

**UNIVERSIDADE FEDERAL DE SANTA CATARINA
CENTRO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM FARMACOLOGIA**

Gecioni Loch Neckel

**ATIVIDADE ANTINEOPLÁSICA *IN VITRO* E *IN VIVO* DA
CHALCONA N9 E SEU POSSÍVEL MECANISMO DE AÇÃO**

**Florianópolis
2011**

Gecioni Loch Neckel

**ATIVIDADE ANTINEOPLÁSICA *IN VITRO* E *IN VIVO* DA
CHALCONA N9 E SEU POSSÍVEL MECANISMO DE AÇÃO**

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Farmacologia, Centro de Ciências Biológicas, Universidade Federal de Santa Catarina, em cumprimento ao requisito parcial para a obtenção do título de Doutora em Farmacologia.

Orientador: Dr. João Batista Calixto

Co-orientador: Dr. Jarbas Mota Siqueira Junior

**Florianópolis
2011**

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

N365a Neckel, Gecioni Loch
Atividade antineoplásica in vitro e in vivo da chalcona
n⁹ e seu possível mecanismo de ação [tese] / Gecioni Loch
Neckel ; orientador, João Batista Calixto. - Florianópolis,
SC, 2011.

145 p.: il., grafs., tabs.

Tese (doutorado) - Universidade Federal de Santa Catarina,
Centro de Ciências Biológicas. Programa de Pós-Graduação em
Farmacologia.

Inclui referências

1. Farmacologia. 2. Chalconas. 3. Ciclo celular. 4.
Apoptose. 5. Câncer. 6. Agentes antineoplásicos. I. Calixto,
João Batista. II. Universidade Federal de Santa Catarina.
Programa de Pós-Graduação em Farmacologia. III. Título.

CDU 615

*Ao César,
por acreditar sempre.*

Agradeço

Ao meu orientador, Dr. João Batista Calixto, pela confiança e generosidade ao me aceitar como orientanda sem nenhum conhecimento prévio, me dando a oportunidade de uma formação científica de qualidade incomparável.

Ao meu Tutor Co-orientador Dr. Jarbas Siqueira, pela colaboração e orientação em todas as etapas deste trabalho, pelas lições de otimismo, e também pela amizade.

Ao Dr. Rosendo Yunes, especialmente ao Dr. Paulo César Leal e à doutoranda Alessandra Mascarello, pela síntese e fornecimento do composto testado neste trabalho.

Ao Dr. Marcio Alvarez, pela doação das células de glioma humano.

A Tânia Mazzuco e Janice Koepp, pelo apoio, incentivo e confiança na preparação do projeto de seleção de doutorado. E pela amizade.

Aos colegas do LAFEX, atuais ou egressos: Alexandre, Allisson, Andrey, Ana Flávia, Carlos Eduardo, Cláudia, Dani Balz, Dani Leite, Denise, Diogo, Edinéia, Emerson, Fabiana, Fernanda, Flávia, Gisele, Israel, Juliana Chaves, Kathryn, Maíra Cola, Marianne, Patrícia, Rafael, Rafaela, Raquel, Ricardo, Rodrigo Marcon e Stefânia, pela amizade e pelo crescimento pessoal e profissional.

A Lizi Patrício e Nati Domingos, pela colaboração em etapas tão diferentes do doutorado, pelo companherismo e amizade.

A Ju Fabris e Robson pela contribuição em experimentos ou considerações em partes da Tese e, sobretudo, pelos bons momentos e pela amizade.

A Maíra Bicca pelo auxílio nos experimentos e em partes da Tese. Agradeço também a esta amiga dedicada e grande companheira pelos bons momentos compartilhados.

A Dra. Elenara Lemos, por ter me guiado nos primeiros passos da pesquisa científica.

As minhas amigas: Sandra, Françoise, Márcia, Taty e Kiki, pela força, amizade e por deixarem minha vida mais alegre.

Aos meus pais, Geni e Vitalino, pela educação e valores que proporcionaram a formação do meu caráter, por me mostrarem que através da determinação e do esforço é que se alcançam os objetivos.

Aos meus irmãos, Marta e Zé, por vibrarem comigo em cada conquista.

Aos amigos Flávio, Vera, Suely e Luís pelo incentivo e amizade.

A Valentina, Pietra e Lavínia pelas alegrias proporcionadas.

Ao César, pelo amor, amizade, companheirismo, incentivo e apoio, incondicionais em todos os momentos.

Ao Prof. Dr. José Eduardo, pela generosidade e pela disponibilização do 'sistema' e da sala para os blots.

Ao Pedro, Juliana, Aline e Adriane pelo suporte técnico fundamental no dia a dia.

A todos os demais professores, funcionários e colegas do Departamento de Farmacologia.

A Universidade Federal de Santa Catarina, por ter proporcionado minha formação desde a Graduação. Sou muita grata a esta instituição pública, sem a qual não poderia ter chegado tão longe.

Ao CNPq, Capes e Fapesc, pelo apoio financeiro.

Do reino da indiferença
Nada sei
Também não visto
A roupa das diferenças

Na proximidade, sim,
encontro chão,
Retiro pão,
sol da manhã partilho,
na ceia
da iniciação

Lindolf Bell

RESUMO

Loch-Neckel, Gecioni. **Atividade antineoplásica *in vitro* e *in vivo* da Chalcona N9 e seu possível mecanismo de ação.** Florianópolis, 2011, 145p. Tese (Doutorado em Farmacologia) – Programa de Pós-Graduação em Farmacologia, Universidade Federal de Santa Catarina.

As chalconas (1,3-diaril-2-propen-1-onas), formam o núcleo de uma ampla variedade de compostos biológicos obtidos de vegetais, que têm despontado como potenciais agentes antitumorais. Neste contexto, este trabalho teve como objetivo principal avaliar os efeitos antineoplásicos *in vitro* e *in vivo* do composto Chalcona N9, obtido sinteticamente. A Chalcona N9 demonstrou ser citotóxica nas linhagens celulares de carcinoma de pulmão humano A549, melanoma de camundongos B16-F10, glioma de rato C6, carcinoma de próstata humano DU 145, carcinoma de mama humano MCF-7 e glioblastoma humano U-87 MG e com citotoxicidade menor sobre a linhagem imortalizada de fibroblastos L929. Nos ensaios de citometria de fluxo para avaliação do ciclo celular foi demonstrado que a Chalcona N9 induziu o acúmulo de células U-87 MG na transição das fases G1-S. Ensaios por *Western blotting* demonstraram que a Chalcona N9 foi capaz de interferir na expressão de proteínas que participam do ciclo celular, reduzindo a expressão das ciclinas A, D1 e E, e quinases dependentes de ciclina CDK 2 e 6 nas células de glioma humano U-87 MG. Os ensaios de incorporação de Anexina V-FITC demonstraram que as duas concentrações utilizadas da Chalcona N9 induziram a morte por apoptose nas células U-87 MG ao final de 24 horas, e aumento no número de células apoptóticas ao final de 48 horas de tratamento com a Chalcona N9. A morte por apoptose foi também confirmada pelo ensaio de TUNEL. Através da utilização da sonda fluorescente JC-1, foi possível verificar que a Chalcona N9 alterou o potencial de membrana mitocondrial, num período de 2 até 24 horas, sugerindo um efeito sustentado sobre a permeabilidade mitocondrial. Alterações morfológicas da U-87 MG, como células arredondadas e fragmentação no núcleo, puderam ser visualizadas quando observadas por microscopia de fluorescência após o período de 24 horas de incubação com a Chalcona N9 na maior concentração utilizada. O tratamento com a Chalcona N9 reduziu significativamente o número de colônias das células U-87 MG, após 24 horas de incubação. O número de clones das células de glioblastoma multiforme após 48 horas de tratamento, foi significativamente reduzido, comparado com os clones das células do grupo controle. Nos modelos de tumor ascítico de Ehrlich em camundongos BALB/c, modelo de melanoma B16-F10 em camundongos C57Bl/6 e glioblastoma multiforme humano em camundongos *nude*, inoculados com as células U-87 MG, a Chalcona N9 foi capaz de reduzir a progressão tumoral. Em resumo, podemos concluir que a Chalcona N9 promove um atraso no ciclo celular, especialmente na fase de transição G1/S, além de promover o desencadeamento do processo apoptótico. O tratamento com a Chalcona N9 também altera o potencial de membrana mitocondrial e diminui o potencial proliferativo das células U-87 MG. Nossos resultados sugerem que a Chalcona N9 apresenta potencial atividade antitumoral sugerindo potenciais perspectivas com este composto em terapias contra o câncer.

Palavras chaves: chalcona, ciclo celular, apoptose, câncer, atividade antitumoral *in vitro* e *in vivo*.

ABSTRACT

The chalcones (1,3-diaryl-2-propen-1-ones), a group of aromatic enones, form the core of a wide variety of organic compounds obtained from plants, and in the past 15 years those compounds have emerged as potential antitumor agents. This study aimed at evaluating the *in vitro* and *in vivo* antineoplastic effects of the compound Chalcone N9, which was synthetically obtained. The Chalcone N9 was shown to be cytotoxic in cell lines of human lung carcinoma A549, mouse melanoma B16-F10, rat glioma C6, human prostate carcinoma DU 145, human breast carcinoma MCF-7 and human glioblastoma U-87 MG and with lower cytotoxicity in immortalized fibroblast line L929. In tests of flow cytometry used to assess the cell cycle of U-87 MG cells, it was demonstrated that Chalcone N9 induced accumulation of cells in transition from G1-S phase. Western blotting assays showed that Chalcone N9 was able to influence the expression of proteins involved in the cell cycle, reducing the expression of cyclins A, D1 and E and the cyclin dependent kinases CDK 2 and 6. The annexin V-Fitc assay, which detects the incorporation of annexin, demonstrated that both concentrations of Chalcone N9 induced apoptosis in U-87 MG cell after 24 hours and increased the number of apoptotic cells after 48 hours of incubation with Chalcone N9. Death by apoptosis was also confirmed by TUNEL assay. By using the fluorescent probe JC-1, we observed that Chalcone N9 altered the mitochondrial membrane potential in a period of 2 to 24 hours, suggesting a sustained effect on mitochondrial permeability. Morphological changes of U-87 MG as round cells and fragmentation in the nucleus could be visualized when observed by fluorescence microscopy after 24 hours incubation with Chalcone N9 at the highest concentration used. Treatment with Chalcone N9 significantly reduced the number of colonies of cells U-87 MG, 24 hours after incubation. The number of clones of cells of glioblastoma multiforme after 48 hours of treatment was significantly reduced compared with clones of cells of the control group. In the models of Ehrlich ascites tumor in BALB/c mice, melanoma B16-F10 in C57BL/6 mice and human glioblastoma multiforme in nude mice inoculated with U-87 MG cells, Chalcone N9 was able to reduce tumor progression. In summary, we conclude that the Chalcone N9 promotes a delay in cell cycle, especially during the transition G1 / S, besides promoting the activation of the apoptotic process. Treatment with Chalcone N9 also changes the mitochondrial membrane potential and decreases the proliferative potential of U-87 MG cells. Our results suggest that Chalcone N9 has a potential antitumor activity suggesting potential prospects with this compound in cancer therapies.

Key words: chalcone, cell cycle, apoptosis, cancer, antitumoral activity *in vitro* and *in vivo*.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Fases do Ciclo Celular e da Mitose.....	14
Figura 2. Variação nos níveis de expressão das ciclinas durante o curso do ciclo celular e representação esquemática dos complexos proteicos Ciclina/CDK e o ciclo celular.....	15
Figura 3. Estrutura química de inibidores de CDKs que estão em fase de testes clínicos.....	19
Figura 4. Esquema representativo das duas vias de morte celular, necrose e apoptose.....	22
Figura 5. Representação simplificada das vias de ativação da apoptose: via intrínseca e via extrínseca.....	26
Figura 6. Relação entre as estruturas das chalconas e o efeito sobre o ciclo celular.....	31
Figura 7. Estrutura química da quinoxalina.....	33
Figura 8. Estrutura química da ((E)-1-(2,5-dimetoxifenil)-3-(quinoxalina-6-il)prop-2-an-1-ona) (Chalcona N9).....	37
Figura 9. Gráfico de pontos obtido em citometria de fluxo após indução de apoptose e marcação das células com Anexina V-FITC e Iodeto de Propídeo.....	42
Figura 10. Efeito da Chalcona N9 sobre a viabilidade de diferentes linhagens celulares.....	52
Figura 11. Efeito da Chalcona N9 e alguns agentes antitumorais sobre a viabilidade celular do glioblastoma humano U-87 MG.....	54
Figura 12. Avaliação do ciclo celular das células U-87 MG, por citometria de fluxo após tratamento com a Chalcona N9 por 24 e 48 horas.....	57

Figura 13. Efeito da Chalcona N9 sobre a expressão de proteínas do ciclo celular nas células U-87 MG, tratadas com a Chalcona N9 por 24 horas.....	59
Figura 14. Avaliação da morte celular através da marcação com Anexina V-FITC e IP em citometria de fluxo na linhagem U-87 MG após 24 e 48 horas de tratamento com a Chalcona N9.....	61
Figura 15. Avaliação da morte celular pelo ensaio de TUNEL nas células U-87 MG tratadas com a Chalcona N9 por 24 horas e 48.....	63
Figura 16. Análise citomorfológica qualitativa de células U-87 MG apoptóticas após tratamento com a Chalcona N9 por 24 horas.....	64
Figura 17. Estimativa do potencial de membrana mitocondrial das células U-87 MG, tratadas por 2 horas e 24 horas.....	66
Figura 18. Efeito da concentração e do tempo de tratamento da Chalcona N9 sobre a proliferação e capacidade de formação de colônias das células U-87 MG.....	68
Figura 19. Efeito da Chalcona N9 sobre o crescimento do tumor ascítico de Ehrlich.....	70
Figura 20. Efeito da Chalcona N9 sobre o crescimento tumoral <i>in vivo</i> de melanoma murino B16-F10.....	72
Figura 21. Efeito da Chalcona N9 sobre o crescimento tumoral xenográfico de glioblastoma humano U-87 MG.....	74
Figura 22. Possível mecanismo da Chalcona N9 sobre a linhagem de glioblastoma humano U-87 MG.....	93

LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Valores de CI_{50} e seus respectivos intervalos de confiança obtidos para a Chalcona N9, utilizada nos testes de viabilidade celular das linhagens A549, B16-F10, C6, DU 145, L929, MCF7 e U-87 MG.....53

Tabela 2. Valores de CI_{50} e seus respectivos intervalos de confiança obtidos para os antitumorais utilizados nos testes de viabilidade celular sobre a linhagem de glioblastoma multiforme U-87 MG.....55

LISTA DE ABREVIATURAS

A.C. – antes de cristo
ANOVA – Análise de variância
APAF-1 – Fator ativador de protease pró-apoptótica
ARF – proteína supressora de tumor
ASC – Área sob a curva
ATCC – American Type Culture Collection
ATM/ATR – proteínas quinases sensibilizadas no dano ao DNA
ATP – Adenosina trifosfato
BH – BCL-2 homology domains
CAK – Proteína quinase dependente de AMPc
CARD – Domínio de recrutamento e ativação de caspases
CDC25 – Subclasse de proteína fosfatase tirosina ativadora de CDK
CDK – Quinase dependente de ciclina
CHK – Proteína quinase do ponto de verificação
CI50 – Concentração inibitória
CpG – Proteína cromossomal que se liga por metilação no DNA
D.C. – depois de Cristo - Anno domini
DISC – Complexo indutor e sinalizador de morte
DMEM – Dulbecco's Modified Eagle Medium
DMSO - Dimetilsulfóxido
DNA – Ácido desoxiribonucleico
DNAPK – Proteína quinase dependente de DNA
E2F - Fator de transcrição dependente da fosforilação de RB
EDTA – Ácido etilenodiaminotetraacético
EGFR – Receptor do fator do crescimento epidermal
EPM – Erro padrão da média
EROs – Espécies reativas de oxigênio
ET-1 – Endotelina 1
FCCP – carbonil cianeto de p-trifluorometoxifenilhidrazona
FDA – Órgão governamental dos Estados Unidos que controla alimentos, cosméticos, alimentos e materiais biológicos para comercialização (Food and Drug Administration)
FITC – Isotiocianato de fluoresceína
GBM – Glioblastoma multiforme
HRP – horseradish peroxidase
i.p. - Intraperitoneal

i.v. – Intravenoso
INCA – Instituto Nacional do Câncer
IP – Iodeto de propídeo
JC-1 – tetracloro tetratilbenzimidazol iodeto de carbocianina
MTT - Brometo de 3-4,5-dimetiltiazol-2-il-2,5-difeniltetrazolil
PDGF – Fator de crescimento derivado de plaquetas
PMM – Potencial de membrana mitocondrial
Rb – Proteína retinoblastoma
PTEN – Gene da proteína supressora de tumor PTEN
RMN – Ressonância magnética nuclear
RNA – Ácido ribonucleico
s.c. - Subcutâneo
TNF – Fator de necrose tumoral
TNM – Classificação de tumores malignos
TP53 – Gene da proteína p53
v.o. – Via oral
VEGF - Fator de crescimento endotelial vascular
VPF - Fator de permeabilidade vascular
WHO – Organização Mundial de Saúde

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO.....	1
1.1. Aspectos Históricos.....	2
1.2. Câncer.....	5
1.2.1. Gliomas.....	9
1.3. Ciclo Celular.....	12
1.3.1. Ciclinas.....	13
1.3.2. Quinases Dependentes de Ciclinas.....	14
1.3.3. Pontos de Verificação.....	16
1.3.4. Inibidores de Quinases Dependentes de Ciclinas.....	17
1.4. Apoptose.....	19
1.4.1. Caspases.....	21
1.5. Chalconas.....	27
1.6. Quinoxalinas.....	32
2. OBJETIVOS.....	34
3. MATERIAIS e MÉTODOS.....	36
3.1. Obtenção do composto Chalcona N9.....	37
3.2. Cultura de células.....	38
3.3. Ensaio de citotoxicidade celular (MTT).....	38
3.4. Determinação da potência citotóxica da Chalcona N9.....	39
3.5. Avaliação do ciclo celular por citometria de fluxo.....	39
3.6. Avaliação da expressão de proteínas que participam da modulação do ciclo celular.....	40
3.6.1. Preparação dos extratos celulares.....	40
3.6.2. Western Blotting.....	41
3.7. Avaliação de Apoptose por citometria de fluxo através da incorporação de Anexina V-FITC e IP.....	41
3.8. Determinação de Apoptose através da detecção da fragmentação do DNA.....	42
3.9. Avaliação das características morfológicas de morte celular através de microscopia de fluorescência.....	43
3.10. Determinação do potencial de membrana mitocondrial ($\Delta\psi_m$).....	44
3.11. Ensaio de clonogenicidade.....	45
3.12. Ensaio Biológicos <i>in vivo</i>	45
3.12.1. Animais.....	45
3.12.2. Modelo de Tumor Ascítico de Ehrlich.....	46
3.12.3. Modelo de Melanoma Murino.....	46
3.12.4. Modelo Xenográfico de Glioblastoma Multiforme.....	47
3.13. Drogas e Reagentes.....	47
3.14. Análise estatística.....	48

4. RESULTADOS.....	50
4.1. Efeito citotóxico da Chalcona N9 em linhagens celulares.....	51
4.2. Determinação da potência citotóxica da N9.....	53
4.3. Atividade da N9 sobre a progressão do ciclo celular e indução de apoptose.....	55
4.3.1. Avaliação do ciclo celular por citometria de fluxo.....	55
4.3.2. Avaliação da expressão de proteínas que participam da modulação do ciclo celular.....	58
4.3.2. Avaliação de Apoptose por citometria de fluxo através da incorporação de Anexina V-FITC e IP.....	59
4.3.3. Determinação de Apoptose através da detecção da fragmentação do DNA.....	62
4.3.4. Avaliação das características morfológicas de morte celular através de microscopia de fluorescência.....	63
4.3.5. Determinação do potencial de membrana mitocondrial ($\Delta\psi_m$)....	64
4.4. Ensaio de clonogenicidade.....	66
4.5. Ensaios Biológicos <i>in vivo</i>	69
4.5.1. Efeito do tratamento com a Chalcona N9 sobre o modelo de tumor ascítico de Ehrlich.....	69
4.5.2. Efeito do tratamento com a Chalcona N9 sobre o modelo de melanoma murino B16-F10.....	71
4.5.3. Efeito do tratamento com a Chalcona N9 sobre o modelo xenográfico de glioblastoma multiforme.....	73
5. DISCUSSÃO.....	75
6. CONCLUSÕES.....	94
7. REFERÊNCIAS.....	97

1. INTRODUÇÃO

1.1 . Aspectos Históricos

O câncer parece nos acompanhar desde os primórdios da humanidade. As primeiras evidências para a ocorrência desta doença na antiguidade incluem inscrições, material arqueológico e espécimes paleopatológicas. Um dos mais remotos indícios de câncer, embora controverso, repousa sobre a ‘mandíbula de Kanam’, um fragmento de mandíbula atribuível ao *Homo erectus* do Kanan (Quênia), que é acompanhada de um crescimento patológico anormal. Inicialmente, esta lesão foi atribuída a um possível Linfoma de Burkitt ou a um sarcoma ossificante, embora, recentemente alguns pesquisadores tenham sugerido ser um calo ósseo associado a uma fratura cicatrizada. Se neste caso, que data de 1,5 milhões de anos atrás, for comprovado que se trata de um verdadeiro neoplasma, então é o primeiro caso desta doença no homem (TOBIAS, 1960; STATHOPOULOS, 1975).

Os casos de neoplasmas foram raros na pré-história e em populações humanas da antiguidade embora algumas destas doenças neoplásicas sejam bem documentadas (AUFDERIDE e RODRIGUEZ-MARTIN, 1988; CAPASSO e MARIANI-COSTANTINI, 1994; ORTNER, 2003). O fato é que, embora existentes, acredita-se que as doenças neoplásicas tenham sido raras por um longo tempo, como demonstrado pela escassez de achados em milhares de múmias humanas. Entretanto, os achados foram fortemente associados a condições ambientais desfavoráveis (como o carcinoma nasofaríngeo no antigo Egito, onde a infecção com o vírus Epstein-Barr foi comum), desnutrição e fome fortemente relacionadas aos casos de mieloma múltiplo, bem como às altas frequências de infecções crônicas, ou ainda, a maior prevalência destas doenças em populações mais civilizadas e com maior nível de agregação social, tal como na Civilização Egípcia e na Europa pós Medieval (CAPASSO, 2005). O mais antigo caso de câncer documentado encontra-se descrito no papiro traduzido por Edwin Smith e remonta a 3000 a.C. Neste Papiro, descoberto no Egito, encontram-se relatados oito casos de tumores ou úlceras de mama e o tratamento mencionado refere ser realizado com cauterização. Sobre a doença, o texto diz: “não há nenhum tratamento” (DIAMANDOPOULUS, 1996).

As evidências sugerem que os Gregos foram os primeiros a identificar o câncer como uma doença específica embora, tal como os Egípcios, não tenham distinguido tumores malignos de benignos. O

médico Grego Hipócrates de Cós (460-375 a.C.) e seus discípulos, acreditavam que o câncer era iniciado por causas naturais e argumentaram que o excesso ou falta de sangue, muco, bile ou outras secreções do corpo, principalmente na idade avançada, poderia induzir o câncer (HAJDU, 2010a).

Hipócrates usou o termo *carcinos* e *carcinoma* para descrever uma variedade de tumores e inchaços e que, de acordo com Galeno (130-200 d.C.), foi o aspecto semelhante ao caranguejo que deu origem ao nome da doença. Em grego, a palavra câncer (*carcinos*) se refere a caranguejo, relacionando esta doença com suas invasões de alguns tumores e que são similares às pernas deste crustáceo (DAVID e ZIMMERMAN, 2010). Aulus Celsus (28 a.C - 50 d.C.), um influente médico romano que tornou a língua latina a linguagem mãe da medicina, continuou a tradição Hipocrática e traduziu o termo grego para *câncer* (HAJDU, 2004).

