos **JA3**, **JA7** e **GE1** diminuíram significativamente a expressão de KI-67 em células K562 e Jurkat (Figura 22 A-B e Figura 46 C). A expressão de KI-67 é um marcador importante de proliferação celular. A porcentagem de células marcadas positivamente para a proteína é utilizada como fator diagnóstico e prognóstico em diversos tipos de neoplasias (PARTHMANATAN; BALLEINE, 2013, DENKERT et al., 2015). Como a proliferação celular descontrolada é considerada um dos principais mecanismos biológicos envolvidos na oncogênese, a diminuição de KI-67 pelos compostos **JA3**, **JA7** e **GE1** é mais um

resultado importante e indica que os compostos também possuem efeitos citostáticos.

Os mecanismos moleculares da regulação do ciclo celular no câncer são interrompidos por mutações nos principais genes dos pontos de controle do ciclo celular. A proteína PML é expressa na maioria dos tecidos humanos e possui um papel importante na regulação de genes e processos celulares como o reparo do DNA, o controle do ciclo celular e as decisões do destino final das células (SALSMAN et al., 2017). Nas células somáticas, a proteína PML inibe a proliferação celular pela ativação de p53 e esta função contribui para o seu papel de supressora de tumor. Estes efeitos são principalmente decorrentes da regulação de modificações pós-tradução. Além disso, foi relatado que, em células tronco-tumorais, a proteína PML é constitutivamente inativada por fosforilação e, portanto, a via p53 não está ativa. Sendo assim, a deficiência de PML nas células-tronco tumorais resulta em uma interrupção da progressão normal do ciclo celular, o que favorece a manutenção de propriedades morfológicas, metabólicas e de proliferação mais próximas do estado pluripotente (HADJIMICHAEL et al., 2017). Recentemente, também foi relatado que a proteína PML é crítica para a morte celular leucêmica mediada por dexametasona. Além disso, existe uma correlação direta entre a susceptibilidade a este glicocorticoide e a expressão de PML em células leucêmicas de pacientes (LAANE et al., 2009). Neste trabalho, demonstrou-se que o composto **GE1** aumentou a expressão de PML em células K562 e Jurkat (Figura 46 D-E), o que sugere que ele age de forma semelhante à dexametasona em células de LA. É interessante observar que o tratamento com **JA3** e **JA7** não alterou a expressão de PML (Figura 22 C-F), o que pode indicar que a citotoxicidade das chalconas pode ser independente da modulação desta proteína. Embora mais experimentos sejam necessários para confirmar esta hipótese, é possível sugerir que as células leucêmicas que expressam pouca PML e que sejam resistentes à dexametasona, poderiam ser suscetíveis às chalconas **JA3** e **JA7**, o que tornaria estes dois compostos ainda mais atraentes como potenciais fármacos antileucêmicos.

O bloqueio do ciclo celular tem a finalidade de reparar o DNA em situações de estresse, impedindo a progressão de mutações que possam vir a gerar uma neoplasia maligna. Se o reparo não ocorre de forma apropriada, diversas vias induzem a célula à morte programada. Como mencionado anteriormente, a busca por compostos antineoplásicos que induzam morte celular por apoptose é altamente desejada por novos quimioterápicos. Além disso, a literatura revela que

o efeito citotóxico de chalconas naturais e sintéticas costuma estar relacionado à apoptose (DAS; MANNA, 2016). Assim, o presente trabalho buscou investigar se a morte celular induzida pelos compostos **JA3**, **JA7** e **GE1** nas células K562 e Jurkat foi por apoptose.

Conforme demonstrado anteriormente, a morte por apoptose foi confirmada por três metodologias diferentes. A primeira metodologia utilizada para avaliar o tipo de morte celular causada pelos compostos **JA3**, **JA7** e **GE1** foi a observação da morfologia celular pela dupla coloração com BE/AO. O AO intercala-se ao DNA nuclear atravessando livremente a membrana celular, enquanto que o BE só entra em células que perderam a integridade da membrana. Este método é simples, facilmente realizável e é utilizado em diversos trabalhos recentes da literatura (ZHANG et al., 2015, KAMATH et al., 2017, XIA et al., 2017, MAIORAL et al., 2017). Nas Figuras 23 e 47 A, pode-se observar que as células K562 e Jurkat tratadas com os compostos **JA3**, **JA7** e **GE1** na  $CI_{50}$  de 24 h apresentaram mudanças na morfologia celular quando comparadas com o grupo controle (o qual apresenta fluorescência verde uniforme e tamanho regular). As células em apoptose inicial apresentam condensação nuclear com condensação perinuclear da cromatina, visível na forma de arcos verdes no núcleo, aumento de tamanho e fluorescência verde devido a preservação da integridade das membranas. Além disso, pode-se observar células com diminuição do volume celular, formação de *blebs* e corpos apoptóticos, as quais apresentam coloração alaranjada devido à formação de poros na MP que permitem a passagem do BE.

Em seguida a apoptose foi avaliada pelo método da Anexina V conjugada a FITC. O princípio desse ensaio baseia-se na ligação da anexina à proteína de membrana fosfatidilserina, normalmente encontrada na parte interna da membrana plasmática. Durante o estágio inicial de apoptose ocorre a perda da assimetria da membrana citoplasmática, com a consequente externalização dos resíduos de fosfatidilserina. A anexina liga-se especificamente a estes resíduos e, quando conjugada ao FITC, permite identificar e quantificar as células em apoptose por citometria de fluxo (ENGELAND et al., 1998). Como essa metodologia baseia-se na ligação da anexina com a proteína de membrana fosfatidilserina, ela é considerada um marcador inicial de apoptose, diferentemente da fragmentação do DNA, a qual, por detectar alterações nucleares, é considerada uma metodologia para detecção da apoptose tardia. Assim, os ensaios foram realizados após 12 h de incubação com os compostos. Conforme demonstrado nas Figuras 24 e 47 B, os três compostos (**JA3**, **JA7** e **GE1**) aumentaram

significativamente a porcentagem de células K562 e Jurkat positivas para anexina quando comparadas ao grupo controle. A porcentagem de células em apoptose foi cerca de 13 vezes maior em células K562 e 12 vezes maior em células Jurkat após incubação com a chalcona **JA3**; e 14 e 13 vezes maior em células K562 e Jurkat, respectivamente, após incubação com **JA7**. Já o composto **GE1** aumentou em 14 e 8 vezes o número de células K562 e Jurkat em apoptose. Por fim, a apoptose foi confirmada por meio do ensaio de fragmentação do DNA em gel de agarose. Essa metodologia permite a observação do “padrão em escada” indicativo da clivagem do DNA por endonucleases em fragmentos múltiplos de 180-200pb. Como pode ser observado nas Figuras 25 e 47 C, foi possível observar claramente a clivagem do DNA nos padrões condizentes com apoptose nas duas linhagens tratadas com os compostos **JA3**, **JA7** e **GE1**.

Diversos estudos relatam a capacidade das chalconas em induzirem a apoptose em células de LA, incluindo K562 e Jurkat (GARCÍA-RODRÍGUEZ et al., 2014, LEON-GONZALES et al., 2015, WANG et al., 2015, DAS; MANNA, 2016, DIAS-TIELAS et al., 2016, MAIORAL et al., 2016, MAIORAL et al., 2017, TENG et al., 2017). Um único estudo (EFFERTH et al., 1996) sugere o efeito apoptótico do acetato de miconidina em células de LA KG-1a, porém diversos relatos associam as hidroquinonas à capacidade de induzir células tumorais à morte por apoptose (CHEN et al., 2016, LUO et al., 2017). Sabe-se também que a identificação dos mecanismos de indução da apoptose é um passo crucial no entendimento da ação de novos compostos quimioterápicos. A apoptose pode ser iniciada por duas vias principais: a via extrínseca ou via dos receptores de morte e a via intrínseca, ou mitocondrial. Além dessas duas vias, existem outras menos conhecidas, como a ativação de caspases por estresse do retículo endoplasmático e a via das perforinas e granzimas que envolve citotoxicidade mediada por linfócitos T (GOLDAR et al., 2015).

Assim, com o objetivo de investigar se a morte celular por apoptose induzida pelas chalconas **JA3** e **JA7** e pelo composto **GE1** em células de LMA e LLA envolveu a via intrínseca, pesquisou-se primeiramente o efeito desses compostos na mitocôndria de células K562 e Jurkat. As mitocôndrias são organelas extremamente dinâmicas que estão constantemente sofrendo processos de fissão e fusão. A dinâmica mitocondrial é regida por uma maquinaria molecular complexa e finamente controlada por proteínas reguladoras. Durante situações de estresse ou lesão celular, este equilíbrio entre fissão e fusão é interrompido. O resultado é a clivagem das mitocôndrias, que deixam



de exibir uma morfologia em filamentos alongados e passam a apresentar-se na forma de pequenas esferas ou hastes curtas. Este fenômeno, denominado de fragmentação mitocondrial, contribui para o dano mitocondrial e conseqüentemente, para a lesão celular que resulta em morte. É importante ressaltar que a fragmentação mitocondrial não é apenas uma mudança morfológica, mas também um processo inicial e crítico que contribui para a perda do  $\Delta\psi_m$  (ZHAN et al., 2013). Segundo a literatura, a perturbação do  $\Delta\psi_m$  aumenta a permeabilidade da membrana e, conseqüentemente, a liberação de proteínas pró-apoptóticas, as quais, por sua vez, ativam diretamente as caspases efetoras e induzem a célula à apoptose (ALLAN; CLARKE, 2011, BOSE; GRANT, 2015).

No presente trabalho foi demonstrado que as chalconas **JA3** e **JA7** induzem extenso dano mitocondrial, manifestado pela fragmentação mitocondrial, perda do  $\Delta\psi_m$  em mais de 50 % e permeabilização da membrana mitocondrial externa, o que leva a uma robusta liberação dos fatores apoptogênicos citocromo c, endonuclease G, SMAC e AIF, além de aumentarem a produção de EROS (Figuras 26 a 29). A atividade pró-oxidante das chalconas parece estar relacionada à sua forte reatividade com grupos tiol, à indução de uma série de reações com radicais hidroxílicos em células vivas e à redução de mecanismos antioxidantes, como o teor de glutatona. As mitocôndrias representam a principal organela produtora de EROS, e sabe-se que EROS possuem um papel duplo na citotoxicidade de células tumorais (YE et al., 2017). Segundo a literatura, algumas chalconas parecem desempenhar duplas funções em modelos tumorais, induzindo a morte celular programada em alguns tipos celulares devido ao aumento na produção e EROS, mas também prevenindo a citotoxicidade oxidativa em outros (DIAZ-TIELAS et al., 2016).

De modo semelhante, o composto **GE1** também induziu danos mitocondriais acentuados em células K562 e Jurkat, como demonstrado pela perda do  $\Delta\psi_m$  em mais de 50% (Figura 48 A-B). Essa perturbação no  $\Delta\psi_m$  levou a um aumento da permeabilidade da membrana mitocondrial externa e, conseqüentemente, à liberação das proteínas apoptogênicas citocromo c, endonuclease G e AIF das mitocôndrias para o citosol (Figura 48 C-D). O composto **GE1** também aumentou a produção de EROS em células K562 e Jurkat (Figura 49), o que, assim como para as chalconas, provavelmente potencializa a liberação dos fatores apoptogênicos.

Como as células tumorais costumam ser mais resistentes à apoptose do que as células não neoplásicas, uma estratégia promissora

na busca por novos quimioterápicos seria direcionar a ação dos agentes terapêuticos às mitocôndrias das células tumorais a fim de melhorar a sua seletividade e perfil de toxicidade. Isso seria possível graças a diferença de  $\Delta\psi_m$ , porque as células tumorais geralmente exibem um  $\Delta\psi_m$  mais elevado em comparação às células não neoplásicas (YE et al., 2017). Essa diferença pode vir a ser utilizada como estratégia futura no aprimoramento dos compostos **JA3**; e **JA7** e **GE1** e também no design de novos análogos.

A regulação da permeabilização mitocondrial e, conseqüentemente, da liberação de proteínas pró-apoptóticas pela mitocôndria é realizada por membros da família Bcl-2, composta por proteínas capazes de induzir ou impedir a apoptose. O equilíbrio entre essas proteínas mantém a célula viva e funcional. Já a inversão na proporção de fatores pró-apoptóticos e antiapoptóticos, ou seja, a diminuição da expressão de membros antiapoptóticos da família Bcl-2 e o aumento da expressão de membros pró-apoptóticos, é responsável por induzir fragmentação mitocondrial, perda do  $\Delta\psi_m$ , formação de poros na membrana mitocondrial externa e, conseqüentemente, morte celular por apoptose (BEM-SAFITA et al., 2015, SAFITA et al., 2015). As chalconas **JA3** e **JA7** reduziram significativamente a expressão das proteínas antiapoptóticas Bcl-2 e Bcl-xL em células K562 e Jurkat e aumentaram de forma significativa a expressão das proteínas pró-apoptóticas Bax e Bak (Figura 30 A-D e Figura 33 A-D). A razão Bax/Bcl-2 foi de 2,2 na linhagem K562 e 2,1 na linhagem Jurkat para ambos os compostos. A pré-incubação com uma concentração não citotóxica de cicloheximida capaz de inibir a síntese proteica protegeu as células K562 e Jurkat da morte celular causada pelas chalconas **JA3** e **JA7** e inibiu o aumento da expressão de Bax e Bak (Figuras 32 e 33). Como relatado na literatura, esses membros pró-apoptóticos são regulados pelo aumento de sua expressão e/ou pela redistribuição subcelular para as mitocôndrias. Os resultados apresentados neste trabalho sugerem que o aumento da expressão de Bax e Bak está relacionado à síntese proteica *de novo*, já que a inibição do aumento dessas proteínas foi acompanhada de uma redução da morte celular.

O composto **GE1** também aumentou significativamente a expressão das proteínas pró-apoptóticas Bax e Bak e reduziu a expressão das proteínas antiapoptóticas Bcl-xL e Bcl-2 após 24 h de incubação (Figura 50 A-C). Os resultados sugerem que um dos mecanismos pelos quais as chalconas **JA3** e **JA7** e o composto **GE1** induzem as células à apoptose envolve a via intrínseca, pela inversão na proporção das proteínas da família Bcl-2, somado à produção de EROS

à indução de dano mitocondrial e à consequente liberação de fatores pró-apoptóticos.

