

Amanda Virtuoso Jacques

**AVALIAÇÃO DO EFEITO CITOTÓXICO DE CHALCONAS
SINTÉTICAS DERIVADAS DO 4-CARBOXIBENZALDEÍDO E
DA 1-NAFTILACETOFENONA SOBRE CÉLULAS DE
LINHAGEM DE LEUCEMIAS AGUDAS E OS MECANISMOS
DE TRANSDUÇÃO DE SINAIS ENVOLVIDOS**

Tese submetida ao Programa de Pós-Graduação em
Farmácia da Universidade Federal de Santa
Catarina para a obtenção do Grau de Doutor em
Farmácia na área de Concentração de Análises
Clínicas
Orientador: Prof^ª. Dra. Maria Cláudia Santos da
Silva

Florianópolis
2018

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

Jacques, Amanda Virtuoso
AVALIAÇÃO DO EFEITO CITOTÓXICO DE CHALCONAS
SINTÉTICAS DERIVADAS DO 4-CARBOXIBENZALDEÍDO E DA 1
NAFTILACETOFENONA SOBRE CÉLULAS DE LINHAGEM DE
LEUCEMIAS AGUDAS E OS MECANISMOS DE TRANSDUÇÃO DE
SINAIS ENVOLVIDOS / Amanda Virtuoso Jacques ;
orientador, Maria Cláudia Santos da Silva, 2018.
136 p.

Tese (doutorado) - Universidade Federal de Santa
Catarina, Centro de Ciências da Saúde, Programa de
Pós-Graduação em Farmácia, Florianópolis, 2018.

Inclui referências.

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

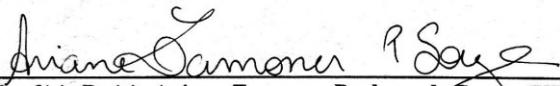
“Avaliação do Efeito Citotóxico de Chalconas Sintéticas Derivadas do 4-carboxibenzaldeído e da 1-naftilacetofenona sobre Células de Linhagem de Leucemias Agudas e os Mecanismos de Transdução de Sinais Envolvidos”

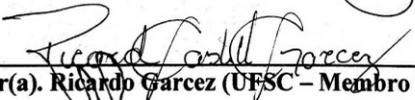
POR

Amanda Virtuoso Jacques

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

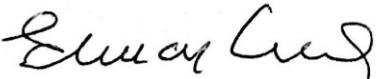
Banca Examinadora:


Prof(a). Dr(a). Ariane Zamonera Pacheco de Souza (UFSC – Membro Titular)


Prof(a). Dr(a). Ricardo Garcez (UFSC – Membro Titular)


Prof(a). Dr(a). Loreia Santos Bubniak (SES-SC – Membro Titular)


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


Prof(a). Dra. Elenara Maria Teixeira Lemos Senna
Coordenadora do Programa de Pós-Graduação em Farmácia da UFSC

Florianópolis, 10 de agosto de 2018.

Dedico este trabalho a Deus e a Espiritualidade que me amparam pela oportunidade de viver em constante aprendizado, amor, fé e caridade; à minha amada mãe Valéria; ao orgulho da minha vida, meu irmão Guilherme; e ao meu padrasto Cláudio por serem minha motivação e minha razão de viver.

AGRADECIMENTOS

A Deus e a Espiritualidade que me guiam, iluminam, direcionam meus caminhos, me fortalecem e me fazem ter fé na vida e a esperança de dias melhores e repletos de oportunidades. À minha mãe, minha alma gêmea, pela educação de excelência, incentivo, confiança, amor e por nunca ter desistido de mim. Ao meu irmão Guilherme a quem tenho como um filho, a quem ensinei as primeiras palavras e que hoje está conquistando o mundo: você é o meu maior presente, és o meu orgulho. Ao meu padrasto Cláudio, meu segundo pai, aquele que Deus em sua infinita bondade colocou em nossas vidas. Ao meu pai José Roberto por ter sido meu herói, sempre te amarei. A toda a minha família, avós, tios, tias, primos e primas que sempre torceram por mim. Agradeço especialmente à Camila e à Mallan, que além de primas são minhas melhores amigas e fazem de nossos momentos únicos, repleto de cumplicidade, lealdade e amor. À minha avó Anália por ter sido uma mãe para mim e para o Gui. Não há palavras suficientes para que eu possa demonstrar todo o meu amor, gratidão e admiração por vocês! À minha família espiritual que sempre me apoiou, incentivou e me deu o direcionamento para que eu desse o melhor de mim nesta etapa. À minha orientadora, Prof^{ta} Dr^a Maria Cláudia Santos da Silva, por todas as oportunidades, pelos ensinamentos, atenção, dedicação, carinho e preocupação para que eu concluísse com êxito este trabalho. A todos os colegas de laboratório, pelos agradáveis anos de convivência e parcerias. Agradeço de forma especial à Lorena por ter me “apresentado” o fascinante mundo da cultura celular ao Álisson, à Daiane e à Mariana por todos os experimentos que realizamos juntos. À Manoela por todas as palavras de incentivo, apoio, abraços e risadas. À Natália, não só pelas atividades realizadas juntas no laboratório, mas pela cumplicidade, pelos inúmeros conselhos, por ser essa menina amável, dedicada e uma verdadeira amiga que levarei para a vida. Ao Prof. Dr. Ricardo José Nunes, à Dra. Louise Domeneghini Chiaradia, ao doutorando Luiz Felipe Schmitz e à graduanda Dalila Rosmary Lovato Galli do Laboratório Estrutura e Atividade do Departamento de Química da UFSC, pela colaboração, síntese das chalconas utilizadas neste trabalho e auxílio nas discussões sobre a relação estrutura e atividade dos compostos. Ao Programa de Pós-Graduação em Farmácia, da Universidade Federal de Santa Catarina, à CAPES e ao CNPQ pelo financiamento da pesquisa e pela oportunidade de concluir mais uma etapa da minha formação. E enfim, a todos que, de alguma maneira, contribuíram para a realização deste trabalho. Muito obrigada a todos vocês!

RESUMO

As leucemias agudas são caracterizadas pela proliferação descontrolada de precursores hematopoiéticos na medula óssea e/ou nos tecidos linfóides que, posteriormente, atingem a circulação periférica e podem se infiltrar em outros sistemas orgânicos. Apesar dos novos protocolos de tratamento estabelecidos, a quimioterapia ainda é a terapia antileucêmica mais utilizada, entretanto a morbidade associada aos quimioterápicos é um obstáculo a ser superado. Desse modo, a meta dos pesquisadores e oncologistas tem sido a descoberta de fármacos antineoplásicos que tenham maior especificidade na indução de morte das células tumorais, com poucos ou insignificantes efeitos sobre células normais. Dentro desse contexto, as chalconas sintéticas constituem um grupo de compostos com ampla aplicabilidade na química medicinal, apresentando atividade antileucêmica. Assim, o objetivo do presente estudo foi avaliar a ação citotóxica de 24 chalconas sintéticas derivadas do 4-carboxibenzaldeído e 11 chalconas sintéticas derivadas da 1-naftilacetofenona sobre células de linhagem de leucemia mieloide aguda (K562) e de leucemia linfóide aguda (Jurkat) de origem humana, bem como os mecanismos de morte celular envolvidos. Dentre as 35 chalconas avaliadas pelo método do MTT, **R32**, **F07**, **F09** e **F10** foram as mais citotóxicas, e, por isso, foram selecionadas para os ensaios posteriores. Além disso, apresentaram certa seletividade pois não foram citotóxicas para células mononucleares de sangue periférico de indivíduos clinicamente saudáveis. Os resultados desse estudo permitem sugerir que as chalconas selecionadas possuem atividade citotóxica pela indução da apoptose (observada na microscopia com brometo de etídio e laranja de acridina, fragmentação de DNA e externalização da fosfatidilserina) por meio da ativação da apoptose intrínseca e extrínseca, além do envolvimento de alterações do potencial de membrana mitocondrial em ambas as linhagens celulares. A ativação da apoptose intrínseca parece estar relacionada com a diminuição da razão Bcl-2/Bax, aumento da expressão do fator indutor de apoptose (AIF) e diminuição da proteína antiapoptótica survivina. O envolvimento da apoptose extrínseca foi observado pelo aumento da expressão do receptor Fas (FasR). Em ambas as linhagens celulares houve o aumento de caspase-3. Além disso, as chalconas selecionadas não apresentaram efeito hemolítico significativo, não alteraram a agregação plaquetária e coagulação sanguínea e obedeceram a "regra de cinco" de Lipinski. Em conjunto, esses resultados sugerem que os compostos **R32**, **F07**, **F09** e **F10** são promissores no desenvolvimento de novos fármacos para o tratamento de leucemias agudas e devem ser avaliados em estudos complementares.

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

ABSTRACT

Acute leukemias are characterized by the uncontrolled proliferation of hematopoietic precursors in the bone marrow and / or lymphoid tissues that subsequently reach peripheral circulation and may infiltrate other organ systems. Although new treatment protocols have been established, chemotherapy is still the most common anti-leukemic intervention used, however, the morbidity associated with chemotherapeutic drugs is an obstacle to be overcome. Thus, the goal of researchers and oncologists has been the discovery of antineoplastic drugs that have higher specificity in the induction of cell death on tumor cells, with low or negligible effect on normal cells. In this context, synthetic chalcones constitute a group of compounds with broad application in medicinal chemistry that present anti-leukemic activity. Therefore, the objective of this study was to assess the cytotoxic action of 24 synthetic chalcones derived from 4-carboxybenzaldehyde, and 11 synthetic chalcones derived from (1-naphthyl)acetophenone over acute myeloid leukemia cell line (K562) and acute lymphoblastic leukemia cell line (Jurkat), both from human origin, as well as to investigate the mechanisms of cell death involved. From the 35 tested chalcones by MTT assay, **R32**, **F07**, **F09**, and **F10** were the more cytotoxic, and, therefore, were selected for further tests. Besides, they presented a considerable selectivity, since they were not cytotoxic to peripheral blood mononuclear cells from clinically healthy individuals. The results from this study suggest that the selected chalcones present cytotoxic activity by the induction of apoptosis (observed by microscopy with ethidium bromide and acridine orange, DNA fragmentation, and phosphatidylserine externalization) by the activation of extrinsic and intrinsic apoptosis, as well as the involvement of alterations in the mitochondrial membrane potential in both cell lines. The activation of intrinsic apoptosis seems to be related to the decreased Bcl-2/Bax ratio, increased expression of apoptosis-inducing factor (AIF) and decreased antiapoptotic protein survivin. The involvement of extrinsic apoptosis was observed by the increased expression of Fas receptor (FasR). In both cell lines there was an increase of caspase-3. Furthermore, the selected chalcones did not show a significant hemolytic effect, did not alter platelet aggregation and blood coagulation and obeyed Lipinski's rule of 5. Altogether, these results suggest that compounds **R32**, **F07**, **F09**, and **F10** are promising for the development of new drugs for the treatment of acute leukemias and should be evaluated in complementary studies.

Keywords: Acute leukemia, cytotoxicity, apoptosis, and chalcone.

LISTA DE ESQUEMAS

Esquema 1 - Apoptose extrínseca e intrínseca.	25
Esquema 2 - Fases do ciclo celular.	31
Esquema 3 - Síntese das chalconas.	37
Esquema 4 - Efeito da chalcona R32 sobre a célula K562.....	111
Esquema 5 - Efeito da chalcona R32 sobre a célula Jurkat.....	112
Esquema 6 - Efeito da chalcona F07 sobre a célula K562.	113
Esquema 7 - Efeito da chalcona F07 sobre a célula Jurkat.	114
Esquema 8 - Efeito da chalcona F09 sobre a célula K562.	115
Esquema 9 - Efeito da chalcona F09 sobre a célula Jurkat.	116
Esquema 10 - Efeito da chalcona F10 sobre a célula K562.	117
Esquema 11 - Efeito da chalcona F10 sobre a célula Jurkat.	118

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 - Núcleo fundamental das chalconas.....	33
Figura 2 - Triagem do efeito citotóxico das chalconas sintéticas derivadas do 4-carboxibenaldeído sobre células de linhagem de leucemia mieloide aguda K562 e de leucemia linfóide aguda Jurkat.....	56
Figura 3 - Triagem do efeito citotóxico das chalconas sintéticas derivadas do 1-naftilacetofenona sobre células de linhagem de leucemia mieloide aguda K562 e leucemia linfóide aguda Jurkat.....	65
Figura 4 - Curvas concentração e tempo resposta das chalconas sintéticas Q6MC, Q7VB, Q19MC e R32 frente a linhagem K562 e Jurkat.....	70
Figura 5 - Curvas concentração e tempo resposta das chalconas sintéticas F07, F09 e F10 frente a linhagem K562 e Jurkat.....	73
Figura 6 - Efeito citotóxico das chalconas R32, F07, F09 e F10 sobre células mononucleares de indivíduos clinicamente saudáveis.....	78
Figura 7 - Efeito hemolítico das chalconas R32, F07, F09 e F10.....	79
Figura 8 - Efeito das chalconas R32, F07, F09 e F10 sobre a agregação plaquetária.....	80
Figura 9 - Efeito das chalconas R32, F07, F09 e F10 sobre o tempo de protrombina (TP) e sobre o tempo de tromboplastina parcial ativada (TTPa).....	81
Figura 10 - Efeito das chalconas R32, F07, F09 e F10 nas fases do ciclo celular das linhagens K562 e Jurkat, desconsiderando células na fase sub G0/G1.....	84
Figura 11 - Expressão da proteína KI-67 nas linhagens celulares K562 e Jurkat tratadas com as chalconas R32, F07, 09 e F10.....	88
Figura 12 - Avaliação morfológica da apoptose induzida pelas chalconas R32, F07, F09 e F10 em células K562 e Jurkat.....	90
Figura 13 - Avaliação da indução da fragmentação do DNA nas células K562 e Jurkat após tratamento com a chalcona R32.....	91
Figura 14 - Avaliação da indução da fragmentação do DNA nas células K562 e Jurkat após tratamento com as chalconas F07, F09 e F10.....	92
Figura 15 - Efeito das chalconas R32, F07, F09 e F10 sobre a exposição dos resíduos de fosfatidilserina nas células K562 e Jurkat.....	93
Figura 16 - Efeito das chalconas R32, F07, F09 e F10 na expressão das proteínas Bcl-2 (Painel A) e Bax (Painel B) em células K562 e Jurkat.....	96
Figura 17 - Efeito das chalconas R32, F07, F09 e F10 sobre o potencial de membrana mitocondrial das células K562 e Jurkat.....	100
Figura 18 - Efeito das chalconas R32, F07, F09 e F10 sobre a expressão da proteína AIF em células K562 e Jurkat.....	102

Figura 19 - Efeito das chalconas R32, F07, F09 e F10 sobre a expressão da proteína FasR em células K562 e Jurkat.	103
Figura 20 - Efeito da chalcona R32 sobre a expressão da proteína procaspase-3 em células K562 e Jurkat.	105
Figura 21 - Efeito das chalconas F07, F09 e F10 sobre a expressão da proteína caspase-3 em células K562 e Jurkat.....	106
Figura 22 - Expressão da proteína inibidora da apoptose survivina nas células K562 e Jurkat após o tratamento com as chalconas R32, F07, F09 e F10.	108

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - Estrutura das 24 chalconas sintéticas derivadas do 4-carboxibenzaldeído (Continua).....	38
Tabela 2 - Estrutura das 11 chalconas sintéticas derivadas da 1-naftilacetofenona (Continua).....	42
Tabela 3 - Estrutura química e viabilidade celular das chalconas sintéticas derivadas do 4- carboxibenzaldeído (100 µM) triadas sobre células K562 e Jurkat (Continua).....	60
Tabela 4 - Estrutura química e viabilidade celular das chalconas sintéticas derivadas da 1-naftilacetofenona (100 µM) triadas sobre células K562 e Jurkat (Continua).....	67
Tabela 5 - Valores de CI ₅₀ calculados em células K562 e Jurkat após 24, 48 e 72 h de incubação com as chalconas sintéticas Q6MC, Q7VB, Q19MC e R32.	71
Tabela 6 - Valores de CI ₅₀ calculados em células K562 e Jurkat após 24, 48 e 72 h de incubação com as chalconas sintéticas F07, F09 e F10. ...	74
Tabela 7 - Propriedades estruturais das chalconas R32, F07, F09 e F10 calculadas utilizando modelo in silico.	76
Tabela 8 - Efeito das chalconas R32, F07, F09 e F10 nas fases do ciclo celular das linhagens K562 e Jurkat.	83
Tabela 9 - Efeito das chalconas R32, F07, F09 e F10 nas fases do ciclo celular das linhagens K562 e Jurkat, desconsiderando células na fase sub G0/G1.....	85
Tabela 10 - Razão entre a expressão da proteína antiapoptótica Bcl-2 e a proteína pró-apoptótica Bax (Continua).....	97

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

AIF	Fator indutor de apoptose
APAF-1	do inglês <i>Apoptotic Protease Activating Factor 1</i> - Fator ativador da apoptose
ATP	Adenosina trifosfato
Bax	do inglês <i>Bcl-2 like protein 4</i> - proteína 4 como Bcl-2
Bcl-2	do inglês <i>B-cell Lymphoma Protein-2</i> - proteína 2 do linfoma de células B
BE/LA	Brometo de Etídeo/ Laranja de Acridina
BH	do inglês <i>Bcl-2 Homology</i> - Proteína homóloga a Bcl-2
Bid	do inglês <i>BH3 interacting-domain death agonist</i> - agonista de morte que interage com o domínio BH3
CAD	do inglês <i>Caspase-Activated Deoxinuclease</i>
Caspase	do inglês <i>Cysteine-Dependent Aspartate-Specific Proteases</i> - proteases aspartato específicas dependents de cisteína
CDKs	do inglês <i>Cyclin-Dependent Kinases</i> - cinases dependentes de ciclinas
CI₅₀	Concentração inibitória 50%
CKI	do inglês <i>CDK Inhibitors</i> - inibidores de CDK
DD	do inglês <i>Death Domain</i> - domínio de morte
DMSO	Dimetilsulfóxido
DNA	Ácido desoxirribonucleico
EDTA	Ácido etilenodiamino tetra-acético

EPM	Erro padrão da média
FITC	Isotiocianato de fluoresceína
G1	do inglês <i>Gap 1</i>
G2	do inglês <i>Gap 2</i>
HEPES	Ácido N-[2-HidroxiEtil]Piperazina-N'-[2-EtanoSulfônico]
IAP	Proteína inibidora da apoptose
IFM	Intensidade de fluorescência média
INCA	Instituto Nacional do Câncer
LA	Leucemia aguda
LLA	Leucemia linfoide aguda
LMA	Leucemia mieloide aguda
M	Mitose
MO	Medula óssea
MTT	Brometo de 3-(4,5-dimetil-2-tiazolil)-2,5-difenil-2H-tetrazólio
OMS	Organização Mundial de Saúde
PBS	Solução tampão fosfato
PI	Iodeto de propídeo
RNA	Ácido ribonucléico
RNase	Ribonuclease
RPMI	Roswell Park Memorial Institute
Smac/DIABLO	do inglês <i>Second Mitochondria-derived Activator of Caspases/Direct IAP</i>
S	Síntese
SNC	Sistema nervoso central

TNF	do inglês <i>Tumor Necrosis Factor</i> - Fator de necrose tumoral
TRAIL-R	do inglês <i>TNF-related apoptosis-inducing Ligand Receptor</i> - ligante indutor de apoptose relacionado ao TNF
UFSC	Universidade Federal de Santa Catarina
UV	Ultravioleta

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	19
2	REVISÃO DA LITERATURA	21
2.1	LEUCEMIAS AGUDAS (LAs).....	21
2.2	MORTE CELULAR E APOPTOSE.....	23
2.3	CICLO CELULAR	29
2.4	CHALCONAS COMO AGENTES ANTILEUCÊMICOS ..	33
3	OBJETIVOS	35
3.1	OBJETIVO GERAL	35
3.2	OBJETIVOS ESPECÍFICOS.....	35
4	MATERIAIS E MÉTODOS	37
4.1	SÍNTESE DAS CHALCONAS	37
4.2	LINHAGENS CELULARES E CULTIVO CELULAR.....	43
4.3	TRATAMENTO DAS CÉLULAS K562 E JURKAT COM AS CHALCONAS	44
4.4	AVALIAÇÃO DA VIABILIDADE CELULAR PELO MÉTODO DO MTT.....	45
4.5	MÉTODO TEÓRICO PARA PREDIÇÃO DA BIODISPONIBILIDADE ORAL: REGRA DOS CINCO DE LIPINSKI.....	46
4.6	AVALIAÇÃO DO EFEITO DAS CHALCONAS SELECIONADAS SOBRE O SANGUE PERIFÉRICO DE INDIVÍDUOS CLINICAMENTE SAUDÁVEIS	46
4.6.1	Seleção de participantes e coleta das amostras.....	46
4.6.2	Avaliação da citotoxicidade em células mononucleares...	47
4.6.3	Avaliação da atividade hemolítica	47
4.6.4	Estudos da agregação plaquetária	48
4.6.5	Estudos de coagulação sanguínea	49
4.7	AVALIAÇÃO DO CICLO CELULAR.....	49
4.8	AVALIAÇÃO DA APOPTOSE	50
4.8.1	Avaliação da apoptose pelo método da fragmentação do DNA.....	50

4.8.2	Avaliação da apoptose por microscopia de fluorescência com brometo de etídio e laranja de acridina	50
4.8.3	Avaliação da apoptose pelo método anexina V	51
4.9	AVALIAÇÃO DO POTENCIAL DE MEMBRANA MITOCONDRIAL.....	52
4.10	AVALIAÇÃO DA EXPRESSÃO DAS PROTEÍNAS KI-67, BCL-2, BAX, AIF, FASR, CASPASE-3 E SURVIVINA POR CITOMETRIA DE FLUXO	53
4.11	ANÁLISE ESTATÍSTICA	54
5	RESULTADOS E DISCUSSÃO	55
5.1	TRIAGEM DAS CHALCONAS SINTÉTICAS DERIVADAS DO 4- CARBOXIBENZALDEÍDO E DA 1-NAFTILACETOFENONA SOBRE CÉLULAS DE LEUCEMIA MIELOIDE AGUDA K562 E SOBRE CÉLULAS DE LEUCEMIA LINFOIDE AGUDA JURKAT 55	
5.1.1	Triagem das chalconas sintéticas derivadas do 4-carboxibenzaldeído sobre células de LMA (K562) e sobre células de LLA (Jurkat).....	55
5.1.2	Triagem das chalconas sintéticas derivadas do 1-naftilacetofenona sobre células de LMA (K562) e de LLA (Jurkat).....	63
5.2	EFEITO CITOTÓXICO DAS CHALCONAS SELECIONADAS DA SÉRIE DERIVADA DO 4-CARBOXIBENZALDEÍDO, Q6MC, Q7VB, Q19MC E R32 SOBRE CÉLULAS DE LEUCEMIA AGUDA K562 E JURKAT	69
5.3	EFEITO CITOTÓXICO DAS CHALCONAS SELECIONADAS DA SÉRIE DERIVADA DA 1-NAFTILACETOFENONA, F07, F09 E F10, SOBRE CÉLULAS DE LEUCEMIA AGUDA K562 E JURKAT	72
5.4	MÉTODO TEÓRICO PARA PREDIÇÃO DA BIODISPONIBILIDADE ORAL: REGRA DOS CINCO DE LIPINSKI.....	75
5.5	EFEITO CITOTÓXICO DAS CHALCONAS R32, F07, F09 e F10 SOBRE SANGUE PERIFÉRICO DE INDIVÍDUOS CLINICAMENTE SAUDÁVEIS	77
5.5.1	Efeito das chalconas selecionadas sobre células mononucleares.....	77

5.5.2	Avaliação da atividade hemolítica	78
5.5.3	Efeito das chalconas selecionadas sobre a agregação plaquetária, o tempo de protrombina e o tempo de tromboplastina parcial ativada	80
5.6	EFEITO DAS CHALCONAS R32, F07, F09 E F10 SOBRE AS FASES DO CICLO CELULAR DAS LINHAGENS K562 E JURKAT.....	81
5.7	EFEITO DAS CHALCONAS R32, F07, F09 E F10 SOBRE O MARCADOR DE PROLIFERAÇÃO CELULAR KI-67	86
5.8	EFEITO DAS CHALCONAS R32, F07, F09 E F10 NA INDUÇÃO DA APOPTOSE EM LINHAGENS DE LEUCEMIAS AGUDAS HUMANAS K562 E JURKAT	89
5.9	EFEITO DAS CHALCONAS R32, F07, F09 E F10 SOBRE A PROTEÍNA ANTIAPOPTÓTICA BCL-2 E SOBRE A PROTEÍNA PROAPOPTÓTICA BAX.....	94
5.10	INVESTIGAÇÃO DO EFEITO DAS CHALCONAS R32, F07, F09 E F10 SOBRE O POTENCIAL MITOCONDRIAL DAS CÉLULAS K562 E JURKAT	99
5.11	EFEITO DAS CHALCONAS R32, F07, F09 E F10 SOBRE O FATOR INDUTOR DE APOPTOSE (AIF).	100
5.12	EFEITO DAS CHALCONAS R32, F07, F09 E F10 SOBRE O RECEPTOR FAS (FasR)	102
5.13	EFEITO DAS CHALCONAS R32, F07, F09 E F10 SOBRE A EXPRESSÃO DA PROTEÍNA CASPASE-3.....	104
5.14	EFEITO DAS CHALCONAS R32, F07, F09 E F10 SOBRE A PROTEÍNA ANTIAPOPTÓTICA SURVIVINA	107
6	CONCLUSÕES	109
7	COMPILAÇÃO DOS RESULTADOS	111
7.1	EFEITO DA CHALCONA R32 SOBRE CÉLULAS DE LMA (K562) E LLA (JURKAT).	111
7.2	EFEITO DA CHALCONA F07 SOBRE CÉLULAS DE LMA (K562) E LLA (JURKAT)	113
7.3	EFEITO DA CHALCONA F09 SOBRE CÉLULAS DE LMA (K562) E LLA (JURKAT)	115

7.4	EFEITO DA CHALCONA F10 SOBRE CÉLULAS DE LMA (K562) E LLA (JURKAT).....	117
	REFERÊNCIAS.....	119
	ANEXOS.....	135

1 INTRODUÇÃO

O câncer compreende um amplo grupo de neoplasias malignas caracterizadas pela proliferação celular descontrolada e invasão celular anormal. Há inúmeras razões para o desenvolvimento do câncer, entre as causas estabelecidas, incluem o estilo de vida (fatores externos), como o tabagismo e a obesidade; e os fatores não modificáveis (fatores internos), como as mutações genéticas, as alterações hormonais e as condições imunes. Esses fatores podem atuar simultaneamente ou em sequência para iniciar e/ou promover o desenvolvimento do câncer. O câncer pode ser categorizado em dois principais grupos: os tumores sólidos (carcinomas e sarcomas) e as neoplasias do tecido hematopoietico e linfóide (SWERDLOW et al., 2008; VARDIMAN, 2010; NCI, 2015).

De acordo com a Organização Mundial da Saúde (OMS), o câncer é uma das principais causas de morte no mundo, o que representa um importante problema de saúde pública. Estima-se para o ano de 2030, 21,4 milhões de novos casos de câncer e 13,2 milhões de mortes relacionadas às neoplasias malignas em todo o mundo (STEWART; WILD, 2014). No Brasil, estima-se para o biênio 2018-2019, segundo o Instituto Nacional de Câncer (INCA), a ocorrência de cerca de 600 mil novos casos de câncer, para cada ano, dentre eles, 10.800 novos casos serão de leucemias, 5.940 em homens e 4.860 em mulheres (INCA, 2018).

As leucemias constituem um grupo heterogêneo de neoplasias malignas caracterizadas pela proliferação anormal de um clone de células hematopoieticas anormais, com alterações na diferenciação, maturação e regulação da hematopoiese. As leucemias podem ser divididas em linfóides e mielóides, e em agudas e crônicas, de acordo com a linhagem e maturação dos precursores afetados (PUI, 2009; SWERDLOW et al., 2008).

As leucemias agudas (LAs) são caracterizadas pela proliferação descontrolada de precursores hematopoieticos na medula óssea (MO) e/ou nos tecidos linfóides que, posteriormente, atingem a circulação periférica e podem se infiltrar em outros sistemas orgânicos (ISLAM, 1992; SWERDLOW et al., 2008). Segundo a classificação atual proposta pela OMS em 2008 e revisada em 2016, as LAs são divididas de acordo com a linhagem celular afetada em mielóides e linfóides (SWERDLOW et al., 2008; SWERDLOW et al., 2016).

Várias formas de terapia são utilizadas para o tratamento das LAs, como a radioterapia, a quimioterapia, a imunoterapia e o transplante de MO. O transplante de MO é a forma de terapia mais eficaz na obtenção da remissão completa das leucemias, no entanto, esse método de

tratamento apresenta restrições clínicas e socioeconômicas para o paciente, o que limita a sua utilização. Devido a isso, a quimioterapia é a terapia antileucêmica mais utilizada. Os protocolos para tratamento de LAs incluem vários quimioterápicos que são utilizados de forma combinada, ou como fármacos isolados (ROBAK; WIERZBOWSKA, 2009). Apesar dos avanços na pesquisa por novos fármacos e na utilização de poliquimioterapia em pacientes portadores de LAs, a quimioterapia ainda apresenta limitações de sua efetividade, pois o desenvolvimento de resistência ao tratamento é um fator recorrente que leva a recidiva da doença e ao óbito. Além disso, como a maioria dos fármacos não são alvos específicos, em muitos casos pode-se observar toxicidade associada ao quimioterápico, o que eleva os índices de morbidade e mortalidade (SZYMANSKA et al., 2012). Nesse contexto, vê-se a necessidade de investigar novas estratégias de tratamento, não apenas para melhorar a sobrevida, mas também a qualidade de vida desses pacientes. Por isso, nas últimas duas décadas, a meta dos pesquisadores e oncologistas têm sido a descoberta de fármacos antineoplásicos que tenham maior especificidade na indução de morte das células tumorais, com poucos ou insignificantes efeitos adversos e que sejam de fácil administração.

Assim, o interesse em novos agentes terapêuticos que atuem em alvos específicos, obtidos a partir de produtos naturais e sintéticos, cresceu exponencialmente nos últimos anos. Nessa linha, o Laboratório de Oncologia Experimental e Hemopatias (LOEH) investiga o efeito citotóxico e o mecanismo de ação de vários compostos sintéticos, como os derivados do ácido gálico (LOCATELLI et al., 2008), de imidas cíclicas (MACHADO et al., 2011; MACHADO et al., 2013), de sulfonamidas (BIGOLIN, 2016) e de chalconas (PEDRINI et al., 2010; MAIORAL et al., 2013; COSTA et al., 2014; MAIORAL et al., 2016; MAIORAL et al., 2017; SANTOS BUBNIAK et al., 2017), os quais demonstraram atividade citotóxica em linhagens de células de LAs humanas. Esses estudos também evidenciaram que a indução da apoptose ocorreu por ativação ou inibição de proteínas envolvidas na resistência tumoral a sinais extracelulares ou intracelulares, como caspases, proteínas da família Bcl-2 e survivina, entre outros. Assim, considerando o exposto acima, objetivamos com este trabalho investigar novos agentes terapêuticos para o tratamento de LAs a partir de duas séries de chalconas sintéticas.

2 REVISÃO DA LITERATURA

2.1 LEUCEMIAS AGUDAS (LAs)

A transformação leucêmica se origina a partir de uma mutação somática em uma única célula-tronco ou célula primordial (*stem cell*), a qual forma o clone leucêmico. A diferenciação anormal dos progenitores hematopoiéticos resulta na desregulação da hematopoiese normal e acúmulo de células neoplásicas na MO que, progressivamente, atingem o sangue periférico (SP). Na circulação periférica, as células neoplásicas podem se infiltrar e invadir outros tecidos como, por exemplo, o fígado e o baço. A leucemogênese pode ocorrer em diferentes fases da diferenciação dos precursores linfóides ou mielóides, o que caracteriza a LA como uma doença heterogênea, sob o aspecto biológico e morfológico. De acordo com os progenitores afetados, mielóides ou linfóides, a proliferação anormal de células poderá originar uma leucemia mieloide aguda (LMA) ou uma leucemia linfóide aguda (LLA), respectivamente (BENNETT et al., 1976; BENNETT et al., 1985; BENNETT et al., 1988; BENNETT et al., 1991; JAFFE et al., 2001; SWERDLOW et al., 2008; BAIN, 2010; SWERDLOW et al., 2016).

A LMA se desenvolve a partir da proliferação desordenada de precursores mielóides, e inclui todas as neoplasias que envolvem as linhagens celulares granulocítica (neutrófilos, eosinófilos e basófilos), monócitos, eritrócitos, megacariócito e mastócitos (SWERDLOW et al., 2008). As LMAs são mais frequentes em adultos, sobretudo nos indivíduos com mais de 60 anos de idade, faixa etária que apresenta pior prognóstico devido à maior incidência de anormalidades citogenéticas (CORNELL; PALMER, 2012).

A LLA é o resultado de múltiplas mutações em uma única célula progenitora linfóide B ou T. Além da MO, os linfoblastos leucêmicos também podem se acumular em sítios extramedulares, especialmente em órgãos hematopoiéticos secundários e meninges (PUI, 2009). A LLA é a neoplasia mais frequente na infância e sua maior incidência ocorre entre crianças de três e seis anos de idade e, nestes casos, em geral apresenta bom prognóstico (MOORMAN, 2016). Entretanto, 20-25 % dos casos de LLA infantil recidivam, desse modo, considerando que as LLAs correspondem a 30 % dos cânceres pediátricos, a recidiva em LLA é apontada como um dos maiores problemas da oncologia pediátrica (PUI 2009). Em adultos, a LLA não é de bom prognóstico, os pacientes não respondem bem à quimioterapia e apresentam uma probabilidade de

sobrevida livre de doença em apenas 40 % dos casos (PUI; EVANS, 2006; MAUDE et al., 2015).

Como visto anteriormente, diversas formas de terapia vêm sendo utilizadas no tratamento de leucemias, como: radioterapia, quimioterapia, imunoterapia e transplante de MO (ROBAK; WIERZBOWSKA, 2009). Apesar de o transplante ser a forma de terapia mais eficaz, ela implica em restrições clínicas e socioeconômicas para o paciente. Por isso, a quimioterapia ainda é a terapia antileucêmica mais utilizada. A quimioterapia tem por objetivo eliminar o clone leucêmico da MO, permitindo assim, a restauração da hematopoiese normal. Esse tratamento costuma ser bastante agressivo para garantir que o paciente entre em remissão completa, pois a remissão parcial não oferece benefícios à sobrevivência, e as recidivas costumam ser frequentes. Essa terapia baseia-se na utilização de diversos fármacos citotóxicos de forma combinada ou isolada visando inibir a proliferação celular, promover a morte por apoptose e/ou induzir a diferenciação celular (SZYMANSKA et al., 2012). Como as LAs são heterogêneas entre si, os tratamentos da LMA e da LLA são constituídos por diferentes abordagens terapêuticas. O tratamento das LMAs é constituído de duas fases: a quimioterapia de indução, que geralmente consiste na combinação de uma antraciclina com citarabina, e a terapia de consolidação pós-remissão, adaptada de acordo com o prognóstico. Já nas LLAs, o tratamento é dividido em três fases: indução de remissão, intensificação/consolidação e manutenção, incluindo profilaxia e/ou tratamento do sistema nervoso central (SNC) e transplante de MO (CORNELL; PALMER, 2012; HAO; KOTA, 2015; AMERICAN CANCER SOCIETY, 2016).