Embora a aplicação esporádica de agentes químicos tenha sido introduzida por Egípcios e Gregos, Paracelsus (1493-1541), foi o pioneiro na utilização sistemática e terapêutica de produtos químicos para as doenças, inclusive o câncer. Próximo ao final do século XVII, estava estabelecido que o câncer iniciava como uma lesão local que cresce destruindo tecidos circundantes. Já no início do Século XVIII, dois importantes livros foram publicados. Em um deles, *De Morbis Artificum*, escrito pelo médico Italiano Bernadino Ramazzini (1633-1714) chama a atenção para as doenças ocupacionais e altas incidências de câncer de mama e a ausência de câncer de colo de útero em freiras. Na outra publicação, o médico Suíço Theophilus Boneti (1620-1689) em seu *Sepulchretum sive Anatomia Practica*, coletou mais de 2000 relatos de autópsias e registros clínicos de médicos e cirurgiões e adicionou seus dados a esta coleção. Entre o material com 2806 casos, 43 relatos contêm descrição de câncer de cérebro, pulmão, estômago, fígado, rins, útero, bexiga e próstata. Apesar das limitações destas publicações, estas instituíram o início da patologia tumoral e a oncologia clínica atual (HAJDU, 2010b).

A introdução de substâncias químicas como agentes terapêuticos foi extremamente lenta e está referida no livro de Récamier sobre o tratamento do câncer publicado em 1829. Em cerca de 1200 páginas, em dois volumes, estão listados poucos medicamentos: pasta de arsênico, nitrato de mercúrio, pasta de belladona, sabão mercurial e cloreto de alumínio. O interesse pela quimioterapia para o tratamento de

tumores aumentou durante a segunda metade do século XIX, como consequência da demonstração de que os microorganismos que causam doenças infecciosas poderiam ser eliminados. Louis Pasteur (1822–1895), Robert Koch (1843–1910), e Joseph Lister (1827–1912) foram pioneiros na patologia e microbiologia. Paul Ehrlich (1854–1915), discípulo de Koch, constatou que o composto arsênico *Salvarsan* era um agente efetivo contra a sífilis. Ele resumiu todas as observações, acerca dos efeitos químicos de várias substâncias sobre carcinomas e sarcomas em um livro de 247 páginas, que é conhecido por ser o primeiro livro sobre quimioterapia (EHRlich, 1909; HAJDU, 2005).

Até os anos de 1950, a cirurgia era a terapia predominante para o tratamento do câncer. Com o término da Primeira Guerra Mundial, as idéias acerca da quimioterapia, que foram iniciadas na Europa antes da guerra, começaram a ser difundidas nos Estados Unidos. Uma observação feita durante a Primeira Guerra Mundial que o envenenamento por gás mostarda provocava leucopenia levou à introdução em 1942, por Alfred Gilman e Louis Goodman, da mostarda nitrogenada como um promissor agente no tratamento de linfomas e leucemias (GOODMAN et al., 1946). Esse é o marco da quimioterapia moderna. Este caminho foi então seguido pelo uso de antagonistas de folatos, análogos de purinas e fármacos baseados em platina e taxol (DEEP e AGARWAL, 2008).

Em 1951, George e Martha Gey anunciaram uma nova era na pesquisa pré-clínica, ao relatarem que era possível cultivar continuamente, células humanas em laboratório. Eles haviam criado a linhagem HeLa em homenagem a Henrietta Lacks, a paciente da qual fora coletada a amostra de tecido de câncer de colo de útero para a biopsia. Passadas seis décadas, muitas questões permanecem não respondidas, mas ajudaram a compreender as diferenças que separam as células normais das tumorais (FINKEL, SERRANO, BLASCO, 2007).

Com a criação do acelerador linear, em 1960, a radioterapia se tornou uma ferramenta preciosa para o controle local e regional da doença, mas, do mesmo modo que a cirurgia, não se mostrou capaz de erradicar o câncer metastático (COLLINS, 2004). O tratamento efetivo para muitos pacientes necessitava alcançar cada órgão do corpo. Desta maneira, a combinação das diferentes modalidades reunindo a cirurgia de ressecção, a quimioterapia e a radioterapia, se mostrou como uma nova perspectiva para o tratamento no câncer (FROSINA, 2009).

Desde a elucidação dos mecanismos de divisão de células de mamíferos na década de 1970 e 1980, nos trabalhos de Lee Hartwell, Paul Nurse e Tim Hunt, os produtos dos genes (oncogenes) que regulam o ciclo celular têm sido investigados como alvos de novos antitumorais (BOYE e GRALLERT, 2001). Em 1990, com o início do projeto Genoma Humano, chefiado por James Watson e com a participação de centenas de laboratórios de todo o mundo, foram dados os primeiros passos fundamentais que levariam a sequência, um a um, dos genes que codificam as proteínas do corpo. Pouco mais de uma década depois foi anunciado que 99% do genoma humano estava sequenciado (HEILIG et al., 2003). Entre os achados, aproximadamente 300 genes foram encontrados mutados no câncer (*COSMIC*, catálogo de mutações somáticas no câncer, *Wellcome Trust Sanger Institute*), e muitos outros apresentavam alterações nos níveis de expressão.

O impacto de todas estas grandes descobertas tem levado a inúmeras frentes de batalha no combate ao câncer. Nos últimos anos, substâncias não citotóxicas como hormônios e moléculas e anticorpos que modulam novos alvos estão em fase de desenvolvimento. Embora a biologia celular e molecular tenham produzido um amplo número de alvos moleculares para a terapia, isto não tem sido acompanhado pelo aumento no número de moléculas correspondentes. O desafio seria determinar a combinação certa dos fármacos ou linhas de terapia para os diferentes tipos de câncer (DEEP e AGARWAL, 2008).

1.2 . Câncer

Apesar do grande avanço nas pesquisas científicas e da disponibilidade de novas terapias, o câncer ainda é a segunda causa de mortes no mundo ocidental. Segundo a Organização Mundial de Saúde, em 2007 ocorreram 7,9 milhões de mortes por câncer (13% do total de mortes registradas). Para 2030 está projetado um crescimento, com o número de mortes estimado em 12 milhões de pessoas (WHO, 2011).

No Brasil foram previstos 489.270 casos novos de câncer para 2010, números válidos também para 2011. À exceção do câncer de pele não-melanoma, os cânceres mais incidentes em homens serão os de próstata e de pulmão, e, em mulheres, os de mama e colo do útero. A estimativa para 2010 é de 52.350 novos casos de câncer de próstata entre os homens, enquanto que o de mama feminina registrará 49.240 novos casos. Os dados ainda apontam maior incidência de casos nas regiões Sul e Sudeste, sendo intermediário na região Centro-oeste e

menores incidências nas regiões Norte e Nordeste do Brasil (INCA, 2009).

O termo câncer é utilizado para designar mais de 100 doenças heterogêneas (incluindo tumores malignos) que, segundo Hanahan e Weinberg (2000), surgem a partir de mutações em genes essenciais ao funcionamento da célula, as quais, coletivamente, contribuem para o crescimento dos tumores malignos. Dentre essas alterações essenciais podem ser citadas: autosuficiência em relação aos sinais de crescimento; insensibilidade a sinais inibitórios de crescimento; evasão à morte celular programada (apoptose); potencial ilimitado de replicação; angiogênese sustentada, invasão tecidual e metástase. Embora esses sejam os seis marcadores clássicos do câncer, a característica fundamental na distinção entre um tumor benigno de um maligno é a capacidade de invadir outros tecidos e formar novos tumores, as metástases (LAZEBNIK, 2010).

Eventos celulares e moleculares múltiplos e interdependentes são responsáveis pela origem e progressão do câncer. Estes estágios responsáveis pela carcinogênese são qualificados como iniciação, promoção e progressão. A iniciação da carcinogênese envolve uma reação de um agente carcinógeno, físico, químico ou biológico, diretamente no DNA. Este evento pode ser facilitado quando houver suscetibilidade genética e/ou permanecer latente e tornar-se um risco para o desenvolvimento do câncer em uma fase tardia. A promoção da carcinogênese ocorre muito lentamente, por um período que compreende muitos meses ou anos e leva ao acúmulo de células pré-malignas em divisão. Durante este estágio, modificações na dieta e estilo de vida podem apresentar efeitos benéficos ao paciente, às vezes cruciais, no desenvolvimento do câncer (REDDY, ODHAV e BHOOLA, 2003).

O terceiro e último estágio envolve a progressão e expansão do câncer e a proliferação descontrolada e irreversível das células mutadas. Este estágio ocorre principalmente, devido a alterações nos mecanismos regulatórios que controlariam a multiplicação celular, inclusive perda na sensibilidade aos sinais inibitórios para a proliferação. Diferentemente, no interior de um tecido normal, múltiplos estímulos antiproliferativos operam com a finalidade de manter a célula em seu estado quiescente e também a homeostase do tecido. A proliferação pode ser impedida por dois mecanismos distintos: as células podem ser forçadas a permanecer em seu estado quiescente, podendo reiniciar o ciclo celular se houver

estímulo suficiente para tal ou podem ser induzidas a abandonar de maneira permanente seu potencial proliferativo, sendo conduzidas à estados pós-mitóticos, usualmente associados com aquisição de traços diferenciados específicos (WEINBERG, 1995).

As células normais requerem sinais de crescimento mitogênicos para que então possam iniciar a transição de um estado quiescente ao estado de proliferação ativa. Esta sinalização é transmitida no interior da célula por receptores transmembrana que ativam distintas classes de moléculas: fatores de crescimento que se difundem, componentes de matriz extracelular e moléculas de adesão. A aquisição de autonomia de sinais de crescimento foi a primeira das seis capacidades adquiridas pela célula tumoral a ser claramente definida pelos pesquisadores em câncer; em grande parte por causa da prevalência de oncogenes dominantes que têm sido encontrados, que participam desta modulação. Três estratégias moleculares comuns para adquirir autonomia são evidentes, envolvendo alterações em sinais de crescimento extracelulares, em transdutores transcelulares destes sinais, ou de circuitos intracelulares que traduzem estes sinais em ação (RAK et al., 1995).

Apesar de um eficiente sistema de reparo, danos ou alterações permanentes no genoma (mutações) podem ocorrer. Várias linhas de evidências indicam que a carcinogênese é um processo multifatorial onde cada evento é o resultado de alterações genéticas que conduzem à transformação progressiva de células normais em células malignas (HANAHAN e WEINBERG, 2000). Estas modificações incluem: pontos de mutação que causam substituições em aminoácidos; mutação por deleção ou inserção de nucleotídeos; desbalanço cromossomal ou instabilidade resultando em amplificação, expressão em níveis elevados ou expressão inapropriada de um gene particular; perda de um gene ou sua fusão com outro gene como resultado de ruptura cromossomal e rearranjo resultando em proteínas quiméricas com função alterada; modificações epigenéticas no DNA, dentre as quais a mais importante é a metilação de citosina em ilhas CpG (do inglês *cytosine phosphate guanine*), levando ao silenciamento de genes. Células tumorais apresentam mutações específicas que possuem duas funções básicas: mutações que aumentam a atividade das proteínas que elas codificam, denominadas oncogenes; ou mutações que inativam a função de genes classificados como supressores de tumor. Contudo, apenas o dano ao DNA isoladamente não é um evento mutagênico, mas somadas a replicação do DNA e subsequente divisão celular são os eventos

fundamentais para converter o dano em alteração e então transmitido às células filhas. Assim, a proliferação é um fator vital na formação de mutações e na expansão de clones de células portadoras de alterações genômicas. Devido aos múltiplos pontos de controle que existem para limitar a proliferação inapropriada, com poucas exceções, células malignas humanas precisam acumular múltiplas mutações (4 – 5 genes) para atingirem sua replicação autônoma e a invasão (BERTRAM, 2001).

Como em todas as estruturas do organismo, nos tecidos tumorais também são encontrados dois componentes básicos: o parênquima que é constituído por células que os estão originando e o estroma, composto por tecido conjuntivo e vasos sanguíneos, que constituem a estrutura de sustentação e o veículo da nutrição do parênquima. Tradicionalmente, a nomenclatura dos tumores é baseada na origem das células do parênquima. Desta maneira, os cânceres humanos de origem epitelial são denominados carcinomas, e representam 80% dos óbitos relacionados ao câncer no mundo ocidental. Os tumores que se originam a partir das camadas celulares epiteliais incluem os carcinomas do trato gastrointestinal, mucosas, pele, glândula mamária, pâncreas, pulmão, fígado, ovário, vesícula biliar e bexiga (COTRAN, KUMAR e COLLINS, 2000). Os carcinomas podem ainda serem classificados em duas categorias, reveladas pela função biológica do epitélio: os carcinomas de célula escamosa (tumores formados a partir de células epiteliais que selam cavidade ou canais) e os adenocarcinomas (tumores gerados a partir de epitélios de células especializadas). O restante dos tumores malignos se desenvolve a partir de tecidos não epiteliais ao longo do organismo. Os cânceres não epiteliais derivados de tecidos conjuntivos das diferentes células mesenquimais são denominados sarcomas e representam apenas 1% dos tumores. São exemplos de sarcomas: fibrossarcomas, lipossarcoma, osteossarcoma e rabdomiossarcoma (ORIMO e WEINBERG, 2006). Outro grupo de tumores não epiteliais se desenvolve a partir de células do sistema hematopoiético, incluindo as células do sistema imune. Como exemplos deste grupo estão os linfomas e as leucemias. O terceiro grande grupo de tumores não epiteliais se origina de células que formam o sistema nervoso central e periférico. Estão inseridos neste grupo os glioblastomas, os neuroblastomas, os schwannomas e os meduloblastomas. Alguns tumores não se encaixam em um dos quatro grandes grupos acima e são representados por dois tipos importantes de

tumores, os melanomas (derivados dos melanócitos) e os carcinomas de pequenas células de pulmão (WEINBERG, 2008).

Os principais recursos terapêuticos empregados para o tratamento do câncer variam de acordo com a classificação histopatológica e a localização anatômica, o chamado estadiamento. Este procedimento baseia-se na classificação dos cânceres por grupos, através do sistema TNM (do inglês *tumor, lymph nodes and metastasis*). Inicialmente desenvolvido por Pierre Denoix, entre 1943 e 1952, este sistema de estadiamento é utilizado para tumores sólidos, e classifica a progressão do tumor com base no tamanho e extensão do tumor primário (T), no envolvimento linfático (N) e a presença ou não de metástases (M). Na interpretação de cada fator são analisadas as diversas variações que, para o tumor primitivo, vão de T1 a T4, para o comprometimento linfático, de N0 a N3, e, para as metástases a distância, de M0 a M1. Através da uniformização dos critérios de classificação dos tumores é possível alcançar concordância nos registros dos casos de câncer, além de obter-se uma avaliação objetiva da extensão anatômica da doença, visando a precisão do prognóstico e consequentemente, do tratamento mais efetivo a ser realizado (BRASIL, 2004).

1.2.1. Gliomas

A classificação dos tumores cerebrais é realizada de acordo com a célula de origem do tumor, localização, característica histopatológica e marcadores de linhagem. O termo 'glioma' abrange um grupo heterogêneo de cânceres que são classificados em astrocitomas, oligodendrogliomas ou tumores com características morfológicas de oligodendrócitos e astrócitos, e assim chamados de oligoastrocitomas. De acordo com a Organização Mundial de Saúde (OMS), os astrocitomas podem ainda ser subdivididos, dependendo do grau de severidade: astrocitoma pilocítico (Grau I), astrocitoma difuso (Grau II), astrocitoma anaplásico (Grau III) ou glioblastoma multiforme (Grau IV) (KLEIHUES e CAVANEE, 2000). Os astrocitomas malignos, tal como outros tumores cerebrais, podem causar sinais e sintomas neurológicos focais ou generalizados. Os sintomas generalizados geralmente estão relacionados ao aumento da pressão intracranial, que pode incluir dor de cabeça, vômito e anormalidades visuais. As anormalidades focais tais como afasia, fraqueza ou tonturas podem refletir a localização do tumor

no sistema nervoso central (SATHORNSUMETEE, RICH e REARDON, 2007).

Os astrocitomas de alto grau representam os cânceres fatais e que apresentam enorme desafio terapêutico. Apesar da disponibilidade dos tratamentos atuais, a média de sobrevivência dos pacientes com glioblastoma multiforme (GBM) é de 9 a 12 meses, enquanto que a média do astrocitoma de Grau III (astrocitoma anaplásico) é de 2 a 3 anos (JAIN, 2006).

As características histopatológicas do glioblastoma multiforme (GBM) são definidas pela presença de mitoses, atipia nuclear e celular, proliferação microvascular e necrose (RICH e BIGNER, 2004). Com base na descrição clínica, os GBMs podem ainda ser subdivididos em primários ou secundários. Os GBM primários expressam a maioria dos casos de GBM em pacientes de idade mais avançada e se manifestam de maneira aguda, sem evidências de sintomas iniciais ou patologia de menor grau como precursora. Ao contrário, os GBM secundários são raros e tendem a ocorrer em pacientes abaixo de 45 anos e desenvolvem-se lentamente através da progressão a partir de astrocitoma difuso de baixo grau (Grau II) ou astrocitoma anaplásico (Grau III). Não obstante, a separação de GBM primário e secundário permanece conceitual, sem utilização no diagnóstico, uma vez que esses subtipos são considerados histopatologicamente indistinguíveis (OHGAKI e KLEIHUES, 2007).

Entretanto, alterações genéticas comuns que mantêm o fenótipo maligno, frequentemente são encontradas. O GBM é um tumor caracterizado histologicamente por intensa angiogênese e parece ser influenciado pelo aumento da expressão de PDGF (do inglês *platelet-derived growth factor*) e VEGF (do inglês *vascular endothelial growth factor*) e seus receptores e da expressão de VPF (do inglês *vascular permeability factor*) e de endotelina 1 (ET-1). A amplificação do gene EGFR (do inglês *epidermal growth factor receptor*) ocorre em 40% a 50% dos GBM primários, mas raramente é encontrada nos GBM secundários (LOUIS, 2006).

A proteína TP53 (do inglês *tumor protein 53*) é um fator de transcrição nuclear que regula várias funções no reparo e síntese de DNA, na regulação do ciclo celular e na senescência e morte celular. A supressão e/ou mutação do gene TP53 são observadas em aproximadamente 45% dos casos de astrocitomas difusos de todos os graus, e 65% nos tumores astrocíticos de alto grau, o que sugere que a

inativação do TP53 é um evento inicial e importante na formação dos astrocitomas e que contribui para a evolução dos astrocitomas Grau II ou III, para GBM. A mutação de TP53 ou a perda está frequentemente associada em gliomas de crianças, gliomas de baixo grau ou GBM secundário (NUPPONEN e JOENSUU, 2006).

O gene PTEN (do inglês *phosphatase and tensin homolog*) é um gene supressor de tumor que em muitos tipos de câncer humano, não é expresso. Sua função é atribuída ao controle do ciclo celular e sua perda implica em proliferação descontrolada, crescimento invasivo e intensa angiogênese. A principal função da proteína PTEN é inibir a sinalização fosfatidilinositol-3-quinase (PI3K)-AKT, que também é regulada via TP53. Em geral, pacientes diagnosticados com alterações em PTEN tem mau prognóstico (LIAN e CRISTOFANO, 2005).

Após o diagnóstico histológico de astrocitoma maligno, os pacientes geralmente são submetidos a tratamentos combinados, tais como ressecção cirúrgica, radiação e quimioterapia. Embora os astrocitomas malignos sejam altamente invasivos com rápido crescimento infiltrativo, quase nunca ultrapassam áreas além do sistema nervoso central. Estes tumores não possuem bordas demarcadas e conseqüentemente, podem nunca ser completamente excisados cirurgicamente (SATHORNSUMETEE, RICH e REARDON, 2007). Entretanto, a cirurgia é a primeira intervenção a que todos os pacientes são submetidos, pois através desta são obtidos o diagnóstico patológico definitivo e a remoção do tumor, tanto quanto possa ser segura. Após a cirurgia, a radioterapia é indicada para controlar o tecido tumoral residual, estender a sobrevida e melhorar os sintomas. As opções terapêuticas para estes pacientes são muito limitadas. Alguns agentes quimioterápicos que são utilizados para gliomas recorrentes incluem nitrosouréias, procarbazona, etoposídeo, irinotecano e análogos de platina, mas as respostas são fracas e geralmente transitórias (MASON, 2008).

A temozolomida é o fármaco mais utilizado e uma das poucas substâncias aprovadas para a conduta terapêutica de tumores cerebrais. Este fármaco está disponível oralmente e apresenta boa passagem através da barreira hematoencefálica. É um agente alquilante que se liga covalentemente ao DNA e é similar estruturalmente a dacarbazina, mas converte espontaneamente em seu metabólito ativo MTIC (monometil-triaceno-imidazol-carboxamida) no pH fisiológico em todos os tecidos para o qual se distribui. Embora a combinação de temozolomida com

radioterapia, prolongue significativamente a sobrevida dos pacientes com GBM, o grau do benefício ainda é modesto (NICHOLAS, 2007). Um segundo agente, Gliadel®, também foi aprovado pelo FDA, para uso em conjunto com cirurgia e radioterapia em GBM. Gliadel é composto por micropartículas de liberação controlada que contém 3,8% de carmustina, desenvolvido como um agente quimioterápico intratumoral e que mostrou em estudos clínicos de Fase III aumento de seis meses na sobrevida dos pacientes (SALGALLER e LIAU, 2006).

1.3. Ciclo Celular

As células normalmente tornam-se senescentes após um número fixo de divisões, quando são incapazes de continuar a gerar células filhas. Em cultura, células humanas geralmente estão limitadas a 50-70 divisões (o conhecido limite de Hayflick) (HAYFLICK e MOORHEAD, 1961). Algumas células permanecem quiescentes por toda a vida e não se dividem, enquanto outras permanecem em repouso por dias, semanas, meses e até anos (SAGONA e STENMARK, 2010). A duração total do ciclo varia enormemente de um tipo celular para outro. Embriões de moscas têm o mais curto ciclo celular conhecido, durando em média, apenas 8 minutos, enquanto o tempo de duração em uma célula hepática pode ser tão longa, quanto um ano. Contudo, a sequência de eventos necessários para a divisão de uma típica célula proveniente de mamífero leva, em média, 24 horas (ALBERTS et al., 2002).

A divisão celular consiste de dois processos consecutivos, caracterizada principalmente pela replicação do DNA e segregação destes cromossomos para as duas células geradas (Figura 1). Didaticamente, a divisão celular está dividida em duas etapas: a mitose (M), ou seja, o processo de divisão nuclear e interfase, a fase intermediária entre duas mitoses. As fases da mitose incluem prófase, prometáfase, metáfase, anáfase e telófase (Figura 1B). Sob o microscópio, as células na interfase simplesmente aumentam em tamanho, mas diferentes técnicas revelaram que a interfase inclui três fases *Gap* (pausa; intervalo): G0, G1 e G2, e a fase S (Figura 1A). A maioria das células normais, diferenciadas, e não divididas, está na fase G0, momento em que as células permanecem em um estado de repouso, latência ou quiescência. A fase G1 representa o período no qual a célula está se preparando para a síntese de DNA, e precede a fase de síntese

(S). Nesta fase, ocorre a replicação dos cromossomos, resultando em uma fita recém sintetizada, exatamente complementar à matriz. Após a fase S, inicia-se a fase G₂, momento em que é sintetizado o RNA e muitas proteínas necessárias para as duas células que serão geradas, bem como a preparação para a próxima etapa, a mitose (M). Na mitose ocorre a condensação dos cromossomos, formação dos fusos mitóticos e alinhamento dos microtúbulos e finalmente, a citocinese: separação das células recém formadas (HARPER e BROOKS, 2004; EGGERT, MITCHISON e FIELD, 2006). Em uma típica divisão celular eucariótica, a fase G₁ dura aproximadamente 12 horas, a fase S de 6 a 8 horas, a fase G₂ de 3 a 6 horas e a mitose cerca de 30 minutos, embora a duração exata de cada etapa varie com o tipo celular e com as condições de crescimento (SHACKELFORD, KAUFMANN e PAULES, 1999).