Alguns membros da família Bcl-2, como, por exemplo, a proteína Bid, também são capazes de ativar a via extrínseca da apoptose, funcionando como uma ponte entre as duas vias. De fato, a incubação das células leucêmicas com **JA3** e **JA7** levou a clivagem de Bid (Figura 30 E-F), o que sugere um possível efeito dos compostos selecionados sobre via extrínseca. A via extrínseca começa com a ativação de receptores de membrana como, por exemplo, o FasR, pelos seus respectivos ligantes (LEE et. al., 2012). Diversos estudo relatam que os efeitos apoptóticos de novos agentes quimioterápicos estão relacionados à regulação positiva da expressão de FasR (RÖDER;TRAUZOLD; KALTHOFF, 2011; LEE et. al., 2012, BOSE; GRANT, 2015). Os resultados demonstraram que as chalconas **JA3** e **JA7** e também o composto **GE1** causaram um aumento significativo na expressão de FasR (Figura 34 e Figura 50 E), o que sugere que a via extrínseca também pode estar envolvida no mecanismo de morte celular induzido por esses compostos. A ativação da via extrínseca pelas chalconas **JA3** e **JA7** parece estar relacionada à ativação de caspase-8, o que pode ocorrer de maneira independente do ligante. A inibição da via Fas por pré-incubação com o inibidor de caspase-8 ou por superexpressão de c-FLIP (Figuras 35 e 36, Quadro 10) resgatou parcialmente a viabilidade celular após o tratamento com **JA3** e **JA7**, o que sugere que a ativação da via extrínseca é necessária para o efeito citotóxico desses compostos.

A ativação das vias intrínseca e extrínseca converge para a via comum, com ativação das caspases efetoras, dentre as quais se destaca a caspase-3 pelo seu papel essencial na propagação do sinal apoptótico (GOLDAR et al., 2015). O presente trabalho demonstrou que os compostos **JA3**, **JA7** e **GE1** induziram a clivagem de caspase-3 e PARP (Figura 37 C-D e Figura 50 F), o que indica que a morte das células leucêmicas está não apenas sendo iniciada, como também executada. Estudos recentes com chalconas em diferentes linhagens tumorais relatam a indução da apoptose pela ativação da caspase-3, envolvendo ou não as vias tradicionais (WANG et al., 2015, YONG et al., 2015). A apoptose também pode estar relacionada à diminuição da expressão de proteínas que inibem a cascata das caspases, como, por exemplo, as IAPs. O principal membro dessa família é a survivina, cuja expressão costuma estar aumentada em células tumorais. O seu efeito antiapoptótico está relacionado ao estresse celular, à divisão celular e à inibição das caspases-9, -3 e -7 (PARK et al., 2011, CHEN et al., 2016).

De acordo com a literatura, a diminuição da expressão dessa proteína está relacionada à indução da célula tumoral, à apoptose e a uma melhor resposta ao tratamento (HARIKUMAR et al., 2009). Os compostos **JA3**, **JA7** e **GE1** diminuíram a expressão de survivina em células K562 e Jurkat (Figura 37 A-B e Figura 50 D), o que pode potencializar o seu efeito citotóxico e a indução das células tumorais a apoptose.

Recentemente, foi demonstrado que o estresse no RE promove a apoptose de forma autônoma em células tumorais por ativar a via mitocondrial e aumentar a expressão dos receptores de morte. Esta regulação positiva mediada pelo estresse no RE leva à ativação dos receptores de morte independentemente do ligante e, conseqüentemente, à apoptose dependente de caspase-8 (LU et al., 2014). A ativação de caspase-8 também está relacionada à via intrínseca (mitocondrial), pois a caspase-8 ativada pode clivar e ativar a proteína Bid em uma via de mão dupla. A clivagem de Bid, por sua vez, ativa outros membros pró-apoptóticos da família Bcl-2, como Bak e Bax, o que resulta em sua oligomerização e na formação de canais de alta condutância na membrana mitocondrial externa, o que leva à liberação de fatores apoptogênicos (SUZUKI-KARASAKI et al., 2016). Estudos da literatura relatam que o efeito citotóxico das chalconas parece ser iniciado pelo estresse no RE (PHANG et al., 2016, LEE et al., 2016), por isso, na sequência da investigação, os efeitos das chalconas **JA3** e **JA7** foram analisados nos marcadores de estresse do RE Bip, CHOP, p-eiF2 $\alpha$  e p-PERK (LU et al., 2014; ZHANG et al., 2014).

Os resultados mostram que **JA3** e **JA7** induziram estresse no RE, demonstrado pelo aumento da expressão de Bip, CHOP, p-eiF2 $\alpha$  e p-PERK (Figura 38). A prevenção desse estresse com o uso do potente inibidor TUDC (ENGIN et al., 2013) protege as células K562 e Jurkat da morte celular induzida por **JA3** e **JA7** (Figura 39), o que sugere que o efeito apoptótico das chalconas está fortemente associado ao estresse no RE. De fato, conforme descrito anteriormente, foi observado que a indução de estresse no RE pelas chalconas **JA3** e **JA7** levou à regulação positiva das proteínas pró-apoptóticas Bax e Bak. Esta regulação positiva de proteínas pró-apoptóticas parece ser necessária para a citotoxicidade induzida por **JA3** e **JA7**, pois o seu bloqueio com cicloheximida ou com o inibidor específico TUDC resgatou parcialmente a viabilidade celular após o tratamento com as chalconas. A regulação positiva de FasR parece ser suficiente para ativar a via extrínseca dos receptores de morte, pois o uso do inibidor específico de caspase-8 ou a superexpressão de c-FLIP protegeram parcialmente as células K562 e Jurkat da apoptose induzida por **JA3** e **JA7**.

Recentemente foi relatado que o estresse no RE pode induzir a regulação de CHOP e a ativação independente do ligante dos receptores DR5, FasR e TRAIL (LU et al., 2014, SUZUKI-KARASAKI et al., 2016). Assim, é possível que as alterações celulares induzidas pelo estresse no RE após o tratamento com as chalconas **JA3** e **JA7** resulte na ativação da via FasR de forma independente do ligante. Como consequência, o extenso dano mitocondrial relatado anteriormente provavelmente é resultado da ativação combinada de Fas e caspase-8 em resposta ao estresse no RE, o que levou à clivagem de Bid e à desregulação do equilíbrio entre os membros pró-apoptóticos e antiapoptóticos da família Bcl-2. As EROS aumentam ainda mais o sinal apoptótico ao potencializar a liberação de fatores apoptogênicos, pois foi demonstrado que a produção de EROS é necessária para isolar esses fatores da interação eletrostática e hidrofóbica com a cardiolipina, o que permite a sua correta liberação (KIM et al., 2008; PETROSILLO et al., 2003, ROJAS et al., 2015). A esse respeito, foi recentemente demonstrado que, durante a morte celular citotóxica mediada por células T, a serina protease granzima B também desencadeia uma produção robusta de EROS, a qual potencializa a liberação de fatores apoptogênicos medido por Bid/ Bax/ Bak, o que leva à amplificação da ativação de caspase-3 (JACQUEMIN et al., 2015) e que poderia ser um alvo futuro para o estudo das chalconas **JA3** e **JA7**.

No presente trabalho, também foi demonstrado que a incubação com **JA3** e **JA7** resultou em uma liberação inicial significativa de ATP e em uma exposição tardia de CALR na superfície de células K562 e Jurkat (Figura 40), o que indica que essas duas chalconas induzem uma forma imunogênica de apoptose. A resposta imune de um organismo está intimamente relacionada ao surgimento e à manutenção de processos neoplásicos e pode ser um importante alvo para novas terapias antitumorais. Sabe-se que a maioria das lesões neoplásicas recém-formadas são prontamente eliminadas pelo sistema de defesa, pois existe um mecanismo de imunovigilância antitumoral que impede que as lesões neoplásicas avancem para o surgimento de tumores malignos (GALLUZI et al., 2017). No entanto, em casos de lesões muito agressivas relacionadas a células com alta diversidade mutacional, podem formar-se células tumorais variantes capazes de evadir os sistemas de defesa do organismo contra a proliferação descontrolada. A resistência contra a imunovigilância antitumoral e a consequente imunidade antitumoral é conseguida através de diversos mecanismos, os quais incluem a baixa imunogenicidade das células mutadas, a capacidade de induzir imunotolerância ou imunossupressão

ativa e capacidade de resistir a lise mediada por células imunes. A baixa imunogenicidade é um obstáculo particularmente importante na indução da imunidade antitumoral duradoura e estável. Assim, recentemente foi proposto na literatura que, uma via através da qual é possível induzir potentes respostas imunes antitumorais é através do aumento da imunogenicidade das células tumorais, o que é feito principalmente pela emissão de DAMPs. A exposição de CALR é o DAMP mais importante associado à morte celular imunogênica, pois sua presença é universal para todos os indutores desse tipo específico de morte celular. Outros marcadores, como a secreção inicial de ATP e a liberação de HMGB1, HSP70 e HMGB1 podem ou não estar presentes. A morte celular imunogênica é altamente dependente do estresse no RE e da produção de EROS, pois ambos são necessários para a ativação dos sinalizadores de perigo que medeiam a emissão de DAMPs (KEPP et al., 2009, GARG et al., 2015, XU et al., 2017, GALLUZI et al., 2017).

Até o presente momento não foi encontrado nenhum estudo associando chalconas naturais ou sintéticas à indução de morte celular imunogênica, o que indica que este é o primeiro trabalho a sugerir que o estresse no RE e o estresse oxidativo induzidos pelas chalconas **JA3** e **JA7** podem levar à emissão de DAMPs e à apoptose imunogênica. Esse é um resultado importante, pois foi demonstrado que diversos indutores da morte celular imunogênica são quimioterápicos, dentre os quais destacam-se as antraciclina e a mitoxantrona (GARG et al., 2015), e as chalconas estudadas poderiam ter um efeito semelhante a esses fármacos na modulação da resposta imune. Além disso, o estudo de novos compostos que explorem o sistema imunológico do paciente a gerar respostas específicas contra as células tumorais é uma importante estratégia que vem sendo cada vez mais explorada pela comunidade científica (JACQUEMIN et al., 2015, VASEKAR et al., 2016). Para o futuro, é importante caracterizar o impacto da morte celular imunogênica na clínica e identificar biomarcadores capazes de prever a probabilidade de um paciente responder à terapias antitumorais que envolvam o sistema imune (GARG et al., 2015). Além disso, recentemente foi descoberto que outras formas de morte celular programada, além da apoptose, também podem gerar uma resposta imunológica (GALLUZZI et al., 2017). Seria interessante avaliar futuramente se outros tipos de morte programada, como mitose catastrófica, anoikis, paraptose, piroptose e entose também podem estar associadas à morte celular imunogênica.

Finalmente, a associação de fármacos é definida pela combinação de um ou mais compostos com potencial sinérgico ou

aditivo com o objetivo de melhorar sua eficácia terapêutica (DORET et al., 2003, FUSO et al., 2016). Segundo a literatura, um efeito sinérgico ou aditivo é observado na combinação de diferentes agentes quimioterápicos, bem como entre outras classes de fármacos (BISHAYEE et al., 2016). A citarabina, um fármaco utilizado no tratamento de LMA, é um inibidor da pirimidina capaz de inibir a DNA polimerase (JIANG et al., 2000), enquanto que a vincristina, um alcaloide de vinca utilizado para LLA, atua ligando-se à tubulina e inibindo a polimerização dos microtúbulos, o que resulta na interrupção da metáfase e na apoptose (DUMONTET; JORDAN, 2010). Apesar do efeito citotóxico sobre células de LA, ambos os fármacos estão relacionados a fortes efeitos adversos, como supressão da MO, distúrbios gastrointestinais e neurotoxicidade (CHAO et al., 2015). No presente trabalho foi demonstrado que a combinação de **JA3**, **JA7** e **GE1** com citarabina e vincristina aumentou o efeito antileucêmico desses fármacos quando comparado aos compostos isolados (Figura 41 e 51). Apesar de ser um resultado preliminar, é possível sugerir que a combinação de quimioterápicos atuais com chalconas pode ter um efeito sinérgico ou aditivo, o que poderia resultar na redução dos seus efeitos adversos, bem como na prevenção da resistência aos medicamentos. Porém, mais estudos são necessários a fim de confirmar esse resultado.

## 8 CONCLUSÕES

- As chalconas **JA3** e **JA7**, da série JA do aldeído bifeníl, foram as mais citotóxicas dentre as 70 chalconas sintéticas investigadas no presente estudo.
- As chalconas **JA3** e **JA7** reduziram a viabilidade celular das linhagens de LMA K562 e Kasumi, de LLA Jurkat e CEM, de leucemia monocítica aguda U937, de LPA HL-60 e de MM MM-1S de forma dependente do tempo e da concentração, o que mostra que elas são citotóxicas para diferentes linhagens de neoplasias hematológicas.
- As chalconas **JA3** e **JA7** reduziram a viabilidade celular das linhagens HT-29, MDA-MB-231, SSC-25, A549, HeLa e U251 de forma dependente do tempo e da concentração, o que mostra que elas também são citotóxicas para diferentes linhagens de tumores sólidos.
- As chalconas **JA3** e **JA7** reduziram a viabilidade celular da linhagem de célula-tronco de glioma U251NS de forma dependente do tempo e da concentração, o que sugere que elas também sejam citotóxicas para células-tronco tumorais.
- A citotoxicidade das chalconas **JA3** e **JA7** foi seletiva para células tumorais ( $IS \geq 10$ ), não foi observada redução significativa na viabilidade celular de linhagens não neoplásicas e de células mononucleadas, e os compostos não causaram hemólise.
- As chalconas **JA3** e **JA7** bloquearam o ciclo celular das linhagens de LMA K562 e de LLA Jurkat na fase S e diminuíram a expressão do marcador de proliferação celular KI-67.
- As chalconas **JA3** e **JA7** causam morte celular por apoptose nas linhagens de LMA K562 e de LLA Jurkat.
- O mecanismo envolvido na apoptose induzida por **JA3** e **JA7** envolve a ativação da via intrínseca, com inversão dos membros pró-apoptóticos (Bcl-2 e Bcl-xL) e antiapoptóticos (Bax e Bak) da família Bcl-2, o que leva à perda do  $\Delta\psi_m$ , à produção de EROS e à liberação das proteínas pró-apoptóticas AIF, citocromo c, endonuclease G e SMAC da mitocôndria para o citosol.
- A via extrínseca também está envolvida na morte celular induzida pelas chalconas **JA3** e **JA7**, o que fica evidenciado pelo aumento da expressão do receptor de membrana FasR e pela clivagem da proteína pró-apoptótica Bid.
- O aumento das proteínas pró-apoptóticas nas duas vias, bem como a inibição de proteínas antiapoptóticas como a IAP survivina,



leva a clivagem de caspase-3 e PARP pelas chalconas **JA3** e **JA7**, o que resulta na ativação da via comum da apoptose.