Apesar dos progressos na pesquisa de novos quimioterápicos, a eficácia dos fármacos antitumorais ainda é limitada por três fatores principais: (i) pelas características farmacocinéticas do fármaco em relação ao alcance do fármaco à célula alvo em concentrações adequadas; (ii) pelos efeitos adversos que causam nos tecidos e células normais; e (iii) pela resistência dos tumores a agentes citotóxicos administrados, sendo o último a principal causa de insucesso do tratamento

Assim, o entendimento dos mecanismos moleculares de resistência das células leucêmicas à apoptose induzida por quimioterápico e/ou outros compostos se faz necessário para o desenvolvimento de compostos antineoplásicos com citotoxicidade mais específica para as células tumorais e com menos efeitos adversos para o paciente.

2.2 MORTE CELULAR E APOPTOSE

Por muitos anos, a morte celular, como por exemplo a apoptose, foi considerada um processo passivo de caráter degenerativo, que ocorre em situações de lesão celular, infecção e ausência de fatores de crescimento. Sob essas condições, a célula sofre alterações, como a perda da integridade da membrana plasmática, aumento do volume celular e consequente perda das suas funções metabólicas. Atualmente, sabe-se que nem todos os eventos de morte celular são processos passivos, pois os organismos multicelulares são capazes de induzir a morte celular como resposta a estímulos intracelulares ou extracelulares (GRIVICICH; REGNER; DA ROCHA, 2007).

Conforme o Comitê de Nomenclatura em Morte Celular (CNMC) publicado em 2018, os processos de morte celular podem ser classificados de acordo com suas características morfológicas, bioquímicas e funcionais. Dentro desses critérios, a morte celular regulada é a forma de morte que resulta da ativação de mecanismos de transdução de sinais moleculares, já a morte celular acidental é a forma de morte que resulta no desaparecimento instantâneo e catastrófico de células expostas a graves insultos físicos (como, altas pressões, temperaturas ou forças osmóticas), químicos (como, variações extremas de pH) ou mecânicos (como, forças de cisalhamento). A morte celular regulada apresenta vantagem para a homeostasia do organismo em condições fisiológicas e patológicas em relação à morte celular acidental. A morte celular regulada pode ocorrer na ausência de qualquer perturbação ambiental exógena, operando, portanto, como efetora interna de programas fisiológicas para o desenvolvimento ou renovação tecidual, essas formas completamente fisiológicas de morte celular regulada são denominadas de morte celular programada. Entretanto, quando a morte celular pode ser modulada, isso é, atrasada ou acelerada, por intervenções farmacológicas ou genéticas, como por exemplo a apoptose induzida por compostos citotóxicos, é denominada morte celular regulada. Mais de dez tipos de morte celular regulada já foram descritos pelo CNMC, tais como anoikis, morte celular dependente de autofagia, autose, ferroptose, necroptose, necrose, poroptose, partanatos, entose, morte celular imunogênica, mitose catastrófica e apoptose (GALLUZZI et al., 2018).

A morte celular regulada tem sido estabelecida como um mecanismo de defesa contra o câncer. Portanto, quaisquer alterações nessas vias de sinalização de morte levam a proliferação celular descontrolada e oncogênese. Desse modo, a indução da apoptose estimulada por novos quimioterápicos é o tipo de morte celular regulada

desejada, sendo rápida, eficiente e altamente regulada (HAAKE; POLAKOWSKA, 1993; WICKMAN, et al., 2012; DANESE et al., 2017; GALLUZZI et al., 2018).

A apoptose é o tipo de morte mais bem estudado na literatura e os mecanismos que regulam esse tipo de morte são complexos e consistem na ativação de numerosas vias de sinalização e de componentes inibitórios, os quais compõem vários sistemas paralelos ou inter-relacionados, que culminam na autodestruição celular. Quando esses mecanismos são alterados em favor da sobrevivência das células, eles contribuem para o desenvolvimento e resistência da neoplasia (REED, 2000; FULDA, 2009). Vários tipos de câncer são atribuídos a uma desordem na apoptose, inclusive, as neoplasias onco-hematológicas, como o linfoma folicular de baixo grau (LODISH et al., 2000; REED, 2000) e a síndrome mielodisplásica (SLOAND et al., 2002). Os tratamentos atuais contra o câncer incluem agentes citotóxicos e radioterapia que induzem as células neoplásicas à apoptose. No entanto, a presença de mutações em proteínas-chave da apoptose resultam no desenvolvimento de resistência a essas terapias. Assim, novas abordagens visando às vias de sinalização apoptótica podem resultar na morte das células tumorais, reverter à resistência ou induzir sensibilidade aos tratamentos atuais (KHAN; BLANCO-CODESIDO; MOLIFE, 2014).

Os mecanismos responsáveis pela regulação da apoptose envolvem dois processos distintos: a apoptose extrínseca e a apoptose intrínseca (GALLUZZI et al., 2018).

A apoptose extrínseca (Esquema 1) é mediada pela ativação de receptores localizados na superfície da membrana plasmática da maioria das células. Esses receptores são: a) os receptores de morte, cuja ativação depende da ligação a seus respectivos ligantes, e b) receptores de dependência, cuja ativação ocorre quando a concentração de seus ligantes específicos diminui consideravelmente (GALLUZZI et al., 2018).

Dentre os receptores de morte pode-se incluir o receptor Fas (FasR), também denominado de CD95 ou Apo1, e o receptor TNF (TNF-R; TNFR1, TRAILR1 ou DR4, TRAILR2 ou DR5, DR3 ou Apo2, DR6). Todos os receptores dessa família são formados por um domínio citoplasmático, denominado 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 e incluem os receptores funcionais e receptores disfuncionais decoy (DcR). Tanto os receptores funcionais, quanto os DcR apresentam um domínio extracelular rico em cisteína (CRD), mas apenas os receptores

(domínio de morte associado a Fas), que em conjunto com as caspases iniciadoras -8 e -10 formam o complexo sinalizador indutor de apoptose (DISC). A ligação entre TRAIL-R e TRAIL-L também promove a formação de um complexo com FADD e desencadeia eventos semelhantes aos do FasR, enquanto que a ligação entre TNF e TNF-R promove a ligação da proteína TRADD. O complexo DISC induz a clivagem da procaspase-8 e liberação da caspase-8 ativa, a qual pode ativar as caspases efetoras -3 e -7, independente da via mitocondrial. Dessa forma, fica evidente que tanto a caspase-8, quanto o FADD são essenciais para a indução da apoptose pelo FasR (NAGATA, 1997; KHAN; BLANCO-CODESIDO; MOLIFE, 2014). Por outro lado, em células como hepatócitos, células β pancreáticas e a maioria das células cancerígenas, nas quais a ativação de caspase-3 e caspase-7 é restrita pela proteína inibidora da apoptose XIAP, a apoptose extrínseca requer a clivagem proteolítica da proteína proapoptótica Bid (membro da família Bcl-2) pela caspase 8, isto leva à geração de uma forma truncada de Bid (tBid), que é translocada para a membrana mitocondrial externa. Na membrana mitocondrial externa, o tBid atua como um ativador BH3-only, possibilitando o aumento da permeabilidade mitocondrial e a liberação das proteínas proapoptóticas Bax e Bak, ativando, assim, a caspase-9, e, dessa forma, faz uma ligação entre a apoptose extrínseca e a intrínseca (GALLUZZI et al., 2018).

Já a família de receptores de dependência, consiste em aproximadamente vinte membros, incluindo os receptores DCC, UNC5A, UNC5B, UNC5C e UNC5D, NTRK3, PTCH1. Intrigantemente, os receptores de dependência promovem a sobrevivência, proliferação e diferenciação celular em condições fisiológicas, quando seus ligantes estão em concentrações normais; mas ativam vias de sinalização letais distintas, geralmente, impactando na ativação de caspases quando a concentração de seus ligantes diminui consideravelmente. Assim, os receptores de dependência podem desempenhar um papel duplo como supressores de tumor e mediadores da morte celular no desenvolvimento. Além disso, a morte celular mediada pelo receptor de dependência também pode implicar em neurodegeneração. Assim, mutações em genes que codificam receptores de dependência têm sido associadas a estados de doença, e incluem a formação de tumor, a metástase, a perda neuronal do desenvolvimento e a neurodegeneração (MEHLEN; BREDESEN, 2011; GALLUZZI et al., 2018).

Como pode ser observado no Esquema 1, a apoptose intrínseca ocorre na mitocôndria, e é regulada pelas proteínas da família Bcl-2. Essa via é ativada em resposta aos estresses extra e intracelulares, decorrentes,

por exemplo, de lesões ao DNA, hipóxia, defeitos no ciclo celular, privação de fatores de crescimento, estresse do retículo endoplasmático (RE), sobrecarga de espécies reativas de oxigênio (ERO), alterações microtubulares ou defeitos mitóticos, radiação UV e outros estresses celulares. A exposição a esses agentes leva à permeabilização da membrana mitocondrial externa que é controlada por membros da família de proteínas Bcl-2. Essa família é dividida em duas classes de moléculas que apresentam efeitos opostos: os membros antiapoptóticos, como Bcl-2, Bcl-xL, Bcl-w, Mcl-1 e Bfl-1; e os membros proapoptóticos, como Bad, Bax, Bak, Box, Bid, Bim, Hrk, Puma e Noxa. Essas proteínas proapoptóticas se ligam ao sulco hidrofóbico das proteínas antiapoptóticas Bcl-2 e inibem sua ação. Os membros da família Bcl-2 contêm até quatro grandes domínios conservados, denominados domínios homólogos à Bcl-2 (BH). As proteínas antiapoptóticas possuem os quatro domínios (BH1, BH2, BH3 e BH4), enquanto que as proteínas proapoptóticas são divididas em um grupo que apresenta os domínios BH1, BH2 e BH3 (Bax, Bak e Bok, Hrk) e um grupo denominado BH3-only, que apresenta apenas o domínio BH3 (Bid, Bim, Noxa e Puma).

Diante de um sinal estimulador que induzem uma transição da permeabilidade da membrana mitocondrial, ocorre a despolarização e a perda do potencial de membrana mitocondrial ($\Delta\Psi_m$), desse modo, membros proapoptóticos da família Bcl-2, que se encontram inicialmente na sua forma inativa no citosol, são translocados para a membrana mitocondrial externa. A oligomerização dessas proteínas induz a célula à apoptose por dois mecanismos distintos: o primeiro se dá pela formação de poros proteicos na membrana mitocondrial, permeabilizando-a e permitindo a liberação de proteínas proapoptóticas do espaço intermembranar para o citosol, como, por exemplo, o citocromo-*c*, o fator indutor da apoptose (AIF), a endonuclease G e as proteínas Smac/DIABLO; o segundo se dá pela ligação, via domínios BH3, às proteínas Bcl-2 e Bcl-xL, antagonizando-as (ADAMS; CORY, 2007; SCARFO; GHIA, 2013; KHAN; BLANCO-CODESIDO; MOLIFE, 2014; GALLUZZI et al., 2018).

O citocromo-*c*, em células saudáveis, funciona como um transportador de elétrons na cadeia transportadora de elétrons. Quando liberado da mitocôndria, o citocromo-*c* se associa ao fator ativador de apoptose (Apaf-1) e à procaspase-9, formando um complexo denominado apoptossoma, que na presença de ATP cliva a procaspase-9 (considerada a proteína iniciadora da apoptose intrínseca) em caspase-9 ativa, que por sua vez ativa as caspases efetoras -3 e -7 (ALLAN; CLARKE, 2009; GALLUZZI et al., 2018). Apesar de o citocromo-*c* ser a principal proteína

mitocondrial envolvida na apoptose intrínseca, outras proteínas liberadas pela mitocôndria apresentam atividades proapoptóticas independente das caspases, como o AIF, a endonuclease-G e as proteínas Smac/DIABLO.

O AIF uma vez liberado no citosol, se transloca para o núcleo e induz a condensação da cromatina e a fragmentação do DNA, além de induzir o aumento na permeabilidade mitocondrial, ocasionando o extravasamento do citocromo-*c*. A endonuclease G pode induzir a morte de maneira independente de caspases por meio da indução de condensação da cromatina e da clivagem do DNA. Já as proteínas Smac/DIABLO se ligam às proteínas inibidoras de apoptose (IAPs), inibindo assim a ação das IAPs e, conseqüentemente, promovendo a apoptose e impedindo que as IAPs se liguem às caspases (ELMORE, 2007; RASTOGI; SINHA, 2009; FRANKLIN, 2011; SEVRIUKOVA, 2011; KHAN; BLANCO-CODESIDO; MOLIFE, 2014).

As IAPs compreendem uma família de proteínas que servem como inibidores endógenos da apoptose. Essa família é composta por oito membros (NAIP, XIAP, cIAP1, cIAP2, ILP2, livina, survivina e BRUCE) que apresentam um domínio em comum de 70 aminoácidos, denominado BIR. O domínio BIR suprime a função das caspases efetoras -3 e -7, da caspase iniciadora -9 e modulam o fator de transcrição NF- κ B, inibindo desse modo a apoptose. Durante a apoptose, as IAPs são removidas pela proteína Smac/DIABLO. Após o dano mitocondrial, a Smac/DIABLO é liberada do espaço intermembrana para o citoplasma juntamente com o citocromo-*c*, enquanto o citocromo-*c* se liga à Apaf-1 ativando a caspase-9, a Smac/DIABLO remove as IAPs de sua ligação inibitória com as caspases. A proteína c-FLIP também atua regulando a apoptose inibindo-a ao se ligar ao FADD, prevenindo assim, a ativação da caspase-8. Das IAPs, as melhores caracterizadas são a XIAP e a survivina, que se ligam efetivamente as caspases-3, -7 e -9 e inibem a sua ativação (PLATI; BUCUR; KHOSRAVI-FAR, 2011; KHAN; BLANCO-CODESIDO; MOLIFE, 2014). Outro modo de inibição da apoptose ocorre por meio dos receptores DcRs. Esses competem com os receptores DR4 e DR5 pelo ligante TRAIL, mas são incapazes de iniciar a apoptose porque não apresentam o domínio de morte intracelular e, portanto, não conseguem recrutar as proteínas adaptadoras (KHAN; BLANCO-CODESIDO; MOLIFE, 2014).

A survivina é uma proteína essencial na regulação da progressão da mitose, inibição da apoptose e resistência à radioterapia e à quimioterapia em diversos tipos de cancer. Essa IAP encontra-se superexpressa na maioria das neoplasias humanas e também está envolvida na resistência ao tratamento, por isso é associada a um pior

prognóstico (GRIVICICH; REGNER; DA ROCHA, 2007; FULDA, 2009).

Em ambos os processos de apoptose ocorre a ativação de caspases, as quais podem funcionar como iniciadoras ou efetoras da propagação do sinal apoptótico (LO et al., 2011; SCARFO; GHIA, 2013; SWART; DU TOIT; LOSS, 2016; GALLUZZI et al., 2018). As caspases (Esquema 1) compreendem a uma família de proteases que possuem um resíduo de cisteína em seus sítios ativos, os quais são capazes de clivar os resíduos de ácido aspártico de proteínas específicas. Essas enzimas são sintetizadas como zimogênios inativos ou de baixa atividade, denominadas procaspases, que são clivadas em enzimas ativas. As caspases são divididas em iniciadoras (caspase -2, -8, -9 e -10) e em efetoras (caspase -3, -6 e -7), as caspases iniciadoras são as primeiras a serem ativadas durante a apoptose e são responsáveis por clivar as caspases efetoras, as quais, por sua vez, desencadeiam uma série de eventos proteolíticos que levam à morte celular. Como a apoptose intrínseca e a apoptose extrínseca estão envolvidas na ativação das caspases, essas enzimas são um potencial alvo para o desenvolvimento de novos fármacos no combate às neoplasias malignas (DEL POETA et al., 2008; LO et al., 2011; GALLUZZI et al., 2018). A apoptose extrínseca e a apoptose intrínseca convergem para a ativação das caspases efetoras -3 e -7 pela caspase-9 da apoptose intrínseca e pela caspase-8 da apoptose extrínseca. As caspases efetoras desencadeiam uma série de alterações morfológicas e bioquímicas que caracterizam a apoptose e culminam na morte celular, incluindo a exposição dos resíduos de fosfatidilserina, a formação de corpos apoptóticos e a fragmentação do DNA. Estudos recentes demonstram que a caspase-3 promove a exposição dos resíduos de fosfatidilserina pela ativação de proteínas envolvidas na externalização da fosfatidilserina, como as proteínas scramblases fosfolipídicas. Além disso, a caspase-3 cliva o inibidor de DNase ativado por caspase (ICAD/DFF45) possibilitam que a DNase (CAD) entre no núcleo e fragmente o DNA, provocando o característico padrão “em escada” observado nas células apoptóticas (FULDA, 2009; LO et al., 2011; GALLUZZI et al., 2018).

2.3 CICLO CELULAR

A atividade aberrante característica das células tumorais no ciclo celular ocorre como resultado de mutações em genes que codificam proteínas do ciclo celular. A ativação aberrante de uma série de enzimas

denominadas “cinases dependentes de ciclinas” (CDKs) que interagem com proteínas específicas, denominadas ciclinas, são frequentemente observadas nas neoplasias humanas. Assim, o desenvolvimento de inibidores sintéticos de CDKs são candidatos promissores a novos fármacos utilizados no tratamento do câncer, uma vez que a regulação do ciclo celular apresenta importante papel nas vias de transformação neoplásica (SCHWARTZ; SHAH, 2005; OTTO; SICINSKIL, 2017).

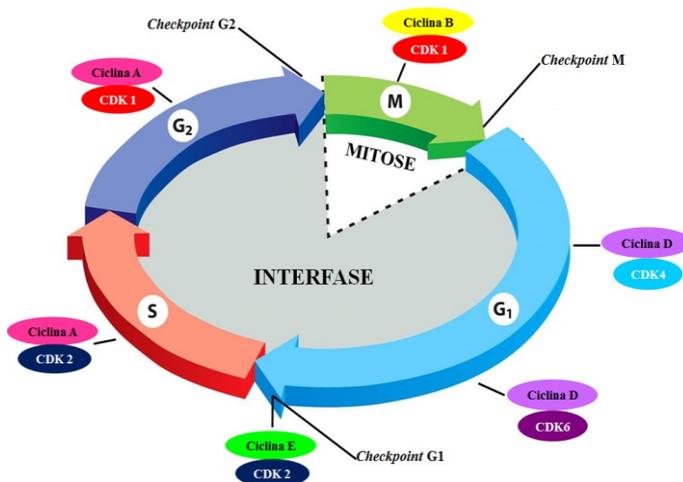
O ciclo celular dos mamíferos é um processo altamente organizado e regulado, que ocorre por meio de uma sequência ordenada de eventos que visa a duplicação do material genético e divisão celular. Essa regulação envolve proteínas reguladoras de crescimento, bem como proteínas responsáveis pela integridade genética que checam e corrigem possíveis danos no DNA. O ciclo celular eucariótico é dividido em duas etapas principais: mitose (M) e intérfase. A mitose é o processo de divisão celular, compreendido das seguintes fases: prófase, metáfase, anáfase e telófase. A intérfase é um período de intenso metabolismo celular, que ocorre entre duas fases M, e é dividido em três fases: gap 1 (G1), síntese (S) e gap 2 (G2). Quando as células estão em estado de quiescência, ou seja, fora do ciclo celular, diz-se que elas estão na fase gap zero (G0). Durante a fase G1, ocorre a preparação para a divisão celular, com aumento do volume celular, condensação dos cromossomos e síntese de proteínas necessárias à fase seguinte, como enzimas responsáveis pela duplicação do DNA. A fase G1 é seguida pela fase S, durante a qual a célula realiza a replicação do seu DNA. Após a replicação, inicia-se a fase G2, que se caracteriza pela diferenciação celular e pela síntese de proteínas necessárias para a mitose, como o fuso mitótico (KUMAR et al., 2010; TARN; LAI, 2011).

A proliferação celular depende da progressão das quatro fases distintas do ciclo celular: G0/G1, S, G2 e M. A progressão do ciclo celular é promovida por diferentes proteínas celulares, dentre elas as enzimas CDKs, as quais são ativadas em pontos específicos do ciclo celular. A ativação dessas CDKs requer sua interação com as ciclinas. Essa interação promove a ativação das cinases, as quais, por sua vez, fosforilam uma série de substratos-chave que permitem a progressão do ciclo celular. A atividade das CDKs também é regulada pela sua ligação às proteínas inibidoras de CDK (CKIs), formando complexos estáveis que inibem o ciclo celular (SCHWARTZ; SHAH, 2005; OTTO; SICINSKIL, 2017).

A progressão do ciclo celular é regulada por várias CDKs que atuam interagindo com as ciclinas. A atividade das CDKs é rigorosamente controlada. Elas são induzidas por sinais mitogênicos e podem ser

inibidas pela ativação dos pontos de checagem (*checkpoints*) do ciclo em resposta ao dano no DNA (Esquema 2) (OTTO; SICINSKIL, 2017).

Esquema 2 - Fases do ciclo celular.



Fonte: adaptado de VERMEULEN; BERNEMAN; VAN BOCKSTAELE, 2003.

Os *checkpoints* são responsáveis por prevenir a progressão do ciclo celular para uma nova fase sem que a fase anterior esteja completa. Três pontos de checagem principais são reconhecidos durante o ciclo celular: (i) em G₁, antes da célula entrar na fase S do ciclo; (ii) em G₂, antes da célula entrar em mitose; e (iii) durante a metáfase, impedindo a ligação dos cromossomos aos microtúbulos (Esquema 2) (HARTWELL; WEINNERT, 1989; VERMEULEN; BERNEMAN; VAN BOCKSTAELE, 2003). Perturbações nesses checkpoints comprometem a integridade do genoma, promovem o desenvolvimento de neoplasias e podem afetar significativamente a eficácia das terapias antitumorais (KASTAN; BARTEK, 2004).

Vários trabalhos demonstram que o produto final do gene *p53*, a proteína p53, é responsável pelo primeiro *checkpoint* entre as fases G₁ e S. Essa proteína, quando expressa na sua forma normal (não mutada) atua como um fator de transcrição que promove a transcrição de diversos genes efetores. Dentre esses, encontra-se o *p21*, que transcreve uma proteína homônima responsável por inibir a atividade das enzimas cinases, impedindo, dessa forma, a ativação das cinases dependentes de ciclinas, que são elementos-chave na iniciação e progressão do ciclo

celular. A parada do ciclo celular permite que os diversos mecanismos celulares de reparo do DNA atuem a fim de corrigir o dano genômico (LODISH et al., 2000). No entanto, se o reparo do DNA não ocorrer de forma correta, a p53 pode induzir a célula a apoptose pela ativação do gene *bax*, cujo produto de transcrição, a proteína Bax, inibe a ação antiapoptótica do gene *bcl-2* (CLARKE et al., 1993; BULLOCK; FEISHT, 2001). Quando há uma mutação no gene que transcreve a proteína p53 origina-se uma proteína mutante que é incapaz de exercer a sua função de “ponto de checagem”, e, nesses casos, a replicação do DNA e proliferação celular prossegue, mesmo na presença de um dano genômico, o que leva a produção de clones celulares aberrantes e ao desenvolvimento e resistência do câncer (HUNTER; LACASSE; KORNELUK, 2007; GU; ZHU, 2012).

Além das proteínas citadas anteriormente, KI-67 é um marcador de proliferação celular. O aumento da expressão de KI-67 pode refletir a atividade de proliferação celular em neoplasias hematológicas e outros tipos de câncer, levando à proliferação celular descontrolada. A detecção de KI-67 tem sido amplamente aplicada no diagnóstico, estadiamento, monitorização do efeito terapêutico e avaliação do prognóstico de linfomas. Muitos estudos têm investigado a expressão de KI-67 na LLA e leucemia linfóide crônica (LLC), investigando a relevância entre a expressão de KI-67 e o efeito da terapia e prognóstico. Existem estudos sobre a expressão de KI-67 na LMA, mas os resultados não são consistentes (WANG M.; WANG L., 2016). A caracterização da região promotora do gene *ki-67* é essencial para a compreensão da transcrição gênica e, por isso, é importante investigá-la para desenvolver intervenções medicamentosas direcionadas que visem à modulação da expressão gênica (LI; JIANG, 2015).

Como pode ser visto, anormalidades no ciclo celular, como alterações na expressão de ciclinas, deficiência de CKI, desregulação de CDK, mutações do gene *p53* e aumento na expressão de KI-67 estão envolvidas na maioria das neoplasias humanas. Assim, a compreensão das bases moleculares do ciclo celular é de grande importância para o entendimento dos mecanismos envolvidos na leucemogênese e para o desenvolvimento de novos quimioterápicos (KASTAN; BARTEK, 2004; GU; ZHU, 2012).

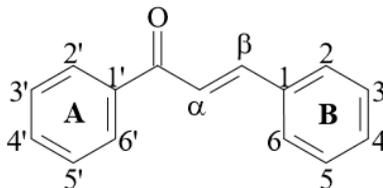
2.4 CHALCONAS COMO AGENTES ANTILEUCÊMICOS

O tratamento das LAs melhorou com o uso de múltiplos agentes quimioterápicos, mas a barreira da tolerância para intensificar a quimioterapia parece ter sido alcançada, requerendo integração de novos agentes terapêuticos com menor toxicidade (GÖKBUGET; HOELZER, 2006).

Apesar dos grandes investimentos direcionados para a compreensão dos mecanismos moleculares que envolvem o controle dos processos normais de proliferação, diferenciação e morte celular programada, as causas de alterações nesses processos que podem estar ligadas ao desenvolvimento tumoral, à refratariedade e à resistência ao tratamento em portadores de LAs ainda não estão esclarecidos. Dessa forma, a busca por alvos moleculares expressos diferentemente nas LAs e o desenvolvimento de novos fármacos com capacidade de atingir esses alvos é imprescindível, e representam uma forma menos tóxica e potencialmente mais efetiva de tratar pacientes com câncer.

Nessa linha de investigação, protótipos para a síntese de novos agentes quimioterápicos específicos, como algumas classes de produtos naturais (flavonoides, isoflavonoides, ligninas, glicosídeos, alcaloides, chalconas) e sintéticos (imidaz, chalconas, tiouréias, pirazolinas, sulfonamidas) biologicamente ativos têm constituído uma espetacular diversidade molecular de padrões estruturais. Dentro desse contexto, as chalconas e seus derivados têm sido descritos na literatura como promissores compostos com atividade antitumoral (SAYDAM et al, 2003; ACHANTA et al., 2006). Esses compostos são precursores da via de biossíntese dos flavonoides e isoflavonoides das plantas. Estruturalmente, as chalconas, ou 1,3-difenil-2-propen-1-ona são flavonoides de cadeia aberta, na qual dois anéis aromáticos são unidos por três carbonos, uma carbonila e dois carbonos α -, β –insaturados (Figura 1, FANG et al., 2013).

Figura 1 - Núcleo fundamental das chalconas.



Fonte: FANG et al., 2013.

Diversos trabalhos descrevem que as chalconas e seus derivados apresentam atividade antiproliferativa sobre células leucêmicas *in vitro*. Estudos prévios realizados no Laboratório de Oncologia Experimental e Hemopatias (LOEH) demonstraram que a chalcona sintética (2E)-3-(2-naftalenil)-1-(3'-metoxi-4'-hidroxi-fenil)-2-propen-1-ona derivada do 2-naftaldeído causa bloqueio no ciclo celular e induz a apoptose em células de LLA murina L-1210, e que o mecanismo de ação envolve o aumento da expressão de p53, diminuição da expressão de Bcl-2, aumento da expressão de Bax e aumento da expressão da caspase-3 (PEDRINI et al., 2010). Recentemente, o grupo do LOEH demonstrou que as chalconas derivadas do 1-naftaldeído e da 2,4,5-trimetoxiacetofenona, possuem atividade citotóxica sobre linhagens de LAs, com indução de morte celular por apoptose, redução do PMM, bloqueio do ciclo celular e diminuição do marcador de proliferação celular KI-67. Além disso, essas chalconas não causaram redução da viabilidade de células normais, o que indica uma maior seletividade e possível minimização dos efeitos adversos (MAIORAL et al., 2013; COSTA et al., 2014; MAIORAL et al., 2016; MAIORAL et al., 2017).

Um estudo *in vivo* demonstrou a eficácia e segurança no tratamento de camundongos com leishmaniose cutânea e visceral com uma nitrochalcona administrada via oral. Embora doses dez vezes mais altas da chalcona fossem necessárias para produzir o mesmo efeito antiparasitário que o medicamento de referência miltefosina, a última foi nefrotóxica, enquanto que a nitrochalcona além de apresentar atividade antiparasitária, apresentou atividade hepato e nefroprotetora (SOUSA-BATISTA et al., 2018).

Apesar de diversos estudos relatarem o efeito antiproliferativo e citotóxico das chalconas e seus derivados em células de LAs (BANDGAR; GAWANDE, 2010; PEDRINI et al., 2010; ZHANG et al., 2011, MAIORAL et al., 2013; COSTA et al., 2014; MAIORAL et al., 2016; BUBNIAK et al., 2017), os mecanismos de ação descritos ainda não foram completamente elucidados. Neste sentido, é de grande relevância a continuidade dos estudos da atividade antiproliferativa das chalconas sintéticas e seus derivados para a elucidação dos mecanismos de ação antitumoral envolvidos nos processos de sinalização e morte celular, em especial, nas desordens hematológicas.

No presente trabalho, pretende-se estudar os mecanismos de ação envolvidos no efeito citotóxico de chalconas sintéticas sobre células de LAs, K562 e Jurkat, partindo do pressuposto de que essas chalconas apresentam efeitos semelhante às estudadas anteriormente pelo LOEH.

3 OBJETIVOS

3.1 OBJETIVO GERAL

Investigar o efeito citotóxico de 24 chalconas sintéticas derivadas do 4-carboxibenzaldeído e de 11 chalconas sintéticas derivadas da 1-naftilacetofenona sobre linhagens celulares de leucemia mieloide aguda (K562) e de leucemia linfóide aguda (Jurkat) de origem humana, junto aos mecanismos de morte celular dos compostos mais ativos.

3.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Triar a citotoxicidade *in vitro* de 24 chalconas derivadas do 4-carboxibenzaldeído e de 11 chalconas derivadas da 1-naftilacetofenona sobre células de linhagem de LMA (K562) e de LLA (Jurkat) pelo método do MTT;

- Avaliar a relação estrutura-atividade a partir dos resultados de redução da viabilidade celular;

- Selecionar as chalconas que apresentaram menor % de viabilidade celular e determinar suas respostas em relação à concentração e ao tempo de incubação, bem como calcular sua concentração inibitória 50 % (CI₅₀) em células de linhagem de LMA (K562) e de LLA (Jurkat);

- Avaliar a biodisponibilidade teórica oral das chalconas selecionadas por meio da “Regra dos cinco de Lipinski”;

- Avaliar a citotoxicidade das chalconas que apresentaram menor valor de CI₅₀ em células mononucleares de sangue periférico isoladas de voluntários clinicamente saudáveis;

- Avaliar o efeito das chalconas selecionadas sobre eritrócitos de paciente clinicamente saudáveis;

- Avaliar o efeito das chalconas selecionadas sobre a agregação plaquetária e a coagulação sanguínea;

- Verificar se as chalconas selecionadas induzem morte celular por necrose ou apoptose nas células K562 e Jurkat;

- Avaliar o efeito das chalconas selecionadas sobre o ciclo celular e sobre a expressão do marcador de proliferação celular KI-67 nas células K562 e Jurkat;

- Avaliar o efeito das chalconas selecionadas sobre o potencial de membrana mitocondrial (PMM) das células K562 e Jurkat;

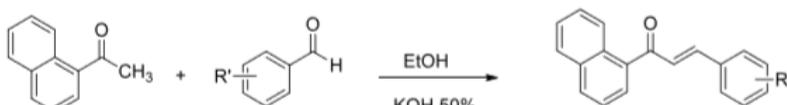
- Investigar se a atividade citotóxica das chalconas selecionadas envolve alterações nos seguintes fatores reguladores da apoptose: proteína antiapoptótica Bcl-2, proteína proapoptótica Bax, fator indutor de apoptose (AIF), receptor Fas (FasR), caspase-3 e proteína antiapoptótica survivina.

4 MATERIAIS E MÉTODOS

4.1 SÍNTESE DAS CHALCONAS

As duas séries de chalconas sintéticas, as chalconas derivadas do 4-carboxibenzaldeído e as chalconas derivadas da 1-naftilacetofenona, utilizadas no presente trabalho foram sintetizadas e gentilmente cedidas pelo Laboratório de Estrutura e Atividade (LEAT) do Departamento de Química da UFSC, sob coordenação do Prof. Dr. Ricardo José Nunes. Para a preparação das chalconas foi utilizada a metodologia de condensação aldólica. Essa metodologia consiste na condensação de uma acetofenona com um benzaldeído em etanol e hidróxido de potássio (KOH) 50 % à temperatura ambiente por 24 horas (h) conforme demonstrado no Esquema 3. A água destilada e o ácido clorídrico (10%) foram adicionados à reação para a precipitação dos compostos, que foram então obtidos por filtração a vácuo. Posteriormente, foram recristalizados em diclorometano e hexano. As estruturas (Tabela 1 e Tabela 2) foram identificadas pelo ponto de fusão, espectroscopia de infravermelho, espectroscopia de ressonância magnética nuclear e análise elementar (CHIARADIA et al., 2008a,b).

Esquema 3 - Síntese das chalconas.



Fonte: Adaptado de CHIARADIA et al., 2008a,b.

Tabela 1 - Estrutura das 24 chalconas sintéticas derivadas do 4-carboxibenaldeído (Continua).