1.3.1. Ciclinas

A expressão de ciclinas varia durante o ciclo celular e sua expressão periódica forma a base para definir o início e a transição para as fases seguintes do ciclo (Figura 2). Até o momento, 29 proteínas foram formalmente denominadas de ciclinas, pois todas elas compartilham uma região conservada de 150 aminoácidos, chamada *Cyclin Box*. Este domínio composto por cinco regiões helicoidais é responsável pela ligação na porção N-terminal de várias proteínas, incluindo as CDKs. As ciclinas possuem ainda, um sítio de ligação hidrofóbico exposto, que está conservado nas Ciclinas A, B, D e E, distante do sítio catalítico para as CDKs e que funciona como um ponto de ancoragem para o recrutamento de substratos. Este sítio é reconhecido por numerosos substratos do ciclo celular (por exemplo, os fatores de transcrição p107, p130, p53 e E2F) e proteínas inibitórias endógenas (ex. p27 e p21). Das 29 ciclinas, apenas 8 parecem afetar diretamente a progressão do ciclo celular: Ciclinas A (1 e 2), B (1, 2 e 3), C, D (1, 2 e 3), E (1 e 2), F, G (1 e 2) e H (VIALARD et al., 2001; LAPENNA e GIORDANO, 2009).

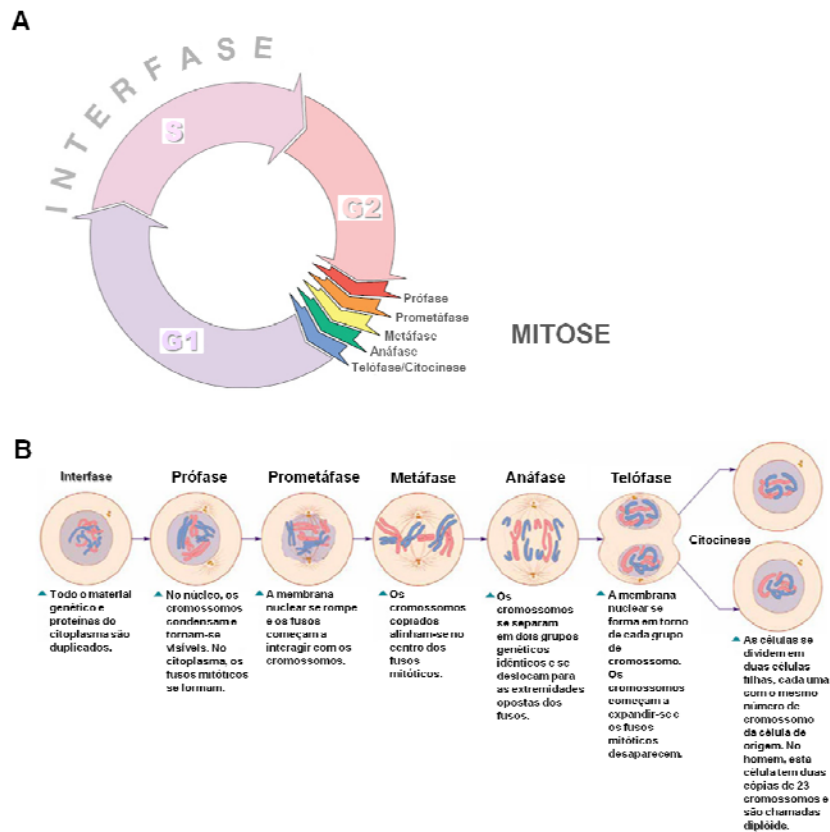


Figura 1. Fases do Ciclo Celular e da Mitose. **A.** O ciclo celular consiste de dois processos consecutivos: a Mitose e a Interfase. A interfase corresponde a etapa que as células se preparam para divisão celular e é subdividida em fase G1, S e G2. As fases da Mitose, que é a divisão celular propriamente dita, incluem a prófase, prometáfase, metafase, anáfase e telófase. **B.** A mitose é responsável pelo crescimento e desenvolvimento, bem como por substituir células lesionadas ou senescentes no organismo. Para simplificar, as células da ilustração contêm apenas seis cromossomos. Adaptado da página do Instituto Nacional de Saúde-EUA (<http://publications.nigms.nih.gov/insidethecell>).

1.3.2. Quinases Dependentes de Ciclinas

Quinases dependentes de ciclinas, ou CDKs, são subunidades catalíticas de uma grande família de proteínas quinases heterodiméricas serina/treonina. A atividade das CDKs é dependente de fosforilação, que

por sua vez depende da associação com ciclinas, suas subunidades reguladoras (Figura 2). Em humanos, a família de CDKs é composta de 13 membros, mas o papel fisiológico de muitas CDKs e seus pares associados, ainda permanece desconhecido. Apenas cinco CDKs parecem ser ativas durante o ciclo celular: CDK4, CDK6 e CDK2 (durante G1), CDK2 (na fase S), CDK1, também conhecida como CDC2 (em G2 e M). As CDKs restantes parecem não ter um papel crucial na progressão do ciclo celular normal (LAPENNA e GIORDANO, 2009; MALUMBRES e BARBACID, 2009). As CDKs também são reguladas por fosforilação: elas devem ser fosforiladas no resíduo treonina (T172 em CDK4 e T160 em CDK2) para a atividade catalítica. Isto é realizado pelo complexo CDK7-Ciclina H (também conhecida como CAK; do inglês *CDK-activating kinase*). A fosforilação inibitória de resíduos tirosina e treonina adjacentes (T14/Y15 em CDK1) é mediada pelas quinases de dupla especificidade (WEE1 e MYT1). As fosfatases CDC25 (CDC25A, CDC25B e CDC25C, do inglês *cell division cycle 25 phosphatases*) ativam estas quinases desfosforilando estes resíduos de aminoácidos. Se ambas fosforilações, ativadora e inibitória, existem na mesma molécula, elas resultarão em uma quinase inativa (MALUMBRES e BARBACID, 2001; MALUMBRES e BARBACID, 2005).

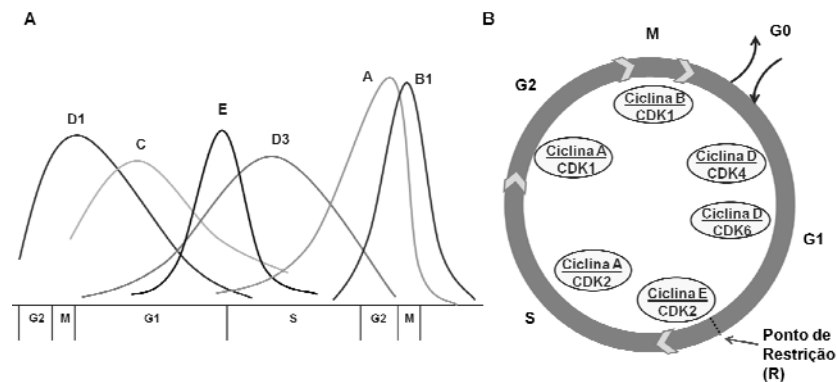


Figura 2. A. Variação nos níveis de expressão das ciclinas durante o curso do ciclo celular (Adaptado de Viillard et al, 2001). B. Representação esquemática dos complexos protéicos Ciclina/CDK e o ciclo celular (Adaptado de Shackelford, Kaufmann e Paules, 1999).

1.3.3. Pontos de Verificação

Os mecanismos de controle que asseguram a realização correta dos eventos anteriores e a integridade celular durante a progressão do ciclo celular são definidos como pontos de verificação. É na fase G1 que a célula responde a 'informações' extracelulares e que determinarão o início do ciclo celular. Nesta etapa, mais precisamente na transição de G1 para S, ocorre o primeiro ponto de checagem, identificado como "Ponto de Restrição" (R) (Figura 2) por Arthur Pardee (1974), onde, ultrapassada esta etapa, as células tornam-se independentes de fatores de crescimento e comprometidas com a divisão celular. Caso a sinalização para a proliferação não seja suficiente para que a célula possa superar o Ponto de Restrição, a célula pode entrar no período quiescente (G0), ou entrar em apoptose caso haja dano ao DNA que não possa ser reparado. Um ponto é determinante para a entrada no estado de quiescência (G0): o estado de fosforilação da proteína RB (retinoblastoma). A proteína RB é uma proteína inibitória que se encontra hipofosforilada em seu estado normal. Por influência de complexos enzimáticos ativados pela sinalização mitogênica, pode ser hiperfosforilada, permitindo a liberação do fator de transcrição E2F, que por sua vez induz a expressão de genes que controlam a entrada da fase S (HIRSCHI et al., 2010). A RB fosforilada (pRb) e suas proteínas relacionadas, p107 e p130, regulam a proliferação celular e foram descritas por estarem mutadas em muitos tipos de câncer (HARBOUR et al., 1988).

Outro ponto de verificação ocorre na fase S e controla a capacidade da célula para entrar em mitose. Este ponto de verificação é conhecido por envolver a ativação de ATM/ATR (do inglês *ataxia telangiectasia mutated/ATM Rad3-related*) ou DNAPK (do inglês *DNA-Dependent Protein Kinase*) com a subsequente ativação de quinases homólogas às tirosinas quinases citosólicas – CHKs - CHK1 e CHK2 (do inglês *CHK Csk Homologous Kinase; Csk – Cytosolic tyrosine kinase*) e resulta no reparo ao dano, interrupção do ciclo celular ou apoptose, dependendo da extensão do dano ao DNA. Similarmente, durante a mitose, há o ponto de verificação na organização dos fusos mitóticos, que inibe o início da anáfase, até que os cinetócoros estejam apropriadamente ligados aos fusos de microtúbulos e distendidos em grupos durante a metáfase, prevenindo assim a disseminação de cromossomos (HARPER e BROOKS, 2004; DEEP e AGARWAL, 2008).

1.3.4. Inibidores de Quinases Dependentes de Ciclinas

A atividade de CDKs é regulada por duas famílias de inibidores: proteínas INK4 (do inglês *inhibitor of CDK4*), e as famílias CIP (do inglês *CDK-interacting protein*) / KIP (do inglês *kinase inhibitor protein*). A família INK4 inclui p14 e p15 (INK4A), p16 (INK4B), p18 (INK4C) e p19 (INK4D) e inibem especificamente complexos Ciclina/CDK (Ciclina D/CDK4 e CiclinaD/CDK6), envolvidas no controle da fase G1. A família de inibidores polipeptídicos CIP/KIP inclui p21 (CIP1/WAF1/SDI1), p27 (KIP1) e p57 (KIP2). A família CIP/KIP desempenha especificidade mais ampla que INK4, pois a primeira interage e inibe as atividades quinases dos complexos Ciclina E/CDK2, Ciclina D/CDK4, Ciclina D/CDK6, Ciclina A/CDK2 e Ciclina B/CDK1. Os membros das duas famílias de CDKI inibem a atividade de CDK por mecanismos distintos: membros da família CIP/KIP se ligam, e inibem a atividade de todo o complexo Ciclina/CDK, enquanto que a família INK4 bloqueia a ligação da ciclina indiretamente, provocando mudanças alostéricas na CDK e desta maneira, alterando o sítio de ligação da ciclina. Cada uma destas proteínas é codificada por um único gene e, portanto, constituem o principal regulador da fosforilação da pRb. Sinais antiproliferativos tais como inibição de contato, senescência, fatores mitógenos extracelulares, pontos de verificação do ciclo celular, como p53, induzem a expressão de p27, p16, p15 e p21, respectivamente (PAVLETICH, 1999; SHERR, 2000; LAPENNA e GIORDANO, 2009).

De acordo com o modelo clássico para o ciclo celular de mamíferos, complexos Ciclina-CDK específicos são responsáveis por orientar os vários eventos conhecidos que ocorrem durante a interfase, de maneira seqüencial e ordenada (Figura 2). Por exemplo, sinais mitogênicos são percebidos primeiro, pela expressão de ciclinas do tipo D (D1, D2 e D3) que preferencialmente ligam e ativam CDK4 e CDK6 durante G1 (HOCHEGGER, TAKEDA e HUNT, 2008). A ativação destes complexos leva a inativação parcial do grupo de proteínas RB (proteínas do grupo da proteína oncogênica retinoblastoma - pRb, p107 e p130) para assegurar a expressão de Ciclinas E (E1 e E2), que se ligam a CDK2. Os complexos Ciclina E-CDK2 então fosforilam as proteínas Rb levando a sua completa inativação, resultando assim na liberação do fator de transcrição E2F, que então transcreve as proteínas necessárias para a transição da fase G1 para S (WEINBERG, 1995). A

disponibilidade de Ciclinas E durante o ciclo celular é rigorosamente controlada e limitada aos primeiros estágios da síntese de DNA. Estas observações, juntamente com a capacidade de mutantes dominantes negativos e anticorpos contra CDK2 em inibir o ciclo celular em certas linhagens tumorais humanas, foi interpretado como evidência que Ciclina E-CDK2 é essencial para conduzir a transição de G1/S (HOCHEGGER, TAKEDA e HUNT, 2008). Em seguida, CDK2 é ativada por Ciclina A durante o último estágio da replicação do DNA para orientar a transição da fase S para a mitose, o período conhecido como fase G2. Finalmente, CDK1 é ativada por ciclinas do tipo A, no final da interfase para facilitar o início da mitose. Após o rompimento do envelope nuclear, as ciclinas do tipo A são degradadas, facilitando a formação de complexos Ciclina B-CDK1, responsáveis por guiar as células através da mitose (VERMEULEN, BOCKSTAELE e BERNEMAN, 2003; MALUMBRES e BARBACID, 2009).

Recentemente, a desregulação de CDKs foi observada em tumores primários em humanos e em linhagens celulares tumorais, indicando as CDKs como alvos promissores para o desenvolvimento de fármacos antitumorais. Além disso, a pesquisa em novos agentes antitumorais tem focado em proteínas que orientam e controlam a progressão do ciclo celular, dos quais as CDKs têm papel fundamental. Entre as substâncias que agem seletivamente como inibidores de CDKs e que estão em fase clínica I e II (Figura 3), encontram-se: o inibidor das CDK1, CDK2, CDK4, CDK6, CDK7 e CDK9, o Flavopiridol; inibidor de CDK1, CDK2, CDK5, CDK7 e CDK9, R-roscovitina, também conhecido como CYC202 e seliciclib; inibidor de CDK2, CDK7 e CDK9, o SNS-032; inibidor de CDK1, CDK4 e CDK9, o P276-00; inibidor de CDK2, CDK4, CDK5 e CDK9 o AT7519; inibidor de CDK1, CDK2, CDK4 e CDK7 o R547, também conhecido como RO-4584820; inibidor de CDK4 e CDK6 o PD-0332991 e o inibidor de CDK1, RO-3306 que se encontra em triagem pré-clínica (LAPENNA e GIORDANO, 2009; MALUMBRES e BARBACID, 2009).

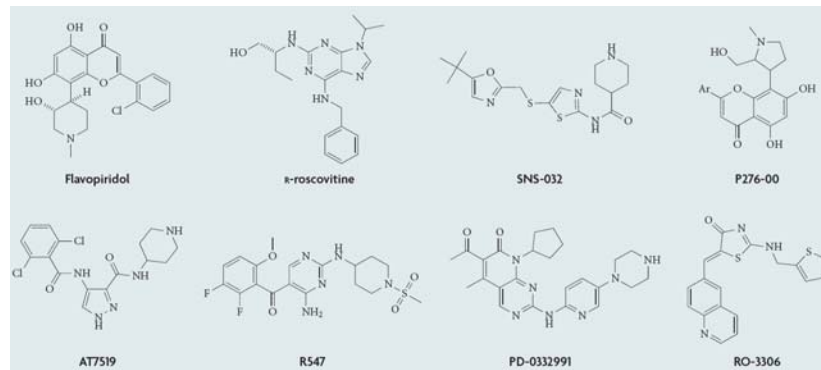


Figura 3. Estrutura química de inibidores de CDKs que estão em fase de testes clínicos (Extraído de Lapenna e Giordano, 2009).

Durante a carcinogênese, o ciclo celular está desregulado devido a superexpressão de reguladores positivos (CDKs e Ciclinas) e da perda de função de proteínas inibitórias. A superexpressão de CDC25 e alterações genéticas em CHK2 têm sido identificadas em uma ampla variedade de tumores. Além disso, em muitas células tumorais, o descontrole do ponto de verificação em G1 ocorre devido a mutações inibitórias em muitos destes reguladores (p53, RB, INK4) ou devido a mutações nos oncogenes (ciclina D1, RAS, erbB, EGFR). Consequentemente, todas estas alterações nas moléculas reguladoras do ciclo celular resultam no crescimento celular descontrolado (DEEP e AGARWAL, 2008). Neste cenário, a combinação de agentes que vetorizem alterações moleculares específicas envolvidas na progressão do ciclo celular das células tumorais é considerada a estratégia ideal para a terapêutica. Por esta razão, recentemente, agentes inibidores de quinases dependentes de ciclinas e substâncias como anticorpos monoclonais, estão disponíveis para a utilização na clínica, associados a outras modalidades de tratamento para o câncer (MALUMBRES et al., 2008).

1.4. Apoptose

A palavra grega ‘apoptose’ foi inicialmente usada para descrever a queda das folhas das árvores, no outono. O primeiro uso do termo apoptose na Medicina é atribuído a Hipócrates de Cos, que a utilizou para descrever a gangrena resultante do tratamento de fraturas

com bandagens (ANDRÉ, 2003). Cerca de 2000 anos depois, a mesma palavra foi reutilizada por Kerr, Wyllie e Curie (1972), para descrever uma forma fisiológica de morte celular, após a observação de hepatócitos “convertidos em pequenas massas redondas de citoplasma que muitas vezes continham partículas de cromatina nuclear condensada”.

Apoptose, ou morte celular programada, é uma propriedade comum de todos os organismos multicelulares e desempenha um importante papel no desenvolvimento e na homeostasia tecidual. Durante o desenvolvimento, muitas células são produzidas em excesso e eventualmente ocorre morte celular programada e, desta maneira, contribuem para modelar órgãos e tecidos. No contexto fisiológico, a apoptose está rigorosamente regulada e balanceada. Falhas nesta regulação resultam em condições patológicas tais como defeitos de desenvolvimento, doenças autoimunes, neurodegeneração ou câncer. Além de seu papel na homeostasia, a morte celular programada também pode ser desencadeada por vários determinantes, tais como irradiação gama ou ultravioleta, privação de fatores de crescimento, quimioterápicos ou sinalização por receptores de morte (ASHKENAZI e DIXIT, 1998; JIN e EL-DEIRY, 2005).

As características celulares da morte por apoptose diferem das características de morte por necrose (Figura 4). Necrose é tradicionalmente conceituada como uma morte passiva. É o resultado final de uma catástrofe bioenergética resultante da depleção de ATP em um nível de incompatibilidade com a sobrevivência celular e que pode ser iniciada principalmente por ‘acidentes’ celulares, tais como danos físicos ou tóxicos. Morfologicamente, é caracterizada por aumento e vacuolização do citoplasma, que leva ao rompimento da membrana citoplasmática e liberação do seu conteúdo no tecido circundante, causando uma resposta inflamatória. As alterações na morfologia celular, porém, não incluem a condensação da cromatina e fragmentação do DNA em 200pb, que é característica da morte apoptótica (EDINGER e THOMPSON, 2004).

Para a morte celular ser classificada como apoptótica devem ser observadas características morfológicas (Figura 4) muito marcantes e coordenadas tais como a formação de vacúolos citoplasmáticos, encolhimento celular e diminuição do contato entre células vizinhas, condensação e fragmentação nuclear, despolarização da membrana mitocondrial, clivagem do DNA em fragmentos internucleossomal,

alterações na assimetria de fosfolípidos de membrana que desencadeia e encerra, finalmente, com a fagocitose por macrófagos ou células vizinhas, evitando assim uma resposta inflamatória nos tecidos vizinhos (DANIAL e KORSMEYER, 2004).

Vários são os métodos disponíveis para a detecção de apoptose de células em cultura. As técnicas atualmente mais utilizadas baseiam-se nos seguintes parâmetros: a) morfologia (microscopia de transmissão eletrônica, microscopia de fluorescência e citometria de fluxo), b) marcadores da superfície celular (exposição da fosfatidilserina *versus* permeabilidade da membrana por citometria de fluxo), c) marcadores intracelulares (fragmentação de DNA por citometria de fluxo ou microscopia de fluorescência, ativação de caspase, BID clivada e liberação de citocromo *c* por Western Blotting) e d) liberação de marcadores extracelulares no sobrenadante (caspases e citoqueratina) (KRYSKO et al., 2008).

1.4.1. Caspases

As caspases são um dos principais efetores de apoptose e sua ativação é um indicativo do processo apoptótico. Caspases são proteases cisteinil-aspartato específicas, sintetizadas como zimógenos com um pró-domínio N terminal de comprimento variável, seguido por uma subunidade maior de cerca de 20 kDa (p20) e uma subunidade menor, com cerca de 10 kDa (p10). As caspases são ativadas através da clivagem no sítio C terminal do aspartato, separando as subunidades p20 e p10, seguida pela remoção do prodomínio. Algumas vezes, a clivagem resulta em ativação da proteína, outras vezes em inativação, mas nunca em degradação, pois sua especificidade a distingue como a mais restrita das endopeptidases (BOATRIGT e SALVESEN, 2003).

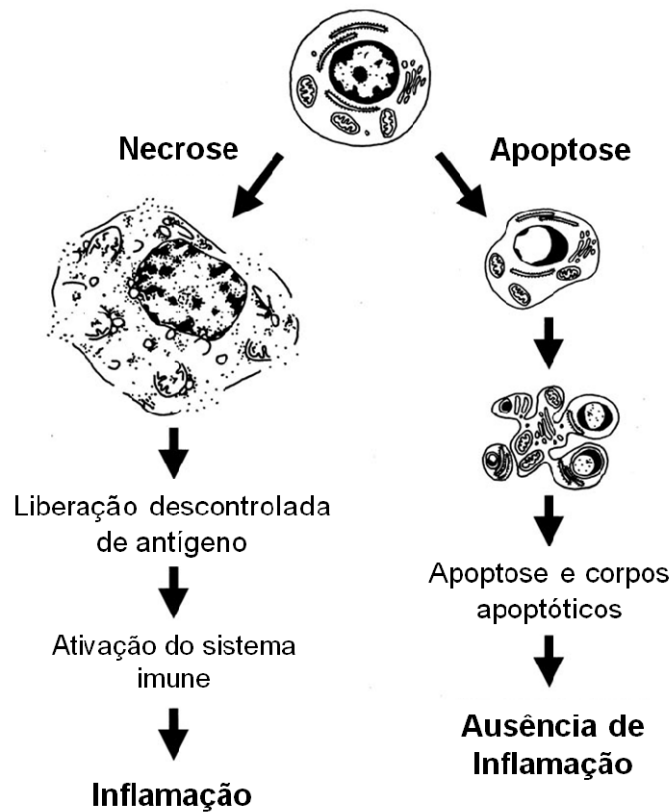


Figura 4. Esquema representativo das duas vias de morte celular, necrose e apoptose (modificado de Leist e Jäättelä, 2001). Necrose é caracterizada por inchamento da célula, dano na membrana plasmática e perda do conteúdo citoplasmático no espaço extracelular, que leva a apresentação descontrolada de antígenos ao sistema imune e pode causar reações inflamatórias. Ao contrário, a célula apoptótica retrai enquanto permanece com a membrana plasmática intacta. Seu conteúdo celular é distribuído em corpos apoptóticos, que subsequentemente será fagocitado por células vizinhas ou por macrófagos. Geralmente, as vias de apoptose não levam a inflamação.