- O início do sinal apoptótico induzido pelas chalconas **JA3** e **JA7** envolve a produção de estresse no RE e a expressão de marcadores de morte celular imunogênica.
- Finalmente, a associação das chalconas **JA3** e **JA7** com os quimioterápicos citarabina e vincristina foi ainda mais citotóxica do que os fármacos isolados.
- A quinona **GE1**, isolada do extrato bruto de *E. hiemalis*, reduziu significativamente a viabilidade celular das linhagens de LMA K562, de LLA Jurkat, de MM MM-1S e das linhagens HT-29, HeLa, U251 e U251NS, o que indica que o composto é efetivo para diferentes linhagens de neoplasias hematológicas, tumores sólidos e célula-tronco tumoral.
- A citotoxicidade do composto natural **GE1** foi seletiva para células tumorais ( $IS \geq 10$ ) e não induziu hemólise significativa em eritrócitos normais.
- O composto natural **GE1** bloqueou a fase G2/M do ciclo celular de células de LMA K562 e de LLA Jurkat, reduziu a expressão do marcador de proliferação celular KI-67 e aumentou a expressão da proteína supressora de tumor PML.
- O composto **GE1** causou morte celular por apoptose nas células K562 e Jurkat e ativou a via intrínseca, com diminuição da expressão da proteína antiapoptótica e Bcl-xL, aumento da expressão das proteínas pró-apoptóticas Bax e Bak, redução do  $\Delta\psi_m$ , produção de EROS e liberação de AIF, citocromo C e endonuclease G da mitocôndria para o citosol. A via extrínseca também parece estar envolvida na morte celular, conforme demonstrado pelo aumento da expressão do receptor de membrana FasR, o que culmina na ativação da via comum pela clivagem de caspase-3 e PARP.
- Finalmente, a associação de **GE1** com citarabina e vincristina foi ainda mais citotóxica do que os fármacos isolados, o que sugere um possível efeito sinérgico ou aditivo.

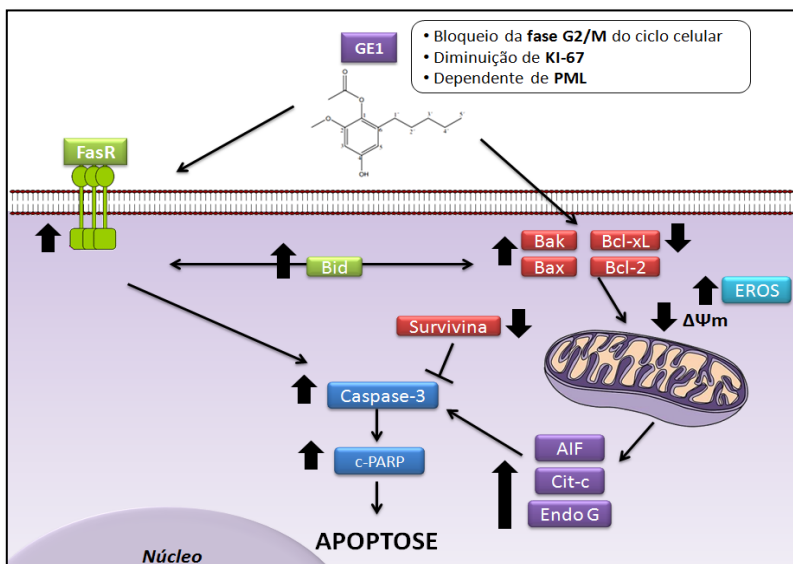
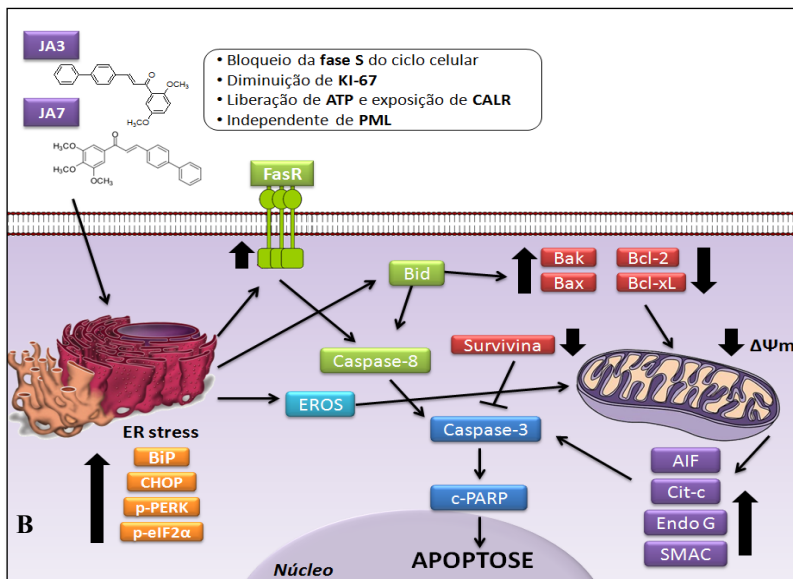
A compilação de evidências obtidas no presente estudo permite sugerir um dos prováveis múltiplos mecanismos de citotoxicidade das chalconas **JA3** e **JA7** e do composto **GE1** em células leucêmicas. Como pode ser observado na Figura 52 A e B, os resultados demonstram que os compostos bloquearam o ciclo celular de células K562 e Jurkat nas fases S (**JA3** e **JA7**) e G2M (**GE1**) e diminuíram a

expressão do marcador de proliferação celular KI67. As chalconas **JA3** e **JA7** induziram estresse oxidativo e estresse no RE, o que parece levar a um aumento na expressão do receptor Fas, ativação de caspase 8 e clivagem de Bid. O estresse no RE também parece ativar a via intrínseca, diminuindo a expressão das proteínas antiapoptóticas Bcl-2 e Bcl-xL e aumentando a expressão das proteínas pró-apoptóticas Bax e Bak. Essa inversão dos membros da família Bcl-2 levou a um extenso dano mitocondrial manifestado pela fragmentação mitocondrial, redução do  $\Delta\psi_m$  e liberação dos fatores apoptogênicos AIF, citocromo c, endonuclease G e SMAC, além da inibição da XIAP survivina. A morte celular induzida pelas chalconas **JA3** e **JA7** ocorreu de maneira independente da proteína PML e envolveu o aumento da liberação de ATP e a exposição de CALR, o que sugere um tipo imunogênico de apoptose. O composto **GE1** ativou a via extrínseca da apoptose, com aumento da expressão de FasR e clivagem de Bid, e também a via intrínseca com inversão dos membros da família Bcl-2, perda do  $\Delta\psi_m$  e liberação de AF, citocromo c e endonuclease G pela mitocôndria. A morte celular mediada por **GE1** também envolveu o aumento da proteína PML, a diminuição de survivina e a clivagem de caspase-3 e PARP.

Juntos, os resultados apresentados fornecem novas informações a respeito dos mecanismos de morte celular das chalconas inéditas **JA3** e **JA7** e da quinona natural **GE1** e sugerem que os mesmos representam novos compostos potencialmente promissores para o tratamento de diferentes subtipos de neoplasias hematológicas. Futuramente pretende-se investigar novos mecanismos envolvidos na morte celular induzida por esses compostos e, dessa forma, contribuir com a busca por novas substâncias que possam vir a ser utilizadas no combate às LAs ou como protótipo para a síntese de novos compostos.

Figura 52 - Esquema ilustrativo do mecanismo de ação dos compostos JA3, JA7 e GE1 em células de LA.

A



## 9 PERSPECTIVAS

- Investigar o efeito de **GE1** no estresse do RE e na morte celular imunogênica.
- Investigar o efeito de **JA3**, **JA7** e **GE1** sobre células-tronco leucêmicas.
- Avaliar se **JA3**, **JA7** e **GE1** induzem outros tipos de morte celular programada.
- Investigar o efeito de **JA3**, **JA7** e **GE1** sobre as ciclinas e CDKs envolvidas no bloqueio do ciclo celular e avaliar a ação de **GE1** no citoesqueleto de células de LA.
- Analisar o efeito de **JA3**, **JA7** e **GE1** na atividade das proteínas de resistência a múltiplos fármacos ABCB1, ABCC1 e LRP.
- Investigar os mecanismos de morte celular dos compostos **JA3**, **JA7** e **GE1** em células de MM e em outros modelos tumorais.
- Investigar a resposta dos compostos **JA3**, **JA7** e **GE1** na sensibilização celular por granzimas e perforinas e na apoptose mediada por células T e NK.
- Analisar o efeito citotóxico de **JA3**, **JA7** e **GE1** em amostras de SP e MO de pacientes portadores de LA.
- Avaliar o efeito dos compostos **JA3**, **JA7** e **GE1** em modelo *in vivo*.



## REFERÊNCIAS

- ABBAS, T.; DUTTA, A. p21 in cancer: intricate networks and multiple activities. **Nature Reviews in Cancer**. v. 9, n. 6, p. 400-414, 2009.
- ABU, N.; AKHTAR, M. N.; YEAP, S. K.; LIM, K. L.; HO, W. Y.; ZULFADLI, A. J.; OMAR, A. R.; SULAIMAN, M. R.; ABDULLAH, M. P.; ALITHEEN, N. B. Flavokawain A induces apoptosis in MCF-7 and MDA-MB231 and inhibits the metastatic process in vitro. **PLoS One**, v. 9, n. 10, 2014.
- ADIANTI, M.; AOKI, C.; KOMOTO, M.; DENG, L.; SHOJI, I.; WAHYUNI, T. S.; LUSIDA, M. I.; SOETJIPTO, S.; FUCHINO, H.; KAWAHARA, N.; HOTTA, H. Anti-hepatitis C virus compounds obtained from Glycyrrhiza uralensis and other Glycyrrhiza species. **Microbiology and Immunology**, v. 58, n. 3, 2014.
- ALLAN, L.A.; CLARKE, P.R. Apoptosis and autophagy: Regulation of caspase-9 by phosphorylation. **The FEBS Journal**, n. 276, p. 6063-73, 2009.
- AMARANTE, C.B.; MÜLLER, A. H.; PÓVOA, M.M.; DOLABELA, M.F. Estudo fitoquímico biomonitorado pelos ensaios de toxicidade frente à Artemia salina e de atividade antiplasmódica do caule de aninga (Montrichardia linifera). **Acta Amazonica**, v. 41, n.3, p. 431-434, 2011.
- ARBER, D. A.; ORAZI, A.; HASSERJIAN, R.; TIELE, J.; BOROWITZ, M. J.; LE BEAU, M. M.; BLOOMFIELD, C.D.; VARDIMAN, J.W. The 2016 revision to the World Health Organization classification of myeloid **neoplasms** and acute leukemia. **Blood**, v. 127, n. 20, p. 2391-2405, 2016.
- ARYA, D.; SACHITHANANDAN, S.P.; ROSS, C.; PALAKODETI, D.; LI, S.; KRISHNA, S. MiRNA182 regulates percentage of myeloid and erythroid cells in chronic myeloid leukemia. **Cell Death and Disease**, v. 8, n. 1, p. 2547-2559, 2017.
- ARYAPOUR, H.; RIAZI, G. H.; AHMADIAN, S.; FOROUMADI, A.; MAHDAVI, M.; EMAMI, S. Induction of apoptosis through tubulin inhibition in human cancer cells by new chromene-based chalcones. **Pharmaceutical Biology**, v. 50, n. 12, p. 1551-1560, 2012.
- AWANG, N.; AZIZ, Z. A.; KAMAUDIN, N. F.; CHAN, K. M. Citotoxicity and mode of cell death induced by tripenyltin (IV) compounds in vitro. **Online Journal of Biological Sciences**, v. 14, n. 2, p. 84-93, 2014.
- BAIN, B.J. Células Sangüíneas: um guia prático. 4.Ed. Porto Alegre:**Artmed**, 2007.
- BABASHAH, S. (Ed.) Cancer Stem Cells: Emerging Concepts and Future Perspectives in Translational Oncology. 1.Ed. Nova York: **Springer International Publishing**, 2015.

BASSAN, R.; HOELZER, D. Modern Therapy of Acute Lymphoblastic Leukemia. **Journal of Clinical Oncology**, 2011.

BEN SAFTA, T.; ZIANI, L.; FAVRE, L.; LAMENDOUR, L.; GROS, G.; MAMI-CHOUAIB, F. Granzyme B-activated p53 interacts with Bcl-2 to promote cytotoxic lymphocyte-mediated apoptosis. **Journals of Immunology**, v. 194, n. 1, 2015.

BISHAYEE, A.; HASKELL, Y.; DO, C.; SIVEEN, K.S.; MOHANDAS, N.; SETHI, G.; STONER, G.D. Potential Benefits of Edible Berries in the Management of Aerodigestive and Gastrointestinal Tract Cancers: Preclinical and Clinical Evidence. **Critical Reviews in Food Science and Nutrition**, v. 56, n. 10, p. 1753-1775, 2016.

BONELLI, P.; TUCCILLO, F. M.; BORRELLI, A.; SCHIATTARELLA, A.; BUONAGURO, F. M. CDK/CCN and CDKI alterations for cancer prognosis and therapeutic predictivity. **Biomed Research International**, v. 36, 2014.

BONNET, D.; DICK, J. E. Human acute myeloid leukemia is organized as a hierarchy that originates from a primitive hematopoietic cell. **Nature Medicine**, v. 3, p. 730-737, 1997.

BOSE, P.; GRANT, S. Rational Combinations of Targeted Agents in AML. **Journal of Clinical Medicine**, v. 4, n. 4, p. 634-664, 2015.

BRISSOT, E.; MOTY, M. Which Acute Myeloid Leukemia Patients Should Be Offered Transplantation? **Seminars in Hematology**, v. 52, n. 3, p.223-231, 2015.

BURGER, A.M.; FIEBIG, H.H. Preclinical Screening for New Anticancer Agents. In: FIGG, W.D.; MCLEOD, H. L. (Ed.). Handbook of Anticancer Pharmacokinetics and Pharmacodynamics. Totowa, NJ: **Humana Press**, 2014. p.29-44.

CARVALHO JUNIOR, A. R.; GOMES, G. A.; FERREIRA, R. O.; CARVALHO, M. G. Constituintes químicos e atividade antioxidante de folhas e galhos de *Eugenia copacabanensis* Kiaersk (Myrtaceae). **Química Nova**, v. 37, n. 3, p. 477-482, 2014.

CHAO, M. W.; LAI, M. J.; LIOU, J. P.; CHANG, Y. L.; WANG, J. C.; PAN, S. L.; TENG, C. M. The synergic effect of vincristine and vorinostat in leukemia in vitro and in vivo. **Journal of Hematology & Oncology**, v. 10, 2015.