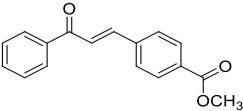
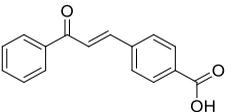
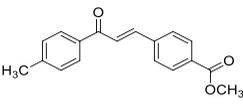
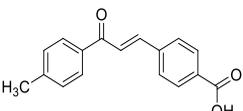
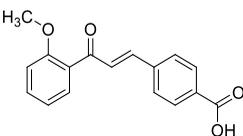
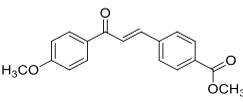
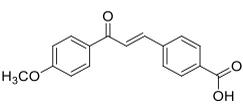
Composto	Estrutura	Massa Molar (g/mol)	Nomenclatura
Q1VA		266,29	(E)-4-(3-oxo-3-fenilprop-1-en-1-il) benzoato de etila
Q1VB		252,26	(E)-4-(3-oxo-3-fenilprop-1-en-1-il) ácido benzoico
Q2VA		280,32	(E)-4-(3-oxo-3-(p-tolil) prop-1-en-1-il) benzoato de metila
Q2VB		266,29	(E)-4-(3-oxo-3-(p-tolil) prop-1-en-1-il) ácido benzoico
Q3MC		282,29	(E)-4-(3-(2-metoxifenil)-3-oxoprop-1-en-1-il) ácido benzoico
Q5VA		296,32	(E)- 4-(3-(4-metoxifenil)-3-oxoprop-1-en-1-il) benzoato de etila
Q5VB		282,29	(E)-4-(3-(4-metoxifenil)-3-oxoprop-1-en-1-il) ácido benzoico

Tabela 1 - Estrutura das 24 chalconas sintéticas derivadas do 4-carboxibenzenalaldeído (Continuação).

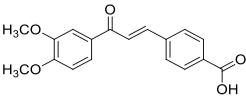
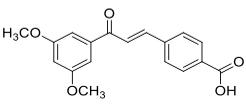
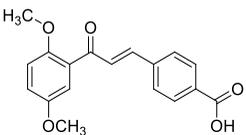
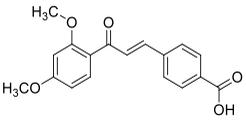
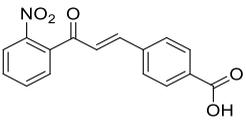
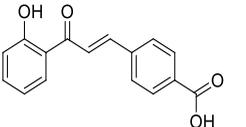
Composto	Estrutura	Massa Molar (g/mol)	Nomenclatura
Q6MC		312,32	(E)-4-(3-(3,4-dimetoxifenil) - 3-oxoprop-1-en-1-il) ácido benzoico
Q7VB		312,32	(E)-4-(3-(3,5-dimetoxifenil) - 3-oxoprop-1-en-1-il) ácido benzoico
Q8VB		312,32	(E)-4-(3-(2,5-dimetoxifenil) - 3-oxoprop-1-en-1-il) ácido benzoico
Q9MC		312,32	(E)-4-(3-(2,4-dimetoxifenil) - 3-oxoprop-1-en-1-il) ácido benzoico
Q10		297,26	(E)-4-(3-(2-nitrofenil)-3-oxoprop-1-en-1-il) ácido benzoico
Q15		268,26	(E)-4-(3-(2-hidroxifenil)-3-oxoprop-1-en-1-il) ácido benzoico

Tabela 1 - Estrutura das 24 chalconas sintéticas derivadas do 4-carboxibenzaldeído (Continuação).

Composto	Estrutura	Massa Molar (g/mol)	Nomenclatura
Q16MC		268,26	(E)-4-(3-(3-hidroxifenil)-3-oxoprop-1-en-1-il) ácido benzoico
Q17		298,29	(E)-4-(3-(4-hidroxí-3-metoxifenil)-3-oxoprop-1-en-1-il) ácido benzoico
Q18VA		342,34	(E)-4-(3-(4-hidroxí-3,5-dimetoxifenil)-3-oxoprop-1-en-1-il) benzoato de metila
Q19MC		331,16	(E)-4-(3-(4-bromofenil)-3-oxoprop-1-en-1-il) ácido benzoico
Q22		323,3	(E)-4-(3-oxo-3-(3-oxo-3,4-dihidro-2H-benzo [b] [1,4] oxazin-6-il) prop-1-en-1-ilo) ácido benzoico

Tabela 1 - Estrutura das 24 chalconas sintéticas derivadas do 4-carboxibenaldeído (Conclusão).

Composto	Estrutura	Massa Molar (g/mol)	Nomenclatura
Q23VB		302,32	(E)-4-(3-(naftalen-1-il) - 3-oxoprop-1-en-1-il) ácido benzoico
Q26VB		267,28	(E)-4-(3-(4-aminofenil)-3-oxoprop-1-en-1-il) ácido benzoico
Q30		270,26	(E)-4-(3-(4-fluorofenil)-3-oxoprop-1-en-1-il) ácido benzoico
R32		302,33	(E)-4-(3-(naftalen-2-il)-3-oxoprop-1-en-1-il) ácido benzoico
Q25		342,34	(E)-4-(3-oxo-3-(3,4,5-trimetoxifenil) prop-1-en-1-il) ácido benzoico
Q31		296,27	(E)-4-(3-(benzo [d] [1,3] dioxol-5-il)-3-oxoprop-1-en-1-il) ácido benzoico

Fonte: Própria (2018).

Tabela 2 - Estrutura das 11 chalconas sintéticas derivadas da 1-naftilacetofenona (Continua).

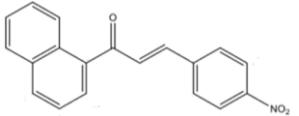
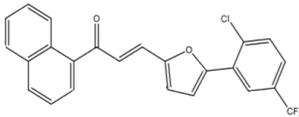
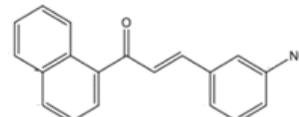
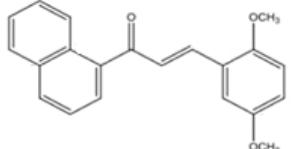
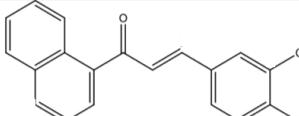
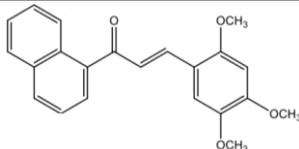
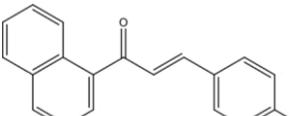
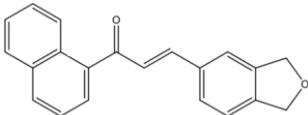
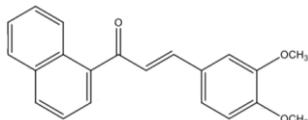
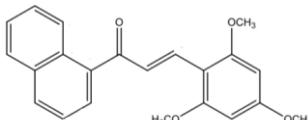
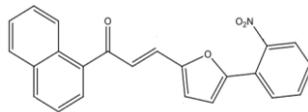
Composto	Estrutura	Massa Molar (g/mol)	Nomenclatura
F03		303,16	(E)-1-(naftaleno-1-il)-3-(4-nitrofenil)prop-2-en-1-ona
F04		426,69	(E)3(5(2cloro5(trifluorometil)fenil)furano-2-il)1(naftaleno-1-il)prop-2-en-1-ona
F05		303,33	(E)-1-(naftileno-1-il)-3-(3-nitrofenil)prop-2-em-1-ona
F06		318,21	(E)-3-(2,5-dimetoxifenil)-1-(naftaleno-1il)prop-2-en-1-one
F07		327,09	(E)-3-(3,4-diclorofenil)-1-(naftalen-1-il)prop-2-em-1-ona
F08		348,22	(E)-1-(naftaleno-1-il)-3-(2,4,5trimetoxifenil)prop-2-en-1-ona
F09		292,64	(E)-3-(4-clorofenil)-1-(naftalen-1-il)prop2-en-1-ona

Tabela 2 - Estrutura das 11 chalconas sintéticas derivadas da 1-naftilacetofenona (Conclusão).

Composto	Estrutura	Massa Molar (g/mol)	Nomenclatura
F10		302,84	(E)-3-(1,3-diidroisobenzofurano-5-il)-1-(naftaleno-1-il)prop-2-en-ona
F11		318,21	(E)-3-(3,4-dimetoxifenil)-1-(naftaleno-1-il)prop-2-en-1-ona
F12		349,21	(E)-1-(naftaleno-1-il)-3-(2,4,6trimetoxifenil)prop-2-en-1-ona
F13		371,92	(E)-1-(naftaleno-1-il)-3-(5-nitrofenil)furan-2-il)prop-2-en-1-ona

Fonte: Própria (2018).

4.2 LINHAGENS CELULARES E CULTIVO CELULAR

No presente trabalho, foram utilizadas duas linhagens celulares de LAs humanas: LMA secundária à leucemia mieloide crônica (LMC) (K562) e LLA de células T (Jurkat), ambas gentilmente cedidas pelo Prof. Dr. Alberto Orfão, do *Cientro de Investigación del Cancer* da Universidade de Salamanca.

A linhagem celular K562 foi a primeira linhagem de leucemia mieloide humana imortalizada, foi estabelecida de um paciente com leucemia mieloide crônica em fase blástica, em que as células param sua maturação e permanecem como mieloblastos (KOEFFLER; GOLDE, 1980). As células K562 são positivas para o gene de fusão BCR-ABL e

em cultura celular não possuem capacidade de se aderir em frascos plásticos, possuem formato arredondado (LOZZIO; LOZZIO, 1975). A linhagem celular Jurkat foi estabelecida de um paciente com recidiva de LLA de células T (SCHNEIDER; SCHWENK; BORNKAMM, 1977). Em cultura celular, não possuem capacidade de se aderir em frascos plásticos e possuem formato arredondado, além da capacidade de formar aglomerados celulares.

As células K562 e Jurkat foram mantidas em garrafas plásticas para cultura celular contendo meio de cultura *Roswell Park Memorial Institute 1640* (RPMI 1640, Gibco®) suplementado com 10 % de soro fetal bovino (SBF, Gibco®), 100 U/mL de penicilina (Gibco®), 100 µg/mL de estreptomicina (Gibco®) e 10 mM de tampão HEPES (Gibco®) em pH 7,2, sendo mantidas em incubadora com atmosfera úmida de 5 % de CO₂ à 37 °C. O tempo aproximado de duplicação celular de ambas as linhagens celulares é de 27 h.

4.3 TRATAMENTO DAS CÉLULAS K562 E JURKAT COM AS CHALCONAS

As chalconas sintéticas foram diluídas em dimetilsulfóxido (DMSO) na concentração de 10 mM e armazenadas a 4 °C, como solução estoque em alíquotas de 1 mL para evitar o constante descongelamento.

Para a realização dos experimentos, o número de células viáveis (K562 e Jurkat) foi avaliado pelo método de exclusão pelo corante Azul de Trypan (0,5 %) (Sigma-Aldrich®). Foram excluídas as amostras com viabilidade inferior a 95 %. A quantidade de células viáveis adicionadas às placas de cultura variou conforme protocolo experimental, mantendo a relação de $5,0 \times 10^4$ células/200µL de meio para as células K562 e de $1,0 \times 10^5$ células/200µL de meio para as células Jurkat, para o tempo de incubação de 24 h. Para as células K562 foram utilizadas $2,5 \times 10^4$ células/200µL de meio e $1,25 \times 10^4$ células/200µL de meio para os tempos de 48 e 72 h, respectivamente. Para as células Jurkat foram utilizadas $5,0 \times 10^4$ células/200µL de meio e $2,5 \times 10^4$ células/200µL de meio para os tempos de 48 e 72 h, respectivamente. Todas as incubações foram realizadas em incubadora com atmosfera úmida de 5 % de CO₂ à 37 °C. A proporção de células/ volume de meio foi mantida nos diferentes tempos e experimentos, seguindo a proporção utilizada no ensaio do MTT. Os procedimentos de preparação das amostras foram realizados em fluxo laminar e todo material utilizado foi esterilizado. No presente trabalho, em todos os ensaios realizados foi inserido aos experimentos o

grupo veículo (grupo de células tratadas com o veículo de dissolução das chalconas, o solvente DMSO).

4.4 AVALIAÇÃO DA VIABILIDADE CELULAR PELO MÉTODO DO MTT.

Inicialmente, realizou-se a triagem para avaliar o efeito citotóxico das duas séries de chalconas sintéticas, as 24 chalconas derivadas do 4-carboxibenzaldeído e as 11 chalconas derivadas da 1-naftilacetofenona, na concentração de 100 μ M, sobre as células K562 e Jurkat. Após 24 h de incubação, a viabilidade celular foi avaliada pelo método do brometo de 3-(4,5-dimetil-2-tiazolil)-2,5-difenil-2H-tetrazólio (MTT, Amresco®). Este método consiste em um ensaio colorimétrico que se baseia na redução do MTT ao seu derivado formazan, de cor roxa, pelo metabolismo mitocondrial (MOSMANN, 1983). Dessa forma, o ensaio funciona como um indicador da função mitocondrial, e, por conseguinte, de viabilidade celular.

Após o tempo de incubação, as placas contendo as células foram centrifugadas, o sobrenadante removido e adicionado novo meio de cultura contendo 10 % (v/v) de solução de MTT (5 mg/mL em PBS). Após 3 h de incubação, as placas contendo as células foram novamente centrifugadas e o sobrenadante removido. Os precipitados formados em cada poço foram dissolvidos em 100 μ L de solução de álcool isopropílico/HCl 0,04 N e as placas submetidas à nova centrifugação para a remoção dos restos celulares. O sobrenadante foi transferido para outra placa, onde foi realizada a leitura das absorbâncias em espectrofotômetro Microwell Systems (Organon Teknika®) no comprimento de onda 540 nm. A densidade óptica do grupo controle (células sem tratamento) foi considerada como 100 % de células viáveis

Os compostos das duas séries triadas que demonstraram maior redução na viabilidade das células K562 e Jurkat foram selecionados para a determinação da curva concentração e tempo-resposta. Para isso, as células K562 e Jurkat foram adicionadas a poços de 200 μ L de placa de cultura, respeitando a concentração celular descrita no item 4.3, e foram incubadas com as chalconas selecionadas, em concentrações crescentes (5, 10, 25, 50 e 100 μ M). Após 24, 48 e 72 h de incubação, a viabilidade celular foi avaliada pelo método do MTT. A CI_{50} foi obtida a partir de uma curva concentração resposta em 24, 48 e 72 h, utilizando-se o software GraphPad Prism 6.

Após a determinação das CI_{50} das chalconas selecionadas, foram escolhidas as chalconas com menores valores de CI_{50} para dar continuidade aos experimentos.

4.5 MÉTODO TEÓRICO PARA PREDIÇÃO DA BIODISPONIBILIDADE ORAL: REGRA DOS CINCO DE LIPINSKI

Os parâmetros de semelhança de fármaco para as chalconas selecionadas foram avaliados de acordo com a regra de cinco de Lipinski (LIPINSKI et al., 2001; LIPINSKI, 2004). Essa regra prediz a biodisponibilidade oral das moléculas por meio da não violação de 5 parâmetros: menos de cinco doadores de ligação de hidrogênio, menos de 10 aceptores de ligação de hidrogênio, peso molecular inferior a 500, valores de $Mlog P$ abaixo de cinco e número de ligações rotáveis menores de 10. Os valores do peso molecular (PM), $Mlog P$, aceptores de ligação hidrogênio (N + O), doadores de ligação hidrogênio (NH + OH), número de ligações rotáveis, área de superfície polar topológica (TPSA) e o número de violações foram obtidos a partir do programa Free molinspiration disponibilizado on line pelo JME Editor, cortesia de Peter Ertl da Novartis, disponível no site: <http://www.molinspiration.com/cgi-bin/properties>. A área de superfície polar topológica foi usada para calcular a porcentagem de absorção (% ABS) de acordo com a equação: $ABS = 109 - [0,345 \times TPSA]$ (AHSAN et al., 2011).

4.6 AVALIAÇÃO DO EFEITO DAS CHALCONAS SELECIONADAS SOBRE O SANGUE PERIFÉRICO DE INDIVÍDUOS CLINICAMENTE SAUDÁVEIS

4.6.1 Seleção de participantes e coleta das amostras

Foram utilizadas amostras de SP de seis doadores voluntários clinicamente saudáveis, não fumantes, atendidos no Serviço de Hemoterapia do Hospital Universitário Polydoro Ernani de São Thiago da Universidade Federal de Santa Catarina (HU/UFSC). Todos os indivíduos assinaram o TCLE presente no projeto de pesquisa aprovado pelo CEPESH-UFSC sob parecer nº 746.486 /2014 (Anexo 1). Para os experimentos de viabilidade celular sobre células mononucleares de SP foram utilizadas amostras coletadas por punção venosa em tubos com anticoagulante EDTA, já para os experimentos de hemólise, coagulação

sanguínea e agregação plaquetária foram utilizadas amostras coletadas com o anticoagulante citrato de sódio.

4.6.2 Avaliação da citotoxicidade em células mononucleares

Como modelo de células humanas normais, foram utilizadas células mononucleares de SP de indivíduos clinicamente saudáveis. As amostras de SP foram coletadas e diluídas em tampão fosfato (PBS) imediatamente após a coleta. As células mononucleares foram isoladas após separação com Ficoll-Hypaque (densidade 1.077 g/mL, Sigma-Aldrich®, EUA). Após centrifugação, a interfase contendo as células mononucleares foi transferida para um tubo cônico, lavadas duas vezes com PBS e ressuspensas em meio RPMI 1640 para contagem celular. O número de células viáveis foi avaliado pelo método de exclusão do corante Azul de Trypan (0,5 %). A cada poço da placa de cultura celular foram adicionadas $5,0 \times 10^5$ células/ 200 μ L de meio. Em seguida, as células foram incubadas com as chalconas selecionadas nas concentrações das maiores CI_{50} de 24 h encontradas. Após 24 h de incubação, a viabilidade celular foi avaliada pelo método do MTT.

4.6.3 Avaliação da atividade hemolítica

A capacidade das chalconas citotóxicas de induzir ruptura na membrana dos eritrócitos e conseqüentemente hemólise foi avaliada pelo ensaio de hemólise. Para o ensaio, os eritrócitos das amostras de SP foram isolados do restante do conteúdo sanguíneo (plasma e leucócitos) por centrifugação (10 minutos em 264 x g), lavagens com solução salina (cloreto de sódio 0,9 %) e descarte do sobrenadante. O sedimento de eritrócitos foi diluído a fim de obter a dispersão estoque, com valor de absorbância entre 1,8 e 2,2, quando lida em espectrofotômetro a 540 nm. A partir da dispersão de estoque de eritrócitos foram montados os ensaios: controle negativo ou zero por cento de hemólise (50 μ L de dispersão de eritrócitos com adição de 950 μ L de salina), controle positivo ou 100 % de lise celular (50 μ L de dispersão de eritrócitos com adição de 950 μ L de água destilada) e amostras testes (50 μ L de dispersão de eritrócitos com adição de 950 μ L de solução salina contendo diferentes concentrações das chalconas selecionadas). Cada amostra foi incubada a 37 °C por 1 hora sobre agitação de 100 x g (WANG J. J. et al., 2009). Após a incubação, as amostras foram centrifugadas a 500 x g por 5 minutos e a absorbância do sobrenadante foi lida em espectrofotômetro Microwell Systems a 540 nm. Todos os ensaios foram realizados em

triplicata. A taxa de hemólise foi calculada (Equação 1) de acordo com a densidade óptica de cada amostra e controles, que demonstram a quantidade de hemoglobina liberada no sobrenadante devido a ruptura dos eritrócitos.

$$\text{Taxa de Hemólise (\%)} = \frac{\text{DOt} - \text{DOcn}}{\text{DOcp} - \text{DOcn}} \times 100 \quad (1)$$

Onde DOt é a densidade óptica da amostra teste; DOcn é a densidade óptica do controle negativo; e DOcp é a densidade óptica do controle positivo.

4.6.4 Estudos da agregação plaquetária

A agregação plaquetária foi avaliada de acordo com Born e Cross (1963), utilizando-se um agregômetro semi-automatizado (AgreGO, Qualitem). Depois de coletadas as amostras de sangue total, as plaquetas foram isoladas através de centrifugação do sangue citratado a 123 g por 10 minutos à temperatura ambiente para a obtenção do pool de plasma rico em plaquetas (PRP). As plaquetas foram contadas em câmara de Neubauer e reajustadas com PBS para 250.000 plaquetas/mm³ antes da realização dos experimentos. Para avaliar os efeitos das chalconas sobre a agregação plaquetária, 400 µL do pool de PRP foram incubados a 37 °C por 5 minutos com 10 µL das chalconas selecionadas (na concentração final respectiva a sua maior CI₅₀ de 24 h) ou de veículo de dissolução (DMSO 0,6 % concentração final). A seguir, as amostras foram estimuladas individualmente com ADP (6 µM; Sigma-Aldrich®, St. Louis, EUA) ou epinefrina (6 µM; Hipolabor, Minas Gerais, BR) e a agregação foi acompanhada por 5 minutos. Para acertar a linha de base de turbidez da amostra, utilizou-se o PPP obtido pela centrifugação das amostras de sangue citratado a 1.107 g por 15 minutos à temperatura de 8 °C. Todos os experimentos foram realizados em triplicatas e dentro de um período de três horas após a coleta da amostra.

4.6.5 Estudos de coagulação sanguínea

O estudo de coagulação foi realizado de acordo com Triplett, Harms e Koepke (1978) utilizando-se coagulômetro semi-automatizado (CLOTimer, Quick Timer). Para os ensaios de coagulação, foi utilizado um pool de plasma pobre em plaquetas (PPP). Para a obtenção do pool de PPP, as amostras de sangue anticoagulado com citrato de sódio foram centrifugadas a 1.107 g por 15 minutos à temperatura de 8 °C. Após a centrifugação, o sobrenadante (PPP) de todos os tubos foi transferido para um tubo tipo Falcon de 15 mL. Para a realização dos ensaios, 100 µL do pool de PPP foram incubados a 37 °C por 5 minutos com 10 µL das chalconas selecionadas (na concentração final respectiva a sua maior CI₅₀ de 24 h) ou de veículo de dissolução (DMSO 0,7 % concentração final) e, em seguida, foram realizados os testes de tempo de protrombina (TP) ou de tempo de tromboplastina parcial ativada (TTPa), conforme a bula do kit HemosIL® (Instrumentation Laboratory, Massachusetts, EUA). Todos os experimentos foram realizados em triplicatas e dentro de um período de três horas após a coleta da amostra.

4.7 AVALIAÇÃO DO CICLO CELULAR

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

As células K562 (1,0 x 10⁶ células/ 4mL de meio) e Jurkat (1,0 x 10⁶ células/ 2mL de meio) foram tratadas com as chalconas selecionadas nas suas CI₅₀ de 24 h, e incubadas durante 24 h. Após esse período, as células foram lavadas duas vezes com PBS, submetidas à centrifugação a 200 x g por 10 minutos e o sobrenadante foi descartado. Em seguida, as células foram fixadas com etanol 70 % e incubadas durante 30 minutos a -4° C. Após esse período, as células foram lavadas duas vezes em PBS contendo 2 % de albumina bovina e centrifugadas a 200 x g durante 10 minutos. Posteriormente, foi adicionado ao sedimento celular 500 µL de solução de PI contendo RNase, e as células foram mantidas ao abrigo da luz durante 15 minutos em temperatura ambiente. As análises foram

realizadas no citômetro de fluxo BD FACSCanto™ II (Becton Dickinson Immunocytometry Systems) por meio da estratégia de *gate* de aquisição de 20.000 eventos, no modo “low”, em ciclo celular (fases G0/G1, S e G2/M). Os resultados foram avaliados pelo software *Infinicyt* (Cytognos®) versão 1.7. O controle negativo foi preparado com células sem tratamento para caracterização dos parâmetros a serem analisados no citômetro de fluxo.

4.8 AVALIAÇÃO DA APOPTOSE

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

4.8.1 Avaliação da apoptose pelo método da fragmentação do DNA

Uma das principais características da morte celular por apoptose é a degradação do DNA nuclear em unidades nucleossomais (NAGATA, 1997). No caso de morte celular por apoptose, o padrão em escada, característico deste tipo de morte celular pode ser observado usando o método de eletroforese em gel de agarose.

As células K562 ($6,0 \times 10^6$ células/24 mL de meio) e Jurkat ($6,0 \times 10^6$ células/12 mL de meio) foram tratadas com as chalconas selecionadas nas CI_{50} de 24 h e incubadas durante 24 h em estufa úmida a 37 °C com 5 % de CO₂. Após a incubação, a extração do DNA foi realizada utilizando o kit comercial NucleoSpin (Macherey-Nagel®), conforme instruções do fabricante. As amostras de DNA extraídas foram submetidas à eletroforese em gel de agarose 2 % e corados com brometo de etídio (2 µg/mL). Na sequência, os padrões de separação do DNA formados foram visualizados e fotografados sob iluminação UV de foto documentação de géis (DOC-PRINT, Biosystems®). Como controle negativo utilizou-se as células sem tratamento nas mesmas condições citadas anteriormente.

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

Para a avaliação das células apoptóticas por microscopia de fluorescência, foram utilizados os corantes fluorescentes laranja de

acridina e brometo de etídio. O laranja de acridina é permeável à membrana íntegra e se liga ao DNA emitindo fluorescência verde às células quando observadas ao microscópio de fluorescência; enquanto que o brometo de etídio é permeável à membrana somente quando a integridade da mesma está alterada, conferindo fluorescência vermelha ao núcleo das células. A fluorescência do brometo de etídio predomina sobre a fluorescência do laranja de acridina; assim, as células viáveis apresentam fluorescência verde, células em apoptose inicial apresentam núcleo com fluorescência verde, núcleos picnóticos, cromatina nuclear condensada e a formação de corpos apoptóticos; células em apoptose tardia apresentam núcleo com fluorescência laranja e cromatina condensada ou fragmentada e as células necróticas apresentam fluorescência vermelha quando o brometo de etideo intercala-se ao DNA (RENVOIZÉ et al., 1998). As células K562 ($1,0 \times 10^6$ células/ 4mL de meio) e Jurkat ($1,0 \times 10^6$ células/ 2mL de meio) foram incubadas por 12 h com as chalconas selecionadas nas suas CI_{50} de 24 h em placas de cultura celular. O tempo de 12 h foi escolhido para os experimentos de apoptose, levando em consideração experimentos prévios realizados no LOEH; este tempo permite identificar as células K562 e Jurkat em apoptose inicial e tardia e as possíveis proteínas envolvidas. Após o período de 12 h de incubação, as células foram lavadas com PBS, o sobrenadante foi removido e o sedimento celular foi ressuspenso e incubado por 10 minutos em uma solução constituída de brometo de etídio (5 $\mu\text{g}/\text{mL}$) e laranja de acridina (10 $\mu\text{g}/\text{mL}$) na proporção 1:1 à temperatura ambiente. Após esse período, a morfologia das células foi observada com o auxílio de uma lâmina e lamínula de vidro em microscópio de fluorescência (Olympus BX-FLA, Olympus®). Dez campos foram fotografados com câmera (Olympus BX-40, Olympus®), em aumento de 400 vezes.

4.8.3 Avaliação da apoptose pelo método anexina V

Durante o estágio inicial da apoptose ou após a ativação da caspase-3 ocorre a perda da assimetria da membrana citoplasmática, com a consequente externalização dos resíduos de fosfatidilserina. A anexina V possui a propriedade de ligar-se especificamente aos resíduos de fosfatidilserina e quando conjugada ao FITC, permite a identificação e quantificação das células que expõem esses resíduos por citometria de fluxo (ENGELAND et al., 1998; GALLUZZI et al., 2018).

Para a quantificação da externalização dos resíduos de fosfatidilserina as células K562 ($1,0 \times 10^6$ células/ 4mL de meio) e Jurkat

($1,0 \times 10^6$ células/ 2mL de meio) foram incubadas com as chalconas selecionadas nas suas CI_{50} de 24 h por 12 horas. Após a incubação, as células foram lavadas duas vezes com tampão PBS e submetidas à centrifugação a $200 \times g$ por 10 minutos. Para a quantificação da anexina foi utilizado o kit comercial *Annexin V- FITC Apoptosis Detection* (Immunostep®). O sobrenadante foi desprezado e ao sedimento celular foram adicionados 100 μ L de tampão de anexina-V (1:10) e 5 μ L de anexina V-FITC. A suspensão de células com anexina V-FITC foi incubada ao abrigo da luz durante 15 minutos em temperatura ambiente. Transcorrido o tempo, foram adicionados 400 μ L do tampão de anexina (1:10) para posterior análise. O controle negativo dos experimentos foi preparado com as células sem tratamento, a fim de definir a quantificação basal de marcação com anexina V-FITC. As análises foram realizadas no citômetro de fluxo BD FACSCanto™ II (Becton Dickinson®) com a aquisição de 10.000 eventos no modo “right” e avaliadas pelo software *Infinicyt* (Cytognos®) versão 1.7. Os resultados foram expressos em porcentagem por meio da intensidade de fluorescência média (IFM) de pelo menos três experimentos independentes.

4.9 AVALIAÇÃO DO POTENCIAL DE MEMBRANA MITOCONDRIAL

O PMM das células K562 e Jurkat submetidas ao tratamento com as chalconas selecionadas foi avaliado utilizando-se o kit MitoView 633 (Biotium®). O MitoView 633 é um corante fluorescente mitocondrial de coloração vermelha que se difunde através da membrana plasmática e se acumula na mitocôndria. As mitocôndrias com atividade fisiológica do potencial mitocondrial são coradas com o MitoView 633 e fluorescem após o acúmulo do corante no ambiente de lipídios mitocondriais. Quando há uma diminuição no potencial mitocondrial, as mitocôndrias perdem essa fluorescência. As células K562 ($1,0 \times 10^6$ células/ 4mL de meio) e Jurkat ($1,0 \times 10^6$ células/ 2mL de meio) foram tratadas com as chalconas nas suas CI_{50} de 24 h, e incubadas durante 12 h. Após esse período, as células foram lavadas duas vezes com PBS, submetidas à centrifugação a $200 \times g$ por 10 minutos e o sobrenadante descartado. Em seguida, foram adicionados sobre o sedimento celular 100 μ L da solução de MitoView 633 diluído 1:10.000. As células foram incubadas por 30 minutos a temperatura ambiente no escuro. Após esse período, as células foram centrifugadas a $200 \times g$ por 10 minutos, o sobrenadante foi descartado e

o sedimento foi ressuspensionado em 1 mL de PBS. As análises foram realizadas no citômetro de fluxo BD FACSCanto™ II (Becton Dickinson®) com a aquisição de 10.000 eventos no modo “right” e avaliadas pelo software *Infinicyt* (Cytognos®) versão 1.7. Os resultados foram expressos em porcentagem por meio da intensidade de fluorescência média (IFM) de pelo menos três experimentos independentes.

4.10 AVALIAÇÃO DA EXPRESSÃO DAS PROTEÍNAS KI-67, BCL-2, BAX, AIF, FASR, CASPASE-3 E SURVIVINA POR CITOMETRIA DE FLUXO

As células K562 ($1,0 \times 10^6$ células/ 4mL de meio) e Jurkat ($1,0 \times 10^6$ células/ 2mL de meio) foram tratadas com as chalconas selecionadas nas suas CI_{50} de 24 h, e incubadas durante 12h. Para a fixação e permeabilização das células foi utilizado o kit *BD Fix/Perm* (Becton Dickinson®), exceto para o FasR, por se tratar de um receptor de membrana plasmática o qual deve ser mensurado sem a permeabilização da membrana plasmática. Após 20 minutos de incubação a 8 °C, as amostras foram submetidas a novas centrifugações, o sobrenadante foi descartado e o sedimento celular foi ressuspensionado com 100 µL de tampão de lavagem *Fix/Perm*. Depois, foram adicionados 5 µL do anticorpo monoclonal anti-KI-67 conjugado a FITC, 5 µL do anticorpo monoclonal anti-Bcl-2 conjugado a FITC, 5 µL do anticorpo monoclonal anti-Bax conjugado ao PerCP, 5 µL do anticorpo monoclonal anti-AIF conjugado a FITC, 5 µL do anticorpo monoclonal anti-FasR conjugado a PE, 5 µL do anticorpo monoclonal anti-caspase-3 ou anti-procaspase-3 conjugados a FITC e 5 µL do anticorpo monoclonal anti-survivina conjugado a PE, em seus respectivos tubos e quando possível associados em uma mesma análise. Após 15 minutos de incubação a 8 °C, foram adicionados 500 µL do tampão de lavagem e as amostras foram centrifugadas duas vezes nas mesmas condições descritas acima. Por fim, foram adicionados 500 µL de PBS ao sedimento celular. O controle negativo foi preparado com células sem tratamento. As análises foram realizadas no citômetro de fluxo BD FACSCanto™ II (Becton Dickinson®) com a aquisição de 10.000 eventos no modo “right” e avaliadas pelo software *Infinicyt* (Cytognos®) versão 1.7. Os resultados foram expressos em porcentagem por meio da intensidade de fluorescência média (IFM) de pelo menos três experimentos independentes.

4.11 ANÁLISE ESTATÍSTICA

Os resultados obtidos nos experimentos foram expressos como média \pm erro padrão da média (EPM). Cada experimento foi repetido pelo menos três vezes de maneira independente. Para avaliação da citotoxicidade em células de leucemias agudas LAs foi utilizado a análise de variância de uma via (ANOVA *one way*) seguida de Turkey ou Bonferroni.

A análise da viabilidade celular em células mononucleares, a avaliação do efeito hemolítico, a avaliação do ciclo celular, a avaliação do marcador de proliferação celular KI-67, a avaliação da exposição dos resíduos de fosfatidilserina, a alteração do potencial de membrana mitocondrial (PMM) e a avaliação da expressão de proteínas envolvidas na apoptose das chalconas selecionadas foram realizados através do teste *t* de Student não-pareado, comparando cada ponto com o grupo controle. O efeito das chalconas selecionadas sobre a agregação plaquetária e coagulação sanguínea (TP e TTPa) foram realizados através do teste *t* de Student pareado, comparando cada ponto com o grupo controle. Em todas as análises foi adotado um nível de significância mínimo de 5 % ($P \leq 0,05$). As análises foram realizadas com o auxílio do software GraphPad Prism 6.

5 RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.1 TRIAGEM DAS CHALCONAS SINTÉTICAS DERIVADAS DO 4-CARBOXIBENZALDEÍDO E DA 1-NAFTILACETOFENONA SOBRE CÉLULAS DE LEUCEMIA MIELOIDE AGUDA K562 E SOBRE CÉLULAS DE LEUCEMIA LINFOIDE AGUDA JURKAT

Chalconas e seus derivados têm sido descritas pelo seu potencial citotóxico sobre células tumorais, incluindo células de linhagens de leucemias. A atividade citotóxica das chalconas está largamente atribuída à porção cetona insaturada da molécula (GAUR et al., 2016). Estudos realizados anteriormente no LOEH demonstraram a atividade citotóxica de diversas chalconas sintéticas e derivados sobre células de LAs (PEDRINI et al., 2010; MAIORAL et al., 2013; COSTA et al., 2014; MAIORAL et al., 2016; BUBNIAK et al., 2017). Assim, inicialmente, foi realizada uma triagem inicial das duas séries de chalconas sintéticas (24 chalconas derivadas do 4-carboxibenzaldeído e 11 chalconas derivadas da 1-naftilacetofenona) com o objetivo de avaliar se as mesmas eram citotóxicas para células de leucemias agudas K562 e Jurkat.