Dependendo da estrutura do prodomínio e sua função, as caspases são classicamente divididas em três principais grupos: as caspases com prodomínio grande são referidas como caspases inflamatórias (grupo I) e caspases iniciadoras de apoptose (grupo II), enquanto as caspases com um prodomínio curto são denominadas caspases efetoras (grupo III) (DEGTEREV, BOYCE e YUAN, 2003; LEIST e JÄÄTTELÄ, 2001). As caspases iniciadoras possuem uma das duas características da interação na porção proteína-proteína: o domínio efetor de morte (DED, do inglês *death effector domains*) (caspases 8 e 10) e o domínio de recrutamento e ativação de caspases (CARD, do inglês *Caspase Recruitment Domain*) (caspases 1, 2, 4, 5, 9, 11 e 12), proporcionando a base para a interação com moléculas adaptadoras acima (DEGTEREV, BOYCE e YUAN, 2003; DEBATIN e FULDA, 2006).

As vias de sinalização apoptótica que conduzem à ativação da caspase zimógena diferem entre a via extrínseca (mediada por receptor de morte) e a via intrínseca (mediada pela mitocôndria). Na ativação da apoptose pela via extrínseca (Figura 5), o desencadeamento ocorre em resposta a sinais extracelulares ou por receptores de morte que são receptores de membrana da superfamília dos receptores de fatores de necrose tumoral – TNFr (do inglês *tumor necrosis factor receptor*). Esta superfamília inclui o fator de necrose tumoral (TNF) e seu receptor, TNFR1; FAS ligante (também conhecido como CD95L) com FAS (CD95) e TRAIL (também conhecido como APO2 ligante (APO2L) ou TNFSF10) e seus receptores DR4 também conhecido como TRAILR1) ou DR5 (conhecido como TRAILR2). Todos os membros da família TNFr possuem um subdomínio extracelular rico em cisteína, o qual permite que eles reconheçam seus ligantes. Tal fato resulta na trimerização e conseqüente ativação dos receptores de morte específicos. A sinalização a seguir é mediada pela porção citoplasmática desses receptores. As interações levam à formação de DISC (do inglês *Death Inducing Signaling Complex*). DISC por sua vez, recruta os adaptadores correspondentes através do domínio de morte. Os receptores de morte e adaptadores tornam-se ativados em DISC, tanto quanto eles podem ligar-se a moléculas efetoras como pró-caspase 8 e induzir a ativação desta via de sinalização apoptótica (JIN e EL-DEIRY, 2005; RIEDL e SALVESEN, 2007).

A via intrínseca (Figura 5) é desencadeada por vários sinais extracelulares e intracelulares, como ausência de fatores de crescimento,

hipóxia, dano ao DNA e indução oncogênica. A resposta a estes sinais de estresse convergem para a permeabilização da membrana mitocondrial externa, conduzindo a liberação de proteínas pró-apoptóticas, localizadas no espaço intermembranares da mitocôndria (OKADA e MAK, 2004). Além da liberação de moléculas pela mitocôndria, a indução do colapso do potencial da membrana mitocondrial interna ($\Delta\psi_m$) leva à perda da homeostasia celular, interrompendo a síntese de ATP e aumentando a produção de espécies reativas de oxigênio. O aumento nestas espécies reativas leva a oxidação de lipídeos, proteínas e ácidos nucleicos, aumentando o colapso do $\Delta\psi_m$. Todos estes danos resultam na liberação do citocromo *c* pela mitocôndria e sua ligação a APAF-1 (do inglês *apoptotic protease activating factor 1*), uma proteína citosólica que contém um domínio de recrutamento de caspase – CARD. A ligação ao citocromo *c* gera a oligomerização e a modificação conformacional de APAF-1 e conduz à formação de uma plataforma de ativação de caspase, denominada apoptossomo (WANG, 2001). O apoptossomo recruta, dimeriza e ativa uma caspase iniciadora, a caspase 9, que por sua vez, cliva e ativa caspases 3 e 7. A liberação mitocondrial de SMAC (do inglês *second mitochondria-derived activator of caspase*; também conhecido como DIABLO) e OMI (também chamado HTRA2) bloqueia a inibição mediada pela proteína inibidora de apoptose ligada ao X (XIAP – do inglês *X-linked Inhibitor of Apoptosis Protein*) (TAIT e GREEN, 2010).

Como citado acima, a mitocôndria integra os sinais vitais e letais e desse modo desempenha um papel decisivo no destino da célula. Se ocorrer a permeabilização da membrana mitocondrial, as funções bioenergéticas ou biossintéticas param e as proteínas do espaço intermembranar mitocondrial são liberadas no citosol, onde promoverão a morte celular por múltiplos mecanismos. Esquemáticamente, a apoptose mitocondrial pode ser subdividida em três fases: a) durante a fase de iniciação mitocondrial, as células reconhecem sinais de perigo e ativam as vias de indução de morte, mas também vários mecanismos pró- sobrevivência na tentativa de combater o estresse. b) durante a fase de integração, as cascatas metabólicas convergem para a mitocôndria e, se os sinais letais predominam, as membranas mitocondriais são permeabilizadas. Quando a permeabilização é permanente e afeta uma considerável fração de mitocôndrias, as células são irreversivelmente conduzidas à morte. c) durante a fase de execução pós-mitocondrial, a permeabilização da membrana mitocondrial leva a perda do potencial

transmembrana mitocondrial, desacoplamento da cadeia respiratória, superprodução de espécies reativas de oxigênio (EROs), interrupção da síntese de ATP e extravasamento citosólico de proteínas do espaço intermembranar mitocondrial. Estes eventos causam uma profunda crise redox e bioenergética e ativam um conjunto de processos catabólicos que acabam desencadeando a morte celular (GREEN e REED, 1998; ZAMZAMI e KROEMER, 2003; FULDA, GALLUZZI e KROEMER, 2010).

Entre os eventos que conduzem para a morte celular programada, somente o passo da permeabilização da membrana mitocondrial é regulado, momento em que os membros anti-apoptóticos da família de proteínas BCL-2 podem parar a progressão para a morte apoptótica. Entretanto, após a liberação do citocromo *c*, a ativação da cascata de caspases é irreversível (OKADA e MAK, 2004).

O membro protótipo da família BCL-2 foi originalmente identificado na translocação cromossômica em linfoma folicular humano e, subsequentemente, foi mostrado promover tumorigênese, mais por inibir a morte celular do que promover a progressão do ciclo celular (KORSMEYER, 1992). Estas proteínas são localizadas em membranas intracelulares, tais como no retículo endoplasmático e nas mitocôndrias, embora alguns membros translocam do citoplasma para a mitocôndria, após o estímulo de morte celular. As proteínas da família BCL-2 podem ser classificadas de acordo com sua função e sua homologia com a molécula de BCL-2 (BH – do inglês *BCL-2 homology domains*). Três subfamílias compõem estas proteínas: as proteínas antiapoptóticas com multidomínios BH1-BH4 (BCL-2, BCL-XL, BCL-W, A1 e MCL1), as proteínas proapoptóticas com multidomínios BH1-BH3 da subfamília BAX (BAX, BAK e BOK) e as proteínas proapoptóticas apenas com multidomínios BH3 (BID, BAD, BIK, HRK, BIM (ou BOD), BMF, NOXA e PUMA) (CHENG et al., 2001, ADAMS e CORY, 2007). Os membros pró-apoptóticos deste grupo de proteínas promovem a liberação dos fatores apoptogênicos, enquanto que os membros antiapoptóticos previnem a liberação. Após um estímulo de morte, BCL-2 inibe a permeabilização da membrana externa da mitocôndria pelo sequestro de BAX ou por competir por sítios que seriam ocupados por ela. BAX pode promover a apoptose através da interação com a mitocôndria, de forma independente da interação com proteínas antiapoptóticas (YOULE e STRASSER, 2008).

A alta expressão de proteínas apoptóticas (BCL-2, BCL-XL, survivina) e/ou a inativação de proteínas pró-apoptóticas supressoras de tumores (p53, p19^{ARF} do inglês *alternate reading frame*, PTEN) que controlam as vias de apoptose dependentes de caspase, são observadas em muitos tumores humanos (LEIST e JÄÄTTELÄ, 2001). Neste sentido, a compreensão dos mecanismos e alterações das vias apoptóticas e sua correlação com o desencadeamento do câncer são importantes para o desenvolvimento de novas terapias e métodos de prevenção da doença.

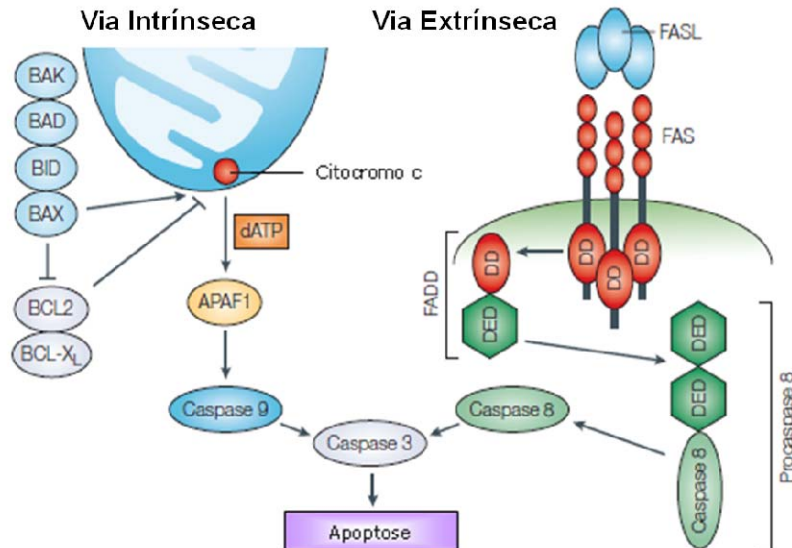


Figura 5. Representação simplificada das duas principais vias envolvidas na apoptose. Na via intrínseca, também chamada de via mitocondrial, o citocromo *c* liberado da mitocôndria interage com dATP e APAF-1, ativando caspase-9, que por sua vez ativa a caspase-3. As proteínas BCL-2 e BCL-XL inibem a liberação do citocromo *c*, enquanto BAK, BAD, BAX e BID promovem esta liberação. A via extrínseca, ou via de receptor de morte, é mediada por receptores do tipo Fas. Seus ligantes (FASL) agem com o receptor através de domínios de morte celular (DD), que ao interagirem com domínios de morte de adaptador de proteína (DED) formam o domínio de morte associado à Fas (FADD). Este interage com a caspase-8 formando caspase-8 ativada, que age sobre a caspase-3, desencadeando a apoptose. Adaptado de Fesik, 2005.

1.5. Chalconas

Ao longo da história, os compostos naturais têm sido uma rica fonte de compostos com aplicações nos campos da biologia, farmácia e medicina. A enorme diversidade estrutural desses compostos fez com que várias substâncias isoladas de plantas, microrganismos, fauna e flora marinhas, pudessem servir como base para alterações moleculares, melhorando seu potencial terapêutico.

Para muitos organismos, essa diversidade química se reflete na seleção, conservação e evolução da espécie, como mecanismos de defesa, inibindo o crescimento de outras plantas ou a ação de predadores. Nas terapias contra o câncer, um número importante de medicamentos comercializados foi obtido a partir de fontes naturais, através de isolamento, modificação estrutural, ou síntese de novas moléculas, utilizando um composto natural como modelo (NOBILI et al., 2009).

Nas últimas décadas, o alto consumo de frutas, legumes, cereais e especiarias tem atraído a atenção tanto da população em geral, como da comunidade científica, devido a baixa incidência de câncer e outras doenças crônicas associadas a este hábito alimentar. Como estes itens da dieta humana e seus componentes ativos minimizam as referidas doenças, ainda não é completamente conhecido. O fato é, que todos estes ingredientes da alimentação têm em comum, dentre outras substâncias, um grupo de cetonas aromáticas conhecidas como chalconas (AGGARWAL, 2010).

As chalconas (1,3-diaril-2-propen-1-onas), um grupo de enonas aromáticas, formam o núcleo de uma ampla variedade de compostos biológicos obtidos de vegetais. São importantes para a pigmentação das flores, muitas vezes responsáveis pela coloração amarela (BATOVSKA e TODOROVA, 2010). São consideradas precursoras de flavonóides e isoflavonóides e abundantes em plantas comestíveis e intermediários na síntese de flavonas. As chalconas podem ser encontradas em várias partes das plantas como nas flores, sementes, folhas, caule e raízes, em espécies como *Angelica*, *Glycyrrhiza*, *Humulus* e *Scutellaria*, todas estas plantas de uso popular tradicional para doenças infecciosas e crônicas (DUCKI, 2007).

A via biossintética dos flavonóides incorpora precursores das vias do ácido chiquímico e dos policetídeos. O primeiro flavonóide formado é a chalcona e todos os outros flavonóides são obtidos a partir

de reações de oxidação e de redução deste intermediário (TAPAS, SAKARKAR e KAKDE, 2008).

Como metabólitos secundários, as chalconas participam do mecanismo de defesa das plantas ao neutralizar espécies reativas de oxigênio (EROs) evitando danos moleculares provocados por microorganismos, insetos ou herbívoros. São conhecidas por possuir caráter antioxidante em várias extensões. Esta atividade antioxidante dos compostos naturais, tais como os chalconóides, está relacionada a diferentes mecanismos de ação como, por exemplo, a resistência das plantas a fotoxidação da luz ultravioleta do sol, o sequestro de radicais livres, a quelação de íons metálicos ou atuando como substrato para radicais livres como superóxido e hidróxido (PATIL, MAHAJAN e KATTI, 2009). Quimicamente, as chalconas são flavonóides de cadeia aberta em que são separados por três carbonos, dos quais dois são conectados a dupla ligação e o terceiro é um grupo carbonila. Possuem a dupla ligação conjugada e um sistema eletrônico deslocado sobre os dois anéis de benzeno. As moléculas que possuem este sistema tem potencial redox relativamente baixo e uma maior probabilidade de ocorrer reações de transferência de elétrons (PADHYE et al., 2009).

A química das chalconas tem gerado intensivos estudos e o interesse tem sido focado na síntese e atividade destes compostos. Algumas substâncias com várias propriedades farmacológicas foram desenvolvidas baseadas no esqueleto das chalconas como cianopiridinas, pirazolininas, isoxazol e pirimidinas (JAYAPAL, PRASAD e SREEDHAR, 2010). Kostanecki e Tambor (1899) pioneiros na área de pigmentos, foram os primeiros a cunhar o termo 'chalcona' e sintetizar esses compostos. O isolamento das primeiras chalconas foi realizado a partir do alcaçuz chinês *Glycyrrhizae inflata* e que teve o sistema 1,3-diaril-1-ona, reconhecido como o principal farmacóforo para as chalconas. Devido sua ampla disponibilidade, estrutura simples, variedade e diferentes vias de ciclização, esta classe de compostos tem despontado como moléculas com potencial terapêutico (PADHYE et al., 2009).

Como várias chalconas são capazes de inibir algumas enzimas na geração de espécies reativas de oxigênio, muitos dos efeitos farmacológicos, tais como a inibição de lipooxigenase ou ciclooxigenase, estão supostamente relacionadas ao seu efeito antioxidante (SOGAWA et al., 1993). Além disso, foi demonstrado que vários derivados de chalconas parecem inibir enzimas celulares

importantes, como xantina oxidase, tirosina quinase e quinona redutase (MIRANDA et al., 2000; YANG et al., 2001). Por outro lado, o efeito antiinflamatório de derivados de chalconas *per se* foi avaliado e parece estar associado com a supressão de mediadores inflamatórios, tais como óxido nítrico e TNF- α . Este mecanismo protetor poderia derivar da inibição simultânea da produção de vários mediadores inflamatórios ou por ação inibitória da ativação dos fatores de transcrição tais como NF κ -B e AP-1 (BAN et al., 2004).

A atividade antibacteriana também tem sido documentada em muitas publicações, através do isolamento e identificação da estrutura das chalconas que possuem atividade antibacteriana, ou ainda sintetizado ou modificado a estrutura natural. A atividade bactericida destes compostos foi relacionada à afinidade da α,β -cetona insaturada pelos grupos tióis. O espectro de ação das chalconas compreende atividade contra os seguintes microorganismos: *Bacillus subtilis*, *Staphylococcus aureus*, *Micrococcus luteus*, *Legionella pneumophila*, *Mycobacterium tuberculosis*, *Leishmania*, *Leishmania donovani*, *Plasmodium falciparum* e *Plasmodium vivax* (HARAGUCHI et al., 1998; HATANO et al., 2000; TSUKIYAMA et al., 2002; ISOMOTO et al., 2005; HANS et al., 2010). Além destes microorganismos foi demonstrada também ação destes compostos contra alguns fungos e vírus (DINMOCK et al., 1999; OPLETALOVA e SEDIVY, 1999; LOPEZ et al., 2001).

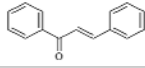
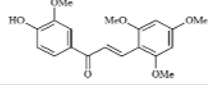
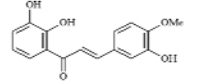
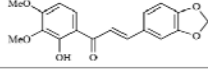
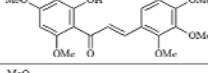
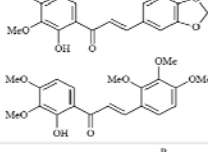
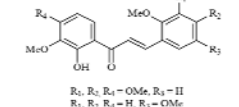
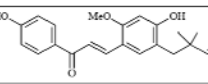
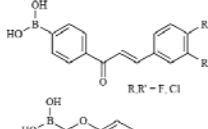
As chalconas apresentam ainda, outros efeitos farmacológicos que incluem ação hipoglicemiante. Chalconas metóxi e hidroxiladas obtidas sinteticamente, bem como as metilhydrochalconas encontradas no cinamono têm sido empregadas como mimetizadoras da insulina. Adicionalmente, foi mostrada sua atividade inibitória seletiva sobre aldose redutase, melhorando a resposta de diabéticos não dependentes de insulina. Foi sugerido que sua atividade antioxidante auxiliaria a evitar complicações vasculares nos pacientes diabéticos (JARVILL-TAYLOR, ANDERSON e GRAVES, 2001).

Nos últimos 15 anos, as chalconas têm despontado como potenciais agentes anticâncer, resultado de inúmeros trabalhos de grupos de todo o mundo que indicaram diferentes mecanismos para a ação antitumoral. Por exemplo, flavokawina B, xantohumol, isoliquiritigenina, flavokawina A, isobavachalcona, cardamonina, licochalcone A e buteina induzem apoptose em diferentes tipos de células, prevenindo a progressão do câncer, por ativação das duas vias

de apoptose. Ademais, estes triterpenóides têm em comum um alvo, a proteína BCL-2, que pode induzir apoptose em células tumorais (YADAV et al., 2011).

Outro mecanismo relacionado a atividade antitumoral das chalconas é a inibição da formação dos microtúbulos, tal qual como ocorre com àquelas já usadas na clínica, como paclitaxel e vinblastina, e ainda a colchicina. Ducki et al. (1998) demonstraram a atividade antitubulina das chalconas e observaram potente ação antitubulina *in vitro* e *in vivo*, da chalcona sintética MDL-27048, nos mesmos níveis de colchicina e vinblastina. Chalconas como caramonina, cardamomina dorsamanina A, xantangelol e estipulina estão implicadas na inibição de VEGF, ICAM e VCAM, além de MMP-9, fatores responsáveis pela angiogênese, invasão e metástases (KIMURA e BABA, 2003; MOTANI et al., 2008). Além disso, as lichochalconas A e E, também conhecidas como retrochalconas, demonstraram ação citotóxica e inibição da enzima topoisomerase I em células de carcinoma de pulmão (A549), ovário (SK-OV-3) e de cólon (HCT-15). Os autores sugerem que estas moléculas poderiam servir de modelo para o desenvolvimento de novos fármacos para o tratamento do câncer (YOON et al., 2007).

A combrestastina A4 é uma das chalconas mais estudadas. A partir do isolamento do arbusto africano *Combretum caffrum* suas propriedades antitumorais têm sido investigadas, dentre as quais se destacam a alta citotoxicidade para várias linhagens tumorais e sua potente atividade antimitótica (WOODS et al., 1995). Em função destas atividades, diversos derivados desta chalcona foram avaliados em conjunto com quimioterápicos. Foi demonstrada sua potente ação na diminuição da perfusão dos tumores (TOZER et al., 1999; BADN et al., 2006).

	Linhagem Celular	Parada do ciclo em:	Ativadores Moleculares	Reguladores Moleculares
	MCF-7, MDA-MB-231	G2 + M	↓ Ciclina B1, Ciclina A, CDK1, CDC2	↑ p21, p27, independente de p53
	K562	G2 + M	↓ Polimerização de tubulina	ND
	Jurkat	G2 + M	ND	ND
	U637	G0/G1	ND	ND
	U637	G2 + M	ND	ND
	PBMC	G2 + M	ND	ND
	PC-3	G2 + M	↓ Ciclina B, CDK1, Ciclina D, CDK4, CDK6; Ciclina E ↓	↓ pRB, E2F
	MCF-7, MDA-MB-231	ND	ND	↓ MDM2/p53
	HCT116	Principalmemente G0/G1	↓ Ciclina B, CDK4,	pRB, ↓ E2F

ND= não detectado

Figura 6. Relação entre as estruturas das chalconas e o efeito sobre o ciclo celular (Extraída e adaptada de Boumendjel, Ronot e Boutonnat, 2009).

Alguns trabalhos relacionam a inibição do ciclo celular às chalconas, mostrando que o principal alvo destas moléculas parece ser a inibição de CDKs (Figura 6). Hsu, Wu e Kuo (2006) utilizaram chalconas para avaliar seus efeitos antiproliferativos. Em células oriundas de tumor de mama (MCF7 e MDA-MB-231), os pesquisadores evidenciaram a indução da apoptose e inibição da progressão do ciclo celular, com bloqueio na fase G2/M. Além disso, demonstraram que as expressões de Ciclinas B1 e A e a proteína CDK1 foram significativamente diminuídas. Observaram ainda que a chalcona ativa a via apoptótica mitocondrial, sugerindo que as chalconas poderiam ser moléculas quimiopreventivas promissoras para o tratamento de câncer de mama. Em outro trabalho, desenvolvido por Lee et al. (2009), foi verificado que a chalcona isoliquiritigenina, presente no alcaçuz, cebola e broto de feijão, inibe a progressão do ciclo celular em células provenientes de tumor de próstata humano (DU 145) e de rato (MLL). As células tratadas com esta chalcona apresentaram níveis de Ciclina D1, Ciclina E e CDK4 diminuídos comparadas com as não tratadas. Os autores observaram também, que estas linhagens celulares apresentaram uma interrupção nas fases G1 do ciclo celular, sugerindo que esta chalcona apresenta potencial como agente antitumoral.

1.6. Quinoxalinas

Outras substâncias, como os derivados de quinoxalinas também representam potenciais novos fármacos, que tem atraído o interesse de diversos pesquisadores. As quinoxalinas são uma importante classe de heterocíclicos que contêm nitrogênio, denominadas assim de sistemas bicíclicos heteroaromáticos (Figura 7). Embora raramente encontrados na natureza, as quinoxalinas são bem conhecidas da indústria farmacêutica por seu amplo espectro de ação terapêutica. Compostos com o núcleo quinoxalínico possuem atividade antiviral (BALZARINI et al., 1994), antagonista seletivo do receptor de adenosina A₃, como antagonistas do receptor 5-HT₃ (MONGE et al., 1993; CATARZI et al., 2005) e atividade antiinflamatória (SINGH et al., 2004; BURGUETE et al., 2007). Além destes efeitos, a atividade antitumoral tem sido mostrada em diversos trabalhos (PRIYADARSINI et al., 1996; GANLEY et al., 2001; CERECETTO et al., 2005). O interesse nestas moléculas foi reforçado após He et al. (2003) demonstrarem que um derivado quinoxalínico (RPR127963), patenteado pela indústria

farmacêutica Aventis, possuía ação inibitória nos receptores de tirosina quinase. A partir daí, diversas publicações têm destacado a ação antitumoral de compostos quinoxalínicos, com ênfase na inibição de proteínas quinases.