CHEN, L.; LI, Y.; YUE, Q.; LOKSZTEJN, A.; YOKOYAMA, K.; FELIZ, E.A.; LIU, X.; ZHANG, N.; AN, Z.; BILLS, G.F. Engineering of New Pneumocandin Side-Chain Analogues from *Glarea lozoyensis* by Mutasynthesis and Evaluation of Their Antifungal Activity. **ACS Chemical Biology**, v. 11, n. 10, 2016.

CHEN, X.; DUAN, N.; ZHANG, C.; ZHANG, W. Survivin and Tumorigenesis: Molecular Mechanisms and Therapeutic Strategies. **Journal of Cancer**, v. 7, n. 3, p. 314-323, 2016.

CHEN, Y.; CHEN, J.; YUN, L.; XU, L.; LIU, J.; XU, Y.; YANG, H.; LIANG, G.; TANG, H. Hydroquinone-induced malignant transformation of TK6 cells by facilitating SIRT1-mediated p53 degradation and up-regulating KRAS. **Toxicology Letters**, v. 259, p. 133-142, 2016.

CHIZUKA, A.; SUDA, M.; SHIBATA, T.; KUSUMI, E.; HORI, A.; HAMAKI, T.; KODAMA, Y.; HORIGOME, K.; KISHI, Y.; KOBAYASHI, K.; MATSUMURA, T.; YUJI, K.; TANAKA, Y. KAMI, M. Difference between hematological malignancy and Solid tumor research articles. [Editorial]. **Leukemia**, v. 20, 2006.

CHU, J.; GUO, C.L. Design and Discovery of Some Novel Chalcones as Antioxidant and Anti-Inflammatory Agents via Attenuating NF- $\kappa$ B. **Archiv der Pharmazie**, v. 349, n. 1, p. 63-70, 2016.

CORNELL, R.F.; PALMER J. Adult acute leukemia. *Disease-a-Month*, v.58, n.4, 2012.

COSTA, G.; HRESHCHYSHYN, M.M.; HOLLAND, J. F. Initial clinical studies with vincristine. **Cancer Chemotherapy Reports**, v. 24, p. 39-44, 1962.

COULTER, J.B.; O'DRISCOLL, C.M.; BRESSLER, J.P. Hydroquinone Increases 5-Hydroxymethylcytosine Formation through Ten Eleven Translocation 1 (TET1) 5-Methylcytosine Dioxygenase. **Journal of Biological Chemistry**, v. 288, n. 40, p. 28792-28800, 2013.

CROSS-KNORR, S.; LU, S.; PEREZ, K.; GUEVARA, S.; BRILLIANT, K.; PISANO, C.; QUESENBERY, P. J.; RESNICK, M. B.; CHATTERJEE, D. RKIP phosphorylation and STAT3 activation is inhibited by oxaliplatin and camptothecin and are associated with poor prognosis in stage II colon cancer patients. **BMC Cancer**, v. 13, 2013.

CUI, Y.L.; QIU, L.H.; ZHOU, S.Y.; LI, L.F.; QIAN, Z.Z.; LIU, X.M.; ZHANG, H.L.; REN, X.B.; WANG, Y.Q. Necroptosis as a potential therapeutic target in multiple organ dysfunction syndrome. **Oncotarget**, 2017. [Epub ahead of print]

DAHAM, S. S. et al. The Anticancer, Antioxidant and Antimicrobial Properties of the Sesquiterpene  $\beta$ -Caryophyllene from the Essential Oil of *Aquilaria crassna*. **Molecules**, v. 20, n. 7, p. 11808-29, 2015.

DAS, M.; MANNA, K. Chalcone Scaffold in Anticancer Armamentarium: A Molecular Insight. **Journal of Toxicology**, v. 2016, p. 765-775, 2016.

DEANGELO, D.J.; STEVENSON, K. E.; DAHLBERG, S. E.; SILVERMAN, L. B.; COUBAN, S.; SUPKO, J. G.; AMREIN, P. C.; BALLEEN, K. K.; SEFTEL, M. D.; TURNER, A. R.; LEBER, B.; HOWSON-JAN, K.; KELLY, K.; COHEN, S.; MATTHES, J. H.; SAVOIE, L.; WADLEIGH, M.; SIRULNIK, L.A.; GALINSKY, I.; NEUBERG, D. S.; SALLAN, S. E.; STONE, R. M. Long-term outcome of a



- pediatric-inspired regimen used for adults aged 18-50 years with newly diagnosed acute lymphoblastic leukemia. **Leukemia**, v. 29, n. 3, p. 526-634, 2015.
- DENKERT, C.; BUDCZIES, J.; VON MINCKWITZ, G.; WIENERT, S.; LOIBL, S.; KLAUSCHEN, F. Strategies for developing Ki67 as a useful biomarker in breast cancer. **Breast**. v. 2, p. 67-72, 2015.
- DÍAZ-TIELAS, C.; GRAÑA, E.; REIGOSA, M.J.; SÁNCHEZ-MOREIRAS, A.M. Biological activities and novel applications of chalcones. **Planta daninha** v. 34 n. 3, p. 36-46, 2016.
- DING, W.; SHANG, L.; HUANG, J. F.; LI, N.; CHEN, D.; XUE, L. X.; XIONG, K. Receptor interacting protein 3-induced RGC-5 cell necroptosis following oxygen glucose deprivation..**BMC Neurosciences**, v. 16, n. 1, 2015.
- DORET, M.; MELLIER, G.; GAUCHERAND, P.; SAADE, G.R.; BENCHAI, M.; FRUTOSO, J.; PASQUIER, J.C. The in vitro effect of dual combinations of ritodrine, nicadipine and atosiban on contractility of pregnant rat myometrium. **BJOG**, v. 110, n. 8, p. 731-734, 2003.
- DORRANCE, A. M.; NEVIANI, P.; FERENCHAK, G. J.; HUANG, X.; NICOLET, D.; MAHARRY, K. S.; OZER, H. G.; HOELLARBAUER, P.; KHALIFE, J.; HILL, E. B.; YADAY, M.; BOLON, B. N.; LEE, R. J.; LEE, L. J.; CROCE, C. M.; GARZON, R.; CALIGIURI, M. A.; BLOOMFIELD, C. D.; MARUCCI, G. Targeting leukemia stem cells in vivo with ANTAGOMIR-126 nanoparticles in acute myeloid leukemia. **Leukemia**, v. 29, n. 11, 2015.
- DRANITSARIS, G.; U, B.; KING, J.; KAURA, S.; ZHANG, A. Nab-paclitaxel, docetaxel, or solvent-based paclitaxel in metastatic breast cancer: a cost-utility analysis from a Chinese health care perspective.**ClinicoEconomics and Outcomes Research**, v. 12, n. 7, p. 249-256, 2015.
- DUFEY, E.; SEPÚLVEDA, D.; ROJAS-RIVERA, D.; HETZ, C. Cellular Mechanisms of Endoplasmic Reticulum Stress Signaling in Health and Disease. 1. An overview. **American Journal of Physiology**, v. 37, n. 7, p. 1152-1162, 2014.
- DUMONTET, C.; JORDAN, M.A. Microtubule-binding agents: a dynamic field of cancer therapeutics. **Nature Reviews in Drug Discovery**, v. 9, n. 10, 2010.
- EFFERTH, T.; RÜCKER, G.; FALKENBERG, M.; MANNS, D.; OLBRICH, A.; FABRY, U.; OSIEKA, T. Detection of apoptosis in KG-1a leukemic cells treated with investigational drugs. **Arzneimittelforschung**, v. 46, n. 2, p. 196-200, 1996.
- ENGIN, F.; YERMALOVICH, A.; NGUYEN, T.; HUMMASTI, S.; FU, W.; EIZIRIK, D.L. Restoration of the unfolded protein response in pancreatic beta cells protects mice against type 1 diabetes. **Scientific Translational Medicine**, v. 5, n. 211, p.156-166, 2013.

ESPAENET: free access to database of over 90 million patents. Disponível em: [http://worldwide.espacenet.com/?locale=en\\_EP](http://worldwide.espacenet.com/?locale=en_EP). Acesso em: 18 jun. 2017.

EVANS, B.C.; NELSON, C.E.; YU, S.S.; BEAVERS, K.R.; KIM, A.J.; LI, H. Ex vivo red blood cell hemolysis assay for the evaluation of pH-responsive endosomolytic agents for cytosolic delivery of biomacromolecular drugs. **Journal of Visualized Experiments**, v. 73, 2013.

EZOE, S. Secondary leukemia associated with the anti-cancer agent, etoposide, a topoisomerase II inhibitor. **International Journal of Environmental Research and Public Health**, v. 9, n. 7, p. 2444-2453, 2012.

FALKENBERG, M. B. **Chinone und andere Inhaltstoffe aus Eugenia hiemalis Cambessèdes und Paramyrciaria glazioviana (Kiaerskou) Sobral (Myrtaceae)**. 84p. Tese (Doutorado em Pharmazeutische Chemie). Mathematisch-Naturwissenschaftlichen Fakultät, Universität Bonn, 1996.

FERREIRA, F. P. S.; MORAIS, S. R.; BARA, M. T. F.; CONCEIÇÃO, E. C.; PAULA, J. R.; CARVALHO, T. C.; VAZ, B. G.; COSTA, H. B.; ROMÃO, W.; REZENDE, M. H. Eugenia calycina Cambess extracts and their fractions: Their antimicrobial activity and the identification of major polar compounds using electrospray ionization FT-ICR mass spectrometry. **Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis**, v. 99, p. 89-96, 2014.

FONSECA, B. F.; PREDES, D.; CERQUEIRA, D. M.; REIS, A. H.; AMADO, N. G.; CAVRES, M. C. L.; KUSTER, R. M.; OLIVEIRA, F. L.; MENDES, F. A.; ABREU, J. G. Derricin and Derricidin Inhibit Wnt/ $\beta$ -Catenin Signaling and Suppress Colon Cancer Cell Growth In Vitro. **PLoS One**, v. 10, n. 3, 2015.

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

FUSO, N.I.; CESCA, M.; BIZZARO, F.; GIAVAZZI, R. Combination therapy in cancer: effects of angiogenesis inhibitors on drug pharmacokinetics and pharmacodynamics. **Chinese Journal of Cancer**, v. 35, n. , p. 61-72, 2016.

GAHVANE, Y. N.; SHETE, A.; BHAGAT, A. K.; SHINDE, V. R.; BHONG, K. K.; KHAIRNAR, G. A.; YADAV, A. Solid Tumors: Facts, Challenges and Solutions. **International Journal of Pharmaceutical Sciences and Research (IJPSR)**, v. 2, n. 1, p. 1-12, 2011.

GALLUZI, L.; BUQUÉ, A.; KEPP, O.; ZIVOGEL, L.; KROEMER, G. Immunogenic **cell death** in cancer and infectious disease. **Nature Reviews in Immunology**, v. 17, n. 2, p. 97-111, 2017.

GARCÍA-RODRÍGUEZ, J.; PÉREZ-RODRÍGUEZ, S.; ORTIZ, M.A.; PEREIRA, R.; DE LERA, A.R.; PIEDRAFITA, F.J. Inhibition of I $\kappa$ B kinase- $\beta$  and I $\kappa$ B kinase-

$\alpha$  by heterocyclic adamantyl arotinoids. **Bioorganic Medicinal Chemistry**, v.22, n. 4, p. 1285-1302, 2014.

GARG, A. D.; MAES, H.; VAN VLIET, A. R.; AGOSTINIS, P. Targeting the hallmarks of cancer with therapy-induced endoplasmic reticulum (ER) stress.

**Molecular & Cellular Oncology**, v. 2, n. 1, 2015.

GARG, A. D.; KRYSKO, D. V.; VERFAILLIE, T.; KACZMAREK, A.; FERREIRA, G. B.; MARYSAEL, T.; RUBIO, N.; FIRSZUK, M.; MATHIEU, C.; ROEBROEK, ANNAERT, W.; GOLAB, J.; VANDENABEELE, P.; AGOSTINIS, P. A novel pathway combining calreticulin exposure and ATP secretion in immunogenic cancer cell death. **EMBO Journal**, v. 31, n. 5, p. 1062-1079, 2012.

GOLDAR, S.; KHANIANI, M. S.; DERAKHSHAN, S. M.; BARADARAN, B. Molecular Mechanisms of Apoptosis and Roles in Cancer Development and Treatment. **Asian Pacific Journal of Cancer Prevention**, v. 16, n. 6, 2015.

GREEN, D. R.; FERGUSON, T.; ZITVOGEL, L.; KROEMER, G. Immunogenic and Tolerogenic Cell Death. **Natural Review in Immunology**, v. 9, n. 5, 2009.

GROVE, C. S.; VASSILOU, G. S. Acute myeloid leukaemia: a paradigm for the clonal evolution of cancer? **Disease Models & Mechanisms**, v. 7, n. 8, 2014.

GUAN, D.; KAO, H.Y.; The function, regulation and therapeutic implications of the tumor suppressor protein, PML. **Cell & Bioscience**, v. 5, p. 60-72, 2015.

GUPTA, S.; SHIVAHARE, R.; KORTHIKUNTA, V.; SINGH, R.; GUPTA, S.; TADIGOPPULA, N. Synthesis and biological evaluation of chalcones as potential antileishmanial agents. **European Journal of Medicinal Chemistry**, v. 81, p. 359-366, 2014.

HADJIMICHAEL, C.; CHANOUMIDOU, K.; NIKOLAOU, C.; KLONIZAKIS, A.; THEODOSI, G.I.; MAKATOUNAKIS, T.; KRETISOVALI, A. Promyelocytic Leukemia Protein Is an Essential Regulator of Stem Cell Pluripotency and Somatic Cell Reprogramming. **Stem Cell Reports**, v. 8, n. 5, p. 1366-1378, 2017.

HANAHAN, D.; WEINBERG, R. A. Hallmarks of Cancer: The Next Generation. **Cell**, v. 144, 2011.

HAVERKAMP, H.; BÖLL, B.; EICHENAUER, D. A.; SASSE, S.; FUCHS, M.; BORCMANN, P.; DIEHL, V.; ENGERT, A.; VON TRESCKOW, B. Impact of Bleomycin and Vincristine Dose Reductions in Patients With Advanced Hodgkin Lymphoma Treated With BEACOPP: An Analysis of the German Hodgkin Study Group HD12 and HD15 Trials. **Journal of Clinical Oncology**, v. 33, n. 22., 2015.

HE, W.J.; ZHOU, X.J.; QIN, X.C.; MAI, Y.X.; LIN, X.P.; LIAO, S.R.; YANG, B.; ZHANG, T.; TU, Z.C.; WANG, J.F.; LIU, Y.

Quinone/hydroquinone meroterpenoids with antitubercular and cytotoxic activities produced by the sponge-derived fungus *Gliomastix* sp. ZSDS1-F7. **Natural Product Research**, v. 31, n. 5, p.604-609, 2017.