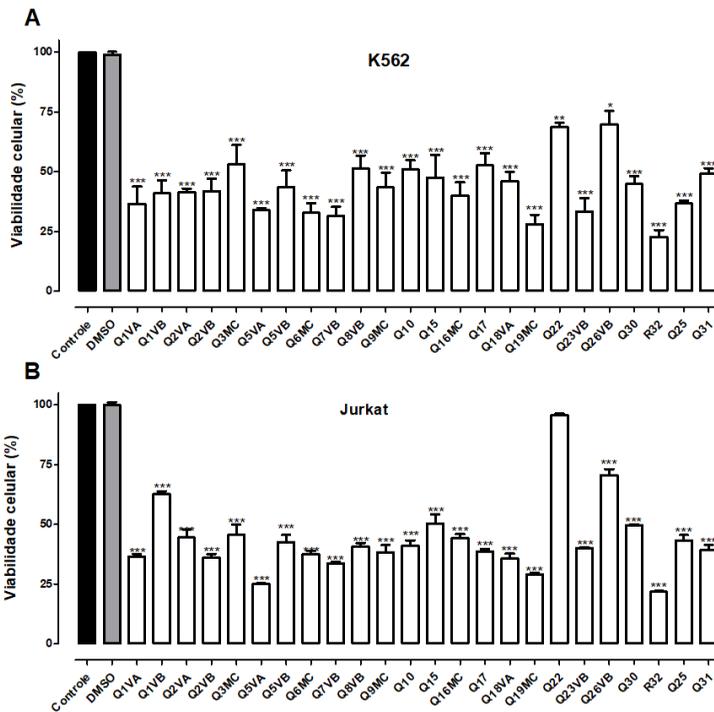
5.1.1 Triagem das chalconas sintéticas derivadas do 4-carboxibenzaldeído sobre células de LMA (K562) e sobre células de LLA (Jurkat)

Como podemos observar na Figura 2, Painéis A e B, com exceção das células Jurkat incubadas com a chalcona **Q22**, a incubação das células K562 e Jurkat com 100 μ M das chalconas derivadas do 4-carboxibenzaldeído por 24 h causou redução significativa da viabilidade celular em comparação ao grupo controle (células sem tratamento) ao qual foi atribuída viabilidade de 100 %. O grupo controle com 2% de DMSO não apresentou diferença significativa na viabilidade celular, quando comparado ao grupo de células sem tratamento. Dentre as 24 chalconas triadas, os compostos **Q1VA**, **Q2VA**, **Q3MC**, **Q5VA**, **Q9MC**, **Q16MC**, **Q17**, **Q22**, **Q25**, **Q26VB** e **Q31** são inéditos, os demais estão descritos na literatura.

Os resultados obtidos demonstram que dentre as 24 chalconas avaliadas, as que apresentaram maior redução da viabilidade celular em 24 h foram as chalconas **Q6MC**, **Q7VB**, **Q19MC** e **R32** com percentuais de viabilidade celular para células K562 de $32,77 \pm 4,04$ %, $28,10 \pm 3,92$ %, $31,42 \pm 3,97$ % e $22,82 \pm 2,82$ %, respectivamente (Figura 2, Painel

A) e viabilidade celular para células Jurkat de $37,36 \pm 1,54$ %, $33,71 \pm 0,62$ %, $29,25 \pm 0,40$ % e $21,81 \pm 0,48$ %, respectivamente. (Figura 2, Painel B).

Figura 2 - Triagem do efeito citotóxico das chalconas sintéticas derivadas do 4-carboxibenaldeído sobre células de linhagem de leucemia mieloide aguda K562 e de leucemia linfóide aguda Jurkat.



As células K562 ($5,0 \times 10^4$ células/200 μ L de meio) e Jurkat ($1,0 \times 10^5$ células/200 μ L de meio) foram incubadas com as chalconas sintéticas na concentração de 100 μ M por 24 h. O grupo controle do veículo no qual as chalconas foram diluídas foi realizado pela avaliação da viabilidade das células incubadas com 2 % de DMSO. A viabilidade celular foi avaliada pelo método do MTT. A densidade óptica do grupo controle, sem tratamento, corresponde a 100 % da viabilidade celular. Cada ponto representa a média \pm EPM de, pelo menos, três experimentos independentes. Diferença estatisticamente significativa em relação ao grupo controle: * $P \leq 0,05$, ** $P \leq 0,01$ *** $P \leq 0,001$, ANOVA *one way*, seguido de teste *post-hoc* de Turkey.

Fonte: Própria (2018).

No presente trabalho, para fins didáticos consideramos as chalconas com viabilidade celular < 30 % com atividade citotóxica elevada, entre 30 % e 50 % com atividade citotóxica moderada e com viabilidade celular > 50 % com atividade citotóxica baixa.

Os estudos de correlação estrutura e atividade, fundamentados no efeito do substituinte em um determinado anel aromático, como por exemplo os anéis A e/ou B das chalconas são muito comuns na química medicinal, pois mais de 50% dos fármacos ou compostos bioativos possuem esse tipo de anel. A substituição de um átomo de hidrogênio por um determinado substituinte pode modificar a potência, duração, e ainda a natureza do efeito farmacológico de uma molécula. As modificações produzidas pela introdução de um substituinte podem modificar várias propriedades físico-químicas da molécula, tais como: hidrofobicidade, densidade eletrônica e conformação estrutural, cuja análise poderá orientar a síntese de novos compostos bioativos (CALIXTO, 2001; CESARIN-SOBRINHO; NETTO-FERREIRA; BRAZ FILHO, 2001).

Em geral, a atividade biológica das chalconas varia de acordo com a natureza dos substituintes: efeitos estéricos causados por substituintes volumosos, efeitos eletrônicos decorrentes da diferença de eletronegatividade entre átomos ou grupos substituintes (se correlaciona com a capacidade de doar ou receber elétrons) e os efeitos hidrofóbicos de substituintes (CESARIN-SOBRINHO; NETTO-FERREIRA; BRAZ FILHO, 2001). Campos-Buzzi e colaboradores (2007) e Chiaradia e colaboradores (2008a,b) descreveram que a substituição no anel A e B de um hidrogênio por qualquer outro substituinte pode resultar em compostos com propriedades farmacológicas totalmente distintas, desse modo o alvo principal dos químicos-medicinais está em variar substituintes desses anéis A e B. Chalconas com substituição de três hidrogênios por metoxilas em um dos anéis aromáticos são descritas na literatura como potentes agentes antitumorais, incluindo atividade antileucêmica (DUCKI et al., 1998; BHAT et al., 2005; GO; WU; LIU, 2005; QUINTIN et al., 2009; SRINIVASAN et al., 2009, COSTA et al., 2014). Bhat e colaboradores (2005) destacaram que a presença do padrão de substituição 3',4',5'-trimetoxifenil é essencial para a atividade citotóxica das chalconas testadas em diferentes linhagens celulares de câncer humano. Da mesma forma, Quintin e colaboradores (2009) descreveram que a presença de metoxilas como substituintes do anel A aumentam o potencial citotóxico das chalconas, sendo as 3',4',5'-trimetoxichalconas as chalconas com maior atividade citotóxica, já a presença de metoxila como substituinte no anel B deve ser evitada, devido

ao impedimento estrutural que dificulta a interação entre os grupamentos do anel A (como por exemplo as metoxilas) com o alvo.

As relações estrutura-atividade seguem descritas de acordos com os parâmetros de substituição do anel aromático A e/ou B nos itens a seguir:

1) Dentre as chalconas que apresentam o grupo 4-carboxi como substituinte do anel aromático B, a chalcona **Q1VB**, sem substituintes no anel aromático A, apresentou atividade citotóxica de baixa a moderada na triagem (Tabela 3).

2) Para os compostos que possuem grupos doadores de elétrons do anel aromático A, e o grupo 4-carboxi no anel aromático B (Tabela 3), constata-se que:

- Chalconas com grupamentos hidroxila no anel A apresentaram atividade citotóxica moderada (**Q16MC**) ou baixa/ moderada (**Q15** e **Q17**), o que permite afirmar que a presença do grupo hidroxila no anel A não parece ser importante para a atividade citotóxica das chalconas.

- Chalconas com grupamentos metil (**Q2VB**) ou metoxi (**Q5VB**) na posição 4 do anel A apresentaram atividade citotóxica moderada, a presença desses substituintes não modificou significativamente a atividade citotóxica, quando comparadas à estrutura sem substituintes no anel A (**Q1VB**). Entretanto, a presença de um grupamento amino na posição 4 do anel A (**Q26VB**) reduziu consideravelmente a atividade citotóxica da chalcona. A chalcona **Q26VB** apresenta atividade baixa.

- Grupamentos metoxila na posição 2 do anel A parecem reduzir a atividade citotóxica das chalconas, o que pode ser observado para as chalconas **Q3MC** e **Q8VB**, quando comparadas à estrutura sem substituintes no anel A (**Q1VB**). Essas chalconas apresentam citotoxicidade baixa/ moderada em células K562 e Jurkat.

- A chalcona **Q25**, com grupamentos metoxila nas posições 3, 4 e 5 do anel A, apresentou melhor atividade citotóxica do que a chalcona **Q5VB**, indicando que mais de um grupo metoxila no anel A aumenta a atividade das chalconas, exceto quando este grupo está na posição 2. A observação de que metoxilações das chalconas **Q6MC** e **Q7VB**, com dois grupamentos metoxila no anel A, respectivamente, nas posições 3 e 4, e

3 e 5 aumentam a atividade citotóxica de ambos os compostos corroboram os estudos de Quintin e colaboradores (2009). A chalcona **Q9MC**, apesar de possuir duas metoxilas (nas posições 2 e 4 do anel A), conferiu atividade citotóxica semelhante à **Q5VB**, possivelmente pela interferência do grupamento 2-metoxi no anel A.

3) Para as chalconas que apresentam o grupo 4-acetil ou 4-carboxi como substituinte do anel aromático B, observa-se que (Tabela 3):

- As chalconas com substituintes doadores de elétrons do anel aromático A, que apresentam como substituinte o grupo 4-acetil no anel B (**Q1VA**, **Q2VA**, **Q5VA** e **Q18VA**) apresentaram atividade citotóxica moderada. Entretanto, pode-se observar que **Q1VA**, **Q2VA** e **Q5VA** conferiram atividade igual ou melhor às suas correspondentes que possuem o grupo 4-carboxi no anel B (**Q1VB**, **Q2VB** e **Q5VB**).

- Para o pequeno grupo de estruturas avaliadas que possuem grupos aceptores de elétrons do anel aromático A, e o grupo 4-carboxi no anel aromático B, observa-se que a presença de um grupo com estas características na posição 2 do anel A (**Q10**) reduz a atividade citotóxica da chalcona, quando comparada à estrutura sem substituintes no anel A (**Q1VB**). Esse resultado permite inferir que, aparentemente, qualquer substituinte na posição 2 do anel A, seja ele doador ou aceptor de elétrons, reduz a atividade citotóxica das chalconas, como já mencionado anteriormente para **Q15** (2-OH) e **Q3MC** (2-OCH₃). Além disso, grupamentos eletronegativos na posição 4 do anel A conferem melhor atividade de acordo com o seu volume, desse modo para a chalcona **Q30**, que possui um átomo de flúor (F) na posição 4, a atividade foi moderada, e para a chalcona **Q19MC**, que apresenta um átomo de bromo (Br) mesma posição, mais volumoso que o átomo de F, a atividade citotóxica foi elevada.

4) Dentre as chalconas que possuem o anel A substituído por anéis diferenciados e o grupo 4-carboxi no anel aromático B, foi possível observar que a presença de anéis polares (**Q22**) ou moderadamente polares (**Q31**) como anel A, implicaram perda da atividade citotóxica das

chalconas, quando comparadas à atividade da chalcona **Q1VB** (sem substituintes no anel A) (Tabela 3).

5) As chalconas que possuem anéis hidrofóbicos conjugados ao anel A, apresentaram grande melhora da atividade citotóxica, o que pode ser observado para as chalcona **Q23VB** (que possui como anel A o grupamento 1-naftil) e a chalcona **R32** (que possui como anel A o grupamento 2-naftil) (Tabela 3).

Tabela 3 - Estrutura química e viabilidade celular das chalconas sintéticas derivadas do 4- carboxibenzaldeído (100 μ M) triadas sobre células K562 e Jurkat (Continua).

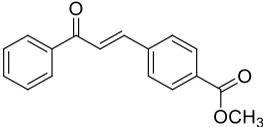
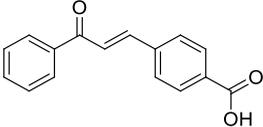
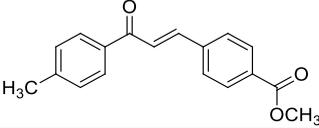
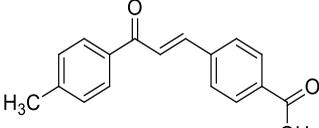
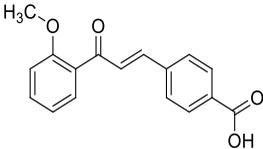
Composto	Estrutura	Viabilidade celular K562 (%)	Viabilidade celular Jurkat (%)
Q1VA		36,64 \pm 7,17	36,61 \pm 1,00
Q1VB		40,95 \pm 5,36	62,68 \pm 1,15
Q2VA		41,41 \pm 1,56	44,46 \pm 3,48
Q2VB		41,85 \pm 5,24	36,01 \pm 1,64
Q3MC		53,12 \pm 8,08	45,66 \pm 4,34

Tabela 3 - Estrutura química e viabilidade celular das chalconas sintéticas derivadas do 4- carboxibenaldeído (100 μ M) triadas sobre células K562 e Jurkat (Continuação).

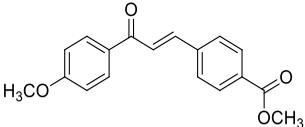
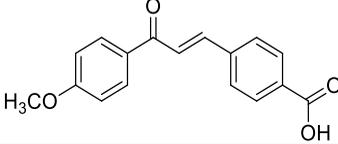
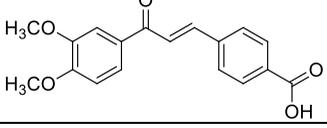
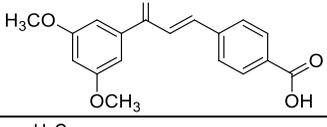
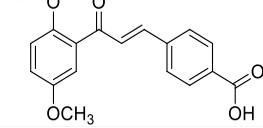
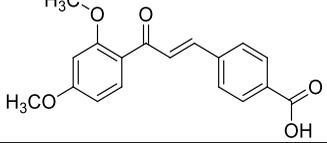
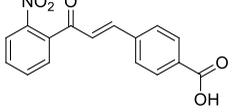
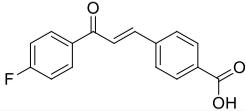
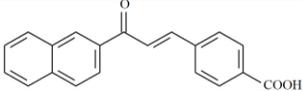
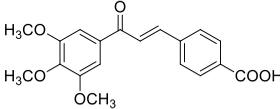
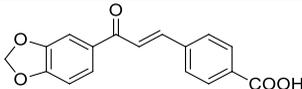
Composto	Estrutura	Viabilidade celular K562 (%)	Viabilidade celular Jurkat (%)
Q5VA		33,92 \pm 0,85	25,07 \pm 0,45
Q5VB		43,64 \pm 6,90	42,49 \pm 3,10
Q6MC		32,77 \pm 4,03	37,36 \pm 1,54
Q7VB		31,42 \pm 3,97	33,71 \pm 0,62
Q8VB		51,39 \pm 5,35	40,65 \pm 1,57
Q9MC		43,47 \pm 6,15	38,28 \pm 3,13
Q10		50,88 \pm 4,02	41,15 \pm 2,20

Tabela 3 - Estrutura química e viabilidade celular das chalconas sintéticas derivadas do 4- carboxibenaldeído (100 µM) triadas sobre células K562 e Jurkat (Continuação).

Composto	Estrutura	Viabilidade celular K562 (%)	Viabilidade celular Jurkat (%)
Q15		47,63 ± 9,43	50,51 ± 3,64
Q16MC		39,95 ± 5,60	44,23 ± 1,70
Q17		52,61 ± 5,17	38,77 ± 0,90
Q18VA		46,08 ± 3,87	35,85 ± 1,93
Q19MC		28,10 ± 3,92	29,25 ± 0,40
Q22		68,75 ± 1,75	95,73 ± 0,60
Q23VB		33,31 ± 5,68	40,16 ± 0,22
Q26VB		69,84 ± 5,70	70,66 ± 2,46

Tabela 3 - Estrutura química e viabilidade celular das chalconas sintéticas derivadas do 4- carboxibenaldeído (100 μ M) triadas sobre células K562 e Jurkat (Conclusão).

Composto	Estrutura	Viabilidade celular K562 (%)	Viabilidade celular Jurkat (%)
Q30		44,82 \pm 3,39	49,79 \pm 0,30
R32		22,82 \pm 2,82	21,81 \pm 0,48
Q25		36,73 \pm 1,21	43,41 \pm 2,21
Q31		49,08 \pm 2,39	39,30 \pm 2,22

Fonte: Própria (2018)

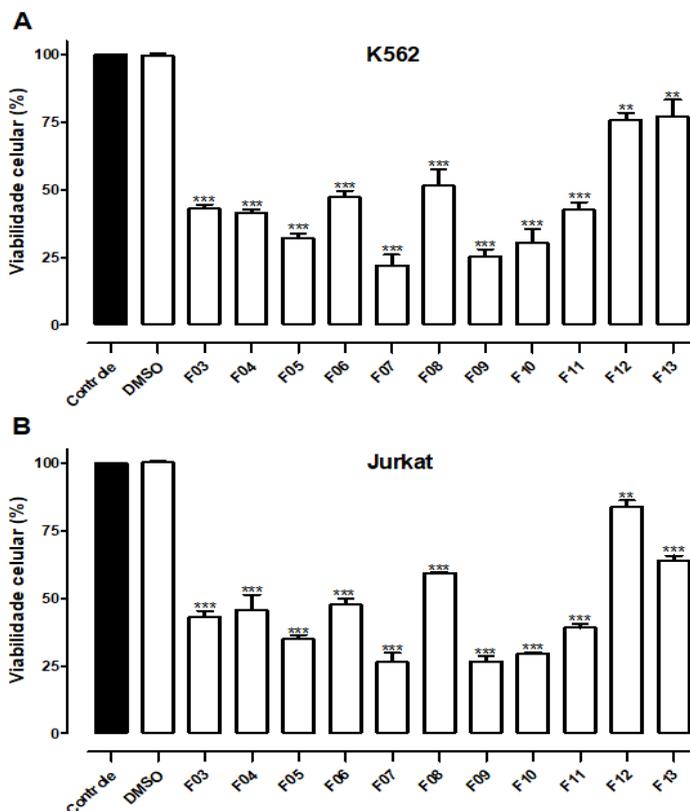
Com base nos resultados encontrados na triagem em células K562 e Jurkat, os quatro compostos que apresentaram maior redução da viabilidade celular em valores absolutos, **Q6MC**, **Q7VB**, **Q19MC** e **R32**, foram selecionados para a realização da curva concentração e tempo resposta em células K562 e Jurkat.

5.1.2 Triagem das chalconas sintéticas derivadas do 1-naftilacetofenona sobre células de LMA (K562) e de LLA (Jurkat)

Com o resultado da triagem inicial foi possível observar que a incubação das células K562 e Jurkat com 100 μ M das chalconas derivadas da 1-naftilacetofenona por 24 h causou redução significativa da viabilidade celular em comparação ao grupo controle (células sem tratamento) ao qual foi atribuída viabilidade de 100 %. O grupo DMSO não apresentou diferença significativa na viabilidade celular, quando comparado ao grupo de células sem tratamento (Figura 3, Painéis A e B). Dentre as 11 chalconas triadas, quatro são inéditas (**F04**, **F10**, **F12**, **F13**) e as demais estão descritas na literatura.

Os resultados obtidos demonstram que dentre as 11 chalconas derivadas da 1-naftilacetofenona, as que causaram maior citotoxicidade sobre as células de LMA (K562) e sobre as células de LLA (Jurkat) foram as chalconas **F07**, **F09** e **F10** com viabilidade celular de $22,01 \pm 3,94$ %, $25,27 \pm 2,69$ % e $30,38 \pm 5,08$ %, respectivamente, para células K562; e de $26,36 \pm 3,48$ %, $26,57 \pm 2,02$ % e $29,71 \pm 0,29$ %, respectivamente, para células Jurkat. (Figura 3 e Tabela 4).

Figura 3 - Triagem do efeito citotóxico das chalconas sintéticas derivadas do 1-naftilacetofenona sobre células de linhagem de leucemia mieloide aguda K562 e leucemia linfóide aguda Jurkat.



As células K562 ($5,0 \times 10^4$ células/200 μ L de meio) e Jurkat ($1,0 \times 10^5$ células/200 μ L de meio) foram incubadas com as chalconas sintéticas na concentração de 100 μ M por 24 h. O grupo controle do veículo no qual as chalconas foram diluídas foi realizado pela avaliação da viabilidade das células incubadas com 2 % de DMSO. A viabilidade celular foi avaliada pelo método do MTT. A densidade óptica do grupo controle, sem tratamento, corresponde a 100 % da viabilidade celular. Cada ponto representa a média \pm EPM de, pelo menos, três experimentos independentes. Diferença estatística em relação ao grupo controle: ** $P \leq 0,01$ *** $P \leq 0,001$, ANOVA one way, seguido de teste post-hoc de Turkey.

Fonte: Própria (2018).

Os estudos de correlação estrutura e atividade fundamentados nas substituições nos anéis A e/ou B da chalcona, mostram que (Tabela 4):

- As 11 chalconas triadas contém o grupo 1-naftila como anel A. Winter e colaboradores (2010) e Maioral e colaboradores (2013) demonstraram a importância do grupamento naftil para a atividade citotóxica de naftilchalconas em células de linhagem leucêmica. Esses estudos demonstram que grupos hidrofóbicos, como o substituinte naftil, são importantes para a atividade biológica/ citotóxica das chalconas.

- As chalconas que apresentaram melhores atividades citotóxicas foram as chalconas **F07**, **F09** e **F10**. As chalconas **F07** e **F09** apresentam o halogênio Cloro (-Cl) como substituinte. Substituintes eletronegativos, isto é, aceptores de elétrons conferem atividade citotóxica elevada às chalconas. O halogênio monossustituído (**F07**) é o composto com melhor atividade biológica sobre às linhagens K562 e Jurkat. A chalcona **F10** apresenta o anel hidrofóbico benzofurano conjugado ao anel B, conferindo elevada atividade citotóxica.

- As chalconas com grupamentos metoxi no anel B (**F06**, **F08**, **F11** e **F12**) apresentaram atividade citotóxica moderada (**F06** e **F11**) a baixa (**F08** e **F12**). Os resultados corroboram os estudos de Quintin e colaboradores (2009) que demonstram que a presença de metoxila como substituinte no anel B pode causar impedimento estérico e dificultar a interação do anel A com o alvo.

- **F03** e **F05** apresentam atividade citotóxica moderada. Ambas as chalconas apresentam grupo aceptor de elétrons no anel B (-NO₂), entretanto a presença do grupamento nitro na posição 3 do anel (**F05**) confere maior atividade citotóxica do que a substituição na posição 4 (**F05**).

- **F04** apresenta modificação estrutural no anel B, com a presença de um anel furano, do grupamento eletronegativo (-Cl) e do grupamento trifluorometil no anel B. A presença do halogênio, observado nos compostos **F07** e **F09**, aumentam a atividade citotóxica, entretanto a presença do anel furano e do grupamento trifluorometil interferem na atividade citotóxica, o que confere à chalcona **F04** atividade citotóxica moderada.

• **F13** apresenta modificação estrutural no anel B com presença do anel furano e do grupamento nitro (-NO₂) no anel B. A presença do anel furano e de um grupamento aceptor de elétrons (-NO₂) diminui a atividade citotóxica do composto, conferindo ao composto **F13** atividade baixa.

Tabela 4 - Estrutura química e viabilidade celular das chalconas sintéticas derivadas da 1-naftilacetofenona (100 µM) triadas sobre células K562 e Jurkat (Continua).

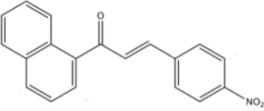
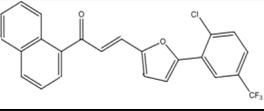
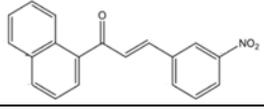
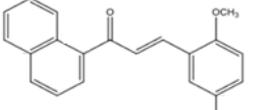
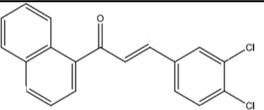
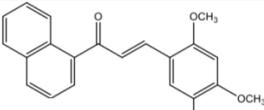
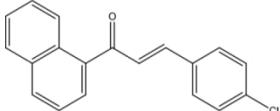
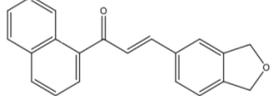
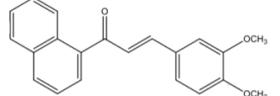
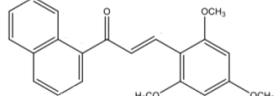
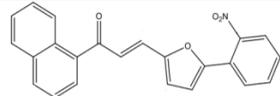
Amostra	Estrutura	% Viabilidade celular K562	% Viabilidade celular Jurkat
F03		42,90 ± 1,45 %	43,03 ± 2,16 %
F04		41,36 ± 1,25 %	45,66 ± 5,55 %
F05		32,11 ± 1,68 %	34,88 ± 1,45 %
F06		47,18 ± 2,31 %	47,58 ± 2,17 %
F07		22,00 ± 3,94 %	26,36 ± 3,48 %
F08		51,47 ± 5,93 %	59,35 ± 0,26%

Tabela 4 - Estrutura química e viabilidade celular das chalconas sintéticas derivadas da 1-naftilacetofenona (100 μ M) triadas sobre células K562 e Jurkat (Conclusão).

Amostra	Estrutura	% Viabilidade celular K562	% Viabilidade celular Jurkat
F09		25,27 \pm 2,69 %	26,57 \pm 2,02 %
F10		30,38 \pm 5,10 %	29,70 \pm 0,29 %
F11		42,60 \pm 2,67 %	39,05 \pm 1,43 %
F12		75,64 \pm 2,65 %	83,82 \pm 2,31 %
F13		77,03 \pm 6,12 %	63,94 \pm 1,75 %

Fonte: Própria (2018).

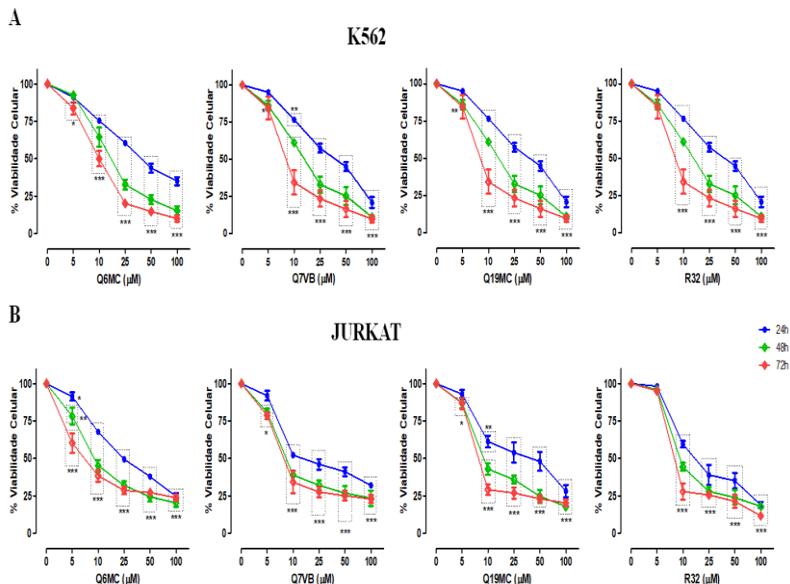
Com base nos resultados encontrados na triagem em células K562 e Jurkat, os três compostos que apresentaram maior redução da viabilidade celular em valores absolutos, **F07**, **F09** e **F10**, foram selecionados para a realização da curva concentração e tempo resposta em células K562 e Jurkat.

Em todos os ensaios realizados no presente trabalho observa-se que o grupo de células tratadas com o veículo (DMSO) não apresenta diferença significativa em relação ao grupo controle, isto é, as células sem tratamento.

5.2 EFEITO CITOTÓXICO DAS CHALCONAS SELECIONADAS DA SÉRIE DERIVADA DO 4-CARBOXIBENZALDEÍDO, Q6MC, Q7VB, Q19MC E R32 SOBRE CÉLULAS DE LEUCEMIA AGUDA K562 E JURKAT

O efeito citotóxico das chalconas **Q6MC**, **Q7VB**, **Q19MC** e **R32** sobre as células K562 e Jurkat foi avaliado em diferentes concentrações (5, 10, 25, 50 e 100 μM), e em diferentes períodos de tempo (24, 48 e 72 h). Conforme demonstra a Figura 4, as chalconas selecionadas reduziram significativamente a viabilidade celular em ambas as linhagens de uma maneira dependente da concentração e do tempo em comparação com o controle (células não tratadas, viabilidade celular de 100 %).

Figura 4 - Curvas concentração e tempo resposta das chalconas sintéticas Q6MC, Q7VB, Q19MC e R32 frente a linhagem K562 e Jurkat.



As células K562 ($5,0 \times 10^4$ células/200 μ L de meio – 24 h, $2,5 \times 10^4$ células/200 μ L de meio – 48h e $1,25 \times 10^4$ células/200 μ L de meio – 72h) e Jurkat ($1,0 \times 10^5$ células/200 μ L de meio – 24 h, $5,0 \times 10^4$ células/200 μ L de meio – 48h e $2,5 \times 10^4$ células/200 μ L de meio – 72h) foram incubadas com as chalconas **Q6MC**, **Q7VB**, **Q19MC** e **R32** nas concentrações de 5, 10, 25, 50 e 100 μ M por 24, 48 e 72 horas. A viabilidade celular foi avaliada pelo método do MTT. A densidade óptica do grupo controle, sem tratamento, corresponde a 100 % da viabilidade celular. Cada ponto representa a média \pm EPM de, pelo menos, três experimentos independentes. Diferença estatística em relação ao controle: * $P \leq 0,05$, ** $P \leq 0,01$, *** $P \leq 0,001$, ANOVA one way, seguido de teste post-hoc de Bonferroni. Fonte: Própria (2018).

Os valores de CI_{50} das quatro chalconas podem ser visualizados na Tabela 5. Os resultados em conjunto demonstram que as células Jurkat são mais sensíveis ao efeito citotóxico das chalconas do que as células K562, já que os valores de CI_{50} encontrados para células Jurkat foram menores do que os encontrados em células K562. Esses resultados podem ser explicados devido a característica fenotípica desse subtipo de LMA, uma vez que a linhagem K562 trata-se de uma LMA secundária a LMC, a qual é mais resistente ao tratamento (LOZZIO; LOZZIO, 1975).

Tabela 5 - Valores de CI_{50} calculados em células K562 e Jurkat após 24, 48 e 72 h de incubação com as chalconas sintéticas Q6MC, Q7VB, Q19MC e R32.

K562				
Compostos	Q6MC	Q7VB	Q19MC	R32
CI_{50} (μM) de 24 horas	40,80 \pm 0,70	45,79 \pm 1,52	41,26 \pm 0,99	35,49 \pm 0,78
CI_{50} (μM) de 48 horas	17,59 \pm 0,78**	16,58 \pm 0,78**	16,14 \pm 0,66**	16,03 \pm 0,62**
CI_{50} (μM) de 72 horas	10,94 \pm 0,61**#	9,41 \pm 0,59**#	9,11 \pm 0,45**#	9,47 \pm 0,83**#

JURKAT				
Compostos	Q6MC	Q7VB	Q19MC	R32
CI_{50} (μM) de 24 horas	27,59 \pm 0,57	24,39 \pm 1,42	32,57 \pm 1,40	19,49 \pm 0,49
CI_{50} (μM) de 48 horas	12,31 \pm 0,56**	11,98 \pm 0,73*	12,42 \pm 0,72**	13,51 \pm 0,89*
CI_{50} (μM) de 72 horas	8,97 \pm 0,59**	9,91 \pm 0,83**	10,46 \pm 0,99**	9,34 \pm 1,04**

Diferença significativa em relação ao tempo de 24 h na mesma linhagem celular, * $P \leq 0,05$, ** $P \leq 0,01$, teste t de Student. # Diferença significativa em relação ao tempo de 48 h na mesma linhagem celular, $P \leq 0,05$, teste t de Student.

Fonte: Própria (2018).

A redução significativa da viabilidade celular de uma maneira dependente da concentração e do tempo em ambas as linhagens de LAs e os valores de CI_{50} encontrados para as quatro chalconas selecionadas

(**Q6MC**, **Q7VB**, **Q19MC** e **R32**) reforçam a importância dos substituintes ligados ao anel aromático A.

A chalcona **Q6MC** apresenta substituição 3,4-dimetoxi no anel A e a chalcona **Q7VB** apresenta substituição 3,5-dimetoxi no anel A. Segundo a literatura, a presença de grupos metoxila (-OCH₃) ligados ao anel A aumenta a lipofilicidade da molécula, o que facilita a sua permeabilidade celular, e, conseqüente aumento da atividade citotóxica dos compostos (KIM et al., 2008; BANDGAR; GAWANDE, 2010; SALUM et al., 2013). Já o composto **Q19MC** apresenta um grupamento -Br na posição 4 do anel A, sendo o bromo um grupo aceptor/ retirador de elétron, o que justificaria sua atividade citotóxica.

A redução significativa da viabilidade celular de uma maneira dependente da concentração e do tempo em ambas as linhagens de LAs e os valores de CI₅₀ encontrados para a chalcona selecionada, **R32**, reforçam a importância dos substituintes ligados ao anel aromático A; **R32** apresenta o grupamento naftil ligado ao anel A. Chiaradia e colaboradores (2008b, 2010 e 2012) e Mascarello e colaboradores (2010) demonstraram que a atividade citotóxica desse composto para *Micobacterium tuberculosis* envolve a atividade biológica do grupo naftil. Winter e colaboradores (2010) e Maioral e colaboradores (2013) demonstraram a importância de substituintes hidrofóbicos, como o grupo naftil, para a atividade citotóxica das chalconas sobre células leucêmicas K562 e Jurkat.