Ortega et al. (2002) avaliaram o efeito de pirazolo[3,4-b]quinoxalinas e observaram que a atividade antiproliferativa desempenhada por este composto, se deve a um efeito inibitório significativo sobre a atividade de CDK1/Ciclina B no ciclo celular. Em 2009, Reiners et al. demonstraram que os derivados quinoxalínicos XK469 (2-{4-[(7-chloro-2-quinoxalinyloxy]phenoxy}propionic acid) e SH80 (2-{4-[(7-bromo-2-quinolinyloxy]phenoxy}propionic acid), são indutores de apoptose e potentes inibidores de citocinese. Verificaram também, que as células tratadas com estas substâncias apresentaram baixos níveis de Ciclina E e Ciclina D1.

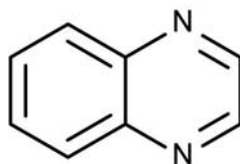


Figura 7. Estrutura química da quinoxalina. Sua fórmula molecular é $C_8H_6N_2$, um composto heterocíclico contendo um anel de benzeno e um anel de pirazina, ou seja, uma benzopirazina.

Embora a combinação de quinoxalina e chalcona pareça resultar em um promissor antitumoral, poucos trabalhos demonstram a associação destas estruturas em único composto (MOUSTAFA, 2003; SRIDEVI et al., 2009; SRIDEVI et al., 2010). Os artigos que incluem quinoxalinas e chalconas combinadas, abordam a síntese destes compostos e alguns testes de triagem para avaliar efeitos antimicrobiano (SRIDEVI et al., 2009) ou antihistamínico (SRIDEVI et al., 2010).

A junção de duas moléculas ativas contra células tumorais, uma chalcona e uma quinoxalina, em um único composto sugere um efeito antitumoral potencialmente relevante. Desta maneira, o presente trabalho procurou avaliar os efeitos antitumorais da Chalcona N9, uma chalcona cujo anel aromático (B) é um radical quinoxalínico.

2. OBJETIVOS

2.1. Objetivo Geral

O presente trabalho teve como objetivo avaliar as propriedades antitumorais da Chalcona N9 ((E)-1-(2,5-dimetoxifenil)-3-(quinoxalina-6-il)prop-2-an-1-ona), através de ensaios *in vitro* utilizando cultura de células humanas e murinas, bem como sobre o crescimento tumoral em modelos *in vivo*.

2.2. Objetivos específicos

- a) Avaliar o efeito citotóxico da Chalcona N9 sobre células de câncer de pulmão humano A549, melanoma murino B16-F10, glioma murino C6, câncer de próstata humano DU 145, fibroblasto imortalizado de camundongo L929, câncer de mama humano MCF7 e glioblastoma humano U-87 MG;
- b) Avaliar os efeitos da Chalcona N9 sobre a citotoxicidade celular na linhagem de glioma humano U-87 MG e comparar com o perfil citotóxico exibido pelos antitumorais carmustina, cisplatina, citarabina e doxorubicina;
- c) Analisar a indução de apoptose e distribuição de células U-87 MG nas diferentes fases do ciclo celular, na presença ou ausência da Chalcona N9;
- d) Avaliar a influência da Chalcona N9 sobre a expressão de proteínas implicadas na progressão do ciclo células da linhagem U-87 MG;
- e) Determinar se a Chalcona N9 altera o potencial de membrana mitocondrial nas células U-87 MG;
- f) Investigar o efeito da Chalcona N9 sobre a capacidade de formação de colônias das células U-87 MG;
- g) Investigar o potencial terapêutico da Chalcona N9 *in vivo*, sobre diferentes modelos de crescimento tumoral: tumor ascítico de Ehrlich em camundongos BALB/c; melanoma murino B16-F10 em camundongos C57BL/6 e tumor xenográfico U-87 MG em camundongos BALB/c *nude*.

3. MATERIAIS E MÉTODOS

3.1. Obtenção do composto Chalcona N9

O composto Chalcona N9 (Figura 8) foi sintetizado por meio do seguinte procedimento: o primeiro passo foi a obtenção do aldeído quinoxalínico através da reação de condensação entre o ácido 3,4-diaminobenzóico e glicoxal, em refluxo com etanol e ácido acético, resultando no ácido quinoxalinocarboxílico. Este ácido foi reduzido a seu álcool primário com hidreto de alumínio e lítio (Li(AlH₄)) e após oxidado a aldeído com piridino-clorocromato em diclorometano. A partir do aldeído quinoxalínico foram sintetizados 8 compostos (dentre eles a Chalcona N9), obtidos através da reação de condensação aldólica entre o aldeído e diferentes acetofenonas em meio básico (hidróxido de sódio 50%), utilizando metanol como solvente, sob agitação magnética por 24 horas à temperatura ambiente. Todas as estruturas foram caracterizadas por ressonância magnética nuclear (RMN) de H e C e espectroscopia no infravermelho. A Chalcona N9 foi obtida e fornecida pelo Dr. Paulo César Leal e pela Doutoranda Alessandra Mascarello, ambos alunos do Dr. Rosendo Yunes, do Programa de Pós-Graduação em Química, da UFSC (Universidade Federal de Santa Catarina).

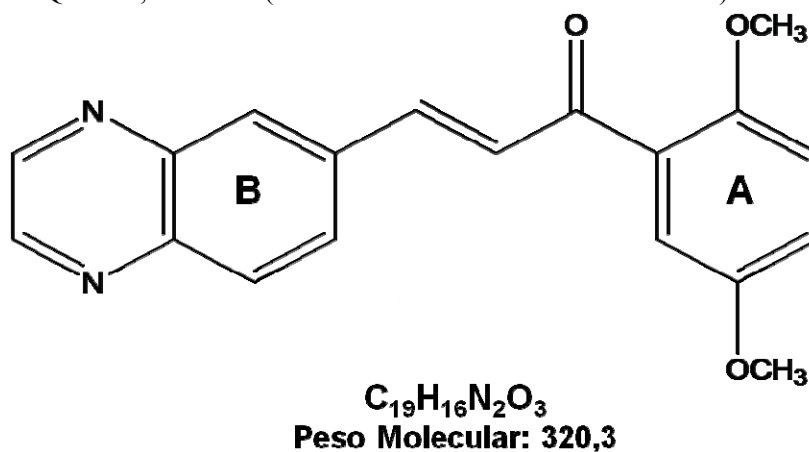


Figura 8. Estrutura química do ((E)-1-(2,5-dimetoxifenil)-3-(quinoxalina-6-il)prop-2-an-1-ona) (Chalcona N9). Consiste de uma chalcona (direita), cujo anel B é um radical quinoxalínico, ou seja, N-óxido heterocíclico aromático.

3.2. Cultura de células

As linhagens celulares de carcinoma de pulmão humano (A549), melanoma de camundongo (B16-F10), glioma de rato (C6), carcinoma de próstata humano (DU 145), fibroblastos de camundongo (L929), carcinoma de mama humano (MCF7) e glioma humano (U-87 MG) foram obtidas da ATCC (do inglês, *American Type Culture Collection*, USA). As células foram mantidas em meio de cultura DMEM (do inglês, *Dulbecco's Modified Eagle's Medium*), suplementado com soro fetal bovino (10%), L-glutamina (2 mM), Glicose (4,5 g/L), bicarbonato de sódio (1,5 g/L), HEPES (10 mL/L) e penicilina/estreptomicina (10 mL/L). As células foram cultivadas em garrafas contendo meio de cultura e mantidas a 5% de CO₂ e a temperatura de 37°C até a formação de monocamada celular; depois as garrafas de células foram submetidas a tripsinização. Para isso, as células foram lavadas com PBS (do inglês, *phosphate buffered saline*) e, em seguida, submetidas à 3 mL de Tripsina-EDTA 0,05% até o desprendimento das células do fundo das garrafas. A seguir, as células foram homogeneizadas com volumes variados do meio de cultura acrescido de 10% de soro fetal bovino para a neutralização da tripsina. O volume da suspensão celular obtido em uma garrafa foi transferido para outras duas garrafas, de modo a obter a quantidade celular adequada para a realização dos experimentos.

3.3. Ensaio de citotoxicidade celular (MTT)

Para o ensaio de citotoxicidade, células das linhagens A549, B16-F10, C6, DU 145, L929, MCF7 e U-87 MG foram semeadas em placas de cultura de 96 poços (2,5 x 10³ células por poço), contendo 100 µL de meio de cultura DMEM. Após 24 horas de incubação, o meio de cultura foi substituído por meio contendo concentrações crescentes da Chalcona N9 (0,01 µg/mL a 100 µg/mL) ou veículo (DMSO 0,1% em meio). Após 48 horas, o meio de cultura foi retirado e um novo meio de cultura foi adicionado, desta vez contendo MTT (3-[4,5-dimethylthiazol-2-yl]-2,5-diphenyltetrazolium bromide; 0,5 mg/mL) e incubado por 3 horas à 37°C em atmosfera umidificada, contendo 5% CO₂. Decorrido este período, o meio foi novamente retirado, e adicionado 100 µL de DMSO, para dissolver os cristais de formazan produzidos durante a incubação com MTT. A leitura espectrofotométrica da absorbância foi realizada em um equipamento de leitura de placas (BioteK ELx 800) em comprimento de onda de 550 nm, para estabelecer a relação linear do

número médio de células viáveis por poço no ensaio do MTT (adaptado de MOSMANN, 1983). A citotoxicidade de cada tratamento foi expressa pela porcentagem de morte celular, calculada em relação ao controle negativo (adaptado de CRAWFORD e BOWEN, 2002):

$$\text{Células Viáveis (\%)} = \frac{\text{Absorbância da amostra} \times 100}{\text{Absorbância do controle negativo}}$$

Foram realizados três experimentos independentes com as concentrações quadruplicadas. A partir do teste de MTT, foram obtidos os valores de CI_{50} (concentrações inibitórias de 50%) da Chalcona N9 para cada linhagem celular tumoral e definida a célula a ser utilizada no restante dos experimentos.

3.4. Determinação da potência citotóxica da N9

Para determinação do potencial citotóxico da chalcona N9, foi utilizada a linhagem celular de glioma humano (U-87 MG), através do ensaio de citotoxicidade celular (MTT), conforme protocolo descrito acima. Em placas de cultura de 96 poços, contendo 100 μL de meio de cultura DMEM, foram semeadas $2,5 \times 10^3$ células/poço. Após 24 horas de incubação, o meio de cultura foi substituído por meio contendo concentrações crescentes de N9 e dos quimioterápicos carmustina, cisplatina, citarabina e doxorrubicina (0,01 $\mu\text{g/mL}$ a 100 $\mu\text{g/mL}$). Após 48 horas, o meio de cultura foi retirado e meio de cultura contendo MTT foi adicionado e incubado por 3 horas à 37°C em atmosfera umidificada, contendo 5% CO_2 . Em seguida, o meio foi novamente removido, adicionou-se 100 μL de DMSO e a leitura da absorbância foi realizada por espectrometria. A partir do teste de MTT foram obtidas as CI_{50} para cada substância testada (com auxílio do software *graphpad prism 4*). Foram realizados três experimentos independentes com concentrações em triplicatas.

3.5. Avaliação do ciclo celular por citometria de fluxo

Visando avaliar o perfil do ciclo celular após o tratamento com a Chalcona N9, foram semeadas 3×10^5 células U-87 MG /poço em placas de cultura de 6 poços, contendo 1,5 mL de meio de cultura DMEM. Verificada a completa adesão das células, o meio de cultura foi retirado, as placas foram lavadas 2x com PBS e DMEM sem soro bovino fetal foi adicionado, para sincronização das células na fase G0 do ciclo celular. Após 24 horas, a Chalcona N9 (0,1 $\mu\text{g/mL}$ ou 1 $\mu\text{g/mL}$)

ou o veículo (DMSO 0,1% em meio) foi adicionado e incubado em estufa de CO₂ por 24 ou 48 hs. Decorridos os períodos de incubação, as células foram cuidadosamente coletadas, centrifugadas e permeabilizadas com tampão H (Triton X-100 0,05% - levemente hipertônico: 20 mM HEPES pH=7,2; 0,16 M NaCl; 1 mM EGTA), fixadas com a adição de paraformaldeído 2% e mantidas em gelo por 30 minutos. Em seguida, as células foram centrifugadas e ressuspensas em tampão H contendo 10 µg/mL de iodeto de propídio e 200 µg/mL de RNase A. Após 30 minutos no escuro, em temperatura ambiente, as amostras foram levadas ao citômetro de fluxo (FACSCAN - Becton-Dickinson, USA) equipado com um laser com excitação a 488 nm para análise. Cerca de 30.000 eventos (isto é, leitura de fluorescência, correspondente a 30.000 células) foram registrados para cada amostra (NUNEZ, 2001). Os dados foram analisados utilizando o software *Facsdiva 6*® e a porcentagem de células agrupadas em cada estágio foi determinada. Foram realizados de três a quatro experimentos independentes com as concentrações triplicadas.

3.6. Avaliação da expressão de proteínas que participam da modulação do ciclo celular

Com o intuito de verificar a expressão de proteínas que modulam o ciclo celular, uma população de 2×10^6 células U-87 MG foi semeada por placa de cultura de 96 x 21mm de diâmetro, contendo 10 mL de meio de cultura DMEM por 24 horas, para completa adesão. Decorrido esse período, o meio de cultura foi retirado, as placas foram lavadas 2x com PBS e DMEM sem soro foi adicionado para a sincronização das células na fase G₀ do ciclo celular. Após 24 horas, as células foram tratadas com a Chalcona N9 (0,1 µg/mL ou 1 µg/mL) ou veículo (DMSO 0,1%), e as placas foram incubadas em estufa de CO₂ por mais 24 horas.

3.6.1. Preparação dos extratos celulares

Após cada período de incubação, as amostras foram obtidas pela lise das células U-87 MG com uma solução contendo Tris-HCl (50 mM, pH 7.5), Triton X-100 (1%), NaCl (100 mM), EDTA (5 mM, pH 8.0), β-glicerolfosfato (40 mM), NaF (50 mM), ortovanadato de sódio (200 µM), Glicerol (5%) e inibidores de protease (PMSF, Leupetina e Aprotinina). Após coleta, as amostras foram centrifugadas a 13.000 rpm, por 10 min, a 4 °C e somente o sobrenadante foi utilizado para as

análises. As concentrações de proteínas por amostra foram determinadas segundo o método de Bradford (BRADFORD, 1976). Os extratos foram congelados em freezer - 70°C para posterior análise.

3.6.2. Western Blotting

As amostras de proteínas (10 µg) foram adicionadas ao tampão, contendo Tris 200 mM, glicerol 10%, SDS 2%, β-mercaptoetanol 2,75 mM e azul de bromofenol 0,04%, em seguida foram fervidas por 5 minutos. Posteriormente, as amostras e o marcador de peso molecular foram separados por gel SDS-PAGE (8-12%) e transferidas por eletrotransferência para membranas de nitrocelulose. Em seguida, as membranas foram incubadas em leite em pó desnatado (5%) diluído em TBS (do inglês, *Tris buffered saline*) por 1 hora à temperatura ambiente sob agitação e lavadas com TBS-T (Tween 20 a 0,05% em TBS) por 3x durante 5 minutos cada. Logo após, as membranas foram incubadas *overnight* a 4°C com anticorpos primários específicos para cada proteína diluídos em solução de bloqueio e então, incubadas com anticorpos secundários conjugados com peroxidase (monoclonais ou policlonais, 1:1000) por 1 hora. As bandas de proteínas foram visualizadas utilizando o sistema Supersignal[®]. Foram avaliadas as proteínas Ciclinas A, D1, D3 e E, CDK2 e CDK6 e β-actina.

3.7. Avaliação da Apoptose por citometria de fluxo através da incorporação da Anexina V-FITC e IP

Para determinação da externalização dos fosfolipídeos internos da membrana celular, um dos sinais iniciais de apoptose (KOOPMAN et al., 1994), 3×10^5 células U-87 MG /poço foram semeadas em placas de cultura de 6 poços, contendo 1,5 mL de meio de cultura DMEM. Após 24 horas, a Chalcona N9 (0,1 µg/mL ou 1 µg/mL) ou o veículo foram adicionados e as placas incubadas em estufa de CO₂ por 24 e 48 hs. Decorridos os períodos de incubação, o sobrenadante foi coletado (para avaliação das células em suspensão) e logo após, as células aderidas foram cuidadosamente coletadas por tripsinização. As duas suspensões (sobrenadante e células tripsinizadas) de cada amostra foram centrifugadas, ressuspensas e reunidas. Após, foram incubadas por 10 minutos, no escuro em temperatura ambiente, com Anexina V-FITC e iodeto de propídio e analisadas em citômetro de fluxo. Os dados foram analisados utilizando o software *Facsdiva*[®] e a porcentagem de células,

agrupadas em cada estágio: Q1 = células mortas – acima à esquerda (Anexina V-, IP+); Q2 = células em estágio de apoptose tardia – acima à direita (Anexina V+, IP+); Q3 = células não apoptóticas ou viáveis – abaixo à esquerda (Anexina V-, IP-); Q4 = células em estágio iniciais de apoptose – abaixo à direita (Anexina V+, IP-) (Figura 9; MATSURA et al., 2002). Foram realizadas de três a quatro avaliações em dois experimentos independentes.

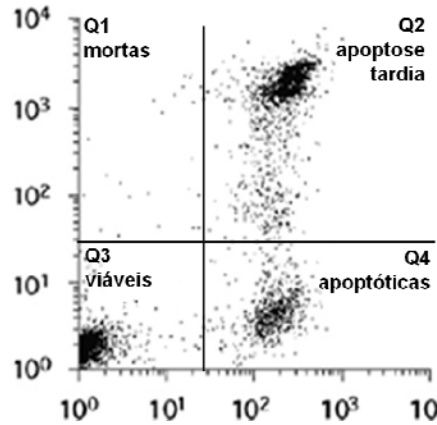


Figura 9. Gráfico de pontos obtido em citometria de fluxo após indução de apoptose e marcação das células com Anexina V-FITC e Iodeto de Propídeo. Os quadrantes representam: Q1 – células mortas (Anexina V-, IP+); Q2 – células em estágio de apoptose tardia (Anexina V+, IP+); Q3 – células não apoptóticas ou viáveis (Anexina V-, IP-); Q4 – células em estágio iniciais de apoptose (Anexina V+, IP-).

3.8. Determinação da Apoptose através da detecção da fragmentação do DNA

Com o intuito de investigar a morte celular por apoptose, foi verificada a fragmentação do DNA através da técnica de TUNEL (do inglês, *Terminal Deoxynucleotide Transferase dUTP NickEnd Labeling*) (KOCKX et al., 1998). Para isso, 3×10^5 células/poço foram semeadas em placas de cultura de 12 poços contendo 1 mL de meio de cultura DMEM e lamínulas de vidro de 13 mm de diâmetro (estéreis e previamente tratadas com poli-L-lisina por 1 h a 37°C). Após 24 horas do plaqueamento das células U87MG, N9 (0,1 µg/mL ou 1 µg/mL) ou veículo (DMSO 0,1%) foram adicionados nos respectivos poços e as placas foram incubadas em estufa de CO₂ por 24 e 48 horas. Após os

períodos de incubação, o meio foi removido e as lamínulas contendo as células foram fixadas em formaldeído 3,7% por 10 minutos a temperatura ambiente, e então permeabilizadas com Triton-X 0,05%. Para o bloqueio da peroxidase interna as lamínulas foram submetidas a uma solução de peróxido de hidrogênio (H_2O_2 , 30%) e metanol (1:10) durante 5 minutos, sucedida pela incubação com tampão de preparação diluído em PBS (1:10) por 5 minutos. Em seguida, as lamínulas contendo as células foram incubadas por 1 hora com o marcador *TdT* em estufa umidificada a 37°C. Nesta etapa, as células utilizadas como controle positivo foram incubadas com a mesma solução contendo o marcador e a enzima *TACS* nuclease. Após esse passo, as lamínulas foram incubadas com o tampão de interrupção da reação (1:10), seguido pelo enxágüe com PBS (2x) por 5 minutos. Para a detecção, as lamínulas foram incubadas com estreptavidina-HRP em PBS, por 10 minutos a 37°C e então lavadas 2x com PBS por 5 minutos. A seguir, as lamínulas foram coradas com DAB por 5 minutos e lavadas com água destilada. A contra coloração foi realizada com o corante verde de metila (1%) que foi então adicionado e permaneceu por 1 minuto sobre as lamínulas, com posterior lavagem em água destilada por 5 minutos. Em seguida, as lamínulas foram desidratadas com etanol a 95% por 5 minutos e com etanol 100% por mais 5 minutos. Por fim, as lamínulas foram montadas sobre lâminas de vidro e as fotos obtidas e analisadas com auxílio da câmera digital DS-5M-L1 (Nikon, Melville, NY, USA) conectada a um microscópio óptico (Nikon) em aumento de 400x. O índice de células apoptóticas foi determinado pela contagem e cálculo das porcentagens das células positivas em três campos randomizados para cada n ($n=3$).

3.9. Avaliação das características morfológicas de morte celular através de microscopia de fluorescência

Para a avaliação citomorfológica qualitativa de células apoptóticas, células U-87 MG (3×10^5 células/poço) foram semeadas sobre lamínulas de vidro de 20 mm de diâmetro, estéreis e previamente tratadas com poli-L-lisina por 1 h a 37°C, em placas de cultura de 6 poços contendo 1,5 mL de meio de cultura DMEM. Após 24 horas do plaqueamento das células, meio de cultura contendo a Chalcona N9 (0,1 $\mu\text{g/mL}$ ou 1 $\mu\text{g/mL}$) ou veículo (DMSO 0,1%) foi adicionado nos respectivos poços e as placas foram incubadas em estufa de CO_2 por 24 hs. Após esse período de incubação, o meio foi removido e as lamínulas

contendo as células foram fixadas em formaldeído 3,7% por 30 minutos a 4°C, e então permeabilizadas com Triton X-100 (0,1% em PBS) por 30 minutos a 25°C. Em seguida, as lamínulas contendo as células foram incubadas por 40 minutos, à temperatura ambiente com 100 µL de solução contendo 1% de faloidina conjugada com isotiocianato de fluoresceína (Faloidina-FITC) para a coloração dos filamentos de actina F e 0,05% de Hoeschst 33342 (1 mg/mL) para a coloração do núcleo. Decorridos esse tempo, as lamínulas foram lavadas 2x com PBS e imediatamente avaliadas com auxílio de microscópio invertido de fluorescência (Olympus CK40). Para a identificação citomorfológica qualitativa das células apoptóticas, foram observadas as características típicas de morte celular programada, tais como retração/condensação do citoplasma com redução do volume celular, desprendimento das células vizinhas e a fragmentação do núcleo (DANIAL e KORSMEYER, 2004).