HEGEDUS, C.; VIRÁG, L. Inputs and outputs of poly(ADP-ribosyl)ation: Relevance to oxidative stress. **Redox Biology**, v. 2, p.978-982, 2014.

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

HOIJAT-FARSANGI, M. Novel and emerging targeted-based cancer therapy agents and methods. **Tumour Biology**, v. 36, n. 2, p.543-546, 2015.

HOPE, K. J.; JIN, L.; DICK, J. E. Acute myeloid leukemia originates from a hierarchy of leukemic stem cell classes that differ in self-renewal capacity. **Nature Immunology**, v. 5, n. 7, p. 738-743, 2004.

HU, D.; SHILATIFARD, A. Epigenetics of hematopoiesis and hematological malignancies. **Genes & Development**, v. 30, n. 18, p. 2021-2041, 2016.

HU, L.; SU, P.; LI, R.; YAN, K.; CHEN, Z.; SHANG, P.; QIAN, A. Knockdown of microtubule actin crosslinking factor 1 inhibits cell proliferation in MC3T3-E1 osteoblastic cells. **BMB Reports**, v. 48, n. 10, p. 583-588, 2015.

HUANG, X.; HUANG, R.; LI, L.; GOU, S.; WANG, H. Synthesis and biological evaluation of novel chalcone derivatives as a new class of microtubule destabilizing agents. **European Journal of Medicinal Chemistry**, v. 132, p. 11-25, 2017.

HYDER, I.; YEDLAPUDI, D.; KALIVENDI, S. V.; KHAZIR, J.; ISMAIL, T.; NALLA, N.; MIRYALA, S.; SAMPATH, K. H. M. Synthesis and Biological evaluation of novel 4 $\beta$ -[(5-substituted)-1,2,3,4-tetrazolyl] podophyllotoxins as anticancer compounds. **Bioorganic Medicinal Chemistry Letters**, v.25, n.1, 2015.

INCA. Estimativa 2016: incidência de câncer no Brasil. SAÚDE, C. D. P. E. V. M. D. Rio de Janeiro: Instituto Nacional de Câncer José Alencar Gomes da Silva, 2015.

INSUASTY, B.; MONTOYA, A.; BECERRA, D.; QUIROGA, J.; ABONIA, R.; ROBLEDO, S.; VÉLEZ, I. D. Synthesis of novel analogs of 2-pyrazoline obtained from [(7-chloroquinolin-4-yl)amino]chalcones and hydrazine as potential antitumor and antimalarial agents. **European Journal of Medicinal Chemistry**, v. 67, 2013.

JACQUEMIN, G.; MARGIOTTA, D.; KASAHARA, A.; BASSOY, E. Y.; WALCH, E. Y.; THIERY, J.; LIEBERMAN, J.; MARTINVALET, D. Granzyme B-induced mitochondrial ROS are required for apoptosis. **Cell Death and Differentiation**, v. 22, n. 5, p. 862-874, 2015.

JANKA, V.; ZATKO, D.; LADISLAV, V.; PÁL, P.; JANKA, P.; GABRIELA, M. Some ferrocenyl chalcones as useful candidates for cancer treatment. **In Vitro Cellular & Developmental Biology Animal**, v. 51, n. 9, p. 964-974, 2015.

JIANG, H.Y.; HICKEY, R.J.; ABDEL-AZIZ, W.; MALKAS, L.H. Effects of gemcitabine and araC on in vitro DNA synthesis mediated by the human breast cell DNA synthesome. **Cancer Chemotherapy & Pharmacology**, v. 45, n. 4, 2000.

JORAY, M.B.; TRUCCO, L.D.; GONZÁLEZ, M.L.; NAPAL, G.N.; PALACIOS, S.M.; BOCCO, J.L.; CARPINELLA, M.C. Antibacterial and Cytotoxic Activity of Compounds Isolated from *Flourensia oolepis*. **Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine**, v. 2015, p. 912-924, 2015.

KAMATH, P.R.; SUNIL, D.; JOSEPH, M.M.; ABDUL SALAM, A.A. Indole-coumarin-thiadiazole hybrids: An appraisal of their MCF-7 cell growth inhibition, apoptotic, antimetastatic and computational Bcl-2 binding potential. **European Journal of Medicinal Chemistry**, v.136, p. 442-451, 2017.

KANIA, E.; ORZECOWSKI, A. Calcium homeostasis and ER stress in control of autophagy in cancer cells. **BioMed Research International**, v. 2015, 2015.

KAWANO, M.; MABUCHI, S.; KISHIMOTO, T.; HISAMATSU, T.; MATSUMOTO, Y.; SASANO, T.; SAWADA, K.; TAKAHASHI, K.; HAMASAKI, T.; KIMURA, T. Combination treatment with trabectedin and **irinotecan** or **topotecan** has synergistic effects against **ovarian** clear cell carcinoma cells. **International Journal of Gynecological Cancer**, v.24, n.5, 2014.

KEPP, O. ; TESNIERE, A. ; SCHLEMMER, F. ; MICHAUD, M. ; SENOVILLA, L. ; ZITVOGEL, L. ; KROEMER, G. Immunogenic cell death modalities and their impact on cancer treatment. **Apoptosis**, v. 14, n. 4, p. 364-375, 2009

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

KHALED, S.; AL MALKI, M.; MARUCCI, G. Acute Myeloid Leukemia: Biologic, Prognostic, and Therapeutic Insights. **Oncology**, v. 30, n. 4, p. 318-29, 2016.

KHAN, S.A. Green Synthesis, Spectrofluorometric Characterization and Antibacterial Activity of Heterocyclic Compound from Chalcone on the Basis of in Vitro and Quantum Chemistry Calculation. **Journal of Fluorescence**, v.27, 2017.

KHAN, I. N.; AL-KARIM, S.; BORA, R. S.; CHAUDHARY, A. G.; SAINI, K. S. Cancer stem cells: a challenging paradigm for designing targeted drug therapies. **Drug Discovery Today**. 2015

KIM, J.S.; LEE, J.H.; JEONG, W.W.; CHOI, D.H.; CHA, H.J.; KIM, H.; Reactive oxygen species-dependent EndoG release mediates cisplatin-induced caspase-independent apoptosis in human head and neck squamous carcinoma cells.

**International Journal of Cancer**, v. 122, n. 3, p.672-680, 2008.

KONUMA, T.; KATO, S.; OIWA-MONNA, M.; TOJO, A.; TAKAHASHI, S. Single-unit cord blood transplant for acute lymphoblastic leukemia and lymphoma using an intensified conditioning regimen of total body irradiation, high-dose cytarabine and cyclophosphamide. **Leukemia & Lymphoma**, v. 56, n.4, 2015.

KOVACS, S.B.; MIAO, E.A. Gasdermins: Effectors of Pyroptosis. **Trends in Cellular Biology**, 2017. [Epub ahead of print]

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

KULKARNI, Y. M.; KAUSHIK, V.; AZAD, N.; WRIGHT, C.; ROJANASAKUL, Y.; O'DOHERTY, G.; LYER, A. K. Autophagy-Induced Apoptosis in Lung Cancer Cells By a Novel Digitoxin Analog. **Journal of Cellular Physiology**, v. 231, n. 4, p. 817-821, 2016.

KUMAR, S.; BAJAJ, S.; BODLA, R.B. Preclinical screening methods in cancer. **Indian Journal of Pharmacology**, v. 48, n. 5, p. 481-486, 2016.

LAANE, E.; TAMM, K.P.; BUENTKE, E.; ITO, K.; KHARAZIHA, P.; OSCARSSON, J. Cell death induced by dexamethasone in lymphoid leukemia is mediated through initiation of autophagy. **Cell Death and Differentiation**, v. 16, n. 7, p. 1018-1029, 2009.

LANCET, J. E.; KARP, J. E. Novel postremission strategies in adults with acute myeloid leukemia. **Current Opinion in Hematology**, v. 16, n. 2, p. 105-111, 2010

LANG, F.; WOJCIK, B.; RIEGER, M. A. Stem Cell Hierarchy and Clonal Evolution in Acute Lymphoblastic Leukemia. **Stem Cells International**, v. 2015, p. 137-164, 2015.

LEE, D.H.; JUNG, Y.; KOH, D.; LIM, Y.; LEE, Y.H.; SHIN, S.Y. A synthetic chalcone, 2'-hydroxy-2,3,5'-trimethoxychalcone triggers unfolded protein response-mediated apoptosis in breast cancer cells. **Cancer Letters**, v. 372, n.1, p. 1-9, 2016.

LEE, J.S.; LEE, S.K.; YOUN, H.D.; YOO, S.J. C-terminal binding protein-mediated transcriptional repression is regulated by X-linked inhibitor of apoptosis protein. **Biochemical.Biophysical Research Communications**, v.417, n.1., 2012.

LEON-GONZALES, A. J.; ACERO, N.; MUNOZ-MINGARRO, D.; NAVARRO, I.; MARTIN-CORDERO, C. Chalcones as Promising Lead Compounds on Cancer Therapy. **Current Medicinal Chemistry**, v. 22, n. 30, p. 3407-3425, 2015.

LETAFAT, B.; SHAKERI, R.; EMAMI, S.; NOUSHINI, S.; MOHAMMADHOSSEINI, N.; SHIRKAVAND, N.; ARDESTANI, S. K.; SAFAVI, M.; SAMADIZADEH, M.; LETAFART, A.; SHAFIEE, A.; FOROUMADI, A. Synthesis and In Vitro Cytotoxic Activity of Novel Chalcone-Like Agents. **Iran Journal of Basic Medicinal Science**, v. 16, n. 11, 2013.

LI, M. X.; DEWSON, G. Mitochondria and apoptosis: emerging concepts. **Prime Reports**, v. 42, 2015.

LI, Q. C.; LI, H. J.; LIU, S.; LIANG, Y.; WANG, X.; CUI, L. Inhibition of  $\gamma$ -secretase by retinoic acid chalcone (RAC) induces G2/M arrest and triggers apoptosis in renal cell carcinoma. **International Journal of Clinical and Experimental Pathology**, v. 8, n. 3, p. 2400-2407, 2015.

LIN, L.; BENSON JR, D. M.; DEANGELIS, S.; BAKAN, C. E.; LI, P. K.; LI, C.; LIN, J. A small molecule, LLL12 inhibits constitutive STAT3 and IL-6-induced STAT3 signaling and exhibits potent growth suppressive activity in human multiple myeloma cells. **International Journal of Cancer**, v. 130, n. 6, p. 1459-1469, 2012.

LU, M.; LAWRENCE, D. A.; MARSTERS, S.; ACOSTA-ALVEAR, D.; KIMMIG, P. MENDEZ, A.S. ; PATON, A.W.; WALTER, P.; SHKENAZI, A. Opposing unfolded-protein-response signals converge on death receptor 5 to control apoptosis. **Science**, v. 345, n. 6192, p. 98-101, 2014.

LUO, H.; LIANG, H.; CHEN, J.; XU, Y.; CHEN, Y.; XU, L.; YUN, L.; LIU, J.; YANG, H. ; LIU, L. ; PENG, J.; LIU, Z. ; TANG, L. ; TANG, H. Hydroquinone induces TK6 cell growth arrest and apoptosis through PARP-1/p53 regulatory pathway. **Environmental Toxicology**, 2017 [Epub ahead of print].

LUPESCU, A.; BISSINGER, R.; JILANI, K.; LANG, F. In vitro induction of erythrocyte phosphatidylserine translocation by the natural naphthoquinone shikonin. **Toxins**, v. 6, n. 5, p. 1559-1574, 2014.

MACHANA, S. et al. Cytotoxic and apoptotic effects of six herbal plants against the human hepatocarcinoma (HepG2) cell line. **Chinese Medicine**, v. 6, n. 1, 2011.

MAGINA, M. D. A.; DALMARCO, E. M.; DALMARCO, J. B.; COLLA, G.; PIZZOLATTI, M. G.; BRIGHENTE, I. M. C. Bioactive triterpenes and phenolics of leaves of *Eugenia brasiliensis*. **Química Nova**, v. 35, n. 6, 1184-1188, 2012.

MAHBUB, A. A.; MAITRE, C. L. L.; HAYWOOD-SMALL, S. L.; MCDOUGALL, G. J.; CROSS, N. A.; JORDAN-MAHY, N. Differential Effects of Polyphenols on Proliferation and Apoptosis in Human Myeloid and Lymphoid

Leukemia Cell Lines. **Anticancer Agents of Medicinal Chemistry**, v. 13, n. 10, p. 1601-1613, 2013.

MAIORAL, M.F.; BODACK, C.D.N.; STEFANES, N.M.; BIGOLIN, A.; MASCARELLO, A.; CHIARADIA-DELATORRE, L. D.; YUNES, R.A.; NUNES, R.J.; SANTOS-SILVA, M.C. Cytotoxic effect of a novel naphthylchalcone against multiple cancer cells focusing on hematologic malignancies. **Biochimie**, 2017 [Epub ahead of print].

MAIORAL, M. F.; DE MOARES, A. C.; SGAMNATTI, K. R.; MASCARELLO, A.; CHIARADIA-DELATORRE, L. D.; YUNES, R. A.; NUNES, R. J.; SANTOS-SILVA, M. C. Investigation of cellular mechanisms involved in apoptosis induced by a synthetic naphthylchalcone in acute leukemia cell lines. **Anticancer Drugs**, v. 27, n. 8, p. 738-747, 2016.

MAIORAL, M.F.; GASPAR, P.C.; ROSA-SOUZA, G.R.; MASCARELLO, A.; CHIARADIA, L.D.; LICÍNIO, M.A.; MORAES, A.C.; YUNES, R.A.; NUNES, R.J.; SANTOS-SILVA, M.C. Apoptotic events induced by synthetic naphthylchalcones in human acute leukemia cell lines. **Biochimie**, v. 95, n. 4, 2013

MAK, J. P.; MAN, W. Y.; CHOW, J. P. H.; MA, H. T.; POON, R. Y. C. Pharmacological inactivation of CHK1 and WEE1 induces mitotic catastrophe in nasopharyngeal carcinoma cells. **Oncotarget**, v. 6, n. 25, p. 21074-21084, 2015.

MARIANI, S. A.; CALABRETTA, B. Leukemia stem cells: Old concepts and new perspectives. **Molecular Aspects of Medicine**, v. 39, 2014.

MATTE-MARTONE, C.; LIU, J.; ZHOU, M.; CHIKINA, M.; GREEN, D.R.; HARTY, J.T.; SHLOMCHIK, W.D. Differential requirements for myeloid leukemia IFN- $\gamma$  conditioning determine graft versus-leukemia **resistance** and sensitivity. **The Journal of Clinical Investigation**, 2017 [Epub ahead of print].