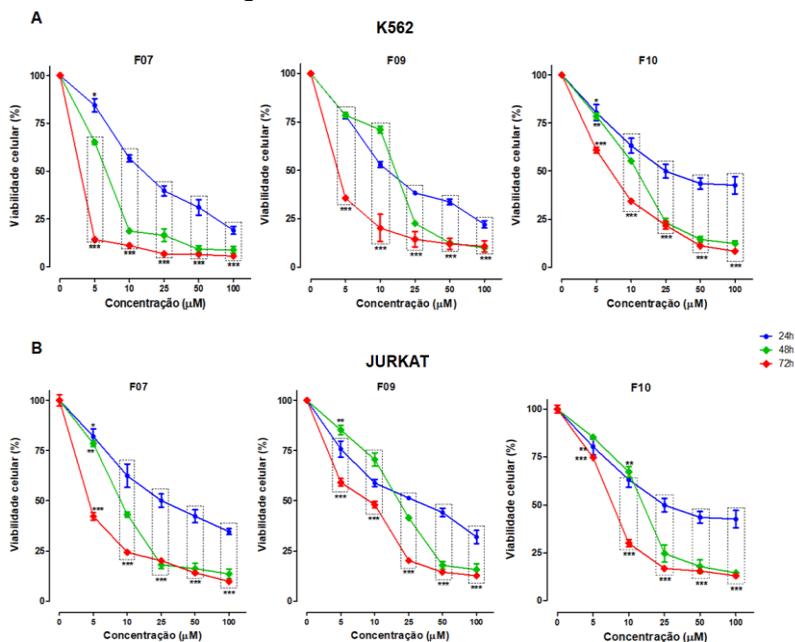
Dentre as chalconas selecionadas, foi possível observar que o composto **R32** apresentou maior atividade citotóxica em ambas as linhagens celulares, com valores de CI₅₀ (tempo de 24 h) de 35,49 ± 0,78 µM para células K562 e de 19,49 ± 0,49 µM para células Jurkat, respectivamente. Os resultados encontrados neste estudo corroboram os de Maioral e colaboradores (2013) que encontraram valores de CI₅₀ semelhantes às do composto **R32**. Desse modo, a chalcona **R32** foi selecionada para avaliar os mecanismos de morte celular envolvidos no seu efeito citotóxico.

5.3 EFEITO CITOTÓXICO DAS CHALCONAS SELECIONADAS DA SÉRIE DERIVADA DA 1-NAFTILACETOFENONA, F07, F09 E F10, SOBRE CÉLULAS DE LEUCEMIA AGUDA K562 E JURKAT

O efeito citotóxico das chalconas **F07**, **F09** e **F10** sobre as células K562 e Jurkat foi avaliado em diferentes concentrações (5, 10, 25, 50 e 100 µM) e em diferentes períodos de tempo (24, 48 e 72 h). Conforme

demuestra a Figura 5, as três chalconas selecionadas reduziram significativamente a viabilidade celular em ambas as linhagens de uma maneira dependente da concentração e do tempo em comparação com o controle (células não tratadas).

Figura 5 - Curvas concentração e tempo resposta das chalconas sintéticas F07, F09 e F10 frente a linhagem K562 e Jurkat.



As células K562 ($5,0 \times 10^4$ células/200 μ L de meio – 24 h, $2,5 \times 10^4$ células/200 μ L de meio – 48h e $1,25 \times 10^4$ células/200 μ L de meio – 72h) e Jurkat ($1,0 \times 10^5$ células/200 μ L de meio – 24 h, $5,0 \times 10^4$ células/200 μ L de meio – 48h e $2,5 \times 10^4$ células/200 μ L de meio – 72h) foram incubadas com as chalconas selecionadas **F07**, **F09** e **F10** nas concentrações de 5, 10, 25, 50 e 100 μ M por 24, 48 e 72 horas. A viabilidade celular foi avaliada pelo método do MTT. A densidade óptica do grupo controle, sem tratamento, corresponde a 100% da viabilidade celular. Cada ponto representa a média \pm EPM de, pelo menos, três experimentos independentes. Diferença estatística em relação ao grupo controle: * $P \leq 0,05$, ** $P \leq 0,01$, *** $P \leq 0,001$, ANOVA *one way*, seguido de teste *post-hoc* de Bonferroni. Fonte: Própria (2018).

Os valores de CI_{50} das chalconas **F07**, **F09** e **F10** podem ser visualizados na Tabela 6. Em conjunto, os resultados demonstram que as células K562 são mais sensíveis ao efeito citotóxico das chalconas **F07**, **F09** e **F10** do que as células Jurkat, pois o valor de CI_{50} encontrado para células K562 foi menor do que o encontrado em células Jurkat. Esses resultados podem ser explicados pelo fato das leucemias tratarem-se de doenças heterogêneas entre si, com comportamentos fisiopatológicos distintos, e portanto, diferem na resposta aos quimioterápicos (RUMJANEK et al., 2001).

Tabela 6 - Valores de CI_{50} calculados em células K562 e Jurkat após 24, 48 e 72 h de incubação com as chalconas sintéticas F07, F09 e F10.

K562			
	F07	F09	F10
CI_{50} (μM) de 24 h	18,18 \pm 0,56	16,89 \pm 0,58	31,66 \pm 1,51
CI_{50} (μM) de 48 h	5,27 \pm 0,55***	13,39 \pm 0,79***	11,45 \pm 0,45***
CI_{50} (μM) de 72 h	1,03 \pm 6,26***,###	2,99 \pm 0,58***,###	6,60 \pm 0,24***,##
JURKAT			
	F07	F09	F10
CI_{50} (μM) de 24 h	28,67 \pm 1,12	27,29 \pm 1,16	26,06 \pm 1,62
CI_{50} (μM) de 48 h	9,52 \pm 0,61***	18,77 \pm 0,66***	14,93 \pm 0,84***
CI_{50} (μM) de 72 h	3,83 \pm 0,26***,###	8,00 \pm 0,22***,###	8,26 \pm 0,56***,###

***Diferença significativa em relação ao tempo de 24 h na mesma linhagem celular, *** $P \leq 0,001$, teste t de Student. Diferença significativa em relação ao tempo de 48 h na mesma linhagem celular, ## $P \leq 0,01$, # $P \leq 0,001$ teste t de Student. Fonte: Própria (2018).

Os valores de CI_{50} encontrados para os compostos selecionados foram semelhantes aos encontrados por Maioral e colaboradores (2013). Desse modo, as chalconas **F07**, **F09** e **F10** foram selecionadas para avaliar os mecanismos de morte celular envolvidos.

5.4 MÉTODO TEÓRICO PARA PREDIÇÃO DA BIODISPONIBILIDADE ORAL: REGRA DOS CINCO DE LIPINSKI

As chalconas selecionadas **R32**, **F07**, **F09** e **F10** foram avaliadas quanto a parâmetros físico-químicos para estimar teoricamente e comparar suas características de solubilidade e absorção oral (Tabela 7). Estes parâmetros permitem prever a absorção oral quando as moléculas seguem a regra dos cinco de Lipinski (peso molecular (PM) ≤ 500 Da, $\log P \leq 5$, doadores de ligação H (HDB) ≤ 5 e aceptores de H (HBA) ≤ 10). Outros parâmetros incluídos na regra de Lipinski são o número de ligações rotativas, que indicam a flexibilidade da molécula, seu volume e área de superfície polar. Moléculas que violam mais de um desses parâmetros podem ter problemas com biodisponibilidade e alta probabilidade de falharem como fármacos. De acordo com os valores calculados, as chalconas estudadas estão de acordo com a regra de 5 de Lipinski (Lipinski et al. 2001, 2004), assim, os compostos **R32** e **F10** não apresentaram violações e os compostos **F07** e **F09** apresentaram apenas uma violação, que segundo Lipinski, não invalida os candidatos a fármacos. A área de superfície polar topológica (TPSA) sugere a absorção de fármacos no intestino (TPSA < 140 angstroms) e penetração da barreira hematoencefálica (TPSA < 60 angstroms). As chalconas **R32**, **F07**, **F09** e **F10** apresentaram valores de TPSA inferiores a 60 angstroms, o que indica que esses compostos podem possuir absorção intestinal adequada e penetração da barreira hematoencefálica (Tabela 7).

Tabela 7 - Propriedades estruturais das chalconas R32, F07, F09 e F10 calculadas utilizando modelo in silico. (<http://www.molinspiration.com/cgi-bin/properties>).

Composto	n atom	LogP	PM	HBA	HBD	n rotb	Volume	TPSA	% ABS	n V
Regra	-	≤ 5	< 500	≤ 10	≤ 5	< 10	-	-		≤ 1
R32	23	4,91	302,33	3	1	4	272,85	54,37	90,24	0
F07	22	6,25	327,21	1	0	3	272,92	17,07	103,11	1
F09	21	5,65	292,76	1	0	3	259,38	17,07	103,11	1
F10	23	4,68	300,36	2	0	3	277,59	26,30	99,92	0

HBA: soma dos aceptores de ligação de H N e O; HBD: soma de doadores de ligação de H NH e OH; nrotb: número de ligação rotativa; TPSA: área de superfície polar topológica; nV: número de violações. %ABS: percentual de absorção. Fonte: Própria (2018).

5.5 EFEITO CITOTÓXICO DAS CHALCONAS R32, F07, F09 e F10 SOBRE SANGUE PERIFÉRICO DE INDIVÍDUOS CLINICAMENTE SAUDÁVEIS

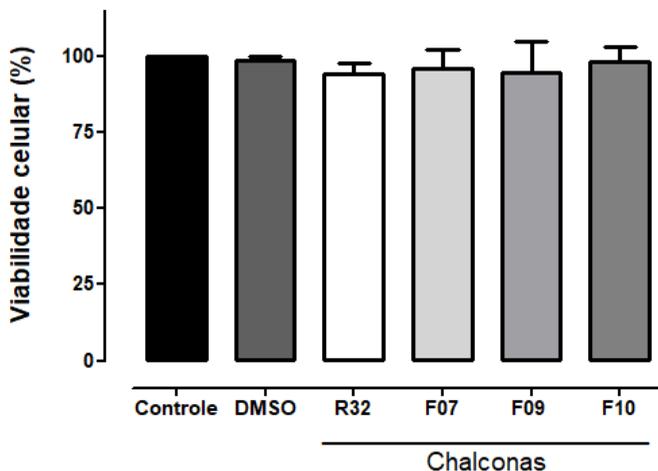
5.5.1 Efeito das chalconas selecionadas sobre células mononucleares

Objetivando avaliar a ausência de efeito citotóxico das chalconas selecionadas **R32**, **F07**, **F09** e **F10** sobre células normais, as células mononucleares de sangue periférico de indivíduos clinicamente saudáveis foram incubadas com os compostos nas concentrações referentes às maiores CI_{50} de 24 h encontradas nas células de linhagem de LA humana.

Como observado na Figura 6, os compostos não provocaram redução significativa na viabilidade celular em células mononucleares. Após 24 h de tratamento com o **R32**, $94,07 \pm 2,0$ % das células mononucleares permaneceram viáveis, já com os compostos **F07**, **F09** e **F10**, $95,87 \pm 6,20$ %, $94,76 \pm 9,92$ % e $98,04 \pm 5,23$ %, respectivamente, das células mononucleares continuaram viáveis. O grupo de células tratadas com DMSO (veículo) não apresentou citotoxicidade significativa em relação ao grupo controle. Esses resultados corroboram os outros já encontrados por nosso grupo que demonstram que chalconas sintéticas e seus derivados, como as pirazolininas, não são citotóxicas para células mononucleares de indivíduos clinicamente saudáveis (MAIORAL et al, 2013; COSTA et al., 2014; BUBNIAK et al., 2017).

Esses resultados demonstram uma possível seletividade dos compostos **R32**, **F07**, **F09** e **F10** sobre células leucêmicas. A seletividade dos compostos estudados sobre células de leucemia é de extrema importância, uma vez que os quimioterápicos disponíveis para uso clínico apresentam muitos efeitos adversos indesejáveis, visto que esses medicamentos não são alvo específicos, e, por isso, são citotóxicos tanto para células malignas quanto para células saudáveis, sendo assim, responsáveis pela maioria dos processos autoimunes e inflamatórios envolvidos nos tratamentos antileucêmicos, ocasionando, por exemplo, supressão da MO, toxicidades gastrointestinais e alopecia. O desenvolvimento de novos quimioterápicos mais seletivos para o tratamento de leucemias com potente toxicidade apenas para as células neoplásicas implica diretamente na diminuição da mortalidade e morbidade sofrida pelos pacientes com LAs (MILLIGAN et al., 2005; OLIVEIRA, 2015; FENG et al., 2016).

Figura 6 - Efeito citotóxico das chalconas R32, F07, F09 e F10 sobre células mononucleares de indivíduos clinicamente saudáveis.



As células mononucleares ($5,0 \times 10^5$ células/200 μ L de meio) foram incubadas por 24 h com as chalconas **R32**, **F07**, **F09** e **F10** nas suas maiores CI_{50} . O grupo veículo (DMSO) foi utilizado na concentração utilizada para diluir o composto (2%). A viabilidade celular foi avaliada pelo método do MTT. A densidade óptica do grupo controle (células sem tratamento) corresponde a 100 % da viabilidade celular. Cada ponto representa a média \pm EPM de, pelo menos, três experimentos independentes. Teste *t* de Student. Fonte: Própria (2018).

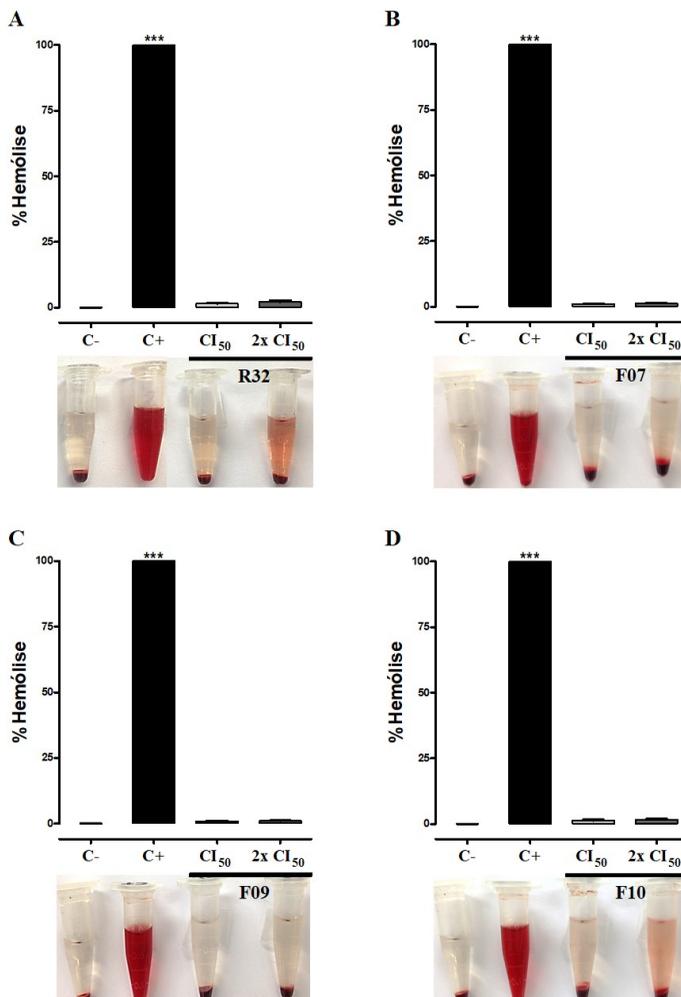
5.5.2 Avaliação da atividade hemolítica

A atividade hemolítica das chalconas **R32**, **F07**, **F09** e **F10** foi avaliada a fim de verificar a possível utilização desses compostos por via sistêmica, visto que um quimioterápico, por mais potente que seja, quando induz hemólise tem o seu uso invalidado (MOCAN, 2010). O ensaio de hemólise utilizou sangue venoso de seis indivíduos considerados saudáveis para o preparo da solução de hemácias. As chalconas **R32**, **F07**, **F09** e **F10** foram avaliadas nas concentrações respectivas às suas maiores CI_{50} e no dobro das maiores CI_{50} . Para o controle negativo foi utilizada solução salina (0% de hemólise) e para o controle positivo foi utilizada água destilada (100% de hemólise).

Como pode ser observado na Figura 7, Painéis A, B, C e D, os compostos avaliados não provocaram hemólise significativa, com valores de $1,54 \pm 0,16$ % (CI_{50}) e $2,07 \pm 0,69$ % (2X CI_{50}) para a chalcona **R32**, $1,11 \pm 0,02$ % (CI_{50}) e $1,33 \pm 0,08$ % (2X CI_{50}) para a chalcona **F07**, $0,97$

$\pm 0,14 \%$ (CI_{50}) e $1,13 \pm 0,08 \%$ ($2X CI_{50}$) para a chalcona **F09** e $1,30 \pm 0,31 \%$ (CI_{50}) e $1,70 \pm 0,25 \%$ ($2X CI_{50}$) para a chalcona **F10**.

Figura 7 - Efeito hemolítico das chalconas R32, F07, F09 e F10.

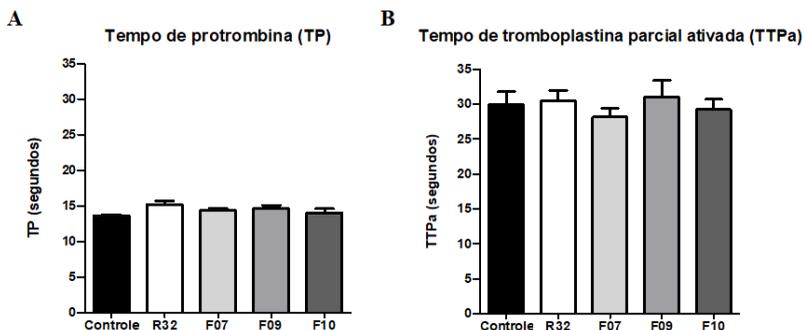


As amostras de sangue venoso foram coletadas em tubo contendo citrato de sódio e a solução de hemácias foi preparada conforme o protocolo experimental. Os ensaios foram realizados em triplicata, com pelo menos três amostras coletadas de diferentes indivíduos. ***Diferença estatística em relação ao grupo controle negativo, $P \leq 0,001$, teste t de Student. Fonte: Própria (2018).

5.5.3 Efeito das chalconas selecionadas sobre a agregação plaquetária, o tempo de protrombina e o tempo de tromboplastina parcial ativada

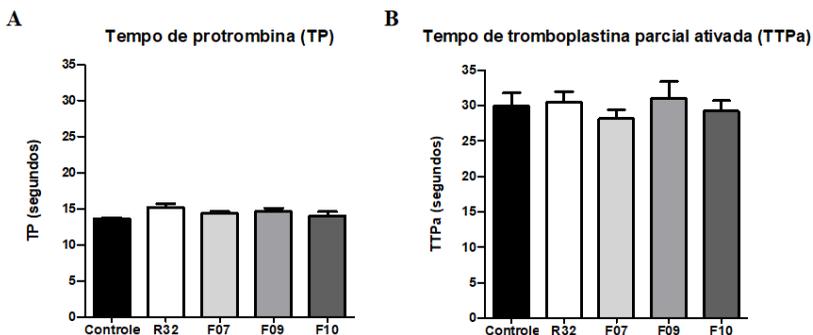
Algumas leucemias, como LMA e leucemia promielocítica aguda (LPA), estão associadas a distúrbios na coagulação sanguínea (CHOUDHRY; DELOUGHERY, 2012; MOHREN et al., 2006; MOHREN et al., 2016), além disso candidatos a novos quimioterápicos que alterem a coagulação sanguínea podem trazer problemas severos quando administrados via sistêmica. Desse modo, avaliou-se o possível efeito das chalconas **R32**, **F07**, **F09** e **F10** sobre a agregação plaquetária e a coagulação sanguínea, o que poderia levar ao agravamento do estado de saúde do paciente. As chalconas **R32**, **F07**, **F09** e **F10** não alteraram a agregação plaquetária após estímulo com ADP e epinefrina (Figura 8, Painel A e B) e nem a coagulação sanguínea, avaliada pelo tempo de protrombina (TP) e o tempo de tromboplastina parcial ativada (TTPa) (Figura 9, Painel A e B). Esses resultados demonstram que as chalconas estudadas não alteram a hemostasia sanguínea, sugerindo que esses compostos apresentam elevada biocompatibilidade com o sangue.

Figura 8 - Efeito das chalconas R32, F07, F09 e F10 sobre a agregação plaquetária.



Para avaliar o efeito das chalconas **R32**, **F07**, **F09** e **F10** sobre a agregação plaquetária, 400 μL do pool de plasma rico em plaquetas (PRP) foram incubados a 37 $^{\circ}\text{C}$ por 5 minutos com 10 μL das chalconas (concentração final respectiva às maiores CI_{50} do respectivo composto) ou de veículo de dissolução (DMSO 0,6 % concentração final). Em seguida, as amostras foram estimuladas individualmente com ADP ou epinefrina e a agregação foi acompanhada por 5 minutos utilizando agregômetro semi-automatizado (AgréGO, Qualitem). Cada valor representa a média \pm EPM de pelo menos três experimentos. Fonte: Própria (2018).

Figura 9 - Efeito das chalconas R32, F07, F09 e F10 sobre o tempo de protrombina (TP) e sobre o tempo de tromboplastina parcial ativada (TTPa).



Após a centrifugação, 100 μ L do pool de plasma pobre em plaquetas (PPP) foram incubados a 37 °C por 5 minutos com 10 μ L das chalconas **R32**, **F07**, **F09** e **F10** (concentração final respectiva às maiores CI₅₀ do respectivo composto) ou de veículo de dissolução (DMSO 0,7 % concentração final) e, em seguida, avaliados os tempos de protrombina (TP) ou de tromboplastina parcial ativada (TTPa) kit HemosIL® (Instrumentation Laboratory, Massachusetts, EUA). Cada valor representa a média \pm EPM de pelo menos três experimentos. Fonte: Própria (2018).

Os resultados encontrados corroboram os de Bubniak e colaboradores (2017) que demonstraram que a 1,3,5-trifenil-4,5-di-hidro-1H-pirazol (Pirazolina 21), um derivado sintético de chalcona, não alterou a coagulação sanguínea.

5.6 EFEITO DAS CHALCONAS R32, F07, F09 E F10 SOBRE AS FASES DO CICLO CELULAR DAS LINHAGENS K562 E JURKAT

Compostos citotóxicos podem influenciar de diversas formas na sinalização celular, levando à indução da morte celular, como, por exemplo, pelos danos no DNA que afetam a progressão do ciclo celular e provavelmente resultam em apoptose (KIM et al., 2004). Considerando os avanços na pesquisa sobre os mecanismos envolvidos na oncogênese e na indução da apoptose, sabe-se que a regulação do ciclo celular exerce importante função na transformação neoplásica e no desenvolvimento de resistência à quimioterapia (SCHWARTZ; SHAH, 2005).

Com o objetivo de avaliar o efeito das chalconas **R32**, **F07**, **F09** e **F10** sobre as fases do ciclo celular, as células K562 e Jurkat foram incubadas com os compostos por 24 h nas suas respectivas CI_{50} de 24 h.

Como pode ser observado na Tabela 08, as células K562 e Jurkat tratadas com os compostos apresentaram um aumento significativo na proporção de células na fase Sub G0/G1 em comparação ao grupo controle (células sem tratamento). Esses resultados mostram um aumento no percentual de células mortas após o tratamento com a chalconas **R32**, **F07**, **F09** e **F10**.

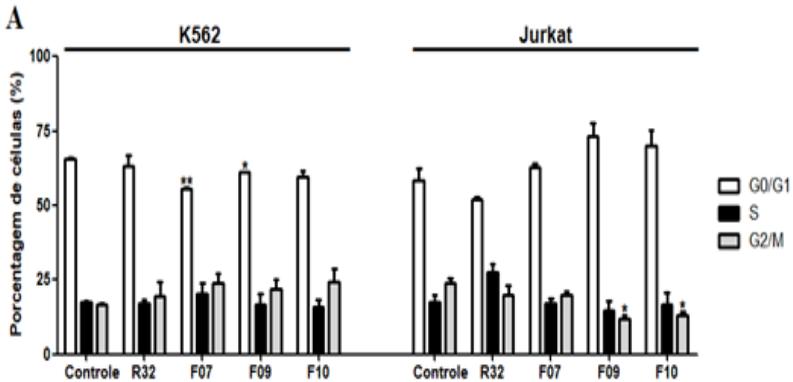
Tabela 8 - Efeito das chalconas R32, F07, F09 e F10 nas fases do ciclo celular das linhagens K562 e Jurkat.

Célula	Tratamento	Sub G0/G1 (%) (Morte Celular)	G0/G1 (%)	S (%)	G2/M (%)
K562	Controle	17,61 ± 0,01	48,21 ± 3,33	14,36 ± 2,14	19,82 ± 1,20
	R32	35,82 ± 1,30**	33,52 ± 0,98	17,85 ± 1,96	12,81 ± 1,65
	F07	57,48 ± 2,76**	26,83 ± 2,14***	7,16 ± 0,35**	8,53 ± 0,98**
	F09	63,49 ± 2,22**	26,71 ± 0,20**	5,40 ± 1,49**	4,40 ± 0,74***
	F10	71,28 ± 0,49***	20,12 ± 1,85*	4,81 ± 1,08**	3,78 ± 0,27***
Jurkat	Controle	14,01 ± 1,52	40,02 ± 0,40	20,21 ± 1,88	25,76 ± 1,58
	R32	17,52 ± 0,34*	52,24 ± 2,76	14,03 ± 1,02	16,21 ± 4,12
	F07	65,95 ± 3,86**	19,00 ± 1,11*	7,02 ± 1,25	8,03 ± 0,32*
	F09	68,18 ± 3,52**	19,58 ± 2,21**	6,21 ± 1,48	6,03 ± 0,23**
	F10	48,67 ± 5,96*	29,51 ± 2,36*	8,59 ± 0,17	13,23 ± 2,45*

Diferença estatística em relação ao grupo controle, *P ≤ 0,05, **P ≤ 0,01, ***P ≤ 0,001. Teste *t* de Student. Fonte: Própria (2018).

Para avaliação do efeito das chalconas no bloqueio do ciclo celular, os dados foram reanalisados, eliminando-se as células que se encontravam na fase sub G0/G1, isso é, em morte celular, por meio da estratégia de gate de aquisição de 20.000 eventos em ciclo celular (fases G0/G1, S e G2/M) (Figura 10 e Tabela 9).

Figura 10 - Efeito das chalconas R32, F07, F09 e F10 nas fases do ciclo celular das linhagens K562 e Jurkat, desconsiderando células na fase sub G0/G1.



Diferença estatística em relação ao grupo controle, * $P \leq 0,05$, ** $P \leq 0,01$ teste t de Student. Fonte: Própria (2018).

Tabela 9 - Efeito das chalconas R32, F07, F09 e F10 nas fases do ciclo celular das linhagens K562 e Jurkat, desconsiderando células na fase sub G0/G1.

Célula	Tratamento	G0/G1 (%)	S (%)	G2/M (%)
K562	Controle	65,62 ± 0,57	17,48 ± 0,48	16,90 ± 0,10
	R32	63,36 ± 3,62	17,02 ± 1,30	19,62 ± 4,92
	F07	55,63 ± 0,56**	20,37 ± 3,70	24,00 ± 3,14
	F09	61,24 ± 0,18*	16,94 ± 3,40	21,82 ± 3,22
	F10	59,62 ± 1,99	15,92 ± 2,42	24,46 ± 4,41
Jurkat	Controle	58,52 ± 4,05	17,44 ± 2,60	24,04 ± 1,44
	R32	52,22 ± 0,48	27,77 ± 2,51	20,01 ± 2,99
	F07	63,04 ± 0,93	16,98 ± 1,94	19,98 ± 1,00
	F09	73,40 ± 4,46	14,62 ± 3,18	11,98 ± 1,28*
	F10	70,01 ± 5,23	16,81 ± 4,02	13,18 ± 1,17*

Diferença estatística em relação ao grupo controle, *P ≤ 0,05, **P ≤ 0,01, *P ≤ 0,001. Teste t de Student. Fonte: Própria (2018).

Como pode ser observado na Figura 10 e na Tabela 9, não foi observado bloqueio em nenhuma fase específica do ciclo celular em ambas as linhagens celulares tratadas com as chalconas **R32**, **F07**, **F09** e **F10**.

Diversos estudos mostram que a atividade antiproliferativa das chalconas interfere em diferentes fases do ciclo celular. Acredita-se que a atividade antitumoral de algumas chalconas está relacionada à sua ligação à tubulina, o que evita a polimerização dos microtúbulos impedindo a progressão do ciclo celular (LAWRENCE et al., 2006; ROMAGNOLI et al., 2008). Rao, Fang e Tzeng (2004) demonstraram que chalconas sintéticas causam bloqueio na fase G2/M em células Jurkat com diminuição concomitante no número de células na fase S. Já, Maioral e colaboradores (2013) demonstraram que a chalcona sintética (2E)-1-(2,5-dimetoxi-fenil)-3-(1-naftil)-2-propen-1-ona (A1) causou bloqueio do ciclo na fase S das células Jurkat. Bubniak e colaboradores (2017) demonstraram que um derivado sintético de chalcona, a 1,3,5-trifenil-4,5-di-hidro-1H-pirazol (Pirazolina 21), causou bloqueio significativo do ciclo celular na fase S em células Jurkat. Em relação à célula K562, diversos estudos demonstram que as chalconas bloqueiam o ciclo celular na fase G2/M, esses resultados sugerem associação com a inibição da polimerização da tubulina (MAIORAL et al, 2013, WANG G. et al., 2013; ELSHEYMY; ZAKI; 2017). Estudos recentes têm demonstrado que algumas chalconas atuam como agentes citotóxicos ou como agentes desestabilizadores de microtúbulos (WANG G. et al., 2013). Entretanto, Vitorović-Todorović e colaboradores (2013) mostraram que chalconas sintéticas bloquearam o ciclo na fase G2/M, mas a inibição da polimerização dos microtúbulos não parece ser o principal mecanismo de ação desses compostos. Como demonstrado no presente estudo, não foram observadas alterações significativas na progressão do ciclo celular das células K562 e Jurkat após tratamento com as chalconas selecionadas, o que sugere que a diminuição da viabilidade celular ocorra por ativação dos mecanismos apoptóticos sem envolver o ciclo celular.

5.7 EFEITO DAS CHALCONAS R32, F07, F09 E F10 SOBRE O MARCADOR DE PROLIFERAÇÃO CELULAR KI-67

A expressão da proteína nuclear KI-67 está fortemente associada à proliferação e crescimento de células tumorais e é amplamente utilizada na investigação patológica de rotina como marcador de proliferação

celular. KI-67 é considerada como um marcador de diagnóstico e prognóstico em diversos tipos de neoplasias (LO et al., 2011; LI; JIANG, 2015; WANG, M.; WANG, L., 2016). Clinicamente, a proteína KI-67 é correlacionada com a metástase e o estágio clínico dos tumores, além disso foi demonstrado que a expressão de KI-67 é significativamente maior nas células tumorais pouco diferenciadas, quando comparadas com o tecido normal; de acordo com seu papel preditivo, a expressão da proteína KI-67 identifica subpopulações de pacientes com maior probabilidade de responder a uma determinada terapia (LI; JIANG, 2015; WANG, M.; WANG, L., 2016).

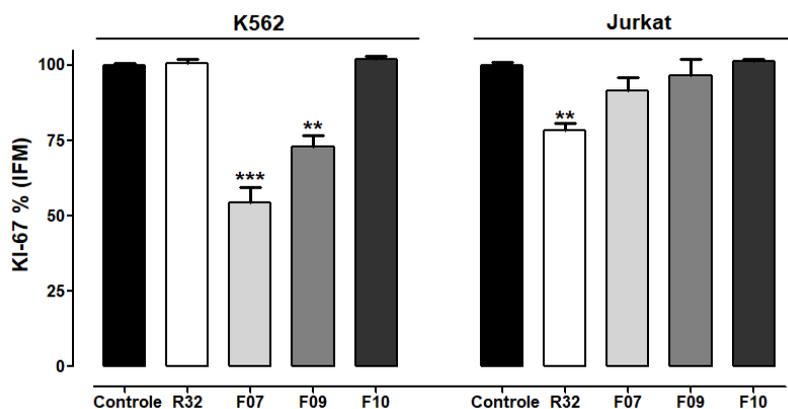
Alguns trabalhos demonstram a influência das chalconas e seus derivados sobre a expressão da proteína KI-67 (JUNG et al., 2014; COSTA et al., 2014; MAIORAL et al., 2016). A isoliquiritigenina, um derivado de chalcona, induz a apoptose e inibe o crescimento de células de câncer de pulmão humano, associado com a diminuição da expressão de KI-67 detectado por imunistoquímica (JUNG et al., 2014). Costa e colaboradores (2014) demonstraram que chalconas sintéticas derivadas da 2,4,5-trimetoxichalcona induzem a morte celular em células de LAs, K562 e Jurkat, e o mecanismo de morte desses compostos envolve a diminuição da expressão de KI-67, o que sugere a ação desses compostos na inibição da proliferação celular. Em um estudo recentemente publicado pelo nosso grupo, foi demonstrado que a chalcona 2E)-(1-(2,5-dimetoxifenil)-3-(1-naftil)-2-propen-1-ona (A1) diminui a expressão de KI-67 em linhagens celulares de LAs humanas K562 e Jurkat, o que sugere o envolvimento da inibição dessa proteína na diminuição da proliferação e morte celular nessas células (MAIORAL et al., 2016).

Nessa perspectiva, considerando-se a importância da proteína KI-67 na proliferação celular, o efeito da chalcona derivada do 4-carboxibenzaldeído **R32** e das chalconas derivadas da 1-naftilacetofenona **F07**, **F09** e **F10** sobre a expressão dessa proteína em células K562 e Jurkat também foi avaliado após 12 h de incubação com os compostos nas suas respectivas CI_{50} de 24 h.

Como observado na Figura 11, as chalconas **F07** e **F09** reduziram significativamente a expressão do marcador de proliferação celular KI-67 em células K562 ($45,64 \pm 4,96\%$ e $27,08 \pm 3,88\%$ em relação ao grupo controle, respectivamente) e a chalcona **R32** reduziu significativamente a expressão de KI-67 em células Jurkat ($21,7 \pm 2,36\%$ em relação ao controle, respectivamente), o que sugere que o mecanismo de ação dessas chalconas está relacionado com a atuação das mesmas sobre a transcrição do gene *ki-67* e, conseqüentemente, diminuição da expressão da proteína KI-67 e da proliferação celular sem bloquear o ciclo celular. Esse mesmo

efeito não foi observado nas células K562 tratadas com as chalconas **R32** e **F10** e nas células Jurkat tratadas com as chalconas **F07**, **F09** e **F10**, o que indica que esses compostos, sobre essas linhagens celulares, não atuam sobre a transcrição do gene *ki-67* e, conseqüentemente, não alteram a expressão da proteína KI-67 e a proliferação celular. Esses resultados corroboram os valores de CI_{50} encontrados para as chalconas nas linhagens celulares de LMA (K562) e LLA (Jurkat), onde o composto **R32**, derivado do 4-carboxibenaldeído, foi mais citotóxico sobre células Jurkat, enquanto que os compostos **F07** e **F09**, derivados da 1-naftilacetofenona, foram mais citotóxicos sobre as células K562.

Figura 11 - Expressão da proteína KI-67 nas linhagens celulares K562 e Jurkat tratadas com as chalconas R32, F07, 09 e F10.