3.10. Determinação do potencial de membrana mitocondrial ($\Delta\Psi_m$)

Com o objetivo de detectar variações no potencial de membrana mitocondrial (PMM) em células U-87 MG, após tratamentos com a Chalcona N9 as células foram submetidas a técnica citofluorimétrica com o cátion lipofílico JC-1 (*5,5',6,6'tetrachloro-1,1',3,3'-tetraethylbenzimidazol-carbocyanine iodide*) (COSSARIZA et al., 1993). Para este experimento, 1×10^5 células U-87 MG em 0,5 mL de meio de cultura DMEM foram semeadas em placas de 24 poços. Após a adesão das células, N9 (0,1 µg/mL ou 1 µg/mL) ou veículo (meio com DMSO 0,1%) foram adicionados nos respectivos poços e as placas foram incubadas em estufa de CO₂ por 2 ou 24 horas. Para cada ensaio, foi também incluído o controle positivo FCCP (*carbonyl cyanide p-(trifluoromethoxy) phenylhydrazone*, 10 mM) um translocador de prótons, que induz o colapso do potencial de membrana mitocondrial, sendo dissolvido em meio de cultura e incubado por 1 hora. Decorridos esses períodos de tempo, 1 µL/mL de JC-1 em meio de cultura foi adicionado nos poços de cada tratamento e incubado por 30 minutos em estufa em 37°C. Os poços foram lavados 3x com PBS, para remoção do fluoróforo não ligado, e as placas foram imediatamente levadas para leitura de emissão de fluorescência em leitor de placa (TECAN Infinite 200) ou fotografadas em microscopia de fluorescência (Olympus CK40). A determinação do potencial de membrana mitocondrial foi realizada através do cálculo da relação entre a fluorescência vermelha

sobre a verde: alta relação denota alto PMM, que é característico em células viáveis. A baixa relação entre as fluorescências indica um baixo PMM, típico de células em apoptose.

$$\text{Razão vermelha/verde} = \frac{\text{intensidade da fluorescência vermelha}}{\text{intensidade da fluorescência verde}}$$

3.11. Ensaio de clonogenicidade

Para o ensaio de clonogenicidade, 1×10^3 células U-87 MG em 1,5 mL de meio de cultura DMEM foram adicionadas por poço em placas de cultura de 6 poços. Após completa adesão, as células foram incubadas com N9 (0,1 $\mu\text{g/mL}$ ou 1 $\mu\text{g/mL}$) ou veículo (DMSO 0,1%) por 24 horas ou tratadas apenas com 1 $\mu\text{g/mL}$ da Chalcona N9 por 12, 24 e 48 horas. Ultrapassados os períodos de incubação, o meio de cultura contendo os tratamentos foi retirado, os poços lavados 2x com PBS e meio DMEM foi adicionado. O meio de cultura foi trocado a cada 3 dias. Após 10 a 15 dias, as células foram coradas com violeta cristal 0,5% (metanol/água, 1:1) e fixadas com paraformaldeído 4%. Agregados com mais de 50 células foram reconhecidos como colônia e classificados assim como sobreviventes. As colônias foram identificadas através da análise por microscopia, com três campos randomizados para cada n . O número de colônias dos tratamentos foi calculado em relação ao controle negativo (FRANKEN et al., 2006):

$$\text{Número de Colônias (\%)} = \frac{\text{número de colônias da amostra} \times 100}{\text{número de colônias do controle negativo}}$$

A imagem representativa das colônias após os tratamentos foi obtida através de câmara fotográfica acoplada ao microscópio invertido, em aumento de 5x ou através de fotografia macroscópica da placa de cultivo. Foram realizados três experimentos independentes com as concentrações triplicadas.

3.12. Ensaio Biológicos *in vivo*

3.12.1. Animais

Para os experimentos *in vivo* foram utilizados camundongos BALB/c fêmeas, com idade entre 6 a 8 semanas, pesando em média 20-25 g; camundongos C57BL/6 machos, com idade entre 6 a 8 semanas, pesando em média 25-30 g e camundongos *nude* (BALB/c *nu/nu*)

machos, com idade entre 6 a 8 semanas, pesando em média 20-25 g. Os camundongos BALB/c e os camundongos da linhagem C57BL/6 foram criados no Biotério do Laboratório de Farmacologia Experimental (LAFEX). Os camundongos *nude* foram adquiridos do Laboratório do Instituto de Pesquisas Energéticas e Nucleares (IPEN-USP). Todos os animais foram alojados em gaiolas plásticas, em temperatura ambiente controlada (21 ± 2 °C), com ciclo claro/escuro de 12 horas, recebendo dieta comercial e água *ad libitum* e mantidos em condições estéreis, no Biotério do Laboratório de Farmacologia Experimental (LAFEX), do Departamento de Farmacologia, CCB-UFSC. O protocolo experimental foi aprovado pelo Comitê de Ética na Utilização de Animais (CEUA) da Universidade Federal de Santa Catarina, registrado com o número PP00533/CEUA de 2010.

3.12.2. Modelo de Tumor Ascítico de Ehrlich

Neste experimento, células de tumor ascítico de Ehrlich foram inoculadas no dia zero (5×10^6 células em 200 μ L de salina por animal) por via intraperitoneal (i.p.) em camundongos BALB/c fêmeas (KVIECINSKI et al., 2008; DA SILVA, CHAAR E YANO, 2009). Os animais (n de 5 a 6 por grupo) foram tratados diariamente com N9 pelas vias intraperitoneal (1 mg/Kg), intravenosa (i.v.; 1 mg/Kg) ou oral (v.o.; 30 ou 100 mg/Kg) durante 9 dias, iniciando 24 horas após a inoculação das células de tumor ascítico. Animais controle receberam somente veículo (NaCl 0,9%). Os animais foram divididos aleatoriamente em grupos e em cada gaiola havia animais de todos os grupos. No momento da inoculação das células tumorais e para os tratamentos, os animais foram anestesiados com isoflurano. O volume tumoral foi determinado através da medida direta do peso dos animais, avaliados diariamente até o 10º dia. Após o término dos tratamentos, foi avaliado o tempo médio de sobrevivência (sobrevida) para cada grupo, com base na porcentagem de dias de sobrevivência dos animais, comparados com o grupo controle (LEE et al., 2003).

3.12.3. Modelo de Melanoma Murino

Células de melanoma da linhagem B16-F10 foram inoculadas no dia zero (1×10^6 células em 100 μ L de meio de cultura por animal) por via subcutânea (s.c.) no dorso de camundongos C57BL/6 machos (CABELLO et al., 2009; SALINAS-JAZMÍN, FUENTE e JAIMEZ, 2010). Os animais (n de 6-8 por grupo) foram tratados diariamente com

N9 pela via i.p. (3, 10 ou 30 mg/Kg) iniciando no 7º dia após a inoculação das células, quando os tumores apresentaram massa sólida palpável. Animais controle receberam somente veículo (NaCl 0,9%). Os animais foram divididos aleatoriamente em grupos e em cada gaiola havia animais de todos os grupos. No momento da inoculação das células tumorais e para os tratamentos, os animais foram anestesiados com isoflurano. Os volumes dos tumores foram medidos com auxílio de um paquímetro e estimados de acordo com a fórmula: volume do tumor (cm^3) = largura² x comprimento x 0,5 (LEE et al., 2003). O volume da massa tumoral sólida e o peso corporal dos animais foram medidos a cada 3 dias durante o período do tratamento de 15 dias. Após o término dos tratamentos, foi avaliado o tempo médio de sobrevivência (sobrevida) para cada grupo, com base na percentagem de dias de sobrevivência dos animais, comparados com o grupo controle.

3.12.4. Modelo Xenográfico de Glioblastoma Multiforme

Células de glioblastoma humano, U-87 MG foram inoculadas no dia zero ($2,5 \times 10^6$ células em 100 μL de meio de cultura/animal) por via s.c. no flanco direito dos camundongos *nude* machos (REGINA et al., 2008). Os animais (n de 10 por grupo) foram tratados diariamente com o composto N9 pela via i.p. (10 ou 30 mg/Kg) iniciando no 7º dia após a inoculação das células, quando os tumores apresentaram massa sólida palpável. Animais controle receberam somente veículo (NaCl 0,9%). Os animais foram divididos aleatoriamente em grupos e em cada gaiola havia animais de todos os grupos. No momento da inoculação das células tumorais e para os tratamentos, os animais foram anestesiados com isoflurano. Os volumes dos tumores foram medidos com auxílio de um paquímetro e estimados de acordo com a fórmula: volume do tumor (cm^3) = largura² x comprimento x 0,5 (HSU et al., 2009). O volume da massa tumoral sólida e o peso corporal dos animais foram avaliados a cada 2 dias durante o tratamento, num período total de 21 dias.

3.13. Drogas e Reagentes

DMEM (*Dulbecco's Modified Eagle's Medium*), soro fetal bovino, L-glutamina, HEPES, Tripsina EDTA e penicilina/estreptomicina foram adquiridos da Gibco, Invitrogen (Carlsbad, CA, USA). Anexina V-FITC, Faloidina-FITC e RNase A foram obtidos da Molecular Probes, Invitrogen (Carlsbad, CA, USA). MTT (*3-[4,5-dimethylthiazol-2-yl]-2,5-diphenyltetrazolium bromide*),

estaurosporina, poli-L-lisina, Hoeschst 33342, FCCP (*carbonyl cyanide p-(trifluoromethoxy) phenylhydrazone*), Tris-HCl, NaF, Tween-20, bicarbonato de sódio, β -glicerolfosfato, dimetilsulfóxido (DMSO), EGTA, BSA, PMSF, SDS, β -mercaptoetanol, ortovanadato de sódio, iodeto de propídio e os inibidores de proteases (pepstatina A, leupeptina e aprotinina) foram obtidos da Sigma-Aldrich (Saint Louis, MO, USA). O marcador de peso molecular e a membrana de nitrocelulose foram obtidos da BioRad (Philadelphia, PA, USA). Glicose, bicarbonato de sódio, cloreto de sódio, metanol, Triton X-100, paraformaldeído, EDTA, hidróxido de sódio, peróxido de hidrogênio, cloreto de cálcio e glicerol foram adquiridos da Vetec (Rio de Janeiro, Brasil). Os corantes azul bromofenol e violeta cristal foram adquiridos da Nuclear (São Paulo, Brasil). O kit para detecção de apoptose por TUNEL (*Terminal Deoxynucleotide Transferase dUTP NickEnd Labeling*) foi adquirido da Trevigen (Gaithersburg, MD, USA), e JC-1 (*5,5',6,6'-tetrachloro-1,1',3,3'-tetraethylbenzimidazol-carbocyanine iodide*) da GenScript Corporation (Piscataway, NJ, USA). O sistema de detecção SuperSignal foi obtido da Pierce, Thermo Scientific (Rockford, IL, USA) e Bradford foram adquiridos da Bioagency Biotecnologia (São Paulo, Brasil). Os anticorpos primários específicos e anticorpos secundários conjugados com peroxidase foram obtidos da Cell Signaling (Danvers, MA, USA). Os antineoplásicos carmustina (Bristol-Myers Squibb), cisplatina (Bergamo), citarabina (Pfizer) e doxorrubicina (Zodiac) foram doados pelo Centro de Pesquisas Oncológicas (CEPON) de Santa Catarina. O isoflurano foi adquirido da Abbott Laboratórios do Brasil (São Paulo, Brasil). As placas, tubos cônicos e as garrafas para os experimentos e cultivo das células foram adquiridas da TPP (Trasadingen, Switzerland). Para minimizar a interferência do solvente nos experimentos *in vitro*, várias soluções estoques foram preparadas, de forma que a quantidade de DMSO presente nos experimentos foi sempre a mesma (0,1%), independentemente da concentração da Chalcona N9 utilizada. Para os ensaios *in vivo*, a Chalcona N9 foi umectada em etanol 5% e suspensa em solução de NaCl 0,9% (salina).

3.14. Análise estatística

Os resultados são apresentados como a média \pm erro padrão da média (EPM). As diferenças estatísticas entre os grupos experimentais foram detectadas com análise de variância (ANOVA) seguida pelo Teste de Dunnett, quando apenas os tratamentos foram analisados. Para

comparar dois ou mais grupos, juntamente com a variável do tempo, ANOVA de duas vias, seguida pelo pós-teste de Bonferroni foi utilizado. Valores de P menores que 0,05 ($*P < 0,05$) foram considerados como indicativos de significância. As curvas de sobrevida relativas a cada variável foram estimadas pelo método de Kaplan-Meier. As CI_{50} (concentração necessária para inibir 50% do crescimento celular) foram apresentadas como médias geométricas, acompanhadas de seus respectivos intervalos de confiança para 95% (FLEMING et al., 1972). As análises estatísticas foram obtidas a partir dos experimentos individuais usando o programa GraphPad (San Diego, CA, USA).

4. RESULTADOS

4.1. Efeito citotóxico da Chalcona N9 em linhagens celulares

Inicialmente, investigou-se o possível efeito citotóxico da Chalcona N9 sobre as seguintes linhagens de células tumorais: A549 (carcinoma de pulmão humano), B16-F10 (melanoma de camundongo), C6 (glioma de rato), DU 145 (carcinoma de próstata humano), MCF7 (carcinoma de mama humano) e U-87 MG (glioblastoma humano) e em uma linhagem imortalizada de fibroblastos de camundongos (L929). Para avaliar o efeito da Chalcona N9 sobre a viabilidade celular foi utilizado o teste do MTT, que mede a atividade da desidrogenase mitocondrial, através da redução do 3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide) em formazan, nas células viáveis (MOSMANN, 1983). A Figura 10 demonstra os resultados obtidos para a viabilidade celular dessas diferentes linhagens celulares após a incubação da Chalcona N9 durante 48 horas. Como pode ser observado, apenas na linhagem celular MCF7 a menor concentração testada (0,01 µg/mL) reduziu significativamente a porcentagem de células viáveis, enquanto nas linhagens B16-F10 e C6 a menor concentração inibitória foi 0,1 µg/mL. Já para as linhagens DU 145 e U-87 MG a concentração efetiva da Chalcona N9 sobre a redução da viabilidade celular variou entre 1 e 100 µg/mL, enquanto que para as linhagens A549 e L929 a faixa inibitória foi de 10 a 100 µg/mL. A concentração inibitória máxima da Chalcona N9 para todas as linhagens foi de 100 µg/mL, com inibições de 55 a 89% da viabilidade celular (Figura 10, Tabela 1). Os valores da inibição máxima obtida com a Chalcona N9 nas linhagens celulares estão apresentados na Tabela 1 e variaram de $58 \pm 4\%$ a $90 \pm 1\%$. O valor médio estimado para CI_{50} (acompanhado pelo intervalo de confiança de 95%) está representado na Tabela 1. Com base nos valores de CI_{50} obtidos pode-se estabelecer uma ordem quanto à sensibilidade das células frente a exposição a Chalcona N9, conforme segue: MCF7 > DU 145 > C6 > U-87 MG > B16-F10 > A549 > L929. Embora as células tumorais MCF7 tenham sido mais sensíveis entre todas aquelas testadas, a linhagem celular de glioblastoma humano (U-87 MG) foi escolhida para os experimentos posteriores, pois além de ser sensível (CI_{50} 0,72 µg/mL) frente a Chalcona N9, há poucos trabalhos envolvendo este tipo celular utilizando chalconas como potenciais antitumorais.

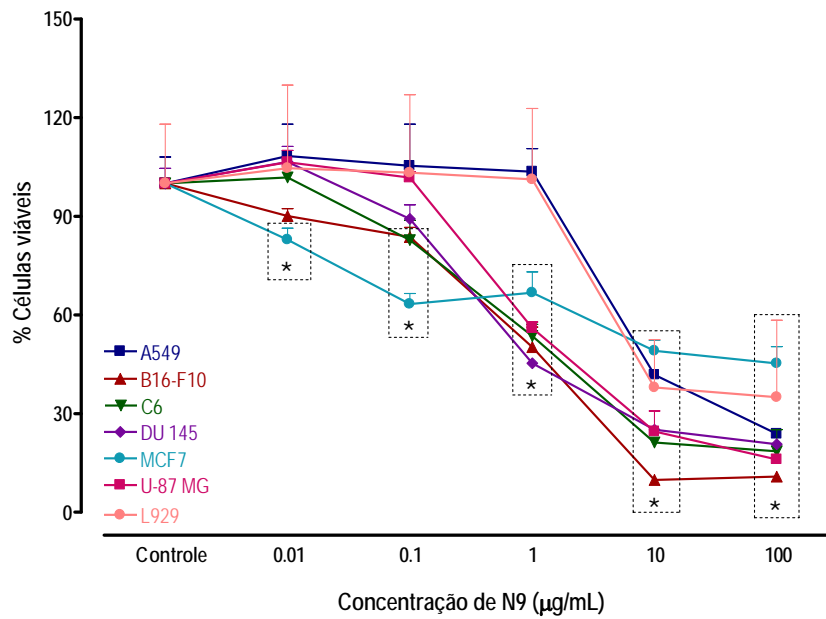


Figura 10. Efeito da Chalcona N9 sobre a viabilidade de diferentes linhagens celulares. No ensaio de citotoxicidade (teste do MTT), $2,5 \times 10^3$ células foram plaqueadas em placas de 96 poços e após 24 horas as células foram incubadas com concentrações crescentes de N9 (0,01 - 100 µg/mL; 37°C, 5% CO₂) por 48 horas. O percentual de células viáveis, considerando o controle como 100% (tratadas apenas com o veículo), foi obtido através da densidade óptica decorrente da oxidação metabólica do MTT. A redução do MTT produz um composto insolúvel em água, o formazan, que solubilizado em DMSO, e medido por espectrofotometria, é diretamente proporcional à atividade metabólica e ao número de células viáveis. Cada ponto representa a média ± Erro Padrão da Média de três experimentos independentes com as concentrações quadruplicadas. * $P < 0,05$ comparados com o controle da mesma linhagem celular (ANOVA de uma via seguida pelo Teste de Dunnett).

Tabela 1. Valores de CI_{50} e seus respectivos intervalos de confiança obtidos para a Chalcona N9, utilizada nos testes de viabilidade celular ($n=12$) das linhagens A549, B16-F10, C6, DU 145, L929, MCF7 e U-87 MG e a porcentagem da inibição máxima (IMax) obtida com a Chalcona N9 .

Linhagem Celular	CI_{50} ($\mu\text{g/mL}$)	IMax (%)
MCF7	0,08 (0,02 – 0,38)	58 \pm 4
DU 145	0,37 (0,25 – 0,54)	81 \pm 2
C6	0,69 (0,42 – 1,13)	83 \pm 2
U-87 MG	0,72 (0,53 – 0,99)	89 \pm 1
B16-F10	0,99 (0,67 – 1,47)	90 \pm 1
A549	2,02 (1,02 – 4,00)	78 \pm 2
L929	3,75 (1,47 – 9,55)	68 \pm 5

4.2. Determinação da potência citotóxica da N9

A linhagem celular tumoral de glioblastoma humano U-87 MG foi a eleita para dar continuidade aos estudos de investigação da atividade antitumoral da N9. Para comparar a potência da Chalcona N9 com alguns quimioterápicos tradicionalmente utilizados na clínica, determinamos a citotoxicidade (MTT) sobre a linhagem U-87 MG empregando os antitumorais carmustina, cisplatina, citarabina e doxorrubicina. Como pode ser observado na Figura 11, apenas a doxorrubicina reduziu significativamente a porcentagem de células viáveis, na menor concentração testada (0,01 $\mu\text{g/mL}$). Para a cisplatina e a citarabina, a menor concentração inibitória foi de 0,1 $\mu\text{g/mL}$ sobre a viabilidade das células U-87 MG. Já para a carmustina, a concentração efetiva para reduzir a viabilidade da linhagem de glioblastoma humano, variou entre 1 e 100 $\mu\text{g/mL}$. Este mesmo comportamento foi observado para a Chalcona N9, que reduziu a viabilidade das células U-87 MG quando utilizada as concentrações de 1 a 100 $\mu\text{g/mL}$. A redução máxima da viabilidade das células de glioblastoma humano foi obtida na concentração de 100 $\mu\text{g/mL}$ para todas as substâncias testadas, com a média de inibições entre 44 a 84% da viabilidade celular (Figura 11, Tabela 2), durante 48 horas de incubação. O valor médio para a concentração inibitória (CI_{50}) dos antitumorais, além da Chalcona N9, está descrito na Tabela 2. A carmustina apresentou o maior valor de CI_{50} , enquanto a doxorrubicina o menor valor de CI_{50} sobre as células U-87 MG. De acordo com os valores da CI_{50} apresentados, a sensibilidade da linhagem de glioblastoma humano diante das substâncias testadas,

pode ser ordenada como segue: doxorubicina > citarabina > chalcona N9 > cisplatina > carmustina. Os valores da inibição máxima das drogas na linhagem de glioblastoma humano U-87 MG estão também apresentados na Tabela 2 e variaram de $48 \pm 5\%$ a $89 \pm 1\%$.

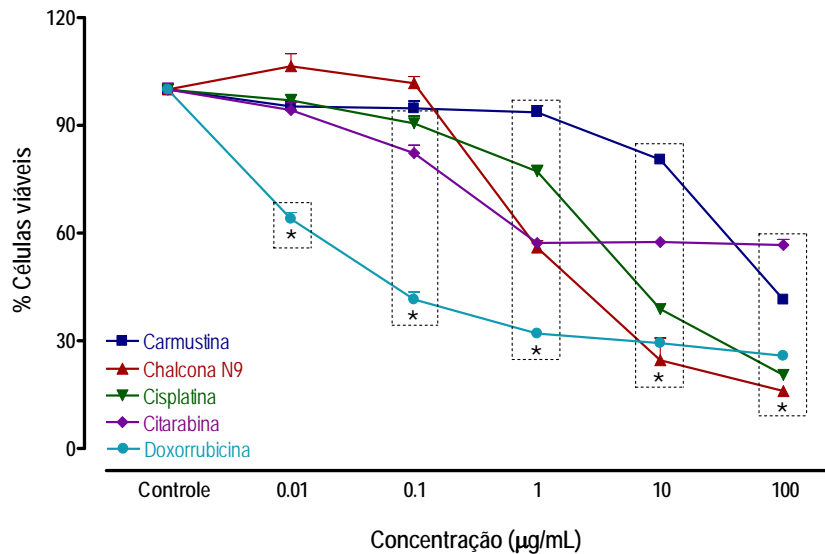


Figura 11. Efeito da Chalcona N9 e de alguns antitumorais sobre a viabilidade celular do glioblastoma humano. No teste do MTT, $2,5 \times 10^3$ células (U-87 MG) foram plaqueadas em placas de 96 poços e após 24 horas as células foram incubadas com concentrações crescentes das drogas (0,01 - 100 µg/mL; 37°C, 5% CO₂) por 48 horas. O percentual de células viáveis, considerando o controle como 100% (tratadas apenas com o veículo), foi obtido através da densidade óptica decorrente da oxidação metabólica do MTT. A redução do MTT produz um composto insolúvel em água, o formazan, que solubilizado em DMSO, e medido por espectrofotometria, é diretamente proporcional à atividade metabólica e ao número de células viáveis. Cada ponto representa a média ± Erro Padrão da Média de três experimentos independentes com as concentrações quadruplicadas. * $P < 0.05$ comparados com o controle da mesma substância testada (ANOVA de uma via seguida pelo teste de Dunnet).

Tabela 2. Valores de CI_{50} e seus respectivos intervalos de confiança obtidos para os antitumorais utilizados nos testes de viabilidade celular ($n=12$) sobre as células de glioblastoma multiforme U-87 MG e a porcentagem da inibição máxima (IMax) obtida nessa linhagem.

Droga	CI_{50} ($\mu\text{g/mL}$)	IMax (%)
Doxorrubicina	0,07 (0,04 – 0,11)	81 \pm 2
Citarabina	0,14 (0,09 – 0,24)	48 \pm 5
Chalcona N9	0,72 (0,53 – 0,99)	89 \pm 1
Cisplatina	3,44 (2,73 – 4,35)	81 \pm 2
Carmustina	41,88 (26,16 – 67,07)	62 \pm 3

4.3. Atividade da Chalcona N9 sobre a progressão do ciclo celular e indução de apoptose

4.3.1. Avaliação do ciclo celular por citometria de fluxo

Após a verificação do potencial citotóxico da N9, buscamos investigar se a linhagem U-87 MG tratada com a Chalcona N9 apresentaria alteração na progressão do ciclo celular. Para isto, tratamos as células com Chalcona N9 (0,1 e 1 $\mu\text{g/mL}$) por um período de 24 a 48 horas e, logo após, submetemos as células a marcação com fluoróforo iodeto de propídeo (IP) e análise pela técnica de citometria de fluxo. Como o IP intercala nos pares de base da dupla fita de DNA, a intensidade da fluorescência resultante da marcação nuclear é diretamente proporcional ao conteúdo de DNA de cada célula. No histograma obtido por este método (Figura 12A), o conteúdo de DNA está representado sobre o eixo X, enquanto o número de células é mostrado sobre o eixo Y. Para um histograma da distribuição típica do conteúdo de DNA (Figura 12A), o primeiro pico representa a quantidade de células em G1 e o segundo, células nas fases G2/M, que correspondem às células com conteúdo de DNA de 2N e 4N, respectivamente. Células na fase S que possuem o conteúdo de DNA entre 2N e 4N, estão distribuídas na depressão entre os dois picos (NUNEZ, 2001). Por meio da avaliação do ciclo celular obtivemos os resultados representados na Figura 12B e 12C. Podemos observar que nas células tratadas por 24 horas com a Chalcona N9 (0,1 a 1 $\mu\text{g/mL}$) não há diferenças entre as porcentagens do conteúdo de DNA (medida direta da fase do ciclo em que se encontra cada célula), quando comparadas com as células controle (Figura 12B). Similarmente, em células tratadas com 0,1 $\mu\text{g/mL}$ da Chalcona N9 por 48 horas não houve

diferença em relação ao perfil do ciclo celular em comparação ao grupo controle (Figura 12C). No entanto, uma variação no perfil do histograma foi observada em células tratadas por 48 horas com 1 $\mu\text{g/mL}$ da Chalcona N9 (Figura 12C). O perfil do ciclo das células tratadas neste período de tempo apresentou-se discretamente alterado, com um aumento na população das células na fase G1 e/ou transição G1/S e redução no número de células detectadas na fase S e G2/M do ciclo celular (Figura 12C).