MITRA, K.; LIPPINCOTT-SCHWARTZ, J. Analysis of mitochondrial dynamics and functions using imaging approaches. **Current Protocols in Cell Biology**, v. 4, 2010.

MOCAN, T.; Hemolysis as Expression of Nanoparticles-Induced Cytotoxicity in Red Blood Cells. Biotechnology, **Molecular Biology and Nanomedicine**, v.1, n.1, 2013.

MOLONEY, J.N.; COTTER, T.G. ROS signalling in the biology of cancer. **Seminars in Cell & Developmental Biology**, 2017 [Epub ahead of print]

MOORE, M.A.; WILLIAMS, N.; METCALF, D. In vitro colony formation by normal and leukemic human hematopoietic cells: characterization of the colony-forming cells. **Journal of National Cancer Institute**, v. 50, p. 603-623, 1973.



- MOSMAN, T. Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: application to proliferation and cytotoxicity assays. **Journal of Immunology Methods**, v. 65, n. 1-2, p. 55-63, 1983.
- MOSNA, F.; CAPELLI, D; GOTTARDI, M. Minimal Residual Disease in Acute Myeloid Leukemia: Still a Work in Progress? **Journal of Clinical Medicine**, v. 6, n. 6, 2017.
- NEWMAN, D.J.; CRAGG, G.M. Natural Products as Sources of New Drugs from 1981 to 2014. **Journal of Natural Products**, v. 79, n. 3, p.629-661, 2016.
- NILAND, B.; MIKLOSSY, G. BANKI, K.; BIDDISON, W.E., CASCIOLAORosen, L.; ROSEN, A. Cleavage of transaldolase by granzyme B causes the loss of enzymatic activity with retention of antigenicity for multiple sclerosis patients. **Journal of Immunology**, v. 184, n. 7, p 4025-432, 2010.
- NILSSON, L.I.H., PETTERSEN, I.K.N.; NIKOLAISEN, J.; MICKLEM, D. ; DALE, H.A. ; ROSLAND, G.V. ; LORENS, J.; TRONSTAD, K.J. A new live-cell reporter strategy to simultaneously monitor mitochondrial biogenesis and morphology. **Science Reports**, v. 5, 2015.
- NKUÉTÉ, A. H.; KUETE, V.; GOZZINI, D.; MIGLIOLO, L.; OLIVEIRA, A. L.; WABO, H. K.; TANE, P.; VIDARI, G.; EFFERTH, T.; FRANCO, O. L. Anti-leukemia activity of semi-synthetic phenolic derivatives from *Polygonum limbatum* Meisn. **Chemistry Central Journal**, v. 9, p. 40-49, 2015.
- ONDREJ, M.; CECHAKOVA, L.; DURISOVA, K.; PEJCHAL, J.; TICY, A. To live or let die: Unclear task of autophagy in the radiosensitization battle. **Radiotherapy & Oncology**, v. 119, n. 2, p. 265-275, 2016.
- ORLIKOVA, B.; MENEZES, J. C.; JI, S.; KAMAT, S. P.; CAVALEIRO, J. A.; DIEDERICH, M. Methyleneedioxy flavonoids: Assessment of cytotoxic and anti-cancer potential in human leukemia cells. **European Journal of Medicinal Chemistry**, v. 84, p. 173-180, 2014.
- PACHIRISWAMY, N.; COULSON, K.F.; HOLCOMBE, S.J.; SORDILLO, L.M. Oxidative stress-induced mitochondrial dysfunction in a normal colon epithelial cell line. **World Journal of Gastroenterology**, v. 23, n. 9, p. 3427-3439, 2017.
- PAHN, E.M.; MOLINA-PORTELA, M.P.; STOPPANI, A.O. Effect of quinones and nitrofurans on *Trypanosoma mega* and *Crithidia fasciculata*. **Revista de Microbiologia**, v.20, n. 3, p. 107-118, 1988.
- PARK, E.; GANG, E. J.; HSIEH, Y. T.; SCHAFFER, P.; CHAE, S.; KLEMM, L.; HUANTES, S.; LOH, M.; CONWAY, E. M.; KANG, E. S.; KOO, H. H.; HOFMANN, W. K.; HEISTERKAMP, N.; PELUS, L.; KEERTHIVASAN, G.;

CRISPINO, J.; KAHN, M.; KIM, Y. M. Targeting survivin overcomes drug resistance in acute lymphoblastic leukemia. **Blood**, v. 118, n. 8, 2011.

PASSALACQUA, T.G.; TORRES, F.A.; NOGUEIRA, C.T.; DE ALMEIDA, L.; CISTIA, M.L.; DOS SANTOS, M.B.; GRAMINHA, M.A.; MARCHETTO, R.; ZOTTIS, A. The 2',4'-dihydroxychalcone could be explored to develop new inhibitors against the glycerol-3-phosphate dehydrogenase from *Leishmania* species. **Bioorganic Medicinal Chemistry**, v. 25, n. 7, p. 3564-3568, 2015.

PATIL, S.A.; PATIL, V.; PATIL, R.; BEAMAN, K.; PATIL, S.A. Identification of novel 5,6-dimethoxyindan-1-one derivatives as antiviral agents. **Medicinal Chemistry**, 2017. [Epub ahead of print]

PARTHMANATAN, N.; BALLEINE, R. L. Ki67 and proliferation in breast cancer. **Journal of Clinical Pathology**, v. 66, n. 6, p. 512-516, 2013.

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

PEÑA-MORÁN, O.A.; VILLARREAL, M.I.;ÁLVAREZ-BERBER,I.; MENESES-ACOSTA, A.; RODRÍGUEZ-LÓPEZ, V. Cytotoxicity, Post-Treatment Recovery, and Selectivity Analysis of Naturally Occurring Podophyllotoxins from *Bursera fagaroides* var. *fagaroides* on Breast Cancer Cell Lines. **Molecules**, v. 21, n.8, 2016.

PETROSILLO, G.; RUGGIERO, F.M.; PARADIES, G. Role of reactive oxygen species and cardiolipin in the release of cytochrome c from mitochondria. **FASEB Journal**, v.17, n. 5, p. 2202-2208, 2003.

PHANG, C.W; KARSANI, S.A.; SETHI, G.; ABD MALEK, S.N. Flavokawain C Inhibits Cell Cycle and Promotes Apoptosis, Associated with Endoplasmic Reticulum Stress and Regulation of MAPKs and Akt Signaling Pathways in HCT 116 Human Colon Carcinoma Cells. **PLoS One**, v. 11, n. 2, p.775-785, 2016.

PINHO-RIBEIRO, F. A.; HOHMANN, M. S.; BORGHI, S. M.; ZARPELON, A. C.; GUAZELLI, C. F.; MANCHOPE, M. F.; CASAGRANDE, R.; VERRI, W. A. Protective effects of the flavonoid hesperidin methyl **chalcone** in inflammation and pain in mice: role of TRPV1, oxidative stress, cytokines and NF- $\kappa$ B. **Chemicho-Biological Interactions**, v. 228, p. 88-89, 2015.

POPESCU, R.C.; ANDRONESCU, E.; VASILE, B.S.; TRUSCA, R.; BOLDEIU, A.; MOGOANTA, L.; MOGOSANU, G.D.; TEMELIE, M.; RADU, M.; GRUMEZESCU, A.M.; SAVU, D. Fabrication and Cytotoxicity of

Gemcitabine-Functionalized Magnetite Nanoparticles. **Molecules**, v.22, n.7, 2017.

PREVOROVSKY, M.; ORAVCOVÁ, M.; ZACH, R.; JORDÁKOVÁ, A.; BÄHLER, J.; PUTA, F.; FOLK, P. CSL protein regulates transcription of genes required to prevent catastrophic mitosis in fission yeast. **Cell Cycle**, v. 15, n. 22, p. 3082-3096, 2016.

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

PUI, C.-H.; EVANS, W. E. Treatment of Acute Lymphoblastic Leukemia. **New England Journal of Medicine**, v. 354, n. 2, p. 166-178, 2006.

RAJENDRAN, M. Quinones as photosensitizer for photodynamic therapy: ROS generation, mechanism and detection methods. **Photodiagnosis and Photodynamic Therapy**, v. 1000, n. 15, 2016.

RAMÍREZ-PRADA, J.; ROBLEDO, S.M.; VÉLEZ, I.D.; CRESPO, M.D.P.; QUIROGA, J.; ABONIA, R.; MONTOYA, A.; SVETAZ, L.; ZACCHINO, S.; INSUASTY, B. Synthesis of novel quinoline-based 4,5-dihydro-1H-pyrazoles as potential anticancer, antifungal, antibacterial and antiprotozoal agents. **European Journal of Medicinal Chemistry**, v. 13, p 237-254, 2017.

RAZMI, A.; ZARGHI, A.; ARFAEE, S.; NADERI, N.; FAIZI, M. Evaluation of Anti-nociceptive and Anti-inflammatory Activities of Novel Chalcone Derivatives. **Iranian Journal of Pharmaceutical Research**, v. 12, p. 153-159, 2013.

REINISCH, A.; CHAN, S. M.; TOMAS, D.; MAJETI, R. Biology and Clinical Relevance of Acute Myeloid Leukemia Stem Cells. **Seminars in Hematology**, v. 15, n. 2, 2015.

RETIEF, F. P.; CILLIERS, L. Breast cancer in antiquity. **SAMJ: South African Medical Journal**, v. 101, n. 8, 2011.

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

RODRIGUES, J. S. M.; FERREIRA, N. M. L. A. Caracterização do perfil epidemiológico do Câncer em umacidade do interior Paulista: conhecer para intervir. **Revista Brasileira de Cancerologia**, v. 56, n. 4, p. 431-441, 2010.

ROY, A.; BANERJEE, S. p27 and leukemia: cell cycle and beyond. **Journal of Cellular Physiology**, v. 230, n. 3, p. 504-509, 2015.

ROZMER, Z.; BERKI, T.; MAÁSZ, G.; PERJÉSI, P. Different effects of two cyclic chalcone analogues on redox status of Jurkat T cells. **Toxicology in Vitro**, v. 28, p. 1359-1365, 2014.

RUMJANEK, V. M.; VIDAL, R. S.; MAIA, R. C. Multidrug resistance in chronic myeloid leukaemia: how much can we learn from MDR–CML cell lines?. **Bioscience Reports**, v. 33, n. 6, 2013.

SAFARZADEG, W.; SHOTORBANI, S. S.; BARADARAN, B. Herbal Medicine as Inducers of Apoptosis in Cancer Treatment. **Advanced Pharmaceutical Bulletin**, v. 4, n. 1, p. 421-426, 2014.

SAFTA, B.; ZIANI, L.; FAVRE, L.; LAMENDOUR, L.; GROS, G.; MAMI-CHOUAIB, F.; MARTINVALET, D.; THIERY, J. Granzyme B-activated p53 interacts with Bcl-2 to promote cytotoxic lymphocyte-mediated apoptosis. **Journal of Immunology**, v. 194, n. 1, p. 418-428, 2015.

SAHU, P.; KASHAW, S.K.; JAIN, S.; SAU, S.; IYER, A.K. Assessment of penetration potential of pH responsive double walled biodegradable nanogels coated with eucalyptus oil for the controlled delivery of 5-fluorouracil: In vitro and ex vivo studies. **Journal of Controlled Release**, v. 253, p. 122-136, 2017.

SAKAMOTO, W.; TAKAMI, T. Nucleases in higher plants and their possible involvement in DNA degradation during leaf senescence. **Journal of Experimental Botany**, v. 64, n. 14, p. 3835-3843, 2014.

SALEM, N.; MSAADA, K.; ELKAHOUI, S.; MANGANO, G.; AZAEIZ, S.; BEM SLIMEN, I.; KEFI, S.; PINTORE, G.; LIMAM, F.; MARZOUK, B. Evaluation of antibacterial, antifungal, and antioxidant activities of safflower natural dyes during flowering. **Biomed Research International**, v. 10, 2014.

SALOMONI, P.; DVORKINA, M.; MICHOD, D. Role of the promyelocytic leukaemia protein in cell death regulation. **Cell Death and Disease**, v. 3, n. 1, 2012.

SALSMAN, J.; RAPKIN, L.M.; MARGAM, N.N.; DUNCAN, R.; BAZETT-JONES, D.P.; DELLAIRE, G. Myogenic differentiation triggers PML nuclear body loss and DAXX relocalization to chromocentres. **Cell Death and Disease**, v. 8, n. 3, p. 2724-2734, 2017.

SALUM, L. B.; ALTEI, W. F.; CHIARADIA, L. D.; CORDEIRO, M. N. S.; CANEVAROLO, R. R.; MELO, C. P. S.; WINTER, E.; MATTEI, B.; DAGHESTANI, H. N.; SANTOS-SILVA, M. C.; CRECZYNSKI-PASA, T. B.; YUNES, R. A.; YUNES, J. A.; ANDRICOPULO, A. D.; DAY, B. W.; NUNES, R. J. VOT, A. Cytotoxic 3,4,5-trimethoxychalcones as mitotic arresters and cell migration inhibitors. **European Journal of Medicinal Chemistry**, v. 63, 2013.