As células K562 e Jurkat (1×10^6 células/poço) foram incubadas por 12 h na ausência, grupo controle, e na presença dos compostos nas suas respectivas CI_{50} de 24 h. A intensidade relativa de fluorescência foi determinada por citometria de fluxo após a marcação com o anticorpo anti-KI-67-FITC. 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. IFM: Intensidade de fluorescência média. Diferença estatística em relação ao grupo controle, ** $P \leq 0,01$, *** $P \leq 0,001$, teste *t* de Student. Fonte: Própria (2018).

5.8 EFEITO DAS CHALCONAS R32, F07, F09 E F10 NA INDUÇÃO DA APOPTOSE EM LINHAGENS DE LEUCEMIAS AGUDAS HUMANAS K562 E JURKAT

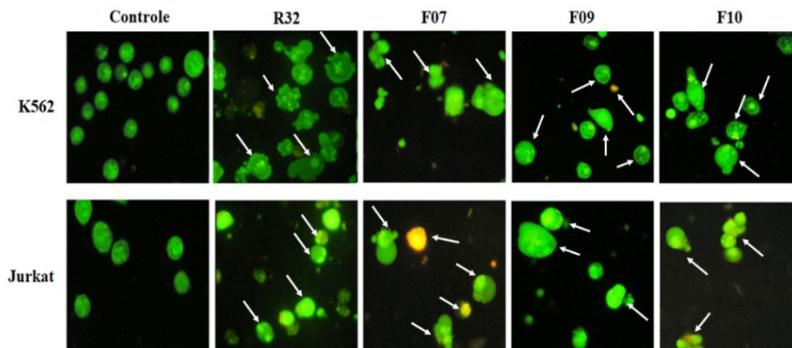
A apoptose pode ser desencadeada durante o desenvolvimento normal e morfogênese, ou em resposta ao estresse e é ativada por estímulos extrínsecos ou intrínsecos. Além disso, é um mecanismo de morte comum para vários agentes antitumorais (WICKMAN et al., 2012; GALLUZZI et al., 2018).

Alguns estudos têm descrito que as chalconas e seus derivados induzem a morte celular por apoptose (SHEN et al., 2007; PEDRINI et al., 2010; WINTER et al., 2010; MAIORAL et al., 2013; COSTA et al., 2014, TENG et al., 2016; BUBNIAK et al., 2017; MAIORAL et al., 2017). Assim, verificamos se as chalconas **R32**, **F07**, **F09** e **F10** induziam morte por apoptose.

Para avaliar o tipo de morte celular (necrose ou apoptose) ocasionado nas células K562 e Jurkat pelas chalconas **R32**, **F07**, **F09** e **F10** foram selecionadas três diferentes metodologias: avaliação da morfologia celular por microscopia de fluorescência após coloração com brometo de etídeo e laranja de acridina (BE/LA), fragmentação de DNA avaliada por eletroforese e anexina V avaliada por citometria de fluxo.

Inicialmente, foi observada a morfologia das células por microscopia de fluorescência após coloração com BE/LA após 12 h de tratamento com as chalconas **R32**, **F07**, **F09** e **F10** nas suas respectivas CI_{50} de 24 h. Como pode ser observado na Figura 12, as linhagens celulares K562 e Jurkat mostram um aumento do número de células em apoptose quando comparado ao grupo controle (sem tratamento). O tratamento da linhagem K562 com as chalconas **R32**, **F07**, **F09** e **F10** apresentaram células em apoptose inicial, caracterizadas pela membrana íntegra (indicada pela fluorescência verde) com condensação da cromatina e formação de *blebs*. O tratamento das células Jurkat com as chalconas **R32**, **F07** e **F10**, demonstraram características morfológicas típicas de células em apoptose inicial e apoptose tardia (indicado pelas setas brancas), nesse último caso com formação de corpos apoptóticos e áreas amarelo-alaranjadas no núcleo, devido a perda da integridade da membrana e consequente intercalação do brometo de etídeo ao DNA. O tratamento das células Jurkat com a chalcona **F09** apresentou células em apoptose inicial.

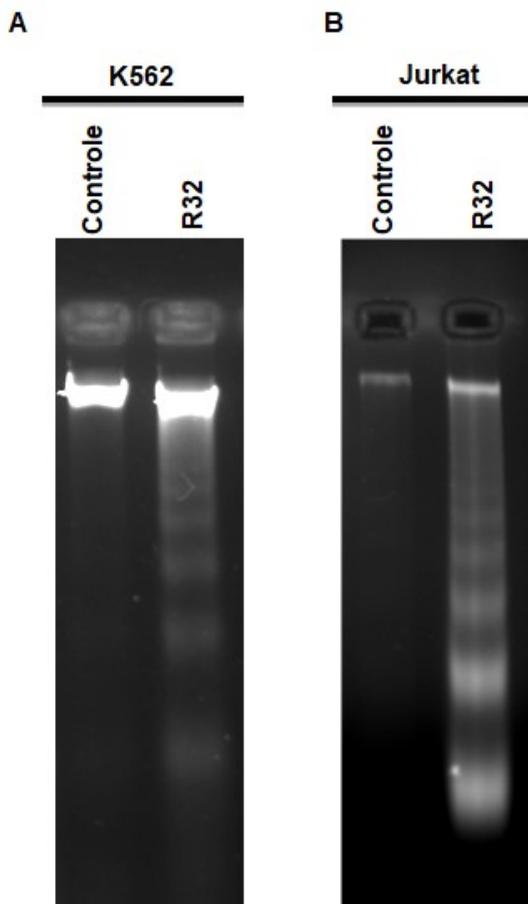
Figura 12 - Avaliação morfológica da apoptose induzida pelas chalconas R32, F07, F09 e F10 em células K562 e Jurkat.



As células K562 e Jurkat (1×10^6 células/poço) foram incubadas com as chalconas **R32**, **F07**, **F09** e **F10** por 12 h nas suas respectivas CI_{50} de 24 h e coradas com uma solução 1:1 de BE/LA. Os grupos controle representam as células sem tratamento. As células foram observadas em microscópio de fluorescência (Olympus BX-FLA) na magnitude de 400 x e campos representativos foram fotografados com câmera digital (Olympus BX-40). Setas indicam células em apoptose. Os resultados foram obtidos de pelo menos três experimentos independentes. Fonte: Própria (2018).

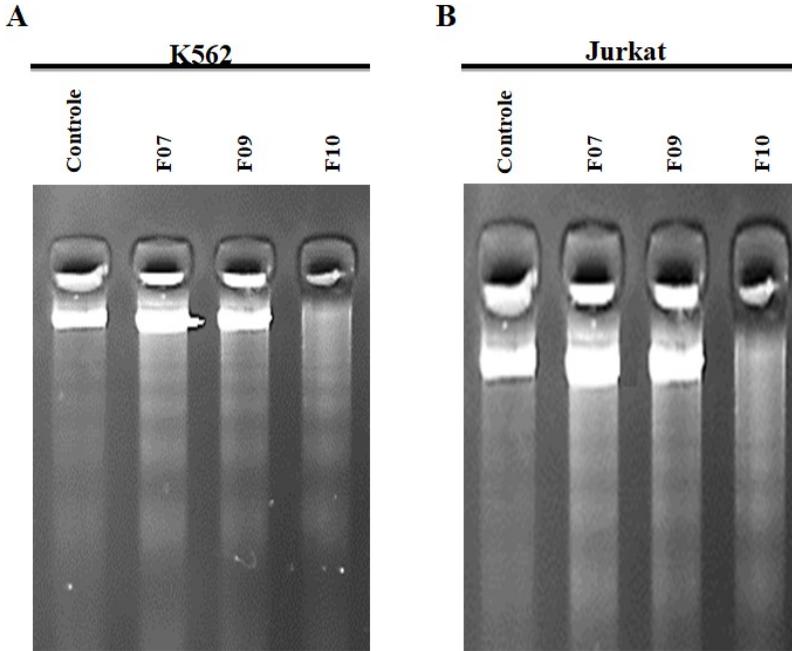
Posteriormente, a apoptose induzida pelas chalconas selecionadas foi avaliada pelo método de fragmentação de DNA. Esse método baseia-se no processo de degradação interssomal do DNA observado durante o processo apoptótico, o qual após extração do DNA e realização da eletroforese do DNA em gel de agarose verifica-se um padrão característico “em escada” opondo-se ao arrastado visto na necrose. Esse “padrão em escada” típico de morte celular por apoptose ocorre devido à fragmentação do DNA por endonucleases em fragmentos múltiplos de 180 a 200 pares de bases (HAAKE; POLAKOWSKA, 1993; KERR et al., 1972). As linhagens K562 e Jurkat foram submetidas a esse ensaio após incubação das células por 24 h com os compostos, nas suas CI_{50} de 24 h. Como observado na Figura 13 e na Figura 14, as chalconas **R32**, **F07**, **F09** e **F10** induziram o padrão de fragmentação “em escada” típico das células mortas por apoptose em células K562 (Painel A) e Jurkat (Painel B), o que não pode ser visualizado no grupo controle (células sem tratamento).

Figura 13 - Avaliação da indução da fragmentação do DNA nas células K562 e Jurkat após tratamento com a chalcona R32.



As células K562 ($6,0 \times 10^6$ células/24 mL de meio) e Jurkat ($6,0 \times 10^6$ células/ 12 mL de meio) foram incubadas com a chalcona **R32** nas suas respectivas CI_{50} de 24 h. Os grupos controle representam as células sem tratamento. Após a incubação, as células foram lavadas com PBS e o DNA foi extraído pelo kit NucleoSpin®. O DNA das amostras foi separado por eletroforese em gel de agarose 2 % e corado com brometo de etídio (1 $\mu\text{g}/\text{mL}$). Por fim, foram visualizados e fotografados sob iluminação UV de fotodocumentação de géis (DOC-PRINT® Biosystems). Fonte: Própria (2018).

Figura 14 - Avaliação da indução da fragmentação do DNA nas células K562 e Jurkat após tratamento com as chalconas F07, F09 e F10.

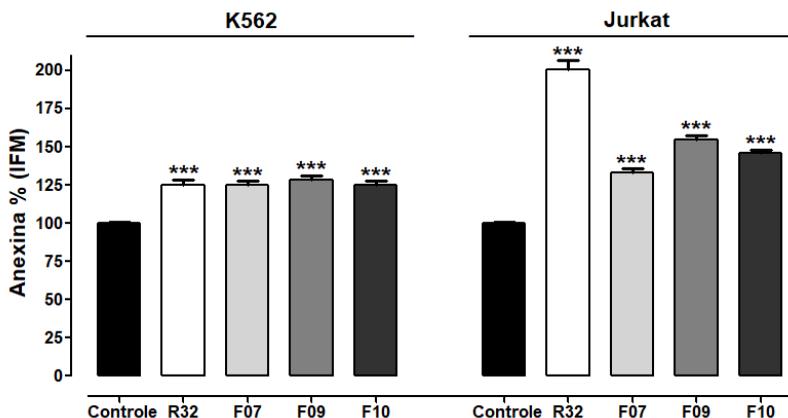


As células K562 ($6,0 \times 10^6$ células/ 24 mL de meio) e Jurkat ($6,0 \times 10^6$ células/ 12 mL de meio) foram incubadas com as chalconas **F07**, **F09** e **F10** nas suas respectivas CI_{50} de 24 h. Os grupos controle representam as células sem tratamento. Após a incubação, as células foram lavadas com PBS e o DNA foi extraído pelo kit NucleoSpin®. O DNA das amostras foi separado por eletroforese em gel de agarose 2 % e corado com brometo de etídio (1 $\mu\text{g}/\text{mL}$). Por fim, foram visualizados e fotografados sob iluminação UV de fotodocumentação de géis (DOC-PRINT® Biosystems). Fonte: Própria (2018).

Por fim, a morte celular por apoptose foi confirmada por meio de uma terceira metodologia. A apoptose induzida pelas chalconas **R32**, **F07**, **F09** e **F10** foi avaliada pela externalização dos resíduos de fosfatidilserina, a qual foi detectada pela anexina V conjugada a FITC. A fosfatidilserina é um fosfolípido que em condições normais está localizada na camada interna da membrana plasmática das células, entretanto quando ocorre a ativação do processo apoptótico, os resíduos de fosfatidilserina ficam expostos na porção extracelular da membrana plasmática da célula, sinalizando que essa célula pode ser fagocitada (FULDA, 2009; LO et al., 2011; GALLUZZI et al., 2018).

Conforme pode ser observado na Figura 15, as chalconas **R32**, **F07**, **F09** e **F10**, nas suas CI_{50} , após 12 h de incubação em cada linhagem celular, aumentou de forma significativa a expressão de anexina V ligada aos resíduos de fosfatidilserina, o que indica a externalização da fosfatidilserina, ou seja, morte celular por apoptose. Nas células K562 o tratamento com as chalconas **R32**, **F07**, **F09** e **F10** induziram aumento significativo na exposição dos resíduos de fosfatidilserina de $25,18 \pm 3,04$ %, $24,84 \pm 2,79$ %, $28,22 \pm 2,94$ % e $25,34 \pm 2,12$ % em relação ao controle, já nas células Jurkat as chalconas induziram aumento de $100,50 \pm 6,32$ %, $33,05 \pm 2,71$ %, $54,54 \pm 2,60$ % e $45,72 \pm 2,45$ %, respectivamente, em relação ao grupo controle (Figura 15).

Figura 15 - Efeito das chalconas R32, F07, F09 e F10 sobre a exposição dos resíduos de fosfatidilserina nas células K562 e Jurkat.



As células K562 ($1,0 \times 10^6$ células/ 4mL de meio) e Jurkat ($1,0 \times 10^6$ células/ 2mL de meio) foram incubadas por 12 h na ausência (grupo controle) e na presença do composto nas suas respectivas CI_{50} de 24 h. A determinação da intensidade de fluorescência média foi determinada por citometria de fluxo após a marcação com a anexina V conjugada ao fluorocromo FITC. Os resultados representam a média \pm EPM de pelo menos três experimentos independentes. As análises foram realizadas no citômetro de fluxo FACSCanto™ II e avaliadas pelo software Infinicyt versão 1.7. IFR: Intensidade de fluorescência média. ***Diferença estatística em relação ao grupo controle, $P \leq 0,001$, teste *t* de Student. Fonte: Própria (2018).

Os resultados observados nos três ensaios: avaliação da morfologia celular por microscopia de fluorescência com BE/LA (Figura 12), fragmentação de DNA em gel de agarose (Figura 13, Painéis A e B, e

Figura 14, Painel A) e externalização dos resíduos de fosfatidilserina pelo método de anexina V (Figura 15), além do número de células encontradas na fração sub-G0/G1 do ciclo celular (Tabela 8), confirmam que as chalconas **R32**, **F07**, **F09** e **F10** provocam a morte celular por apoptose. Esses resultados vão ao encontro daqueles observados por Maioral e colaboradores (2013), Costa e colaboradores (2014) e Maioral e colaboradores (2017) que demonstraram que chalconas sintéticas induzem a apoptose em células de LAs, confirmado por meio das três metodologias que utilizamos em nosso estudo.

Os resultados encontrados no presente estudo são particularmente interessantes, visto que a apoptose é um mecanismo comum a vários agentes antitumorais, e o foco deste trabalho foi a investigação de promissores compostos com atividade antileucêmica que possam servir de protótipo para o desenvolvimento de fármacos quimioterápicos. No entanto, os mecanismos apoptóticos das chalconas **R32**, **F07**, **F09** e **F10** requerem investigação. Dessa forma, avaliamos a ação dos compostos sobre as proteínas da família Bcl-2, Bcl-2 e Bax, sobre o PMM, sobre as proteínas AIF, FasR, caspase-3 e survivina em células de LMA (K562) e de LLA (Jurkat).

5.9 EFEITO DAS CHALCONAS R32, F07, F09 E F10 SOBRE A PROTEÍNA ANTIAPOPTÓTICA BCL-2 E SOBRE A PROTEÍNA PROAPOPTÓTICA BAX

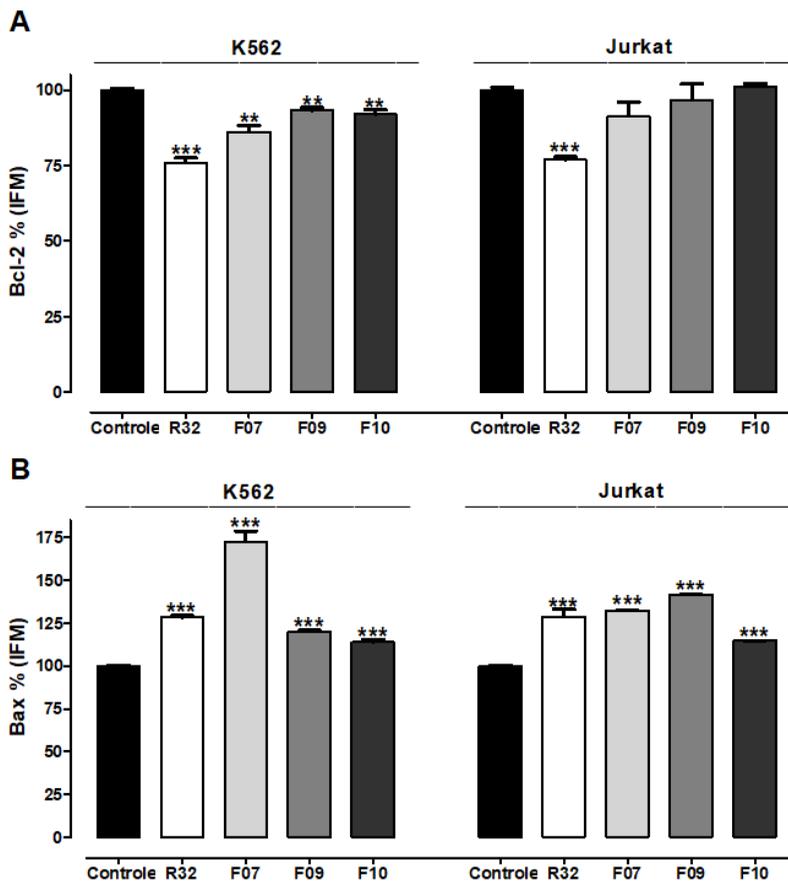
Como já mencionado, a permeabilidade da membrana mitocondrial alterada leva à despolarização da membrana mitocondrial externa, com perda do potencial de membrana mitocondrial e a consequente liberação de proteínas, como o AIF para o citosol. A apoptose causada pelas chalconas **R32**, **F07**, **F09** e **F10** envolve a diminuição do potencial de membrana mitocondrial (Figura 17) e a liberação da proteína AIF (Figura 18). Sabe-se que a liberação dessas proteínas é regulada por membros da família de proteínas Bcl-2. Essa família é dividida em duas classes de moléculas que apresentam efeitos opostos: os membros antiapoptóticos, como a proteína Bcl-2, e os membros pró-apoptóticos, como a proteína Bax (ALLAN; CLARKE, 2009; LO et al., 2011; KHAN; BLANCO-CODESIDO; MOLIFE, 2014). Assim, com o objetivo de avaliar se a apoptose induzida pelas chalconas **R32**, **F07**, **F09** e **F10** envolvia as proteínas da família Bcl-2, Bax e Bcl-

2, as células K562 e Jurkat foram incubadas por 12 h com os compostos nas suas respectivas CI_{50} de 24 h e as proteínas investigadas.

Como pode ser observado na Figura 16, Painei A, as chalconas **R32**, **F07**, **F09** e **F10** diminuíram significativamente a expressão da proteína antiapoptótica Bcl-2 nas células K562 em relação ao controle ($24,10 \pm 3,04$ %, $13,79 \pm 2,79$ %, $6,81 \pm 2,94$ % e $7,97 \pm 2,12$ %, respectivamente). Já nas células Jurkat, somente o tratamento com a chalcona **R32** provocou a diminuição significativa de Bcl-2 ($23,10 \pm 6,32$ % em relação ao grupo controle).

Conforme a Figura 16, Painei B, o tratamento com as chalconas **R32**, **F07**, **F09** e **F10** causaram aumento significativo na expressão da proteína pró-apoptótica Bax nas células K562 ($28,47 \pm 0,82$ %, $72,55 \pm 6,01$ %, $19,98 \pm 0,84$ % e $13,91 \pm 1,48$ %, respectivamente) e nas células Jurkat ($28,74 \pm 4,30$ %, $32,45 \pm 0,05$ %, $41,66 \pm 0,05$ % e $14,84 \pm 0,04$ %, respectivamente) em relação ao grupo controle.

Figura 16 - Efeito das chalconas R32, F07, F09 e F10 na expressão das proteínas Bcl-2 (Painel A) e Bax (Painel B) em células K562 e Jurkat.



As células K562 ($1,0 \times 10^6$ células/ 4mL de meio) e Jurkat ($1,0 \times 10^6$ células/ 2mL de meio) foram incubadas por 12 h na ausência (grupo controle) e na presença das chalconas **R32**, **F07**, **F09** ou **F10** nas suas respectivas CI_{50} de 24 h. A determinação da intensidade de fluorescência média foi determinada por citometria de fluxo após a marcação com o anticorpo anti-Bcl-2-FITC e/ou anticorpo anti-Bax-PerCP. 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. IFM: Intensidade de fluorescência média. Diferença estatística em relação ao grupo controle, ** $P \leq 0,01$, *** $P \leq 0,001$, teste *t* de Student. Fonte: Própria (2018).

Quando analisada a razão entre as proteínas antiapoptótica Bcl-2 e a pró-apoptótica Bax (Tabela 10), há o predomínio da expressão da proteína Bax em relação à proteína Bcl-2 em ambas as linhagens celulares tratadas com as chalconas **R32**, **F07**, **F09** e **F10**.

Tabela 10 - Razão entre a expressão da proteína antiapoptótica Bcl-2 e a proteína pró-apoptótica Bax.

Compostos	Células	Bcl-2 (IFM)	Bax (IFM)	Razão Bcl-2/Bax
Controle	K562	100,00 ± 0,58	100,00 ± 0,43	1,00
	Jurkat	100,00 ± 1,00	100,00 ± 0,41	1,00
R32	K562	75,91 ± 1,59	128,47 ± 0,83	0,59
	Jurkat	76,90 ± 1,04	128,74 ± 4,30	0,45
F07	K562	86,21 ± 1,94	172,55 ± 6,02	0,72
	Jurkat	91,38 ± 4,62	132,45 ± 0,05	0,80
F09	K562	93,19 ± 1,11	119,98 ± 0,84	0,72
	Jurkat	96,62 ± 5,38	141,66 ± 0,05	0,73
F10	K562	92,03 ± 1,52	113,91 ± 1,48	0,65
	Jurkat	101,24 ± 0,95	114,84 ± 0,04	0,88

IFM: Intensidade de fluorescência média. Fonte: Própria (2018).

A superexpressão da proteína Bcl-2 é um fator de mau prognóstico nos pacientes com LAs (KUSENDA, 1998; RUVOLO; DENG; MAY, 2001; SCARFO, GHIA., 2013). Alguns trabalhos mostram que o aumento da expressão de membros pró-apoptóticos da família Bcl-2 em células neoplásicas, como o aumento de Bax, ou a diminuição da expressão de membros antiapoptóticos, como a proteína Bcl-2, está associado à diminuição do potencial oncogênico e a maiores taxas de resposta à quimioterapia. A mudança da proporção Bax/Bcl-2 em favor da proteína Bax predispõe a célula à apoptose (CORY; ADAMS, 2002; SCARFO; GHIA, 2013; ELSHEMY; ZAKI, 2017). Nossos resultados corroboram essa afirmativa, pois, os tratamentos com as chalcona **R32**, **F07**, **F09** e **F10** foram capazes de alterar a proporção Bcl-2/Bax em favor da proteína Bax em ambas as linhagens celulares de LAs.

Os resultados encontrados no presente trabalho estão de acordo com outros que demonstraram que chalconas sintéticas induzem apoptose em células neoplásicas por aumento da expressão de Bax e a diminuição da expressão de Bcl-2 (HSU et al., 2006; PEDRINI et al., 2010; COSTA et al., 2014; WINTER et al., 2014; MAIORAL et al., 2016; ELSHEMY; ZAKI, 2017; TENG et al., 2016). Pedrini e colaboradores (2010) e Winter e colaboradores (2014) demonstraram que chalconas sintéticas causam aumento da expressão da proteína Bax e diminuição da proteína Bcl-2 em linhagens de LLA murina L-1210. Elshemy e Zaki (2017) demonstraram que compostos híbridos chalcona-cumarina induzem a ativação da apoptose intrínseca em células K562 pela diminuição da expressão de Bcl-2 e aumento da expressão da proteína proapoptótica Bax. Teng e colaboradores (2016) mostraram que um derivado de chalcona, o Xantoangelovl, causa diminuição da razão Bcl-2/Bax em células K562, o que sugere o envolvimento da apoptose intrínseca.

Além disso, estudos recentes do nosso grupo demonstraram que chalconas sintéticas e derivados, aumentam a expressão da proteína proapoptótica Bax e diminuem a expressão da proteína antiapoptótica Bcl-2, o que resulta na inversão da razão Bcl-2/Bax em células K562 e Jurkat (COSTA et al., 2014; MAIORAL et al., 2016; BUBNIAK et al., 2017; MAIORAL et al., 2017).

5.10 INVESTIGAÇÃO DO EFEITO DAS CHALCONAS R32, F07, F09 E F10 SOBRE O POTENCIAL MITOCONDRIAL DAS CÉLULAS K562 E JURKAT

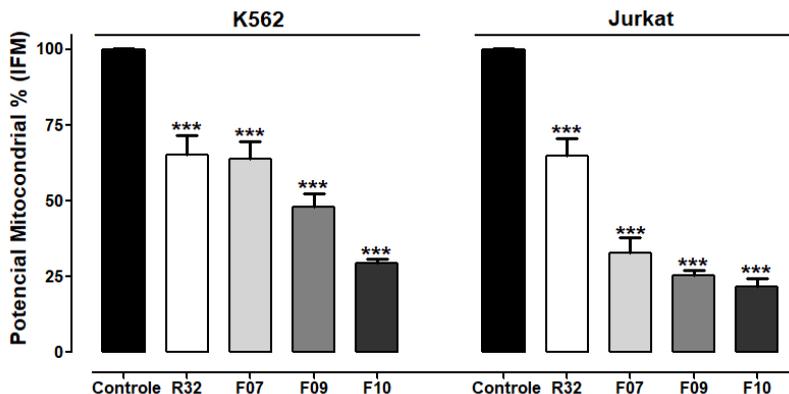
Como já descrito anteriormente, a apoptose intrínseca inicia-se na mitocôndria e é ativada em resposta a diversos estímulos, como, por exemplo, as lesões do DNA, a hipóxia, os defeitos no ciclo celular e a perda de fatores de sobrevivência celular. A exposição a esses agentes causa alterações na permeabilidade da membrana mitocondrial pela formação de poros que levam à despolarização da membrana mitocondrial externa, perda do PMM, e, conseqüente liberação de fatores apoptóticos como o citocromo-c, a proteína Smac/DIABLO e o fator indutor de apoptose (AIF) para o citosol (ALLAN; CLARKE, 2009; LO et al.; 2011).

Estudos demonstram que chalconas e seus derivados diminuem o PMM de células de leucemias humanas K562 e Jurkat (COSTA et al., 2014; GAUR et al., 2016; MAIORAL et al., 2016; BUBNIAK et al., 2017; MAIORAL et al., 2017).

A fim de verificar se a morte celular por apoptose causada pelas chalconas **R32**, **F07**, **F09** e **F10** envolveu a apoptose intrínseca, o potencial mitocondrial das células K562 e Jurkat foi analisado após 12 h de incubação com os compostos **R32**, **F07**, **F09** e **F10** na CI_{50} de 24 h.

Como pode ser observado na Figura 17, as chalconas **R32**, **F07**, **F09** e **F10** reduziram de forma significativa o PMM nas células K562 ($34,70 \pm 6,33$ %, $35,99 \pm 5,69$ %, $51,84 \pm 4,37$ % e $70,65 \pm 1,46$ %, respectivamente) e nas células Jurkat ($35,08 \pm 5,77$ %, $67,27 \pm 5,12$ %, $74,53 \pm 1,46$ % e $78,19 \pm 5,77$ %, respectivamente) em relação ao grupo controle.

Figura 17 - Efeito das chalconas R32, F07, F09 e F10 sobre o potencial de membrana mitocondrial das células K562 e Jurkat.



As células K562 ($1,0 \times 10^6$ células/ 4mL de meio) e Jurkat ($1,0 \times 10^6$ células/ 2mL de meio) foram incubadas por 12 h na ausência (grupo controle), e na presença das chalconas **R32**, **F07**, **F09** e **F10** nas suas respectivas CI_{50} de 24 h. A determinação do percentual de células com o potencial mitocondrial intacto foi determinada por citometria de fluxo após a utilização do kit MitoView 633. 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. IFM: Intensidade de fluorescência média. ***Diferença estatística em relação ao grupo controle, $P \leq 0,001$, teste t de Student. Fonte: Própria (2018).

5.11 EFEITO DAS CHALCONAS R32, F07, F09 E F10 SOBRE O FATOR INDUTOR DE APOPTOSE (AIF).

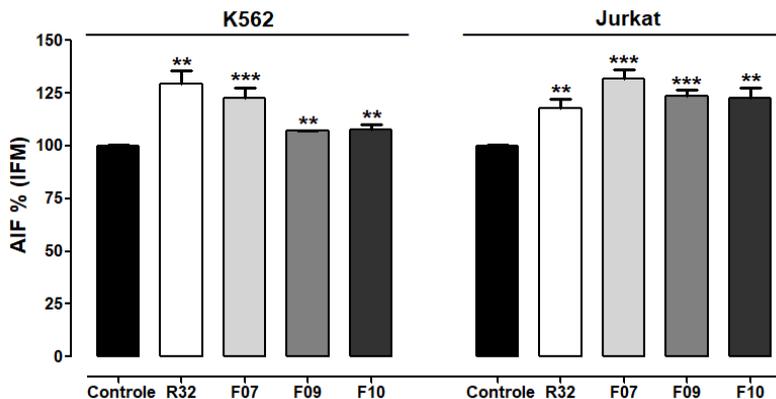
A perda do PMM provoca a liberação de proteínas proapoptóticas, como o AIF para o citosol. No citosol, o AIF transloca-se para o núcleo, causando a condensação da cromatina e a fragmentação do DNA. Além disso, o AIF também pode induzir a permeabilização mitocondrial, ocasionando o extravasamento do citocromo-*c* e iniciando, conseqüentemente, o processo de apoptose (ELMORE, 2007; FRANKLIN, 2011; KHAN; BLANCO-CODESIDO; MOLIFE, 2014; GALLUZZI et al., 2018). Como as chalconas **R32**, **F07**, **F09** e **F10** causaram perda significativa no PMM (Figura 17), na sequência das investigações foi avaliado a expressão do fator indutor de apoptose (AIF)

após 12 h de incubação das células K562 e Jurkat com os compostos **R32**, **F07**, **F09** e **F10** nas suas respectivas CI_{50} de 24 h.

Na Figura 18, pode-se observar que as chalconas **R32**, **F07**, **F09** e **F10** aumentaram significativamente a expressão da proteína AIF nas células K562 ($29,25 \pm 6,41$ %, $22,75 \pm 4,66$ %, $7,30 \pm 0,08$ %, $7,54 \pm 2,28$ %, respectivamente) e nas células Jurkat ($17,83 \pm 4,37$ %, $31,81 \pm 4,31$ %, $23,66 \pm 3,00$ %, $22,63 \pm 4,56$ %, respectivamente) em relação ao controle.

O aumento da expressão de AIF causada pelos compostos **R32**, **F07**, **F09** e **F10** demonstra que os mesmos estão envolvidos na apoptose intrínseca, e corroboram os resultados encontrados por Maioral et al., 2017 e Bubniak et al., 2017 que demonstraram que a chalcona (2E)-1-(3,4,5-trimetoxifenil)-3-(1-naftil)-2-propeno-1-ona (chalcona A23) e um derivado de chalcona, o 1,3,5-trifenil-4,5-di-hidro-1H-pirazol (Pirazolina 21), provocaram o aumento significativo da expressão de AIF em células Jurkat. Hseu e colaboradores (2012) demonstraram que a chalcona sintética Flavocavaina B induziu apoptose em células de carcinoma oral, associada com o aumento da permeabilidade mitocondrial, e consequente liberação de citocromo-c e AIF para o citosol, ativação das caspases-3 e -9 e inversão da proporção Bcl-2/Bax. Em outro estudo, Yong e Abd Malek (2015) demonstraram que uma outra chalcona sintética, a Xantohumul, induz a morte celular de células de câncer cervical pela ativação da apoptose extrínseca e intrínseca por alterações no potencial mitocondrial, fragmentação do DNA, bloqueio na fase S do ciclo celular, aumento das caspases- 3, 8 e 9, e da expressão de proteínas pró-apoptóticas, como o AIF, e a diminuição de proteínas antiapoptóticas, como a Bcl-2, de maneira concentração- dependente.

Figura 18 - Efeito das chalconas R32, F07, F09 e F10 sobre a expressão da proteína AIF em células K562 e Jurkat.



As células K562 ($1,0 \times 10^6$ células/ 4mL de meio) e Jurkat ($1,0 \times 10^6$ células/ 2mL de meio) foram incubadas por 12 h na ausência, grupo controle, e na presença das chalconas **R32**, **F07**, **F09** e **F10** nas suas respectivas CI_{50} de 24 h. A intensidade de fluorescência média foi determinada por citometria de fluxo após a marcação com o anticorpo anti-AIF-FITC. 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. IFM: Intensidade de fluorescência média. Diferença estatística em relação ao grupo controle, ** $P \leq 0,01$, *** $P \leq 0,001$, teste *t* de Student. Fonte: Própria (2018).

Em resumo, os resultados até aqui mostram que a morte causada pelas chalconas **R32**, **F07**, **F09** e **F10** envolve a apoptose intrínseca.

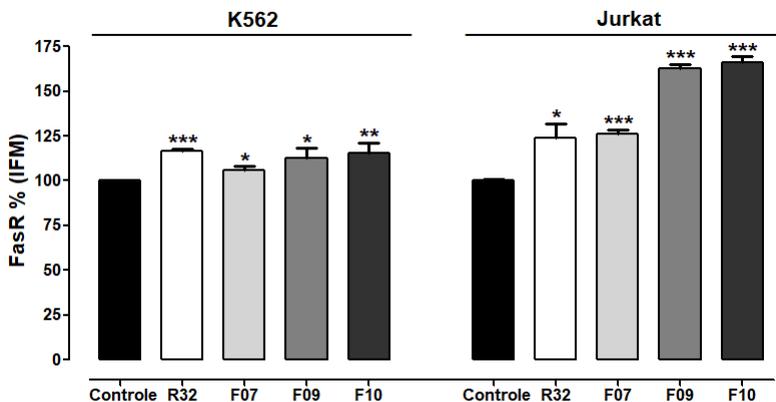
5.12 EFEITO DAS CHALCONAS R32, F07, F09 E F10 SOBRE O RECEPTOR FAS (FasR)

A apoptose extrínseca é mediada pela ativação dos receptores de dependência e dos receptores de morte. O receptor de morte FasR é um dos receptores de morte mais estudados, ele se liga ao ligante Fas (FasL) desencadeando uma cascata de sinalização intracelular que envolve a ativação das caspases-8 e 10, para formar o complexo sinalizador indutor de apoptose (DISC) no citoplasma, e, conseqüente a ativação da caspase-3 (KHAN; BLANCO-CODESIDO; MOLIFE, 2014; KOOF et al., 2015, GALLUZZI et al., 2018).