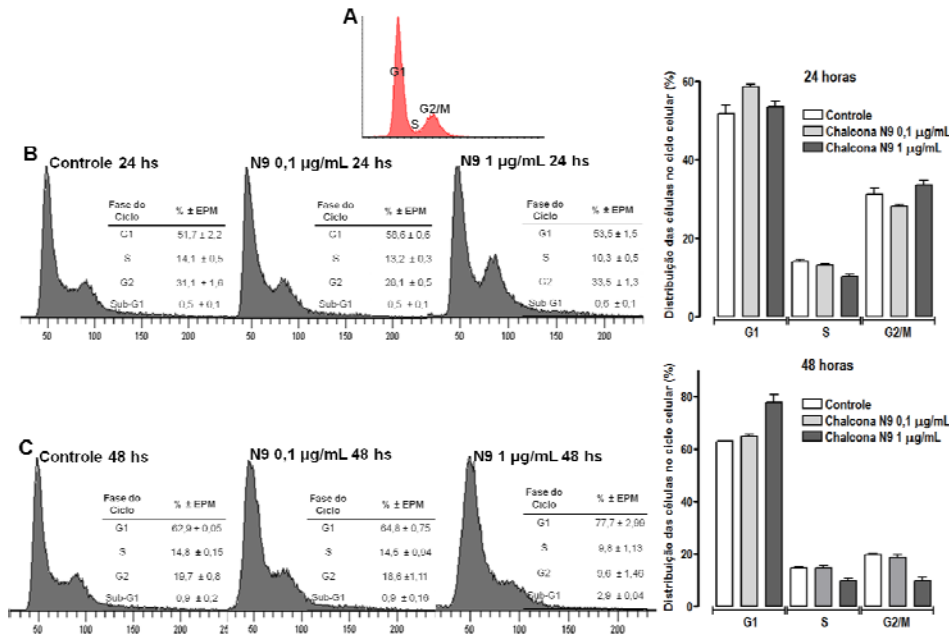


Figura 12. Avaliação do ciclo celular por citometria de fluxo. **A.** Histograma ilustrativo do conteúdo de DNA indicando as fases do ciclo celular correspondentes. **B e C.** Histograma da determinação do conteúdo de DNA da linhagem U-87 MG em citometria de fluxo. As células U-87 MG foram tratadas por 24 horas (**B**) e 48 horas (**C**) com meio de cultura adicionado de veículo (controle) ou a Chalcona N9 nas concentrações de 0,1 µg/mL ou 1 µg/mL. Após os tratamentos, as células foram coletadas e marcadas com iodeto de propídeo e então analisadas por citometria de fluxo. Nos gráficos, as barras representam a média ± EPM. Cada histograma é representativo de três a quatro experimentos.

4.3.2. Avaliação da expressão de proteínas que participam da modulação do ciclo celular

Visando avaliar a expressão de proteínas do ciclo celular da linhagem tumoral U-87 MG, tratadas com veículo ou Chalcona N9 por 24 horas, a metodologia de *western blotting* foi empregada. Neste sentido, foram investigadas as proteínas que participam do controle da replicação celular, como Ciclinas A, D1/D2, E, CDK2 e CDK6, e a proteína β -actina utilizada como controle interno das amostras. Como pode ser observado na Figura 13, a Chalcona N9 foi capaz de interferir de modo significativo, na expressão da CDK2 apenas na concentração de 1 $\mu\text{g/mL}$ da Chalcona N9, quando comparada ao seu controle. Entretanto, a expressão da CDK6 foi significativamente reduzida, nas duas concentrações da Chalcona N9 utilizadas. Da mesma maneira, as concentrações de 0,1 $\mu\text{g/mL}$ e 1 $\mu\text{g/mL}$ de Chalcona N9 reduziram de maneira significativa a expressão das Ciclinas A, E e D1. Todavia, a Chalcona N9 não foi capaz de interferir de modo significativo na expressão da Ciclina D3 (Figura 13), quando comparadas ao grupo controle.

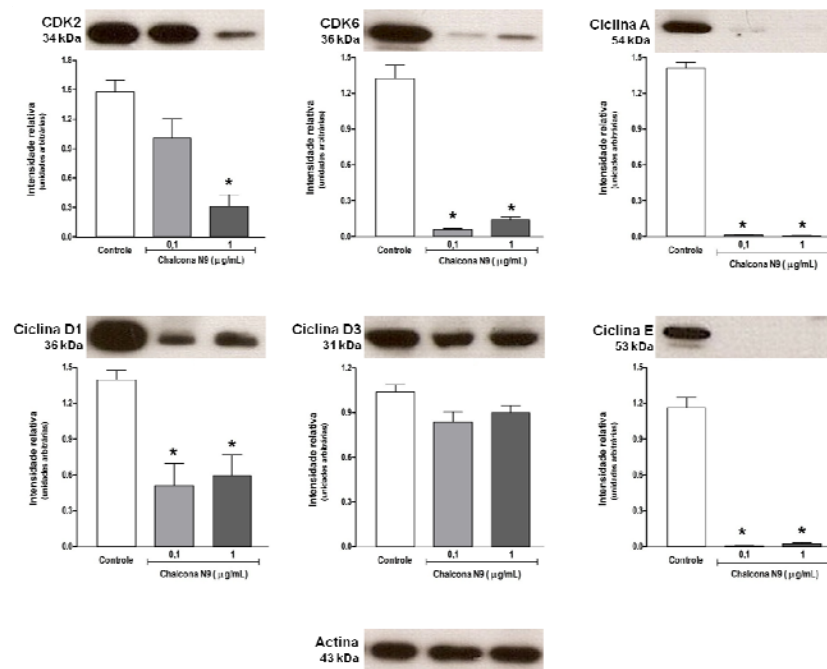


Figura 13. Efeito da Chalcona N9 sobre a expressão de proteínas do ciclo celular. As células U-87 MG foram tratadas com N9 (0,1 µg/mL ou 1 µg/mL) ou veículo (DMSO 0,1%) por 24 horas e então coletadas e lisadas para análise por western blotting. Cada imagem do blot é representativa de três experimentos independentes. Os dados da densitometria indicam a intensidade relativa da banda com relação a actina. Os valores são expressos como Média ± Erro Padrão da Média de três experimentos independentes. * $P < 0.05$ versus controle (ANOVA de uma via seguida pelo Teste de Dunnet).

4.3.3. Avaliação de Apoptose por citometria de fluxo através da incorporação da Anexina V-FITC e IP

Para quantificar a morte celular por apoptose procuramos adotar um método rápido e de fácil execução, permitindo que se obtivesse um número razoável de informações a respeito de uma grande população de células e que permitisse distinguir células apoptóticas de células necróticas. Atendendo a estes requisitos, elegemos a marcação das células por iodeto de propídeo (IP) e Anexina V-FITC seguida da avaliação por citometria de fluxo. Uma vez que o IP é permeável somente em células onde a integridade da membrana (juntamente com o conteúdo citosólico) foi perdida, este marcador é utilizado para

evidenciar os fenômenos típicos da morte por necrose, enquanto que células marcadas apenas com Anexina V-FITC indicam morte apoptótica. Já as células marcadas com ambos os fluoróforos representam a porcentagem de células nos estágios finais de apoptose e coincidentes com a morte por necrose (ZWAAL e SCHROIT, 1997).

Como é possível observar na Figura 14A, células U-87 MG tratadas com a Chalcona N9 na concentração de 0,1 µg/mL pelo período de 24 horas apresentaram um perfil de marcação semelhante ao grupo controle. No entanto, células tratadas com N9 na concentração de 1 µg/mL, pelo mesmo período de tempo, apresentaram aumento significativo na marcação com Anexina V-FITC (quadrante Q4; $12,0 \pm 1,7\%$), comparadas com o grupo controle ($2,6 \pm 0,2\%$), evidenciando morte por apoptose (Figura 14A – Gráfico). Ainda, foi observado que 5,1% ($\pm 0,9$) das células estão no quadrante da marcação apenas com IP (Q1) e são classificadas como células mortas. Em 16,7% ($\pm 1,3$) das células foi observado apoptose tardia, evidenciada pela fluorescência de ambos os marcadores (quadrante Q2). O restante da população das células U-87 MG tratadas com N9 (1 µg/mL, 24 h) ($66,3 \pm 3,5\%$) foram consideradas células viáveis, pois não exibiram marcação fluorescente (quadrante Q3). Já nas células tratadas com a Chalcona N9 por 48 horas, na concentração 0,1 µg/mL, o número de células apoptóticas (quadrante Q4) aumentou com relação àquelas tratadas por 24 horas, na mesma concentração. Como pode ser observado na Figura 14B, o grupo tratado com 0,1 µg/mL da Chalcona N9 apresentou aumento significativo no número de células apoptóticas (Q4 – $41,1 \pm 1,9\%$), comparadas ao mesmo quadrante das células U-87 MG do grupo controle. Igualmente significativa foi o aumento de células apoptóticas quando a concentração de 1 µg/mL da Chalcona N9 foi utilizada (Figura 14B – Gráfico). A porcentagem de células marcadas apenas com Anexina V-FITC foi de $55,9 \pm 1,5\%$, representado no quadrante Q4, indicando as células U-87 MG em estágios iniciais de apoptose.

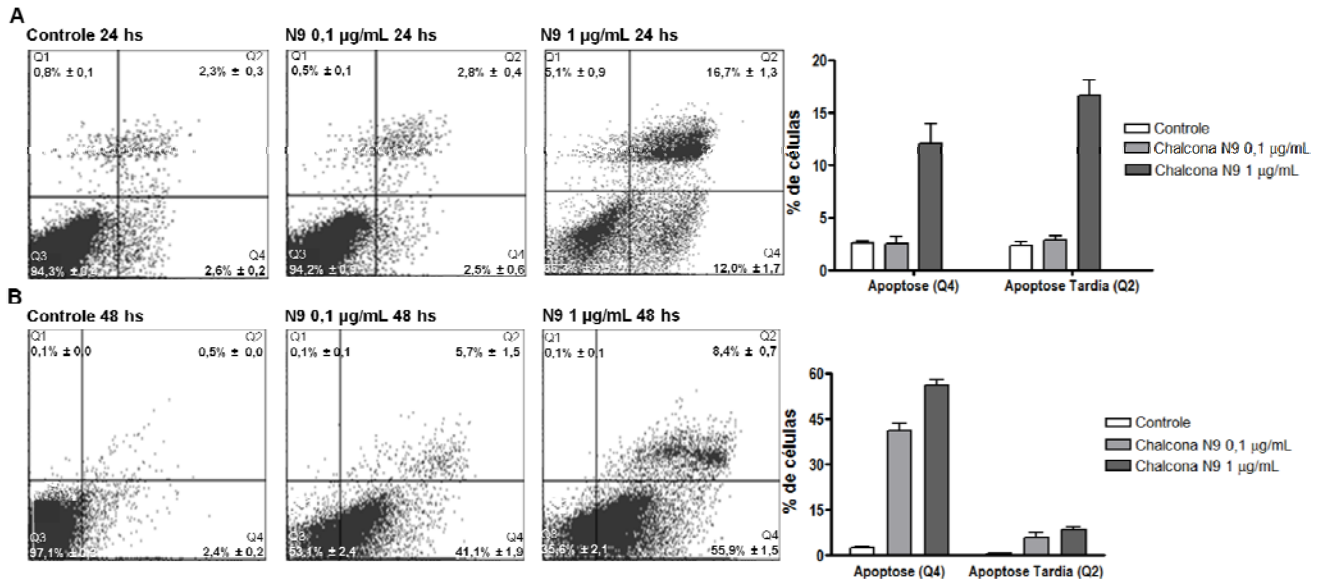


Figura 14. Avaliação da morte celular através da marcação com Anexina V-FITC e IP em citometria de fluxo. As células U-87 MG foram tratadas por 24 horas (A) ou 48 horas (B) com meio de cultura adicionado de veículo (controle) ou com a Chalcona N9 nas concentrações de 0,1 µg/mL ou 1 µg/mL. Após os tratamentos, as células foram coletadas e marcadas com Anexina V e Iodeto de Propídeo e analisadas por citometria de fluxo. Os quadrantes representam: Q1 – células mortas (Anexina V-, IP+); Q2 – células em estágio de apoptose tardia (Anexina V+, IP+); Q3 – células não apoptóticas ou viáveis (Anexina V-, IP-); Q4 – células em estágio iniciais de apoptose (Anexina V+, IP-). Nos gráficos, as barras representam a média da porcentagem ± EPM de três a quatro avaliações de dois experimentos independentes. Os gráficos representam a porcentagem de células apoptóticas, determinados pelos quadrantes Q4 correspondentes a cada grupo.

4.3.4. Determinação de Apoptose através da detecção da fragmentação do DNA

Para caracterizar a apoptose evidenciando outro marcador celular optamos em utilizar a técnica de TUNEL, que detecta DNA fragmentado *in situ*, etapa que ocorre próxima ao passo final do processo apoptótico. Como pode ser observado na Figura 15A, as células tratadas por 24 horas com a Chalcona N9 na concentração de 0,1 µg/mL não apresentaram significante marcação do núcleo pela técnica do TUNEL, ou seja, neste grupo tratado por 24 horas não foi evidenciada uma porcentagem significante de células apoptóticas ($13,70 \pm 11,87$). Diferentemente, nas células tratadas por 24 horas com o composto Chalcona N9 na concentração de 1 µg/mL, foi observado um número significante de células em apoptose ($60,33 \pm 27,87$), comparadas ao controle. De modo esperado, foi observado que nas células tratadas com o controle positivo para DNA fragmentado a porcentagem de células em apoptose foi significativamente alta para os períodos de tratamento. O tratamento por 48 horas com a Chalcona N9 demonstrou ser efetivo em induzir a apoptose nas células U-87 MG (Figura 15B), com aumento expressivo na porcentagem de células apoptóticas quando comparadas ao seu grupo controle. As duas concentrações da Chalcona N9, 0,1 µg/mL e 1 µg/mL, apresentaram 39,14% ($\pm 20,86$) e 69,41% ($\pm 7,89$), de células em apoptose, respectivamente.

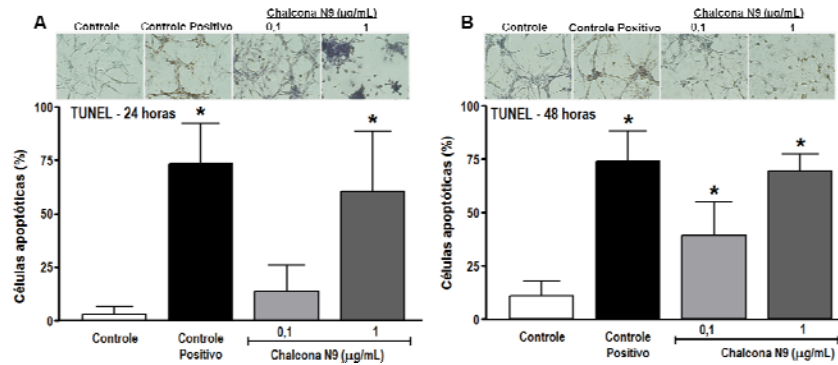


Figura 15. Avaliação da morte celular pelo ensaio de TUNEL. As células U-87 MG foram tratadas por 24 horas (A) e 48 horas (B) com meio de cultura adicionado de veículo (controle) ou a Chalcona N9 nas concentrações de 0,1 µg/mL ou 1 µg/mL. Após os tratamentos, as células foram fixadas e submetidas aos marcadores *TdT*, *TACS* e estreptavidina-HRP e analisadas por microscopia. O índice de células apoptóticas foi determinado pela contagem e cálculo das porcentagens das células positivas em três campos randomizados para cada *n*. Nos gráficos, as barras representam a média ± EPM. **P* < 0.05 comparados com o controle (ANOVA de uma via seguida pelo teste de Dunnett). As fotomicrografias são representativas de cada grupo.

4.3.5. Avaliação das características morfológicas de morte celular através de microscopia de fluorescência

Para a identificação citomorfológica qualitativa das células apoptóticas, por meio da microscopia de fluorescência, utilizamos marcadores fluorescentes para o citoplasma (faloidina conjugada ao FITC, de cor verde) e para o núcleo (Hoechst 33342, de cor azul), que permitem a visualização estrutural das células. De acordo com as fotomicrografias representadas na Figura 16 (A e B), pode-se observar que as células U-87 MG tratadas com a Chalcona N9 na concentração de 0,1 µg/mL não exibiram alteração nas características morfológicas, em comparação às células controle. De modo diferente, as células submetidas ao tratamento com 1 µg/mL de N9 apresentaram alterações visíveis na morfologia, tais como a redução do volume celular, condensação do citoplasma e descolamento das células vizinhas, evidenciadas pela marcação com faloidina (Figura 16A). Além disso, estas células apresentaram fragmentação do núcleo e condensação da

cromatina, observados pela marcação do corante fluorescente Hoechst 33342 (Figura 16B, aumento de 40x).

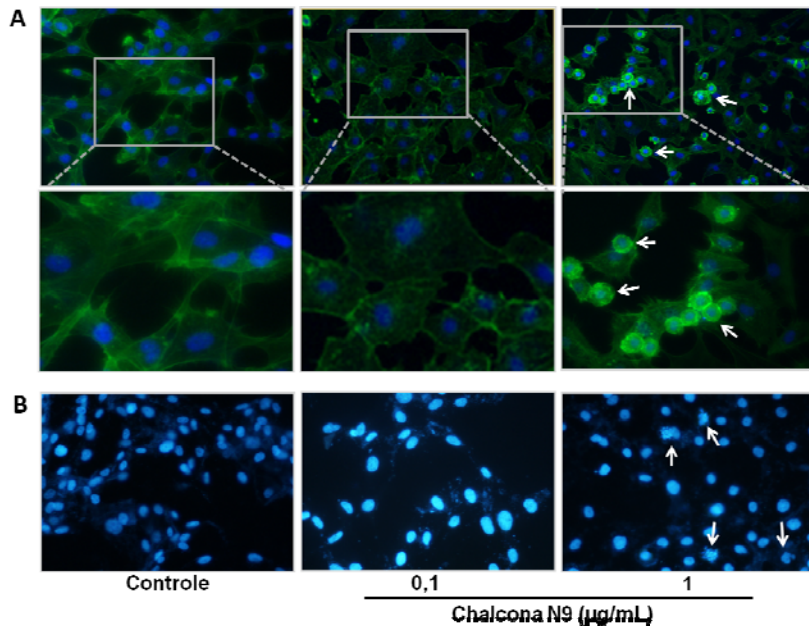
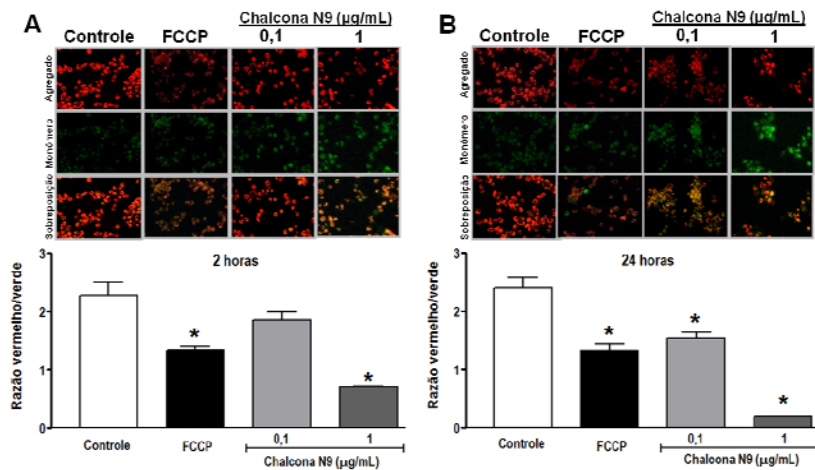


Figura 16. Análise citomorfológica qualitativa de células apoptóticas após tratamento com a Chalcona N9. As células U-87 MG foram tratadas por 24 horas com meio de cultura adicionado de veículo (controle) ou N9 nas concentrações de 0,1 µg/mL ou 1 µg/mL. **A.** Após os tratamentos, as células foram marcadas com Hoechst 33342 (núcleo) e faloidina (actina) e observadas sob microscopia de fluorescência. Imagens capturadas com auxílio de objetiva com aumento de 20x (parte superior) e 40x (inserto inferior). As setas indicam a condensação do citoplasma, nas células tratadas com 1 µg/mL de N9. **B.** Após os tratamentos, as células foram marcadas com Hoechst (núcleo) e observadas sob microscopia de fluorescência. Imagens capturadas com auxílio de objetiva com aumento de 40x. As setas indicam o núcleo apoptótico (fragmentado), nas células tratadas com 1 µg/mL de N9.

4.3.6. Determinação do potencial de membrana mitocondrial ($\Delta\psi_m$)

Para avaliar possíveis efeitos da Chalcona N9 sobre o potencial de membrana mitocondrial (PMM) das células U-87 MG, utilizamos o método de incorporação do marcador JC-1 (COSSARIZZA et al., 1993). Este corante emite coloração vermelha ou coloração verde, de acordo

com sua concentração interna final. Em mitocôndrias funcionais, que apresentam potencial de membrana mitocondrial altamente negativo, o JC-1 penetra e acumula-se no interior desta organela, na forma de agregados, emitindo coloração vermelha, enquanto que em baixas concentrações encontra-se na forma de monômero e emite coloração verde, indicando diminuição do PMM (REERS, SMITH e CHEN, 1991). Assim, a alta razão entre os marcadores vermelho e verde é indicativa de células viáveis, e a baixa relação entre eles designa a despolarização mitocondrial em células apoptóticas. Conforme pode ser observado na Figura 17 (A e B), em células U-87 MG controle, tratadas com veículo (DMSO 0,1%) por 2 ou 24 horas, a relação entre as fluorescências vermelha e verde é naturalmente alta, indicando a viabilidade das células controle. Como esperado, as células tratadas com o oxidante mitocondrial FCCP, apresentaram uma proporção menor entre as fluorescências emitidas, indicando um PMM baixo. Em células tratadas por 2 horas com a Chalcona N9 (Figura 17A), apenas a concentração de 1 µg/mL foi capaz de diminuir o PMM (Figura 17A). De modo relevante, ambas as concentrações de N9 (0,1 e 1 µg/mL), reduziram significativamente o PMM após 24 horas de tratamento (Figura 17B).



4.4. Ensaio de clonogenicidade

Considerando a morte celular por apoptose, buscamos investigar os efeitos do composto Chalcona N9 sobre o potencial replicativo de uma única célula de glioblastoma U-87 MG, através do ensaio de formação de colônia ou ensaio de clonogenicidade. Este método identifica as células que mantiveram a capacidade de gerar um grande número de células filhas, após tratamentos que possam causar morte celular, como resultado de dano ao cromossomo, apoptose, entre outros eventos (FRANKEN et al., 2006).