- SANO, R.; REED, J.C. ER stress-induced cell death mechanisms. **Biochimica et Biophysica Acta**, v. 1833, n. 12, p. 3460-3470, 2013.
- SASHIDHARA, K.V.; RAO, K.B.; KUSHWAHA, P.; MODUKURI, R.K.; SINGH, P.; SONI, I.; SHUKLA, P.; CHOPRA, S. PASUPULETI, M. Novel Chalcone-Thiazole Hybrids as Potent Inhibitors of Drug Resistant Staphylococcus aureus. **ASC Medicinal Chemistry Letters**, v. 6, n. 7, p. 809-813, 2015.
- SAULTZ, J. N.; GARZON, R. Acute Myeloid Leukemia: A Concise Review. **Journal of Clinical Medicine**, v. 5, n. 3, 2016.
- SCHNERCH, D.; YALCINTEPE, J.; SCHMIDTS, A.; BECKER, H.; FOLLO, M.; ENGELHARDT, M.; WÄSCH, R. Cell cycle control in acute myeloid leukemia. **American Journal of Cancer Research**, v. 2, n. 5, p. 508-528, 2012.
- SCHREIBER, R.D.; OLD, L.J.; SMYTH, M.J. Cancer Immunoediting: Integrating Immunity's Roles in Cancer Suppression and Promotion. **Science**, v.331, 2011.
- SHAKHATREH, M.A.; AL-SMADI, M.L.; KHABOUR, O.F.; SHUAIBU, F.A.; HUSSEIN, E.I.; ALZOUBI, K.H. Study of the antibacterial and antifungal activities of synthetic benzyl bromides, ketones, and corresponding chalcone derivatives. **Drug Design, Development and Therapy**, v. 8, p. 3653-3660, 2016.
- SINGH, A.; RANI, A.; GUT, J.; ROSENTHAL, P.J.; KUMAR, V. Piperazine-linked 4-aminoquinoline-chalcone/ferrocenyl-chalcone conjugates: Synthesis and antiplasmodial evaluation. **Chemical Biology & Drug Design**, 2017 [Epub ahead of print].
- SIDOW, A.; SPIES, N. Concepts in solid tumor evolution. **Trends in Genetics**, v. 31, n. 4, p. 208-214, 2015.
- SIEGEL, R. L.; MILLER, K. D.; JEMAL, A. Cancer statistics, 2016. CA: **A Cancer Journal for Clinicians**, v. 66, n. 1, p. 7-30, 2016.
- SIKANDER, M.; MALIK, S.; YADAV, D.; BISWAS, S.; KATARE, D. P.; JAIN, S.K. Cytoprotective Activity of a Trans-chalcone Against Hydrogen Peroxide Induced Toxicity in Hepatocellular Carcinoma (HepG2) Cells. **Asian Pacific Journal of Cancer Prevention**, v. 12, p. 2513-2516, 2011.
- SILVA, L. T.; COSTA, G.M.; STOCO, P.H.; SCHENKEL, E.P.; REGINATTO, F.H.; SIMÕES, C.M.O. In vitro antiherpes effects of a C-glycosylflavonoid-enriched fraction of *Cecropia glaziovii* Sneth. **Letters in Applied Microbiology**, v. 51, n. 2, p. 143-148, 2010.
- SINGH, S., AWASTHI, M., PANDEY, V.P., DWIVEDI, U. Natural Products as Anticancerous Therapeutic Molecules with Special Reference to Enzymatic Targets

Topoisomerase, COX, LOX and Aromatase. **Current Protein & Peptide Science**, 2017 [Epub ahead of print].

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

SMITH, A.; HOWELL, D.; PATMORE, R.; JACK A.; ROMAN, E. Incidence of haematological malignancy by sub-type: a report from the Haematological Malignancy Research Network. **British Journal of Cancer**, v. 105, 2011.

SMITH, P.; KKOHN, R.; HERMANSON, G., MALLIA, A., GARTNET, F., PROVENZANO, M. Measurement of protein using bicinchoninic acid. **Annals of Biochemistry**, v. 150, p. 76-85, 1985.

SOBRAL, M.; PROENÇA, C.; SOUZA, M.; MAZINE, F.; LUCAS, E. Myrtaceae in Lista de Espécies da Flora do Brasil. Jardim Botânico do Rio de Janeiro. Disponível em: <http://floradobrasil.jbrj.gov.br/jabot/floradobrasil/FB10414>. Acesso em: 16 de junho de 2017.

SONG, S.; JEONG, J. Y.; JEONG, S. H.; KIM, H. K.; KO, K. S.; RHEE, B. D.; KIM, N.; HAN, J. Mitochondria as therapeutic targets for cancer stem cells. **World Journal of Stem Cells**, v. 7, n. 2, p. 418-427, 2015.

SORIANO, J.; MORA-ESPÍ, I.; ALEA-REYES, M.E.; PÉREZ-GARCÍA, L.; BARRIOS, L.; INAÑES, E.; NOGUÉS, C. Cell Death Mechanisms in Tumoral and Non-Tumoral Human Cell Lines Triggered by Photodynamic Treatments: Apoptosis, Necrosis and Parthanatos. **Science Reports**, v. 7, p. 23-41, 2017.

STEWART, B. W.; WILD, C. P., editors. World Cancer Report 2014. Lyon, France: **International Agency for Research on Cancer**, 2014.

STRONG, V. E. (Ed). Gastric Cancer: Principles and Practice. 1<sup>a</sup> Ed. Cham: **Springer International Publishing**, 2015.

SURYADEVARA, C. M.; GEDEON, P. C.; SANCHEZ-PEREZ, L.; VERLA, T.; ALVAREZ-BRECKENRIDGE, C. ; CHOI, B. D.; FECCI, P. E.; SAMPSON, J. H. Are BiTEs the "missing link" in cancer therapy? **Oncimmunology**, v. 4, n 6, 2015.

SUZUKI-KARASAKI, Y.; SUZUKI-KARASAKI, M.; UCHIDA, M.; OCHIAI, T. Depolarization Controls TRAIL-Sensitization and Tumor-Selective Killing of Cancer Cells: Crosstalk with ROS. **Frontiers in Oncology**, v. 4, p. 128-138, 2014.

SWERDOLW, S. H.; CAMPO, E.; HARRIS, N. L.; JAFFE, E.S; PILERI, S.A.; STEIN, H.; THIELE, J.; VARDIMAN, J.W. WHO Classification of tumours of haematopoietic and lymphoid tissues. 4. Lyon: **IARC**, 2008.

SWERDOLW, S. H.; CAMPO, E.; PILERI, S.A.; HARRIS, N. L.; STEIN, H.; SIEBERT, S.; ADVANI, R.; GHIELMINI, M.; SALLES, G.A.; ZELENETZ, A.D.; JAFFE, E.S. The 2016 revision of the World Health Organization classification of lymphoid neoplasms. **Blood**, v. 127, n.20, p. 2375-2390, 2016.

SZWED, M.; LAROCHE-CLARY, A.; ROBERT, J.; JOZWIAK, Z. Induction of apoptosis by doxorubicin-transferrin conjugate compared to free doxorubicin in the human leukemia cell lines. **Chemico-Biological Interactions**, v. 220, 2014.

TAKEBE, N.; MIELE, L.; HARRIS, P. J.; JEONG, W.; BANDO, H.; KAHN, M.; YANG, S. X.; IVY, P. Targeting Notch, Hedgehog, and Wnt pathways in cancer stem cells: clinical update. **Natural Reviews Clinical Oncology**, v. 12, 2015.

TAN, B. S.; TIONG, K. H.; CHOO, H. L.; FEI-LEI, C. F.; HJI, L. W.L; TAN, S. H.; YAP, I. K.; PANI, S.; KHOR, N. T.; WONG, S. F.; ROSLI, R.; CHEONG, S. K.; LEONG, C. O. Mutant p53-R273H mediates cancer cell survival and anoikis resistance through AKT-dependent suppression of BCL2-modifying factor (BMF). **Cell Death and Disease**, v. 1826, 2015.

TAN, E.P.; DUNCAN, F.E.; SLAWSON, C. The sweet side of the cell cycle. **Biochemical Society Transactions**, v. 45, n. 2, p. 313-322, 2017.

TENG, Y.; WANG, L.; LIU, H.; YUAN, Y.; ZHANG, Q.; WU, M.; WANG, L.; LIU, Z.; YU, P. 3'-Geranyl-mono-substituted chalcone Xanthoangeloyl induces apoptosis in human leukemia K562 cells via activation of mitochondrial pathway. **Chemico-biological Interactions**, v. 261, p. 103-107, 2017.

TENNANT, J.R. Evaluation of the trypan blue technique for determination of cell viability. **Transplantation**, v. 2, p. 685-694, 1964.

TESTA, U. Leukemia stem cells. **Annals of Hematology**, v. 90, n. 3, 2011.

THOMAS, E.; BUCKNER, C.; CLIFT, R.; FEFER, A.; JOHNSON, F.; NEIMAN, P.; SALE, G.E.; SANDERS, J. E.; SINGER, J. W.; SHULMAN, H.; STORB, R.; WEIDEN, P.L. Marrow transplantation for acute nonlymphoblastic leukemia in first remission. **The New England Journal of Medicine**, v. 301, n. 11, , 1979.

USMANI, S. Z.; RODRIGUEZ-OTERO, P.; BHUTANI, M.; MATEOS, M. V.; MIGUEL, J. S.; Defining and treating high-risk multiple myeloma. **Leukemia**, v. 29, n. 11, p. 2119-2125, 2015.

VARDIMAN, J. W. The World Health Organization (WHO) classification of tumors of the hematopoietic and lymphoid tissues: an overview with emphasis on the myeloid neoplasms. **Chemico-Biological Interactions**, v. 184, n. 1-2, 2010.

- VASEKAR, M.; RIZVI, S.; LIU, X.; VRANA, K. E.; ZHENG, H. Novel Immunotherapies for Hematological Malignancies. **Current Molecular Pharmacology**, v. 9, n. 3, p. 264-271, 2016.
- VILLALBA, M.; LOPES-ROYUELA, N.; KRZYWINSKA, E.; RATHORE, M. G.; HIPSKIND, R. A.; HAOUAS, H.; ALLENDE-VEGA, N. Chemical metabolic inhibitors for the treatment of blood-borne cancers. **Anticancer Agents in Medicinal Chemistry**, v. 14, n. 2, p. 223-232, 2014.
- VITOROVIC-TODOROVIC, M. D.; ERIC-NIKOLIC, A.; KOLUNDZIJA, B.; HAMEL, E.; RISTIC, S.; JURANIC, I. O.; DRAKULIC, B. J. (E)-4-aryl-4-oxo-2-butenic acid amides, chalcone-aroylacrylic acid chimeras: design, antiproliferative activity and inhibition of tubulin polymerization. **European Journal of Medicinal Chemistry**, v. 62, p. 40-50, 2013.
- VOLPE, E.; SAMBUCCI, M.; BATTISTINI, L.; BORSELLINO, G. Fas-Fas Ligand: Checkpoint of T Cell Functions in Multiple Sclerosis. **Frontiers in Immunology**, v. 7, p. 382-392, 2016.
- WAN, Z.; HU, D.; LI, P.; XIE, D.; GAN, X. Synthesis, Antiviral Bioactivity of Novel 4-Thioquinazoline Derivatives Containing Chalcone Moiety. **Molecules**, v. 20, n. 7, p. 11861-11874, 2015.
- WANG, C. Z.; CALWAY, T.; YUAN, C. S. Herbal medicines as adjuvants for cancer therapeutics. **The American Journal of Chinese Medicine**, v.40, n.4, 2012.
- WANG, H. M.; ZHANG, L.; LIU, J.; YANG, Z. L.; ZHAO, H. Y.; YANG, Y.; SHEN, D.; LU, K.; FAN, Z. C.; YAO, Q. W.; ZHANG, Y. M.; TENG, Y. O.; PENG, Y. Synthesis and anti-cancer activity evaluation of novel prenylated and geranylated chalcone natural products and their analogs. **European Journal of Medicinal Chemistry**, v. 92, p. 439-448, 2015.
- WANG, W.; STIEHL, T.; RAFFEL, S.; HOANG, V. T.; HOFFMANN, I.; POISA-BEIRO, L.; SAEED, B. R.; BLUME, R.; MANTA, L.; ECKSTEIN, V.; BOCHTLER, T.; WUCHTER, P.; ESSERS, M.; JAUCH, A.; TRUMPP, A.; MARCINIAK-CZOCHRA, A.; HO, A.D.; LUTZ, C. Reduced hematopoietic stem cells frequency predicts outcome in acute myeloid leukemia. **Haematologica**, 2017 [Epub ahead of print]
- WANI, M. C.; TAYLOR, H. L.; WALL, M. E.; COGGON, P.; MCPHAIL, A. T. Plant antitumor agents. VI. Isolation and structure of taxol, a novel antileukemic and antitumor agent from *Taxus brevifolia*. **Journal of American Chemical Society**, v. 93, n. 9, p. 2325-2327, 1971.
- WEINBERG, O.K.; SEETHARAM, M.; REN, L.; SEO, K.; MA, L.; MERKER, J.D.; GOTLIB, J.; ZEHNDER, J.L., ARBER, D.A. Clinical characterization of



acute myeloid leukemia with myelodysplasia-related changes as defined by the 2008 WHO classification system. **Blood**, v. 113, n. 9, p. 1906-1908, 2009.

WESTOVER, D.; LING, X.; LAM, H.; WELCH, J.; JIN, C.; CONGORA, C.; DEL RIO, M.; WANI, M.; LI, F. FL118, a novel camptothecin derivative, is insensitive to ABCG2 expression and shows improved efficacy in comparison with irinotecan in colon and lung cancer models with ABCG2-induced resistance. **Molecular Cancer**, v. 92, 2015.

WIMAN, K.G.; ZHIVOTOVSKY, B. Understanding cell cycle and cell death regulation provides novel weapons against human diseases. **Journal of Internal Medicine**, v. 281, n. 5, p. 483-495, 2017.

WOO, S.M.; KWON, S.C.; KO, S.G.; CHO, S.G. Barley grass extract causes apoptosis of cancer cells by increasing intracellular reactive oxygen species production. **Biomedical Reports**, v. 6, n. 6, p. 681-685, 2017.

WORLD HEALTH ORGANIZATION. WHO Traditional Medicine Strategy: 2014-2023. Disponível em: <http://who.int/medicines/areas/traditional/en/>. Acesso em: 15 de junho de 2017.

XIA, R.Y.; ZHANG, R.R.; JIANG, Z.; SUN, Y.J.; LIU, J.; CHEN, F.H.  $K_9(C_4H_4FN_2O_2)_2Nd(PW_{11}O_{39})_2 \cdot 25H_2O$  induces apoptosis in human lung cancer A549 cells. **Oncology Letters**, v. 13, n. 3, p. 1348-1352, 2017.

XU, Q.; CHEN, C.; LIN, AN.; XIE, Y. Endoplasmic reticulum stress-mediated membrane expression of CRT/ERp57 induces immunogenic apoptosis in drug-resistant endometrial cancer cells. **Oncotarget**, 2017 [Epub ahead of print].

YADAV, V.; VARSHNEV, P.; SULTANA, S.; YADAV, J.; SAINI, N. Moxifloxacin and ciprofloxacin induces S-phase arrest and augments apoptotic effects of cisplatin in human pancreatic cancer cells via ERK activation. **BMC Cancer**, v. 581, 2015.

YE, Y.; ZHANG, T.; YUAN, H.; LI, D.; LOU, H.X.; FAN, P. Mitochondria-targeted lupane triterpenoid derivatives and their selective apoptosis-inducing anticancer mechanisms. **Journal of Medicinal Chemistry**, 2017 [Epub ahead of print].

YONG, W. K.; ABD MALEK, S. N. Xanthohumol induces growth inhibition and apoptosis in ca ski human cervical cancer cells. Evidence-Based Complementary **Alternative Medicine**, v. 2015, p. 921-936, 2015.

YONG, W.K.; HO, Y.F.; MALEK, S.N. Xanthohumol induces apoptosis and S phase cell cycle arrest in A549 non-small cell lung cancer cells. **Pharmacognosy Magazine**, V.11, N.2, P. 275-283, 2015.