Maioral e colaboradores (2016) demonstraram que a chalcona (2E)-1-(2,5-dimetoxi-fenil)-3-(1-naftil)-2-propen-1-ona (A1) aumentou a expressão de FasR em células Jurkat, o que indica o envolvimento da apoptose extrínseca. Winter e colaboradores (2014) demonstraram que naftilchalconas aumentaram a expressão de FasR em células de LLA murina (L1210). Dessa forma, para avaliar o envolvimento da apoptose extrínseca, na morte causada pelas chalconas **R32**, **F07**, **F09** e **F10**, as células K562 e Jurkat foram incubadas por 12 h com os compostos, nas suas CI_{50} de 24 h, e o efeito sobre a expressão do FasR foi analisada.

Como pode ser observado na Figura 19, os compostos **R32**, **F07**, **F09** e **F10** aumentaram significativamente a expressão de FasR nas células K562 ($16,49 \pm 1,37$ %, $5,75 \pm 2,23$ %, $12,55 \pm 5,98$ %, $15,58 \pm 5,48$ %, em relação ao controle) e Jurkat ($23,95 \pm 7,89$ %, $26,34 \pm 2,34$ %, $62,60 \pm 2,61$ %, $65,92 \pm 3,51$ %, em relação ao controle), o que sugere o envolvimento da apoptose extrínseca causada por esses compostos.

Figura 19 - Efeito das chalconas R32, F07, F09 e F10 sobre a expressão da proteína FasR em células K562 e Jurkat.



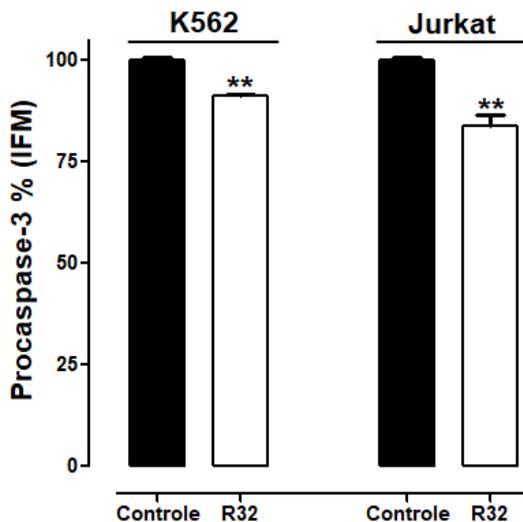
As células K562 ($1,0 \times 10^6$ células/4mL de meio) e Jurkat ($1,0 \times 10^6$ células/2mL de meio) foram incubadas por 12 h na ausência (grupo controle) e na presença das chalconas **R32**, **F07**, **F09** ou **F10** nas suas respectivas CI_{50} de 24 h. A determinação da intensidade de fluorescência média foi determinada por citometria de fluxo após a marcação com o anticorpo anti-FasR-PE. 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. IFM: Intensidade de fluorescência média. Diferença estatística em relação ao grupo controle, * $P \leq 0,05$, ** $P \leq 0,01$, *** $P \leq 0,001$, teste *t* de Student. Fonte: Própria (2018).

5.13 EFEITO DAS CHALCONAS R32, F07, F09 E F10 SOBRE A EXPRESSÃO DA PROTEÍNA CASPASE-3

Ambas as apoptoses, intrínseca e extrínseca, convergem para a ativação das caspases efetoras -3, -6 e -7 (clivagem das procaspases em caspases ativas) que desencadeiam uma série de alterações morfológicas e bioquímicas, que incluem a exposição dos resíduos de fosfatidilserina, a formação de corpos apoptóticos e a fragmentação do DNA, que culminam na morte celular apoptótica (FULDA, 2009; LO et al., 2011; GALLUZZI et al., 2018). Dessa forma, para avaliar se a apoptose causada pelas chalconas **R32**, **F07**, **F09** e **F10** envolve a ativação da proteína caspase-3, as células K562 e Jurkat foram incubadas com os compostos por 12 h em suas CI_{50} de 24 h e a expressão da proteína procaspase-3 ou caspase-3 foi analisada por citometria de fluxo.

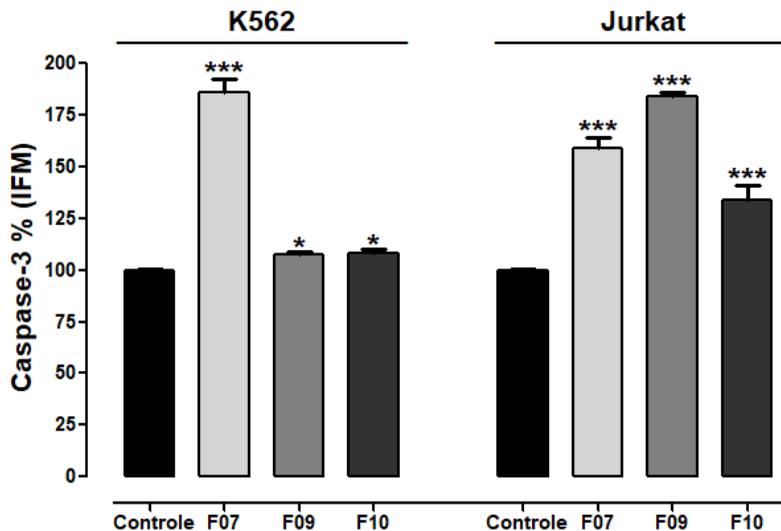
Como pode ser observado na Figura 20, a chalcona **R32** diminuiu significativamente a expressão da procaspase-3 em $8,7 \pm 0,12$ % nas células K562 e em $21,77 \pm 0,58$ % nas células Jurkat em relação ao grupo controle. Na Figura 21, pode-se observar que as chalconas **F07**, **F09** e **F10** aumentaram significativamente a expressão da caspase-3 ativa nas células K562 ($85,88 \pm 6,77$ %, $7,41 \pm 1,59$ % e $8,07 \pm 1,93$ %) e nas células Jurkat ($58,68 \pm 5,66$ %, $84,19 \pm 1,99$ % e $34,17 \pm 6,50$ %) em relação ao controle.

Figura 20 - Efeito da chalcona R32 sobre a expressão da proteína procaspase-3 em células K562 e Jurkat.



As células K562 ($1,0 \times 10^6$ células/ 4mL de meio) e Jurkat ($1,0 \times 10^6$ células/ 2mL de meio) foram incubadas por 12 h na ausência, grupo controle, e na presença da chalcona **R32** nas suas respectivas CI_{50} de 24 h. A intensidade de fluorescência média foi determinada por citometria de fluxo após a marcação com o anticorpo anti-procaspase-3-FITC. 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. IFM: Intensidade de fluorescência média. **Diferença estatística em relação ao grupo controle, $P \leq 0,01$, teste t de Student. Fonte: Própria (2018).

Figura 21 - Efeito das chalconas F07, F09 e F10 sobre a expressão da proteína caspase-3 em células K562 e Jurkat.



As células K562 ($1,0 \times 10^6$ células/ 4mL de meio) e Jurkat ($1,0 \times 10^6$ células/ 2mL de meio) foram incubadas por 12 h na ausência, grupo controle, e na presença das chalconas **F07**, **F09** e **F10** nas suas respectivas CI_{50} de 24 h. A intensidade de fluorescência média foi determinada por citometria de fluxo após a marcação com o anticorpo anti-caspase-3-FITC. 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. IFM: Intensidade de fluorescência média. Diferença estatística em relação ao grupo controle, * $P \leq 0,05$, *** $P \leq 0,001$, teste *t* de Student. Fonte: Própria (2018).

Esses resultados sugerem que as chalconas **R32**, **F07**, **F09** e **F10** ativam a apoptose extrínseca e intrínseca em ambas as linhagens celulares, K562 e Jurkat.

Os resultados obtidos no presente estudo corroboram os de Winter e colaboradores (2010) que demonstraram que chalconas derivadas da 2-naftilacetofenona induzem apoptose com aumento da atividade da caspase-3 em células de leucemia L1210, os de Costa e colaboradores (2014), Maioral e colaboradores (2016) e Maioral e colaboradores (2017) que demonstraram o aumento da caspase-3 em linhagens de células leucêmicas K562 e Jurkat tratadas com chalconas sintéticas. Além disso, outros estudos demonstraram que derivados de chalconas induzem a apoptose em células K562 e Jurkat por ativação da caspases-3

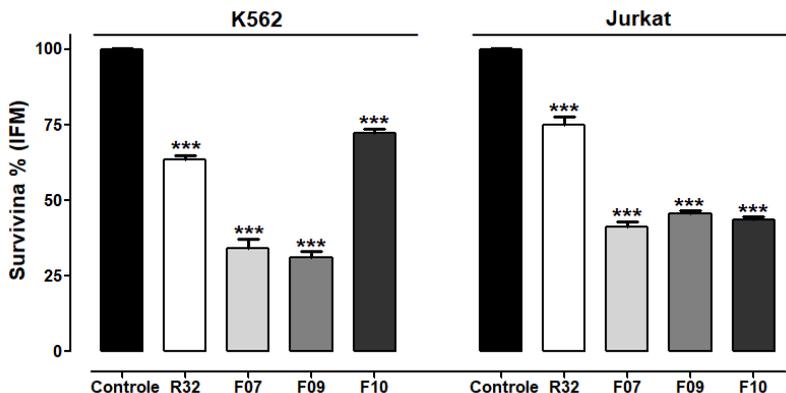
(BUBNIAK et al., 2017). Já Elshemy e Zaki (2017) e Teng e colaboradores (2016), demonstraram que derivados de chalconas provocam o aumento da expressão de caspase-3 induzindo a apoptose em células K562.

5.14 EFEITO DAS CHALCONAS R32, F07, F09 E F10 SOBRE A PROTEÍNA ANTIAPOPTÓTICA SURVIVINA

As proteínas inibidoras da apoptose (IAPs) compreendem uma família de proteínas que servem como inibidores endógenos da apoptose. Essa família é composta por várias proteínas que incluem a survivina. Essa proteína suprime função da cascata de caspases por interações proteína-proteína, permitindo que as IAPs se liguem diretamente às caspases, e, dessa forma, impedem a indução da apoptose (PLATI; BUCUR; KHOSRAVI-FAR, 2011). A survivina é superexpressa na maioria das neoplasias humanas e está envolvida na resistência ao tratamento, por isso, associada a mau prognóstico (FULDA, 2009).

Nessa perspectiva, neste trabalho foi avaliado se os efeitos apoptóticos das chalconas **R32**, **F07**, **F09** e **F10** estavam relacionados com a diminuição da expressão da proteína antiapoptótica survivina. Para isso, as células K562 e Jurkat foram incubadas por 12 h com os compostos **R32**, **F07**, **F09** e **F10** nas suas respectivas CI_{50} de 24 h, e a expressão da proteína survivina foi avaliada. Como pode ser observado na Figura 22, o tratamento com as chalconas **R32**, **F07**, **F09** e **F10** causaram diminuição significativa na expressão da proteína survivina nas células K562 ($36,34 \pm 1,37$ %, $65,86 \pm 3,03$ %, $68,74 \pm 1,84$ % e $27,63 \pm 1,23$ %, respectivamente) e nas células Jurkat ($24,97 \pm 0,41$ %, $58,69 \pm 1,65$ %, $54,34 \pm 1,07$ % e $56,29 \pm 1,03$ %, respectivamente) em relação ao grupo controle. Esses resultados corroboram os de outros encontrados por nosso grupo que demonstram que algumas chalconas sintéticas diminuem a expressão da survivina em células K562 e Jurkat (COSTA et al., 2014; MAIORAL et al., 2016; MAIORAL et al., 2017).

Figura 22 - Expressão da proteína inibidora da apoptose survivina nas células K562 e Jurkat após o tratamento com as chalconas R32, F07, F09 e F10.



As células K562 ($1,0 \times 10^6$ células/ 4mL de meio) e Jurkat ($1,0 \times 10^6$ células/ 2mL de meio) foram incubadas por 12 h na ausência, grupo controle, e na presença das chalconas **R32**, **F07**, **F09** e **F10** nas suas respectivas CI_{50} de 24 h. A determinação da intensidade de fluorescência média foi determinada por citometria de fluxo após a marcação com o anticorpo anti-survivina-PE. 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. IFM: Intensidade de fluorescência média. ***Diferença estatística em relação ao grupo controle, $P \leq 0,001$, teste *t* de Student. Fonte: Própria (2018).

Como por ser observado nos Esquemas 4 a 11, o conjunto de resultados aqui expostos sugerem que as chalconas sintética **F07**, **F09**, **F10** e **R32** provocam morte celular por apoptose em células de leucemia mieloide aguda (K562) e de leucemia linfóide aguda (Jurkat) humanas por apoptose extrínseca (pelo aumento da expressão de FasR) e intrínseca (pela diminuição razão Bcl-2/Bax, diminuição do PMM e aumento da expressão de AIF), além do aumento da expressão de caspase-3 ativa e diminuição da proteína inibidora da apoptose survivina. Considerando esses aspectos, esses compostos são moléculas promissoras para o desenvolvimento de novos fármacos antileucêmicos ou como protótipos para o desenvolvimento de novos quimioterápicos, porém estudos *in vivo* serão necessários.

6 CONCLUSÕES

Os resultados do presente estudo permitem concluir que:

1. Dentre as 24 chalconas sintéticas derivadas do 4-carboxibenzaldeído e as 11 chalconas derivadas da 1-naftilacetofenona avaliadas na triagem, as que apresentaram maior efeito citotóxico foram as chalconas **R32**, **F07**, **F09** e **F10** para as linhagens celulares K562 e Jurkat.
2. As chalconas **R32**, **F07**, **F09** e **F10** causaram redução da viabilidade celular das células de LMA humana (K562) e das células de LLA humana (Jurkat) de maneira concentração e tempo dependentes.
3. Ao realizar as curvas concentração e tempo- resposta, as chalconas **R32**, **F07**, **F09** e **F10** apresentaram CI_{50} em 24 h menor que 40 μ M em ambas as linhagens celulares.
4. As chalconas **R32**, **F07**, **F09** e **F10** obedeceram a "regra de cinco" de Lipinski para estimar teoricamente a absorção oral de fármacos. Os compostos apresentam boa biodisponibilidade oral, indicando seu potencial para serem usados como fármacos orais em tratamentos de LA.
5. Os compostos **R32**, **F07**, **F09** e **F10** não causaram citotoxicidade em células mononucleares de indivíduos clinicamente saudáveis.
6. As chalconas **R32**, **F07**, **F09** e **F10** não provocaram hemólise significativa sobre eritrócitos clinicamente saudáveis, sugerindo a possível utilização desses compostos por via sistêmica.
7. As chalconas **R32**, **F07**, **F09** e **F10** não alteram a agregação plaquetária e a coagulação sanguínea (TP e TTPa), sugerindo que eles apresentam elevada biocompatibilidade com o sangue.
8. Os compostos **R32**, **F07**, **F09** e **F10** não causaram bloqueio em nenhuma das fases do ciclo celular.
9. As chalconas **F07** e **F09** reduziram significativamente a expressão da proteína marcadora de proliferação celular KI-67 nas células K562. Além disso, observou-se que o composto **R32** reduziu significativamente a expressão de KI-67 em células Jurkat.

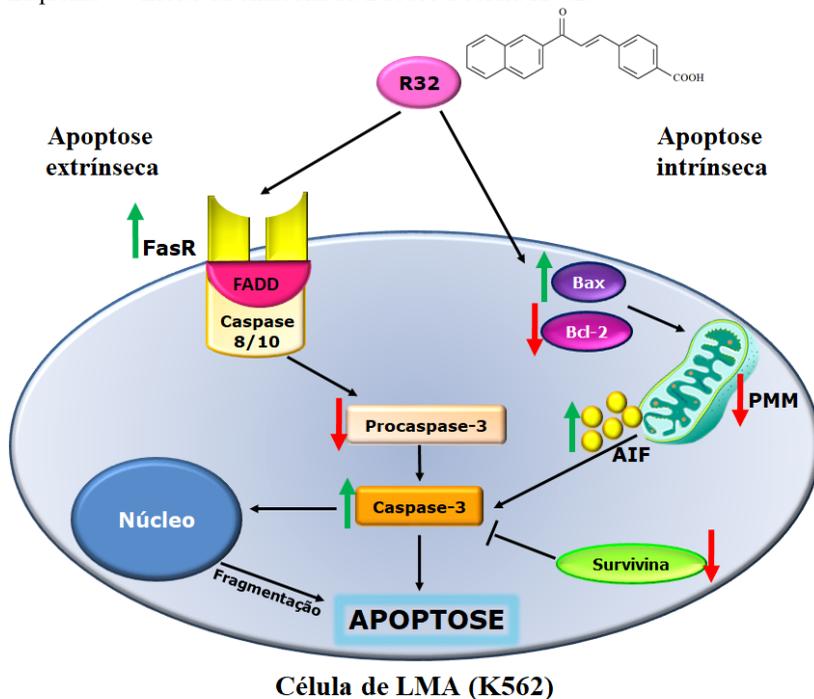
10. Os compostos **R32**, **F07**, **F09** e **F10** induziram a morte celular por apoptose nas células K562 e Jurkat.
11. A razão Bcl-2/Bax diminuiu após o tratamento com os compostos **R32**, **F07**, **F09** e **F10** em ambas as linhagens celulares estudadas. A diminuição dessa razão sugere o envolvimento dos compostos na apoptose intrínseca.
12. Os compostos **R32**, **F07**, **F09** e **F10** reduziram o potencial de membrana mitocondrial em ambas as linhagens celulares estudadas.
13. Os compostos **R32**, **F07**, **F09** e **F10** aumentaram a expressão de AIF em células K562 e Jurkat.
14. As chalconas **R32**, **F07**, **F09** e **F10** aumentaram a expressão de FasR nas células K562 e Jurkat.
15. A chalcona **R32** diminuiu a expressão de procaspase-3 em ambas as linhagens celulares. As chalconas **F07**, **F09** e **F10** aumentaram a expressão de caspase-3 ativa em ambas as linhagens celulares.
16. Os compostos **R32**, **F07**, **F09** e **F10** causaram diminuição da expressão da proteína antiapoptótica survivina nas células K562 e Jurkat.

Em síntese, os dados observados nesse estudo permitem sugerir que as chalconas **R32**, **F07**, **F09** e **F10** possuem atividade citotóxica sobre células de LMA (K562) e de LLA (Jurkat) pela indução de apoptose intrínseca e extrínseca; apresentam teoricamente boa biodisponibilidade oral, o que indica seu potencial para serem usadas como fármacos orais; não causaram citotoxicidade em células mononucleares de indivíduos clinicamente saudáveis, o que sugere seletividade para células de LAs e conseqüente redução de efeitos adversos; não provocaram hemólise, não alteram a agregação plaquetária e a coagulação sanguínea, o que indica a possível utilização desses compostos por via sistêmica. Assim, esses compostos são possíveis candidatos a novos quimioterápicos de uso oral e/ ou sistêmico.

7 COMPILAÇÃO DOS RESULTADOS

7.1 EFEITO DA CHALCONA R32 SOBRE CÉLULAS DE LMA (K562) E LLA (JURKAT).

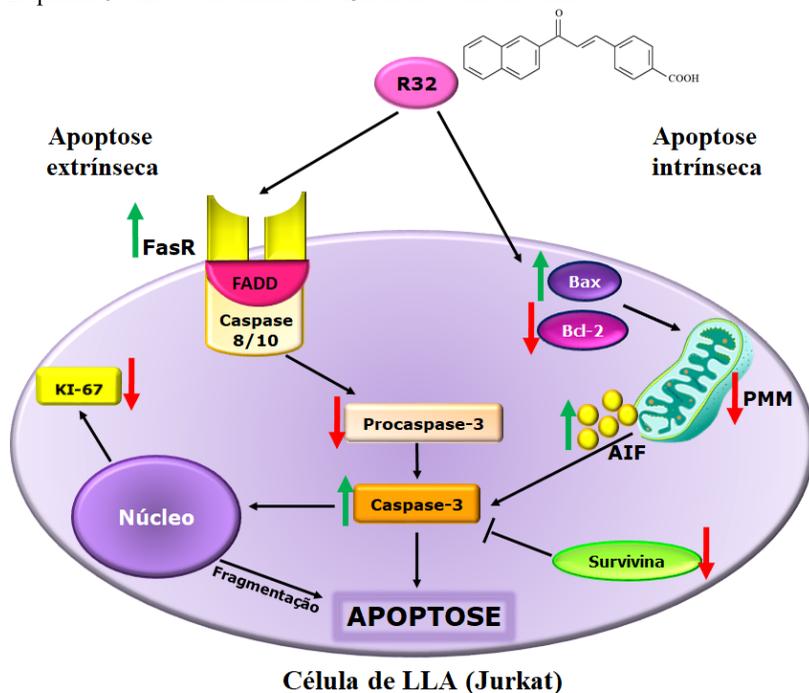
Esquema 4 - Efeito da chalcona R32 sobre a célula K562.



Mecanismo proposto de citotoxicidade induzido pela chalcona derivada do 4-carboxibenzaldeído, **R32**, sobre célula de LMA de origem humana (K562). A apoptose extrínseca é iniciada por meio da ativação do receptor de morte Fas (FasR). A apoptose intrínseca é iniciada por danos na mitocôndria, resultando na despolarização da membrana mitocondrial externa, diminuição do potencial de membrana mitocondrial (PMM) e na liberação de fatores como o fator indutor de apoptose (AIF), evento regulado pela diminuição da expressão da proteína antiapoptótica Bcl-2 e aumento da expressão da proteína proapoptótica Bax (diminuição da razão Bcl-2/Bax). Ambas as apoptoses, extrínseca e intrínseca, resultam na ativação da caspases-3 e diminuição da expressão da proteína inibidora da apoptose survivina, as quais levam a célula à apoptose.

Fonte: Própria (2018).

Esquema 5 - Efeito da chalcona R32 sobre a célula Jurkat.

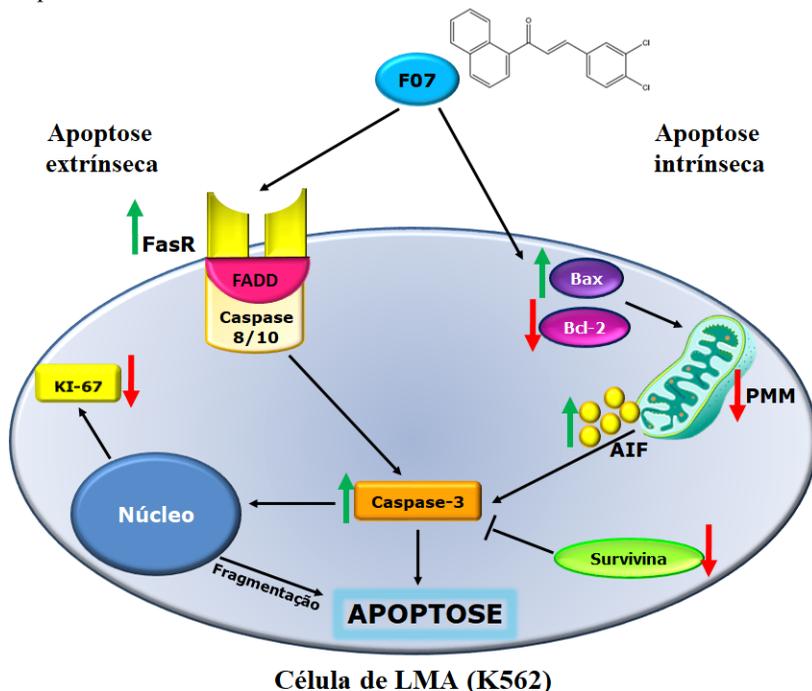


Mecanismo proposto de citotoxicidade induzido pela chalcona derivada do 4-carboxibenzaldeído, **R32**, sobre célula de LLA de origem humana (Jurkat). A apoptose extrínseca é iniciada por meio da ativação do receptor de morte Fas (FasR). A apoptose intrínseca é iniciada por danos na mitocôndria, resultando na despolarização da membrana mitocondrial externa, diminuição do potencial de membrana mitocondrial (PMM) e na liberação de fatores como o fator indutor de apoptose (AIF), evento regulado pela diminuição da expressão da proteína antiapoptótica Bcl-2 e aumento da expressão da proteína proapoptótica Bax (diminuição da razão Bcl-2/Bax). Ambas as apoptoses, extrínseca e intrínseca, resultam na ativação da caspases-3 e diminuição da expressão da proteína inibidora da apoptose survivina, os quais levam a célula à apoptose. Além disso, a chalcona **R32** diminui a expressão da proteína KI-67, diminuindo a proliferação celular.

Fonte: Própria (2018).

7.2 EFEITO DA CHALCONA F07 SOBRE CÉLULAS DE LMA (K562) E LLA (JURKAT)

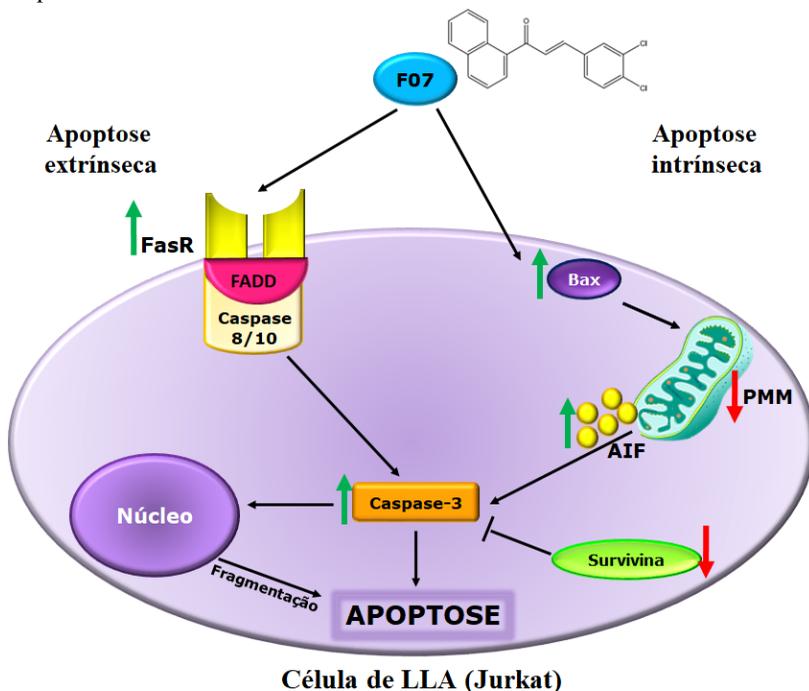
Esquema 6 - Efeito da chalcona F07 sobre a célula K562.



Mecanismo proposto de citotoxicidade induzido pela chalcona derivada da 1-naftilacetofenona, **F07**, sobre célula de LMA de origem humana (K562). A apoptose extrínseca é iniciada por meio da ativação do receptor de morte Fas (FasR). A apoptose intrínseca é iniciada por danos na mitocôndria, resultando na despolarização da membrana mitocondrial externa, diminuição do potencial de membrana mitocondrial (PMM) e na liberação de fatores como o fator indutor de apoptose (AIF), evento regulado pela diminuição da expressão da proteína antiapoptótica Bcl-2 e aumento da expressão da proteína proapoptótica Bax (diminuição da razão Bcl-2/Bax). Ambas as apoptoses, extrínseca e intrínseca, resultam na ativação da caspases-3 e diminuição da expressão da proteína inibidora da apoptose survivina, os quais levam a célula à apoptose. Além disso, a chalcona **F07** diminui a expressão da proteína KI-67, diminuindo a proliferação celular.

Fonte: Própria (2018).

Esquema 7 - Efeito da chalcona F07 sobre a célula Jurkat.

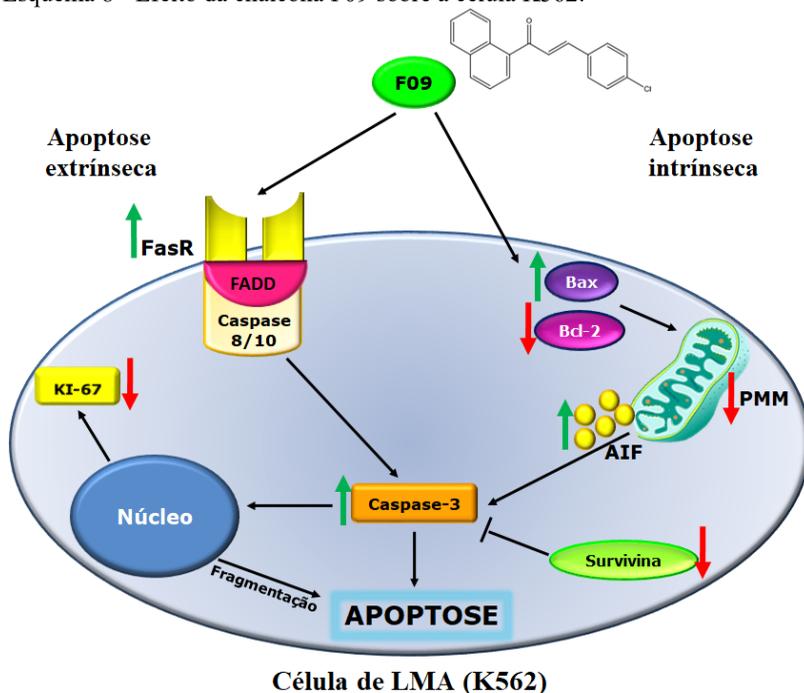


Mecanismo proposto de citotoxicidade induzido pela chalcona derivada da 1-naftilacetofenona, **F07**, sobre célula de LLA de origem humana (Jurkat). A apoptose extrínseca é iniciada por meio da ativação do receptor de morte Fas (FasR). A apoptose intrínseca é iniciada por danos na mitocôndria, resultando na despolarização da membrana mitocondrial externa, diminuição do potencial de membrana mitocondrial (PMM) e na liberação de fatores como o fator indutor de apoptose (AIF), evento regulado pelo aumento da expressão da proteína proapoptótica Bax (diminuição da razão Bcl-2/Bax). Ambas as apoptoses, extrínseca e intrínseca, resultam na ativação da caspases-3 e diminuição da expressão da proteína inibidora da apoptose survivina, os quais levam a célula à apoptose.

Fonte: Própria (2018).

7.3 EFEITO DA CHALCONA F09 SOBRE CÉLULAS DE LMA (K562) E LLA (JURKAT)

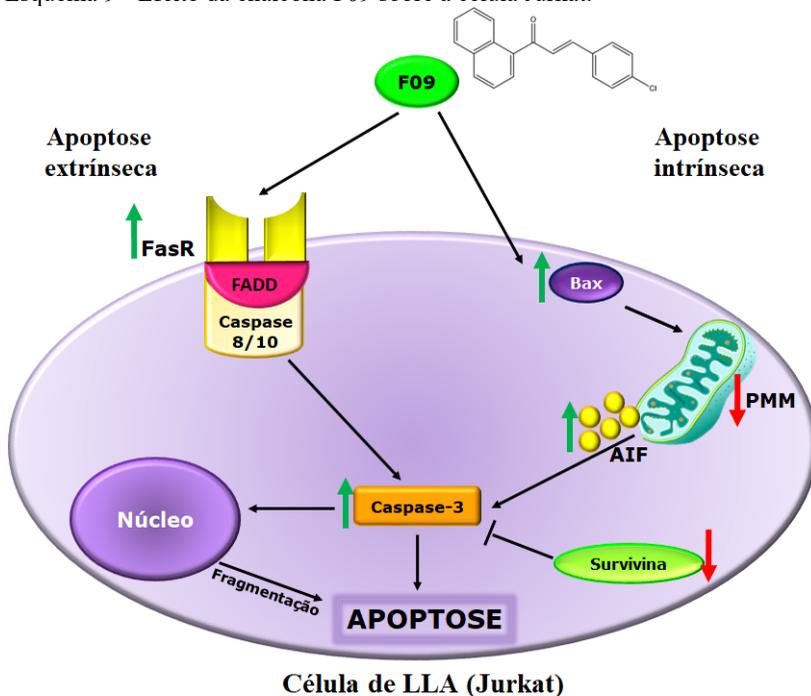
Esquema 8 - Efeito da chalcona F09 sobre a célula K562.



Mecanismo proposto de citotoxicidade induzido pela chalcona derivada da 1-naftilacetofenona, **F09**, sobre célula de LMA de origem humana (K562). A apoptose extrínseca é iniciada por meio da ativação do receptor de morte Fas (FasR). A apoptose intrínseca é iniciada por danos na mitocôndria, resultando na despolarização da membrana mitocondrial externa, diminuição do potencial de membrana mitocondrial (PMM) e na liberação de fatores como o fator indutor de apoptose (AIF), evento regulado pela diminuição da expressão da proteína antiapoptótica Bcl-2 e aumento da expressão da proteína proapoptótica Bax (diminuição da razão Bcl-2/Bax). Ambas as apoptoses, extrínseca e intrínseca, resultam na ativação da caspases-3 e diminuição da expressão da proteína inibidora da apoptose survivina, os quais levam a célula à apoptose. Além disso, a chalcona **F07** diminui a expressão da proteína KI-67, diminuindo a proliferação celular.

Fonte: Própria (2018).

Esquema 9 - Efeito da chalcona F09 sobre a célula Jurkat.

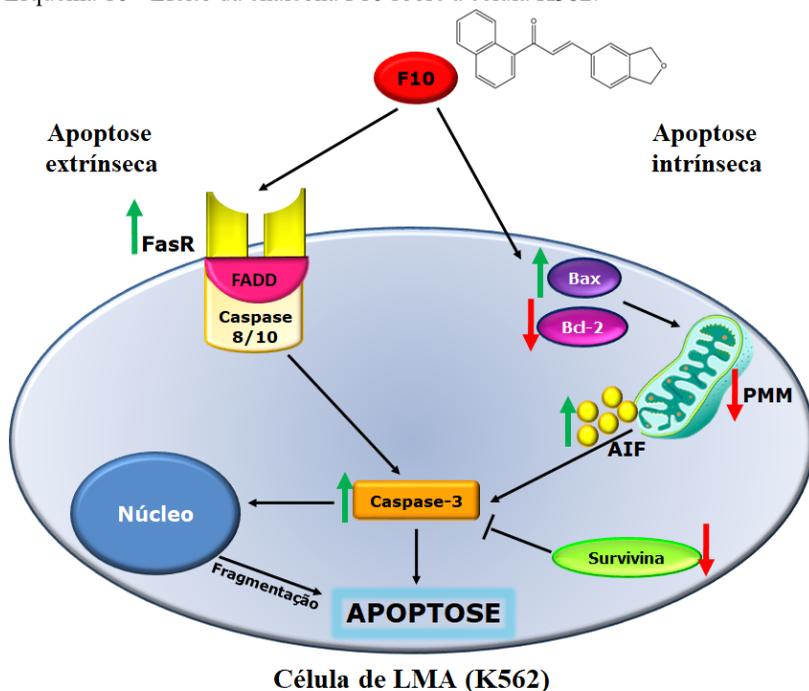


Mecanismo proposto de citotoxicidade induzido pela chalcona derivada da 1-naftilacetofenona, **F09**, sobre célula de LLA de origem humana (Jurkat). A apoptose extrínseca é iniciada por meio da ativação do receptor de morte Fas (FasR). A apoptose intrínseca é iniciada por danos na mitocôndria, resultando na despolarização da membrana mitocondrial externa, diminuição do potencial de membrana mitocondrial (PMM) e na liberação de fatores como o fator indutor de apoptose (AIF), evento regulado pelo aumento da expressão da proteína proapoptótica Bax (diminuição da razão Bcl-2/Bax). Ambas as apoptoses, extrínseca e intrínseca, resultam na ativação da caspases-3 e diminuição da expressão da proteína inibidora da apoptose survivina, os quais levam a célula à apoptose.