YU, Y.; LI, J.; ZHU, X.; TANG, X.; BAO, Y.; SUN, X.; HUANG, Y.; TIAN, F.; LIU, X.; YANG, L. Humanized CD7 nanobody-based immunotoxins exhibit promising anti-T-cell acute lymphoblastic leukemia potential. **International Journal of Nanomedicine**, v. 12, p. 1969-1983, 2017.

ZARITSKY, A.; WOLDRINGH, C. L. Chromosome replication, cell growth, division and shape: a personal perspective. **Frontiers in Microbiology**, v.6, 2015.

ZATELLI, G. A. **Investigação Fitoquímica e Biológica de *Eugenia hiemalis Cambessèdes* (Myrtaceae)** 2015. 219 (Mestrado). Programa de Pós-Graduação em Farmácia, Universidade Federal de Santa Catarina, Florianópolis.

ZHAN, M.; BROOKS, C.; LIU, F.; SUN, L.; DON, Z. Mitochondrial dynamics: regulatory mechanisms and emerging role in renal pathophysiology. **Kidney International**, v. 83, n. 4, p 568-581, 2013.

ZHANG, B.; DUAN, D.; GE, C.; YAO, J.; LIU, Y.; LI, X.; FANG, J. Synthesis of xanthohumol analogues and discovery of potent thioredoxin reductase inhibitor as potential anticancer agent. **Journal of Medicinal Chemistry**, v. 58, n.2, 2015.

ZHANG, D.; TANG, B.; XIE, X.; XIAO, Y. F.; YANG, S. M.; ZHANG, J. W. The interplay between DNA repair and autophagy in cancer. **Cancer Biology & Therapy**, v. 16, n. 7, p. 1005-1013, 2015.

ZHAO, W.; FOGG, D. K.; KAPLAN, M. J. A novel image-based quantitative method for the characterization of Netosis. **Journal of Immunology Methods**, v. 423, p. 104-110, 2015.

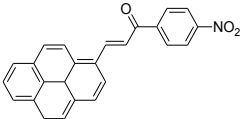
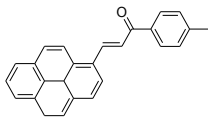
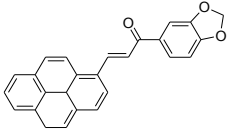
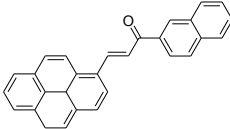
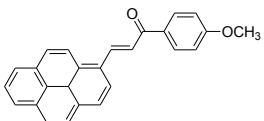
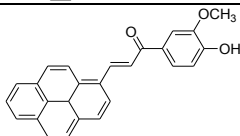
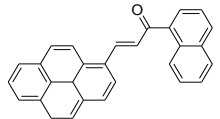
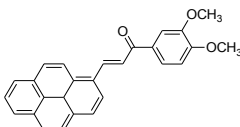
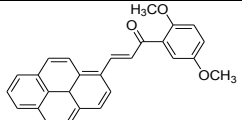
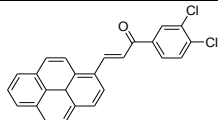
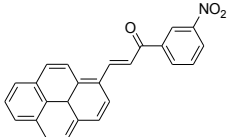
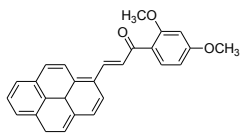
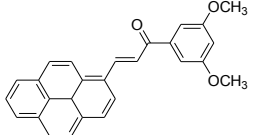
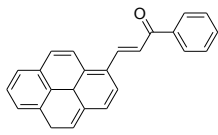
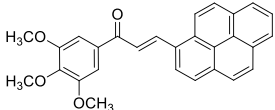
ZHAO, Y.; HU, X.; LIU, Y.; DONG, S.; WEN, Z.; HE, W.; ZHANG, S.; HUANG, Q.; SHI, M. ROS signaling under metabolic stress: cross-talk between AMPK and AKT pathway. **Molecular Cancer**, v. 16, p. 79-89, 2017.

ZHENG, Y.; WANG, X.; CAO, S.; REN, G.; LIU, H.; CHEN, X. Synthesis and antifungal activity of chalcone derivatives. **Natural Products Research**, v. 29, n. 19, p. 1804-1810, 2015.

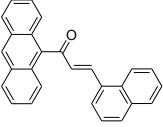
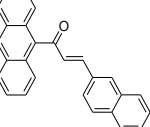
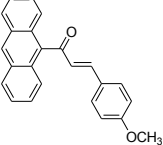
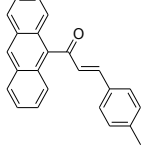
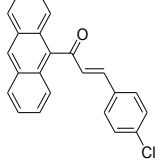
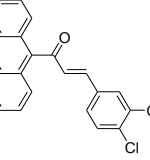
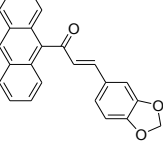
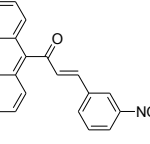
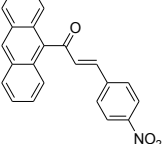
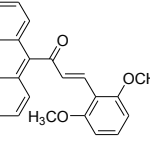
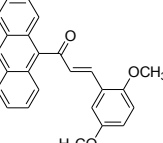
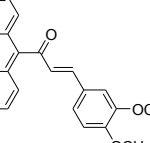
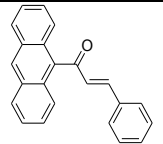
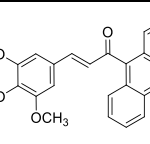
ZOUBOULIS, C.C. Further Evidence of Sebaceous Differentiation Uniqueness: Holocrine Secretion of Sebocytes Is a Multistep, Cell-Specific Lysosomal DNase2-Mediated Mode of Programmed Cell Death. **The Journal of Investigative Dermatology**, v. 137, n. 3, p. 537-539, 2017.

## APÊNDICE 1 – Estrutura química das chalconas

Série PY (chalconas derivadas do aldeído do pireno)

Chalcona MM (g/mol)	Estrutura	Chalcona MM (g/mol)	Estrutura
<b>PY1</b> 379,41		<b>PY2</b> 348,44	
<b>PY3</b> 378,42		<b>PY4</b> 348,47	
<b>PY5</b> 364,44		<b>PY6</b> 380,44	
<b>PY7</b> 348,47		<b>PY8</b> 394,46	
<b>PY9</b> 394,46		<b>PY10</b> 403,30	
<b>PY11</b> 379,41		<b>PY12</b> 394,46	
<b>PY13</b> 394,46		<b>PY14</b> 334,41	
<b>PY15</b> 422,47			

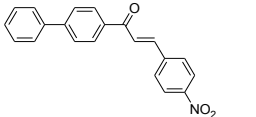
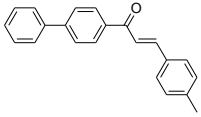
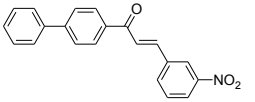
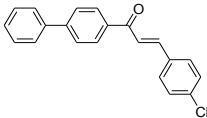
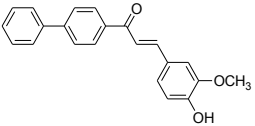
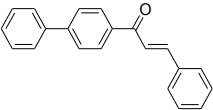
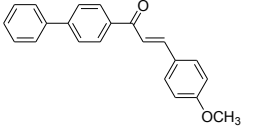
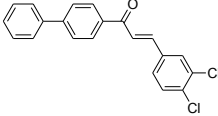
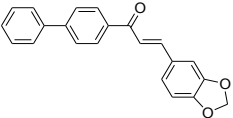
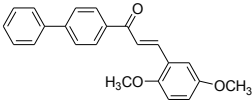
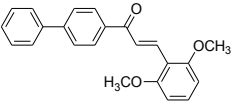
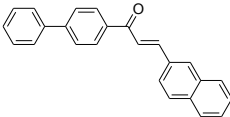
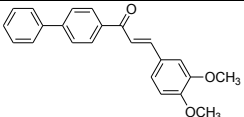
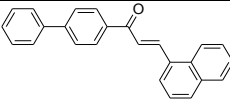
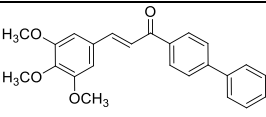
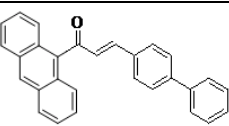
## Série AN (chalconas derivadas da acetofenona do antraceno)

Chalcona MM (g/mol)	Estrutura	Chalcona MM (g/mol)	Estrutura
AN1 358,4		AN2 358,4	
AN3 338,4		AN4 322,4	
AN5 342,8		AN6 377,2	
AN7 352,8		AN8 353,3	
AN9 353,3		AN10 368,4	
AN11 368,4		AN12 368,4	
AN13 308,3		AN15 398,45	

## Série KP (chalconas derivadas do aldeído do antraceno)

Chalcona MM (g/mol)	Estrutura	Chalcona MM (g/mol)	Estrutura
<b>KP01</b> 320,38		<b>KP02</b> 353,37	
<b>KP03</b> 368,42		<b>KP04</b> 368,42	
<b>KP05</b> 368,42		<b>KP07</b> 368,42	
<b>KP09</b> 358,13		<b>KP10</b> 353,37	
<b>KP12</b> 354,39		<b>KP13</b> 352,11	
<b>KP14</b> 398,45			

## Série JE (chalconas derivadas da acetofenona bifeníl)

Chalcona MM (g/mol)	Estrutura	Chalcona MM (g/mol)	Estrutura
<b>JE2</b> 329,35		<b>JE3</b> 298,38	
<b>JE4</b> 329,3		<b>JE5</b> 318,8	
<b>JE6</b> 331,3		<b>JE7</b> 284,4	
<b>JE8</b> 314,4		<b>JE9</b> 353,24	
<b>JE10</b> 328,37		<b>JE11</b> 344,4	
<b>JE13</b> 344,4		<b>JE15</b> 334,4	
<b>JE16</b> 344,4		<b>JE17</b> 334,4	
<b>JE18</b> 374,43		<b>JEKP</b> 384,48	

## Série JA (chalconas derivadas do aldeído bifenil)

Chalcona MM (g/mol)	Estrutura	Chalcona MM (g/mol)	Estrutura
JA1 284,4		JA2 329,4	
JA3 344,4		JA4 318,8	
JA5 329,4		JA6 328,4	
JA7 374,4		JA8 314,4	
JA9 353,3		JA10 360,5	
JA11 344,4		JA12 344,4	
JA13 344,43		JA14 298,40	





## APÊNDICE 2 – Parecer do Comitê de Ética em Pesquisa com Seres Humanos da Universidade Federal de Santa Catarina

UNIVERSIDADE FEDERAL DE  
SANTA CATARINA - UFSC



### PARECER CONSUBSTANCIADO DO CEP

#### DADOS DO PROJETO DE PESQUISA

**Título da Pesquisa:** Análise da expressão de marcadores celulares em indivíduos adultos saudáveis para auxílio no diagnóstico de hemopatias

**Pesquisador:** Maria Cláudia Santos da Silva

**Área Temática:**

**Versão:** 4

**CAAE:** 22406413.5.0000.0121

**Instituição Proponente:** Universidade Federal de Santa Catarina

**Patrocinador Principal:** Financiamento Próprio

#### DADOS DO PARECER

**Número do Parecer:** 746.486

**Data da Relatoria:** 11/08/2014

#### Apresentação do Projeto:

"Análise da expressão de marcadores celulares em indivíduos adultos saudáveis para auxílio no diagnóstico de hemopatias". Projeto que visa criar um banco de imagens de referência com fins de comparação diagnóstica em doenças hematológicas, a partir de indivíduos considerados saudáveis, a fim de estudar as doenças possíveis de serem diagnosticadas pela citometria de fluxo que resulta de uma mutação somática adquirida no gene PIG-A localizado no braço curto do cromossomo X (Xp22.1), relacionado à biossíntese de glicosil-fosfatidil-inositol (GPI), um fosfolípide acrescentado a determinadas proteínas logo após a sua tradução, para fixa-las à parte externa da membrana celular, como uma âncora de proteínas de superfície.

#### Objetivo da Pesquisa:

Criação de um banco de imagens de referência com fins de comparação diagnóstica em doenças hematológicas, a partir de indivíduos considerados saudáveis.

#### Avaliação dos Riscos e Benefícios:

Segundo os pesquisadores não existem riscos, pois não haverá duas coletas, será aproveitado o mesmo sangue colhido para os exames laboratoriais realizados na amostra para a doação de sangue, desta forma não há nenhum desconforto adicional.

**Endereço:** Campus Universitário Reitor João David Ferreira Lima  
**Bairro:** Trindade **CEP:** 88.040-900  
**UF:** SC **Município:** FLORIANOPOLIS  
**Telefone:** (48)3721-9206 **Fax:** (48)3721-9696 **E-mail:** cep@reitoria.ufsc.br

Continuação do Parecer: 746.486

**Comentários e Considerações sobre a Pesquisa:**

Trata o presente de um projeto de pesquisa coordenado pela Profª. Drª. Maria Cláudia Santos da Silva do Departamento de Análises Clínicas da UFSC e tem como objetivo criar um banco de imagens de referência com fins de comparação diagnóstica em doenças hematológicas, a partir de indivíduos considerados realizarem a coleta da amostra de sangue periférico, os doadores serão examinados e entrevistados por um profissional da saúde. No exame físico, os doadores serão avaliados quanto à temperatura corporal, o peso, a altura, a pressão arterial, o pulso e a quantificação de hemoglobina capilar. A entrevista será realizada de acordo com os parâmetros para a seleção dos doadores estabelecidos pelo Ministério da Saúde pela Portaria MS nº 1.353 de 13 de junho de 2011 e pela Resolução RDC nº 57 de 16 de dezembro de 2010. O projeto se encontra devidamente instruído, documentação completa e TCLE adequado aos participantes, estando portanto de acordo com a Resolução CNS nº466/12 e normas complementares. Assim, recomendamos a sua aprovação.

**Considerações sobre os Termos de apresentação obrigatória:**

Documentação completa.

**Recomendações:**

Não se aplica.

**Conclusões ou Pendências e Lista de Inadequações:**

Não foram detectadas pendências ou inadequações neste projeto.

**Situação do Parecer:**

Aprovado

**Necessita Apreciação da CONEP:**

Não

**Considerações Finais a critério do CEP:**

FLORIANOPOLIS, 11 de Agosto de 2014

---

Assinado por:  
Washington Portela de Souza  
(Coordenador)

Endereço: Campus Universitário Reitor João David Ferreira Lima  
Bairro: Trindade CEP: 88.040-900  
UF: SC Município: FLORIANOPOLIS  
Telefone: (48)3721-0209 Fax: (48)3721-0906 E-mail: cep@reitoria.ufsc.br