Fonte: Própria (2018).

7.4 EFEITO DA CHALCONA F10 SOBRE CÉLULAS DE LMA (K562) E LLA (JURKAT)

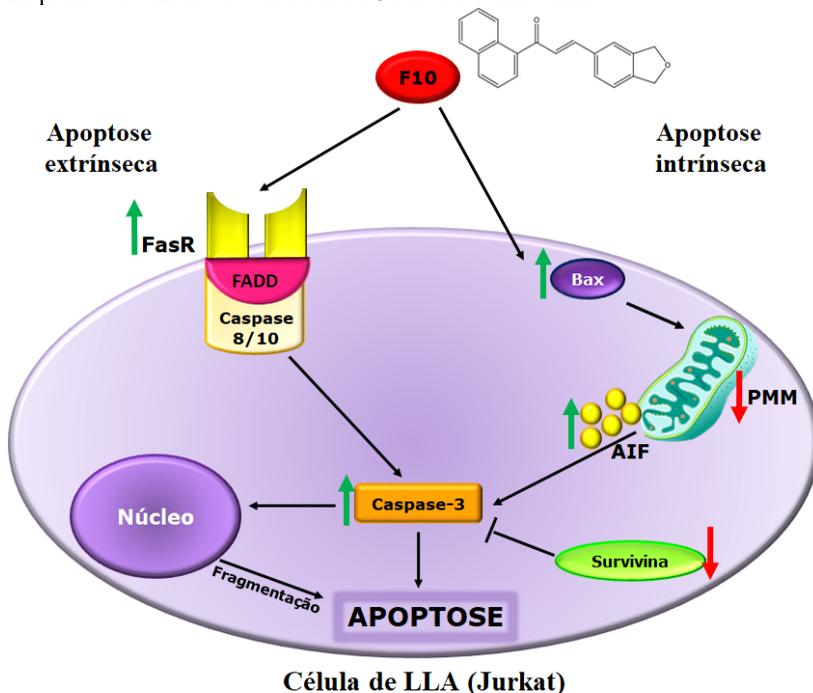
Esquema 10 - Efeito da chalcona F10 sobre a célula K562.



Mecanismo proposto de citotoxicidade induzido pela chalcona derivada da 1-naftilacetofenona, **F10**, sobre célula de LMA de origem humana (K562). A apoptose extrínseca é iniciada por meio da ativação do receptor de morte Fas (FasR). A apoptose intrínseca é iniciada por danos na mitocôndria, resultando na despolarização da membrana mitocondrial externa, diminuição do potencial de membrana mitocondrial (PMM) e na liberação de fatores como o fator indutor de apoptose (AIF), evento regulado pela diminuição da expressão da proteína antiapoptótica Bcl-2 e aumento da expressão da proteína proapoptótica Bax (diminuição da razão Bcl-2/Bax). Ambas as apoptoses, extrínseca e intrínseca, resultam na ativação da caspases-3 e diminuição da expressão da proteína inibidora da apoptose survivina, as quais levam a célula à apoptose.

Fonte: Própria (2018).

Esquema 11 - Efeito da chalcona F10 sobre a célula Jurkat.



Mecanismo proposto de citotoxicidade induzido pela chalcona derivada da 1-naftilacetofenona, **F10**, sobre célula de LLA de origem humana (Jurkat). A apoptose extrínseca é iniciada por meio da ativação do receptor de morte Fas (FasR). A apoptose intrínseca é iniciada por danos na mitocôndria, resultando na despolarização da membrana mitocondrial externa, diminuição do potencial de membrana mitocondrial (PMM) e na liberação de fatores como o fator indutor de apoptose (AIF), evento regulado pelo aumento da expressão da proteína proapoptótica Bax (diminuição da razão Bcl-2/Bax). Ambas as apoptoses, extrínseca e intrínseca, resultam na ativação da caspases-3 e diminuição da expressão da proteína inibidora da apoptose survivina, os quais levam a célula à apoptose.

Fonte: Própria (2018).

REFERÊNCIAS

AHSAN, M.J.; SAMY, J.G.; KHALILULLAH, H.; NOMANI, M.S.; SARASWAT, P.; GAUR, R.; SINGH, A. **Molecular properties prediction and synthesis of novel 1,3,4-oxadiazole analogues as potent antimicrobial and antitubercular agents.** Bioorg Med Chem Lett, v. 15; n. 21(24), p. 7246-7250, 2011.

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

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

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

AMERICAN CANCER SOCIETY. Typical treatment of acute lymphocytic leukemia. **Treating Leukemia - Acute Lymphocytic (ALL) In Adults Topics**, Atlanta, 2016. Disponível em: <<http://www.cancer.org/cancer/leukemiaacutelymphocyticallinadults/detailguide/leukemia-acute-lymphocytic-treating-typical-treatment>>. Acesso em: 24 de fev. 2017.

BAIN, B.J. **Leukaemia diagnosis.** 4.ed. Wiley-Blackwell, Singapore. 2010.

BANDGAR, B.P.; GAWANDE, S.S. **Synthesis and biological screening of a combinatorial library of b-chlorovinylchalconas as anticancer, anti-inflammatory and antimicrobial agents.** Bioorganic & Medicinal Chemistry, v. 18, p. 2060-2065, 2010.

BENNETT, J.M.; CATOVSKY, D.; DANIEL, M.T.; FLANDRIN, G.; GALTON, D.A.; GRALNICK, H.R.; SULTAN, C. **Proposals for the classification of the acute leukaemias. French-American-British (FAB) co-operative group.** British Journal of Haematology, v.33, n.4, p.451-458, 1976.

BENNETT, J.M.; CATOVSKY, D.; DANIEL, M.T.; FLANDRIN, G.; GALTO, D.A.G.; GRALNICK, H.R.; SULTAN, C. **Proposed revised criteria for the classification of acute myeloid leukemia.** A report of the French American British Cooperative Group. *Annals of Internal Medicine*, v.103, p.620-625, 1985.

BENNETT, J.M.; BERGER, R.; CATOVSKY, D. **Morphologic, immunologic and cytogenetic (MIC) working classification of the acute myeloid leukemias.** Second MIC Cooperative Study Group. *British Journal of Haematology*, v.68, p.487-494, 1988.

BENNETT, J.M.; CATOVSKY, D.; DANIEL, M.T. **Proposal for the recognition of minimally differentiated acute myeloid leukaemia (AML_{M0}).** *British Journal of Haematology*, v.78, p.325-329, 1991.

BHAT, B. A.; DHAR, K. L.; PURI, S. C.; SAXENA, A. K.; SHANMUGAVEL, M.; QAZI, G. N. **Synthesis and biological evaluation of chalcones and their derived pyrazoles as potential cytotoxic agents.** *Bioorganic & Medicinal Chemistry*, v. 15, p. 3177-3180, 2005.

BIGOLIN, A. **Investigação do mecanismo de morte celular induzido por compostos em células de linhagens de neoplasias hematológicas.** 2016. Dissertação (Mestrado em Farmácia) - Universidade Federal de Santa Catarina, Florianópolis, 2016.

BORN, G. V.; CROSS, M. J. **Aggregation of blood platelets.** *J Physiology*, v.168, p. 178-195, 1963.

BUBNIAK, L.D.S.; GASPAR, P.G.; DE MORAES, A.C.R.; BIGOLIN, A.; DE SOUZA, R.K.; BUZZI, F.C.; CORRÊA, R.; CECHINEL FILHO, V.; BRETANHA, L.C.; MICKÉ, G.A.; NUNES, R.J.; SANTOS-SILVA, M.C. **Effects of 1,3,5-triphenyl-4,5-dihydro-1H-pyrazole derivatives on cell-cycle and apoptosis in human acute leukemia cell lines.** *Can J Physiol Pharmacol*, v.95(5), p. 548-563, 2017.

BULLOCK, A.N.; FERSHT, A.R. **Rescuing the function of mutant p53.** *Nature Reviews Cancer*, v. 1, p. 68-76, 2001.

CALIXTO, J.B. Estudo Farmacológico Pré-clínico de Plantas Mediciniais. In: Yunes, R. A.; Calixto, J. B. (ed.). **Plantas Mediciniais: sob a ótica da Química Medicinal Moderna**. Chapecó: Argos, 2001. Cap. 3, p. 78.

DE CAMPUS-BUZZI, F.; PADARATZ, P.; MEIRA, A.V.; CORREA, R.; NUNES, R.; CECHINEL-FILHO, V. **4-Acetamidochalcone derivates as potencial antinociceptive agentes**. *Molecules*, v.12, p: 896-906, 2007.

CESARIN-SOBRINHO, D.; NETTO-FERREIRA, J. C.; BRAZ-FILHO, R. **Efeito da substituição por átomos de flúor no equilíbrio conformacional de chalconas**. *Química Nova*, v.24, p. 604-611, 2001.

^aCHIARADIA, L.D.; et al. **Synthesis and pharmacological activity of chalcones derived from 2,4,6-trimethoxyacetophenone in Raw264.7 cells stimulated by LPS: Quantitative structure-activity relationships**. *Bioorganic and Medicinal Chemistry*, v. 16. P. 658-667, 2008.

^bCHIARADIA L.D.; MASCARELLO A.; PURIFICAÇÃO M.; VERNAL J.; CORDEIRO M.N.; ZENTENO M.E.; VILLARINO A.; NUNES R.J.; YUNES R.A.; TERENCE H. **Synthetic chalcones as efficient inhibitors of Mycobacterium tuberculosis protein tyrosine phosphatase PtpA**. *Bioorg Med Chem Lett*, v. 1;18(23), p. 6227-30, 2008.

CHIARADIA, L.D. **Síntese, caracterização e estudo da relação estrutura-atividade (REA) de chalconas e de compostos heterocíclicos biologicamente ativos em doenças negligenciadas, hiperglicemia e leucemia**. 2010. Tese (Doutorado em Química) - Universidade Federal de Santa Catarina, Florianópolis, 2010.

CHIARADIA L.D.; MARTINS P.G.; CORDEIRO M.N.; GUIDO R.V.; ECCO G.; ANDRICOPULO A.D.; YUNES R.A.; VERNAL J.; NUNES R.J.; TERENCE H. **Synthesis, biological evaluation, and molecular modeling of chalcone derivatives as potent inhibitors of Mycobacterium tuberculosis protein tyrosine phosphatases (PtpA and PtpB)**. *J Med Chem*, v. 12;55(1), p. 390-402, 2012.

CHOUHDRY, A.; DELOUGHEREY, T.G. **Bleeding and thrombosis in acute promyelocytic leukaemia.** *Am. J. Hematol.* 87(6):596-603, 2012.

CLARKE, A.R.; PURDIE, C.A.; HARRISON, D.J.; MORRIS, R.G.; BIRD, C.C.; HOOPER, M.L.; WYLLIE, A.H. **Thymocyte Apoptosis Induced by p53-Dependent and Independent Pathways.** *Nature*, v.362, p.849-852, 1993.

CORNELL, R.F.; PALMER, J. **Adult acute leukemia.** *Dis Mon*, v. 58, n. 4, 2012.

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

COSTA, A.; CHIARADIA-DELATORRE, L. D.; SANTOS-BUBNIAK, L.; MASCARELLO, A.; MARZAROTTO, M. A. L.; MORAES, A. C. R.; STUMPF, T. R.; CORDEIRO, M. N.; YUNES, R. A.; NUNES, R. J.; SANTOS-SILVA, M.C. **Apoptotic effect of synthetic 2, 4, 5-trimethoxychalcones in human K562 and Jurkat leukemia cells.** *Med Chem Res.* 2014. DOI: 10.1007/s00044-014-1002-4.

DANESE, A.; PATERGNANI, S.; BONORA, M.; WIECKOWSKI, M.R.; GIORGI M.P.C.; PINTON, P. **Calcium regulates cell death in cancer: roles of the mitochondria and mitochondria-associated membranes (MAMs).** *Bioenergetics*, 2017.

DEL POETA, G.; BRUNO, A.; DEL PRINCIPE, M.I.; VENDITTI, A.; MAURILLO, L.; BUCCISANO, F.; STASI, R.; NERI, B.; LUCIANO, F.; SINISCALCHI, A.; DE FABRITIIS, P.; AMADORI, S. **Deregulation of the mitochondrial apoptotic machinery and development of molecular targeted drugs in acute myeloid leukemia.** *Curr Cancer Drug Targets*, v. 8, n. 3, p. 207-222, 2008.

DUCKI, S.; FORREST, R.; HADFIELD, J. A.; KENDALL, A.; LAWRENCE, N. J.; MCGROWN, A. T.; RENNISON, D. **Potent antimitotic and cell growth inhibitory properties of substituted chalcones.** *Bioorganic & Medicinal Chemical Letters*, v. 8, p. 1051-1056, 1998.

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

ELSHEMY, H.A.; ZAKI, M.A. **Design and synthesis of new coumarin hybrids and insight into their mode of antiproliferative action.** Bioorg Med Chem, v. 25(3), p. 1066-1075, 2017.

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

FANG, X.; YANG, B.; CHENG, Z.; YANG, M.; SU, N.A.; ZHOU, L.; ZHOU, J. **Synthesis and Antitumor Activity of Novel Nitrogen Mustard-Linked Chalcones.** Arch. Pharm. Chem. Life Sci, v. 346, p. 292–299, 2013.

FENG, Q.; LEONG, W. S.; LIU, L.; CHAN, W.I. **Peruvoside, a Cardiac Glycoside, Induces Primitive Myeloid Leukemia Cell Death.** Molecules, v. 21, n. 4, p.534, 2016.

FILIPITS, M. **Mechanisms of cancer: mutidrug resistance.** Drug Discov Today: Dis Mech, v. 1, p. 229–234, 2004.

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

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

GALLUZZI, L.; VITALE, I.; ABRAMS, J.M.; ALNEMRI, E.S.; BAEHRECKE, E.H.; BLAGOSKLONNY, M.V.; DAWSON, T.M.; DAWSON, V.L.; EL-DEIRY, W.S.; FULDA, S.; GOTTLIEB, E.; GREEN, D.R.; HENGARTNER, M.O.; KEPP, O.; KNIGHT, R.A.; KUMAR, S.; LIPTON, S.A.; LU, X.; MADEO, F.; MALORNI, W.; MEHLEN, P.; NUÑEZ, G.; PETER, M.E.; PIACENTINI, M.; RUBINSZTEIN, D.C.; SHI, Y.; SIMON, H.U.; VANDENABEELE, P.; WHITE, E.; YUAN, J.; ZHIVOTOVSKY, B.; MELINO, G.; KROEMER, G. **Molecular definitions of cell death subroutines: recommendations of the Nomenclature Committee on Cell Death.** Cell Death Differ, v. 19, n. 1, p. 107-20, 2018.

GAUR, R.; PATHANIA, A.S.; MALIK, A.F.; BHAKUNI, R.S.; VERMA, R.K. **Synthesis of a series of novel dihydroartemisinin monomers and dimers containing chalcone as a linker and their anticancer activity.** European Journal of Medicinal Chemistry, v. 122, p. 232-246, 2016.

GO, M.L.; WU, X.; LIU, X.L. **Chalcones: an update on cytotoxic and chemoprotective properties.** Current Medicinal Chemistry, v. 12, p. 483-499, 2005.

GÖKBUGET, N.; HOELZER, D. **Novel antibody-based therapy for acute lymphoblastic leukaemia.** Best Pract Res Clin Haematol, v. 19(4), p. 701-13, 2006.

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

GRIVICICH, I.; REGNER, A.; DA ROCHA, AB. **Morte Celular por Apoptose.** Revista Brasileira de Cancerologia, v. 53(3), p. 335-343, 2007.

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

HAAKE, A.R.; POLAKOWSKA, R.R. **Cell Death by Apoptosis in Epidermal Biology.** Journal of Investigative Dermatology, v. 101, n. 2, p.107-112, 1993.

HAO, Z.; KOTA, V. **Volasertib for AML: clinical use and patient consideration.** Onco Targets and Therapy, v. 8, p.1761-1771, 2015.

HARTWELL, L.; WEINHART, T. **Checkpoints: controls that ensure the order of cell cycle events.** Science, v. 246, p. 629-634, 1989.

HSEU, Y.C.; LEE, M.S.; WU, C.R.; CHO, H.J.; LIN, K.Y.; LAI, G.H.; WANG, S.Y.; KUO, Y.H.; KUMAR, K.J.; YANG, HL. **The chalcone flavokawain B induces G2/M cell-cycle arrest and apoptosis in human oral carcinoma HSC-3 cells through the intracellular ROS**

generation and downregulation of the Akt/p38 MAPK signaling pathway. *J Agric Food Chem*, v. 7;60(9), p. 2385-2397, 2012.

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

HUNTER, A.M.; LACASSE, E.C.; KORNELUK, R.G. **The inhibitors of apoptosis (IAPs) as cancer targets.** *Apoptosis*, v. 12, n. 9, p. 1543-68, 2007.

INCA. **Estimativa 2018: 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, p.25, 42, 2018.

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

JAFFE, E.S.; HARRIS, N.L.; STEIN, H.; VARDIMAN, J.W. **World health organization classification of tumours: pathology and genetics of tumours of hematopoietic and lymphoid tissues.** Lyon, 2001.

JUNG, S.K.; LEE, M.H.; LIM, D.Y.; KIM, J.E.; SINGH, P.; LEE, S.Y.; JEONG, C.H.; LIM, T.G.; CHEN, H.; CHI, Y.I.; KUNDU, J.K.; LEE, N.H.; LEE, C.C.; CHO, Y.Y.; BODE, A.M.; LEE, K.W.; DONG, Z. **Isoliquiritigenin induces apoptosis and inhibits xenograft tumor growth of human lung cancer cells by targeting both wild type and L858R/T790M mutant EGFR.** *J Biol Chem*, v. 26;289(52), p. 35839-48, 2014.

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

KHAN, K.H.; BLANCO-CODESIDO, M.L.; MOLIFE, R. **Cancer therapeutics: Targeting the apoptotic pathway.** *Oncology Hematology*, v. 90, n. 3, p. 200–219, 2014.

KERR, J.F.; WYLLIE, A.H.; CURRIE, A.R. **Apoptosis: a basic biological phenomenon with wide-ranging implications in tissue kinetics.** *Br J Cancer*, v. 26, n. 4, p. 239-57, 1972.

KIM, Y.H.; SHIN, K.J.; LEE, T.G.; KIM, E.; LEE, M.S.; RYU, S.H.; SUH, P.G. **G2 arrest and apoptosis by 2-amino-N-quinoline-8-yl-benzenesulfonamide (QBS), a novel cytotoxic compound.** *Biochemical Pharmacology*, v. 69, n. 9, p. 1333-1341, 2004.

KOEFFLER, H. P.; GOLDE, D. W. **Human myeloid leukemia cell lines: a review.** *Blood*, v. 56, n. 3, p. 344-350, 1980.

KOFF, J.L.; RAMACHANDIRAN, S.; BERNAL-MIZRACHI, L. **A time to kill: targeting apoptosis in cancer.** *Int J Mol Sci*, v. 16, n. 2, p. 2942-55, 2015.

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

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

LAWRENCE, N.J.; PATTERSON, R.P., OOI, L.L.; COOK, D.; DUCKI, S. **Effects of alphasubstitutions on structure and biological activity of anticancer chalcones.** *Bioorganic & Medical chemical Letters*, n. 16, p. 5844-5848, 2006.

LI, L.T.; JIANG, G. **Ki67 is a promising molecular target in the diagnosis of cancer (Review).** *Molecular Medicine Reports*, v. 11, p. 1566-1572, 2015.

LIPINSKI, C.A.; LOMBARDO, F.; DOMINY, B.W.; FEENEY, P.J. **Experimental and computational approaches to estimate solubility and permeability in drug driscovey and development settings.** *Adv. Drug Delivery Rev*, v. 46, p. 03-26, 2001.

LIPINSKI, C.A. **Lead- and drug-like compounds: the rule-of-five revolution.** *Drug Discovery Today: Technol*, v. 1, p. 337-341, 2004.

LO, J.; MCNAUGHTAN, J.; RANI, V.; MARIC, D.; SMITH, A.; MCCULLOUGH, M.; CHANDU, A. **An Immunohistochemical Analysis of Cell Cycle Markers in Oral Mucosal Dysplastic Lesions**

Treated by Laser Therapy. A Pilot Study. Journal of Maxillofacial and Oral Surgery, v. 10, n. 3, 2011.

LOCATELLI, C.; ROSSO, R.; SANTOS-SILVA, M.C.; LICÍNIO, M.A.; LEAL, P.C.; BAZZO, M.L.; YUNES, R.A.; CRECZYNSKI-PASA, T.B. **Ester derivatives of gallic acid with potential toxicity toward L1210 leukemia cells.** Bioorg. Med. Chem. v. 16, p. 3791-3799, 2008.

LODISH, H.; BERK, A.; ZIPURSKY, S.L.; MATSUDAIRA, P.; BALTIMORE, D.; DARNELL, J.E. **Molecular Cell Biology**, p. 1184, 2000.

LOZZIO, C.B.; LOZZIO, B.B. **Human chronic myelogenous leukemia cell-line with positive Philadelphia chromosome.** Blood, v. 45, n. 3, p. 321-334, 1975.

MACHADO, K.E.; OLIVEIRA, K.N.; SANTOS-BUBNIAK, L.; LICÍNIO, M.A.; NUNES, R.J.; SANTOS-SILVA, M.C. **Evaluation of apoptotic effect of cyclic imide derivatives on murine B16F10 melanoma cells.** Bioorg Med Chem, v. 1;19 (21), p. 6285-91, 2011.

MACHADO, K.E.; DE OLIVEIRA, K.N.; ANDREOSI, H.M.; BUBNIAK, L. DOS S.; DE MORAES, A.C.; GASPAR, P.C.; ANDRADE, EDA S.; NUNES, R.J.; SANTOS-SILVA, M.C. **Apoptotic events induced by maleimides on human acute leukemia cell lines.** Chem Res Toxicol, v. 16;26(12), p. 1904-16, 2013.

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(4), p. 866-74, 2013.

MAIORAL, M.F.; DE MORAESA, A.C.R.; SGAMBATTI, K.R.; MASCARELLO, A.; CHIARADIA, 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.** Anti-Cancer Drugs, v. 27, p. 738-747, 2016.

MAIORAL, M.F.; BODACK, C.D.N.; STEFANES, N.M.; BIGOLIN, Á.; 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*, v. 140, p. 48-57, 2017.

MASCARELLO A.; CHIARADIA L.D.; VERNAL J.; VILLARINO A.; GUIDO R.V.; PERIZZOLO P.; POIRIER V.; WONG D.; MARTINS P.G.; NUNES R.J.; YUNES R.A.; ANDRICOPULO A.D.; AV-GAY Y.; TERENZI H. **Inhibition of Mycobacterium tuberculosis tyrosine phosphatase PtpA by synthetic chalcones: kinetics, molecular modeling, toxicity and effect on growth.** *Bioorg Med Chem*, v. 1;18(11), p. 3783-9, 2010.

MAUDE, S.L.; TEACHEY, D.T.; PORTER, D.L.; GRUPP, S.A. **CD19-targeted chimeric antigen receptor T-cell therapy for acute lymphoblastic leukemia.** *Blood*, v. 125, n. 26, p.4017-4023, 2015.

MEHLEN, P.; BREDESEN, D.E. **Dependence Receptors: From Basic Research to Drug Development.** *Sci Signal*, vol 4(157), 2011.doi: 10.1126/scisignal.2001521

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

MOCAN, T. **Hemolysis as expression of nanoparticles-induced cytotoxicity in red blood cells.** *Biotechnology, molecular biology and nanomedicine*, v. 1, n. 1, p. 6, 2010.

MOHREN, M.; MARKMAN, I.; JENTSCH-ULRICH, K.; KOENIGSMANN, M.; LUTZE, G.; FRANKE, A. **Increased risk of venous thromboembolism in patients with acute leukaemia.** *British J. Cancer*, v. 94(2), p. 200-202, 2006.

MOHREN, M.; MARKMAN, I.; JENTSCH-ULRICH, K.; KOENIGSMANN, M.; KROPF, S.; SCHALK, E. **High coagulation factor VIII and von Willebrand factor in patients with lymphoma and leukaemia.** *Int. J. Hematol*, v. 103(2), p. 189-195, 2016.

MOSMANN, T. **Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: application to proliferation and cytotoxicity assays.** J. Immunolog. Methods, v. 65(12), p. 55-63, 1983.

MOORMAN, A.V. **New and emerging prognostic and predictive genetic biomarkers in B-cell precursor acute lymphoblastic leukemia.** Haematologica, v. 101, n. 4, p.407-416, 2016.

NAGATA, S. **Apoptosis by Death Factor: Review.** Cell, v. 88, p. 355-365, 1997.

NATIONAL CANCER INSTITUTE. **What Is Cancer? About Cancer, S.I., 2015.** Disponível em: < <http://www.cancer.gov/about-cancer/what-is-cancer> >. Acesso em: 23 fev. 2017.

OLIVEIRA, M.E.I.M. **Avaliação do efeito citotóxico de piranonaftoquinonas inibidoras de DNA topoisomerasas sobre células de leucemia.** Dissertação (Mestrado em Biologia Celular e Molecular) - Fundação Oswaldo Cruz, Instituto Oswaldo Cruz, Rio de Janeiro, RJ, 2015.

OTTO, T.; SICINSKI, P. **Cell cycle proteins as promising targets in cancer therapy.** Nat Rev Cancer, v. 17(2), p. 93-115, 2017.

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

PLATI, J.; BUCUR, O.; KHOSRAVI-FAR, R. **Apoptotic cell signaling in cancer progression and therapy.** Integr Biol (Camb), v. 3, p. 279-96, 2011.

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.** N Engl J Med, v.354, n.2, p.166-178, Jan. 2006.

QUINTIN, J.; DESRIVOT, J.; THORET, S.; Le MENEZ, P.; CRESTEIL, T.; LEWIN, G. **Synthesis and biological evaluation of a series of tangeretinderived chalcones.** Bioorganic & Medicinal Chemistry, v. 19, 167-169, 2009.

RAO, Y.K.; FANG, S.H.; TZENG, Y.M. **Differential effects of synthesized 2'-oxygenated chalcone derivatives: modulation of human cell cycle phase distribution.** Bioorg Med Chem, v. 5;12(10), p. 2679-2686, 2004.

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

REED, C.J. **Apoptosis and cancer: strategies for integrating programmed cell death.** Semin Hematol, v.37, n.4 Suppl 7, Out, p.9-16. 2000.

RENVOIZE, C.; BIOLA, A.; PALLARDY, M.; BRÉARD, J. **Apoptosis: identification of dying cells.** Cell Biol Toxicol, v. 14, n. 2, p. 111-20, 1998.

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

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

RUMJANEK, V. M.; TRINDADE, G. S.; WAGNER-SOUZA, K.; OLIVEIRA, M. C.; MARQUES-SANTOS, L. F.; MAIA, R. C.; CAPELLA, M. A. **Multidrug resistance in tumour cells: characterization of the multidrug resistant cell line K562-Lucena 1.** Anais da Academia Brasileira de Ciências, v. 73, p. 57-69, 2001.

RUVOLO, P.P.; DENG, X.; MAY, W.S. **Phosphorylation of bcl-2 and regulation of apoptosis.** Leukemia, v.15, n.4, p.515-522, 2001.

SALUM, L.B.; ALTEI, W.F.; CHIARADIA, L.D.; CORDEIRO, M.N.; CANEVAROLO, R.R.; MELO, C.P.; 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.; VOGT, A. **Cytotoxic 3,4,5-trimethoxychalcones as mitotic arresters and cell migration inhibitors**. *European Journal of Medicinal Chemistry*, v. 63, p. 501-510, 2013.

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

SCARFO, L; GHIA, P. **Reprogramming cell death: Bcl-2 family inhibition in hematological malignancies**. *Immunology Letters*, v 155, 36-39, 2013.

SCHNEIDER, U.; SCHWENK, H.-U.; BORNKAMM, G. **Characterization of EBV-genome negative "null" and "T" cell lines derived from children with acute lymphoblastic leukemia and leukemic transformed non-Hodgkin lymphoma**. *International Journal of Cancer*, v. 19, n. 5, p. 621-626, 1977.

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

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

SHEN, K.H.; CHANG, J.K.; HSU, Y.L.; KUO, P.L. **Chalcone arrests cell cycle progression and induces apoptosis through induction of mitochondrial pathway and inhibition of nuclear factor kappa B signalling in human bladder cancer cells**. *Basic Clin Pharmacol Toxicol*, v. 101(4), p. 254-261, 2007.

SLOAND, E.M.; KIM, S.; FUHRER, M.; RISITANO, A.M.; NAKAMURA, R.; MACIEJEWSKI, J.P.; BARRETT, A.J.; YOUNG, N.S. **Fas-mediated apoptosis is important in regulating cell**

replication and death in trisomy 8 hematopoietic cells but not in cells with other cytogenetic abnormalities. *Blood*, v. 100 (13), 2002.

SOUSA-BATISTA, A.J.; ESCRIVANI-OLIVEIRA, D.; FALCÃO, C.A.B.; PHILIPPON, C.I.M.D.S.; ROSSI-BERGMANN, B. **Broad spectrum and safety of oral treatment with a promising nitrosylated chalcone in murine leishmaniasis.** *Antimicrob Agents Chemother*, 2018.

SRINIVASAN, B.; JOHNSON, T.E.; LAD, R.; XING, C. **Structure-activity relationship studies of chalcone leading to 3-hydroxy-4,3',4',5'-tetramethoxychalcone and its analogues as potent nuclear factor kappaB inhibitors and their anticancer activities.** *J Med Chem*, v. 26;52(22), p. 7228-35, 2009.

STAVROVSKAYA, A.A. **Cellular mechanisms of multidrug resistance of tumor cells.** *Biochemistry (Mosc)*, v. 65(1), p. 95-106, 2000.

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

SWART, C., DU TOIT, A., LOOS, B. **Autophagy and the invisible line between life and death.** *European Journal of Cell Biology*, v. 95(12), p. 598-610, 2016.

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

SWERDLOW, S.H.; CAMPO, E.; PILERI, S.A.; HARRIS, N.L.; STEIN, H.; SIEBERT, R.; 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.

SZYMANSKA, B.; WILCZYNSKA-KALAK, U.; KANG, M.H.; LIEM, N.L.M.; BOEHM, H.C.I.; GROEPPER, D.; LOCK, R.B. **Pharmacokinetic Modeling of an Induction Regimen for In Vivo**

Combined Testing of Novel Drugs against Pediatric Acute Lymphoblastic Leukemia Xenografts. Plos One, v. 7, n. 3, 2012.

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

TENG, Y.; WANG, L.; LIU, H.; YUAN, Y.; ZHANG, Q.; WU, M.; WANG, L.; WANG, H.; LIU, Z.; YU, P. **3'-Geranyl-mono-substituted chalcone Xanthoangelol induces apoptosis in human leukemia K562 cells via activation of mitochondrial pathway.** Chem Biol Interact, v. 261, p. 103-107, 2016.

TRIPLETT, D.A.; HARMS, C.S.; KOEPKE, J.A. **The effect of heparin on the activated partial thromboplastin time.** Am J Clin Pathol, v. 70, n. 3, suppl. 3, p. 556-559, 1978.

TSURUO, T.; NAITO, M.; TOMIDA, A.; FUJITA, N.; MASHIMA, T.; SAKAMOTO, H.; HAGA, N. **Molecular targeting therapy of cancer: drug resistance, apoptosis and survival signal.** Cancer Sci, v. 94, Issue, p. 15-21, 2003.

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.** Chem Biol Interact, v. 184, n. 1-2, p. 16-20, 2010.

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

VITOROVIĆ-TODOROVIĆ, M.D.; ERIĆ-NIKOLIĆ, A.; KOLUNDŽIJA, B.; HAMEL, E.; RISTIĆ, S.; JURANIĆ, I.O.; DRAKULIĆ, B.J. **(E)-4-aryl-4-oxo-2-butenic acid amides, chalcone-aroylacrylic acid chimeras: design, antiproliferative activity and inhibition of tubulin polymerization.** Eur J Med Chem, v. 62, p. 40-50, 2013.

WANG, G.; PENG, F.; CAO, D.; YANG, Z.; HAN, X.; LIU, J.; WU, W.; HE, L.; MA, L.; CHEN, J.; SANG, Y.; XIANG, M.; PENG, A.; WEI, Y.; CHEN, L. **Design, synthesis and biological evaluation of millepachine derivatives as a new class of tubulin polymerization inhibitors.** Bioorg Med Chem, v. 1;21(21), p. 6844-54, 2013.

WANG, J.J.; LIU, K.S.; SUNG, K.C.; TSAI, C.Y.; FANG, J.Y. **Lipid nanoparticles with different oil/fatty ester ratios as carriers of buprenorphine and its prodrugs for injection.** *Eur J Pharm Sci*, v. 38, n. 2, p. 138-46, 2009.

WANG, M.; WANG, L. R. **Research Progress of Ki-67 in Acute Myeloid Leukemia-Review.** *Zhongguo Shi Yan Xue Ye Xue Za Zhi*, v. 24(4), p. 1264-8, 2016.

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

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

WINTER, E.; CHIARADIA, L.D.; SILVA, A.H.; NUNES, R.J.; YUNES, R.A.; CRECZYNSKI-PASA, T.B. **Involvement of extrinsic and intrinsic apoptotic pathways together with endoplasmic reticulum stress in cell death induced by naphthylchalcones in a leukemic cell line: Advantages of multi-target action.** *Toxicology in Vitro*, v. 28, Issue 5, p. 769-777, 2014.

YONG, W.K.; ABD MALEK, S.N. **Xanthohumol induces growth inhibition and apoptosis in ca ski human cervical cancer cells.** *Evid Based Complement Alternat Med*. 2015:921306, 2015.

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

ANEXOS

Anexo 1 - 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)3721-9090 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:

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