Nesta série de experimentos, procuramos investigar não somente os efeitos do tratamento com diferentes concentrações da Chalcona N9 (0,1 µg/mL e 1 µg/mL) sobre a clonogenicidade, como também avaliar o efeito da exposição das células a esta chalcona (1 µg/mL) em diferentes períodos de tempo (12, 24 e 48 horas).

Como representado na Figura 18, o tratamento com a menor concentração da Chalcona N9 (0,1 µg/mL) durante 24 horas, inibiu

significativamente a formação de colônias nas células U-87 MG. Entretanto, o tratamento com a maior concentração (1 $\mu\text{g/mL}$, 24 horas) reduziu de modo mais pronunciado o número de colônias destas células em comparação ao grupo controle, tratado com DMSO 0,1% em meio de cultura, resultando em uma inibição de 91,5% ($\pm 0,9$) (Figura 18 A). Além disso, o tratamento de células U-87 MG com a Chalcona N9, na concentração de 1 $\mu\text{g/mL}$, inibiu de maneira dependente do tempo a formação de colônias, com inibições de 64,82% ($\pm 2,08$), 89,5% ($\pm 1,3$) e 97,05% ($\pm 2,08$) para os tempos de 12, 24 e 48 horas, respectivamente (Figura 18 B).

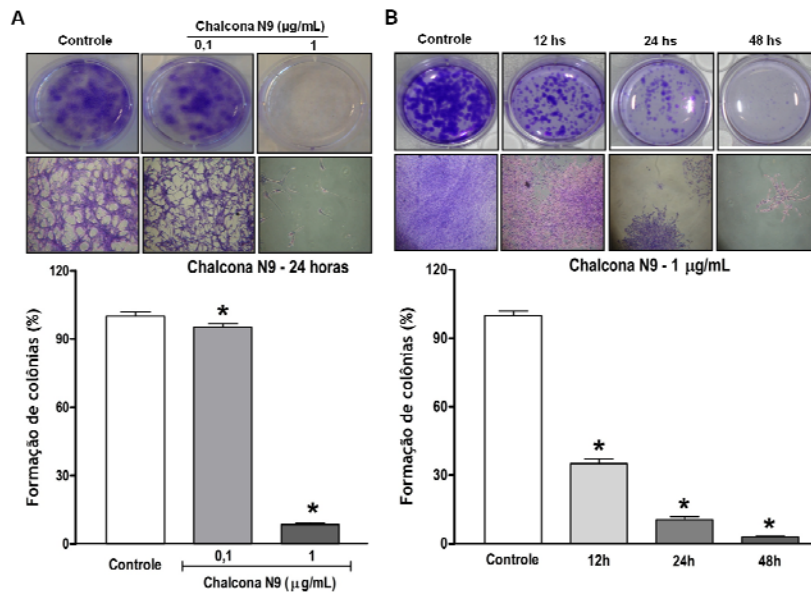


Figura 18. Efeito da concentração e do tempo de tratamento da Chalcona N9 sobre a capacidade de formação de colônias das células U-87 MG. **A.** As células U-87 MG foram tratadas por 24 horas com meio de cultura adicionado de veículo (controle; DMSO 0,1%) ou a Chalcona N9 nas concentrações de 0,1 µg/mL ou 1 µg/mL e então o meio de cada tratamento foi substituído por meio de cultura e mantidas em cultura por 10 dias. Decorrido este período, as células foram coradas com violeta cristal. **B.** As células U-87 MG foram tratadas com meio de cultura adicionado de veículo (controle) ou 1 µg/mL de N9 e incubadas por 12, 24 e 48 horas. Após estes tempos o meio com os tratamentos foi retirado e substituído por meio de cultura e mantidas em cultura por 10 dias. Decorrido este período, as células foram coradas com violeta cristal. **A e B.** As colônias foram contadas sob microscopia, com três campos randomizados para cada *n*. Os resultados são expressos como a porcentagem da proliferação celular relativa a proliferação do controle. Os valores se referem a Média ± Erro Padrão da Média de três experimentos independentes, com os tratamentos triplicados. * $P < 0.05$ versus controle (ANOVA de uma via seguida pelo Teste de Dunnet). As imagens são representativas das colônias após os tratamentos. Imagem superior: fotomicrografia em aumento de 5x. Imagem inferior: fotografia da placa de cultivo.

4.5. Ensaios Biológicos *in vivo*

4.5.1. Efeito do tratamento com a Chalcona N9 sobre o modelo de tumor ascítico de Ehrlich

O tumor ascítico de Ehrlich foi inicialmente descrito como um adenocarcinoma mamário murino espontâneo. Atualmente, tanto a forma sólida quanto a ascítica deste tumor transplantável são frequentemente utilizadas para avaliar a eficácia terapêutica de drogas sobre o crescimento tumoral (SAKAI et al., 2010). Para verificarmos se a Chalcona N9 apresentaria efeitos sobre o crescimento tumoral *in vivo*, utilizamos este modelo de tumor ascítico. Os resultados desta primeira avaliação estão apresentados na Figura 19, que demonstra o peso corporal, o qual foi utilizado como medida indireta do volume tumoral (Figura 19A), e a porcentagem de sobrevivência dos animais em diferentes tempos (sobrevida) após a inoculação das células tumorais (Figura 19B). Como pode ser visto na Figura 19A, o tratamento com a Chalcona N9, por via intraperitoneal (1 mg/kg) preveniu de maneira significativa a evolução do tumor ascítico a partir do 7º dia de tratamento (8º dia após a inoculação das células) quando comparado aos animais que receberam veículo (salina), demonstrando essa Chalcona ser eficaz em controlar a progressão tumoral *in vivo* (Figura 19A). Do mesmo modo, o tratamento por via oral com a Chalcona N9 (30 ou 100 mg/Kg) foi capaz de reduzir o volume tumoral no 10º dia de avaliação (9º dia de tratamento), embora em magnitude menor que a administração por via intraperitoneal neste mesmo período de tempo (20,53 ± 11,42%, 9,42 ± 5,51% e 8,61 ± 7,71% de inibição para 1 mg/kg (i.p.), 10 mg/kg (v.o.) e 30 mg/kg (v.o.), respectivamente). De maneira inesperada, a administração de N9 por via intravenosa (1 mg/kg), não foi capaz de diminuir significativamente a evolução do tumor ascítico. No entanto, quando a área sob a curva foi calculada, não foi apresentada diferença entre quaisquer tratamentos, tampouco das vias de administração. É importante destacar que o tratamento com N9 por via i.p. (1 mg/kg), além de ser efetivo sobre a redução do crescimento tumoral, também foi eficaz em aumentar a sobrevivência dos animais (Figura 19B). Contudo, os tratamentos pelas vias i.v. ou oral não apresentaram efeito sobre este parâmetro (Figura 19B).

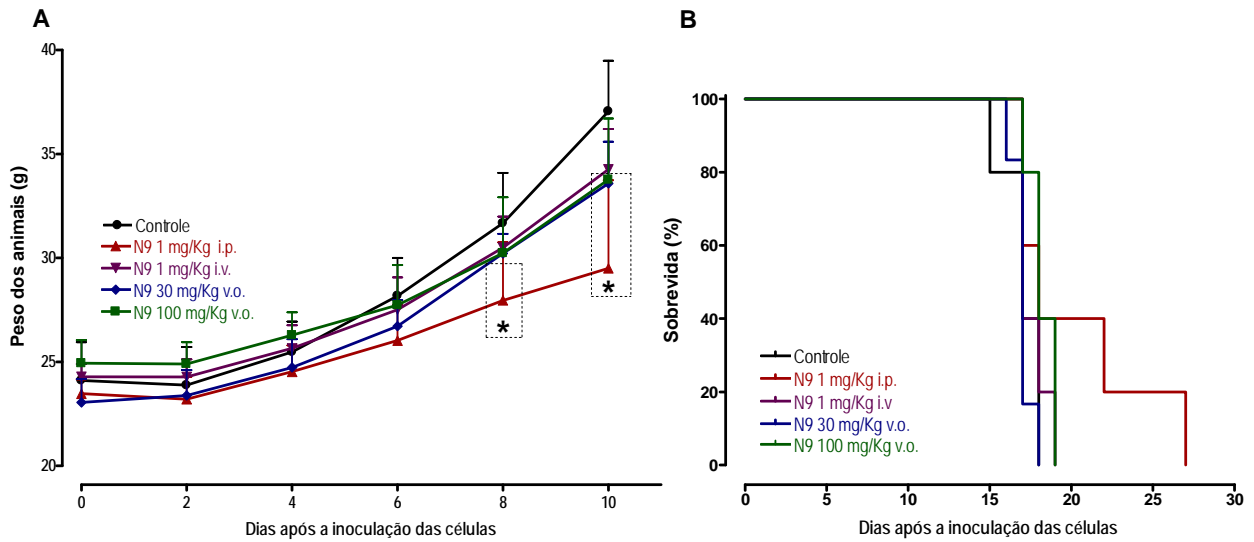


Figura 19. A. Efeito da Chalcona N9 sobre o crescimento do tumor ascítico de Ehrlich. Camundongos BALB/c foram inoculados no dia zero com células de tumor ascítico ($5 \times 10^6/200 \mu\text{l}/\text{animal}$) por via intraperitoneal e tratados diariamente com N9 pelas vias intraperitoneal (1 mg/Kg), intravenosa (1 mg/Kg) ou oral (30 ou 100 mg/Kg) ou veículo (salina por via oral), durante 9 dias, iniciando 24 horas após a inoculação das células. O crescimento dos tumores foi avaliado pela medida direta do peso dos animais a cada dois dias. Os resultados estão expressos como Média \pm Erro Padrão da Média (EPM) do peso dos animais ($n= 5-6$). * $P < 0,05$ representa a diferença significativa em relação ao grupo controle (ANOVA de 2 vias seguido de *posthoc* de Bonferroni). **B.** Efeito da Chalcona N9 sobre o tempo médio de sobrevivência (sobrevivida) no modelo de tumor ascítico de Ehrlich. Após o término dos tratamentos, foi avaliada a percentagem de dias de sobrevivência dos animais, comparados com o grupo controle.

4.5.2. Efeito do tratamento com a Chalcona N9 sobre o modelo de melanoma murino B16-F10

Com o objetivo de avaliar o efeito da Chalcona N9 *in vivo* em um modelo animal utilizando uma das linhagens celulares tumorais submetidas ao teste de citotoxicidade (item 4.2.1), células de melanoma da linhagem B16-F10 foram inoculadas na região dorsal de camundongos C57BL/6. Sete dias após a inoculação das células, os animais foram tratados diariamente com a Chalcona N9 (por via i.p. nas doses de 3, 10 ou 30 mg/Kg) ou veículo (salina por via i.p.) durante 15 dias. O volume da massa tumoral sólida e o peso corporal dos animais foram avaliados a cada 3 dias. Conforme pode ser observado na Figura 20A, o tratamento i.p. com a Chalcona N9 nas doses de 10 ou 30 mg/kg reduziu significativamente a progressão tumoral, sendo que o tratamento com a maior dose apresentou significância estatística já a partir do 11º dia de tratamento (16º dia após inoculação), enquanto que a menor dose inibiu significativamente apenas no 15º dia de tratamento (Figura 20A). Os dados obtidos para a análise da área sobre a curva (ASC) da progressão tumoral, a partir do qual foi calculada a porcentagem de inibição do crescimento do tumor foram: $40,09 \pm 9,05\%$ e $46,98 \pm 7,33\%$ de redução para as doses de 10 e 30 mg/kg, respectivamente (dados não mostrados). Contudo, no grupo de animais tratados com N9 na dose de 3 mg/Kg, não foi observado diminuição significativa no desenvolvimento dos tumores (Figura 20A). Após o término dos tratamentos, os animais foram observados diariamente para a avaliação da sobrevivência dos animais tratados. De modo relevante, o tratamento com N9 nas doses de 10 e 30 mg/kg promoveu um incremento no tempo de sobrevivência dos animais, com elevação de 10 dias para a maior dose (30 mg/kg), quando comparado ao grupo controle (Figura 20B). O grupo que recebeu a dose mais baixa (3 mg/Kg) não mostrou diferença importante no aumento da sobrevivência dos animais (Figura 20B).

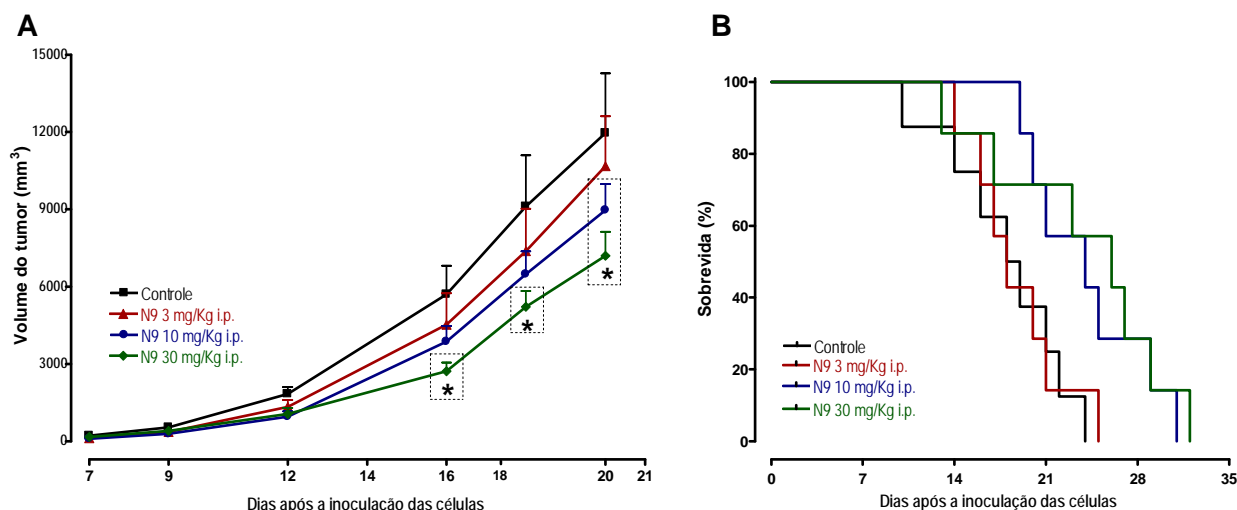


Figura 20. A. Efeito da Chalcona N9 sobre o crescimento tumoral *in vivo* de melanoma murino. Células B16-F10 foram inoculadas no dia zero ($1 \times 10^6/100 \mu\text{l}/\text{animal}$) por via subcutânea, no dorso de camundongos C57Bl/6 machos. Os animais foram tratados por via intraperitoneal (i.p.) com doses diárias de N9 (3, 10 e 30 mg/kg) durante 15 dias, iniciando quando os tumores se tornaram palpáveis (7º dia). O grupo controle recebeu apenas veículo (salina). O tamanho dos tumores foi medido a cada três dias com auxílio de paquímetro. O volume foi calculado de acordo com a fórmula: volume do tumor (mm^3) = largura² x comprimento x 0,5. A inserção representa a área sob a curva calculada com base nos volumes dos tumores. Os resultados estão expressos como Média \pm Erro Padrão da Média (EPM) do volume do tumor ($n= 6-8$). * $P < 0,05$ representa diferença significativa em relação ao grupo controle (ANOVA de 2 vias seguido de *posthoc* de Bonferroni). **B.** Efeito da Chalcona N9 sobre o tempo médio de sobrevivência (sobrevida) no modelo de melanoma murino. Após o término dos tratamentos, foi avaliada a percentagem de dias de sobrevivência dos animais, comparados com o grupo controle.

4.5.3. Efeito do tratamento com a chalcona N9 sobre o modelo xenográfico de glioblastoma multiforme

No intuito de verificar o efeito *in vivo* do tratamento com a Chalcona N9 no glioblastoma humano U-87 MG, reproduzimos o modelo xenográfico em camundongos *nude*. Os animais foram tratados diariamente por via i.p. com N9 (10 ou 30 mg/Kg) ou veículo (salina via i.p.) iniciando no 7º dia após a inoculação das células, quando os tumores apresentaram massa sólida palpável e tratados num período total de 21 dias. Como pode ser observado na Figura 21A, o tratamento com a Chalcona N9 na dose de 10 mg/Kg diminuiu significativamente o desenvolvimento do tumor xenográfico de glioma humano no 21º dia de tratamento (28º dia após a inoculação das células), enquanto que no grupo de animais tratados com a dose 30 mg/Kg a progressão tumoral foi alterada significativamente já a partir do 18º dia após a inoculação das células (Figura 21A). Os dados obtidos para a análise da área sobre a curva (ASC) da progressão tumoral, a partir do qual foi calculada a porcentagem de inibição do crescimento do tumor são: $21,74 \pm 9,87\%$ e $35,57 \pm 6,32\%$ de redução para as doses de 10 e 30 mg/kg, respectivamente (dados não mostrados). Na Figura 21B, estão apresentadas as fotografias obtidas dos animais no 25º dia após a inoculação das células.

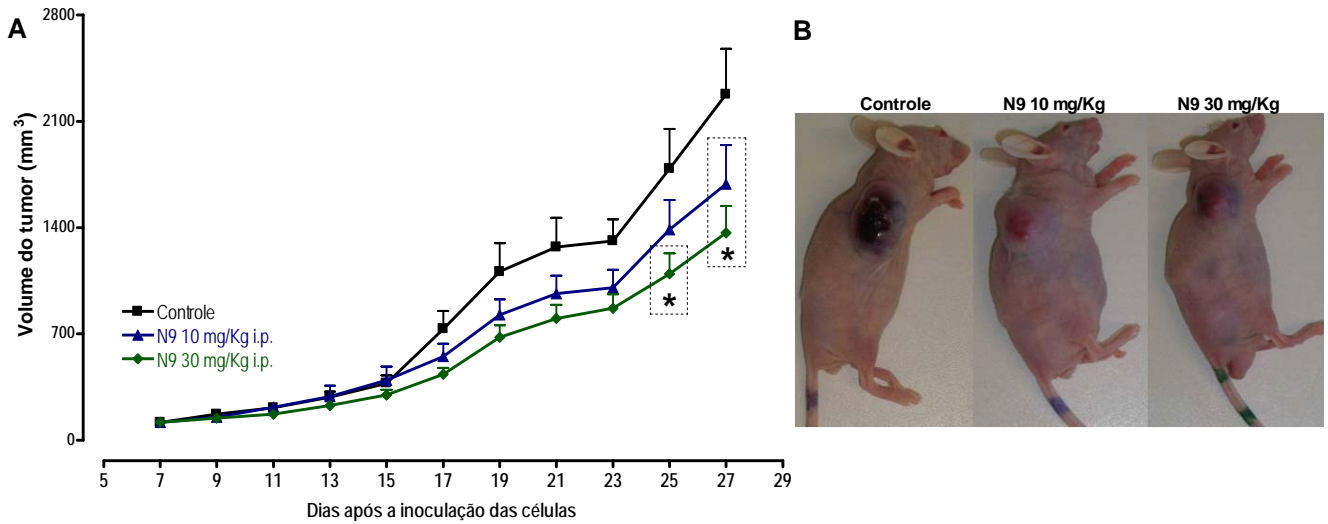


Figura 21. Efeito da Chalcona N9 sobre o crescimento tumoral xenográfico de glioblastoma humano. **A.** Células U-87 MG foram inoculadas no dia zero ($2,5 \times 10^6/100 \mu\text{l}/\text{animal}$) por via subcutânea, no dorso de camundongos *nude* (BALB/c *nu/nu*) machos. Os animais foram tratados por via intraperitoneal (i.p.) com doses diárias de N9 (10 ou 30 mg/kg) ou veículo (salina), durante 21 dias, iniciando quando os tumores se tornaram palpáveis (7º dia). O tamanho dos tumores foi medido a cada dois dias com auxílio de paquímetro. O volume foi calculado de acordo com a fórmula: volume do tumor (mm^3) = largura² x comprimento x 0,5. A inserção representa a área sob a curva calculada com base nos volumes dos tumores. Os resultados estão expressos como Média \pm Erro Padrão da Média (EPM) do volume do tumor ($n=10$). * $P < 0,05$ representa a diferença significativa em relação ao grupo controle (ANOVA de 2 vias seguido de *posthoc* de Bonferroni). **B.** Fotografias obtidas dos animais no 25º dia após a inoculação das células e dos tumores retirados no 30º dia após a inoculação das células.

5. DISCUSSÃO

Com os avanços na compreensão do mecanismo básico da oncogênese e da indução de apoptose, o papel crítico desempenhado pelo ciclo celular na regulação das mutações e na resistência à quimioterapia tem ganhado bastante destaque. O paradigma continua sendo o desenvolvimento de tratamentos personalizados, que vetorizem alterações moleculares específicas de um paciente com câncer. As pesquisas recentes na terapia do câncer têm focado principalmente nas células tumorais e no desenvolvimento de drogas citotóxicas, anticorpos ou vacinas para uma terapia antitumoral seletiva e eficiente, visando atingir molécula-chave para o combate do crescimento de células tumorais, metástases, proliferação ou mudanças no microambiente estromal (MANSON, 2003). A quimioterapia tem sido a linha de frente para o tratamento do câncer nas últimas décadas e tem como objetivo final induzir a morte das células tumorais. A resistência às drogas é o principal fator limitante para a eficácia da quimioterapia utilizada no tratamento do câncer. Uma característica desapontante desta resistência é que os tumores não apenas tornam-se resistentes às drogas usadas especificamente para o esquema terapêutico, mas também podem adquirir resistência cruzada com outros agentes com diferentes mecanismos de ação. A resistência aos quimioterápicos, seja intrínseca ou adquirida, é responsável pelas falhas do tratamento em mais de 90% dos pacientes com câncer metastático (ANDERSEN, BECKER e STRATEN, 2005). Essencialmente todos os agentes antitumorais que estão atualmente em uso na clínica - por exemplo, fármacos que se ligam a microtúbulos, agentes que danificam o DNA e nucleosídeos, induzem a apoptose de células tumorais (incluindo cisplatina, 5-fluorouracil, doxorubicina, fludarabina, docetaxel, ciclofosfamida e dacarbazina). Embora estes fármacos convencionais sejam armas importantes no tratamento do câncer, novas modalidades de terapias vetorizadas baseadas em estratégias que de uma compreensão mais profunda dos mecanismos moleculares que fundamentam o fenômeno de apoptose estão surgindo. Diante disso, estratégias que visam inibir a expressão ou função de proteínas anti-apoptóticas ganharam atenção considerável na pesquisa de potenciais alvos para o tratamento do câncer (BRUNTON, LAZO e PARK, 2010).

Em nosso trabalho utilizamos como objeto de estudo, a Chalcona N9, um composto sintético inovador, onde o anel B desta chalcona está associado a um radical quinoxalínico (Figura 8), tornando esta molécula atraente para a avaliação de suas potenciais propriedades antitumorais, uma vez que dados da literatura indicam que tanto as

chalconas, quanto as quinoxalinas apresentam atividade antitumoral. Diversos trabalhos têm demonstrado a atividade citotóxica de ambas as estruturas isoladamente, portanto a inovação da Chalcona N9 seria a associação destes grupos funcionais em uma única molécula.

Neste contexto, nossa primeira investigação foi acerca da citotoxicidade da N9 sobre diferentes linhagens celulares tumorais e uma linhagem não tumoral, utilizando o ensaio da medida da atividade mitocondrial, que indiretamente determina o número de células viáveis. Os resultados demonstrados na avaliação da citotoxicidade da Chalcona N9 (Figura 10) sugerem alta eficácia dessa substância em reduzir a viabilidade celular em todas as linhagens tumorais testadas, avaliada como a porcentagem de redução da viabilidade dependente da concentração testada. Diferentemente, na linhagem de fibroblastos de camundongos (não tumoral), o efeito citotóxico também foi observado, iniciando apenas nas concentrações mais altas (10 e 100 $\mu\text{g/mL}$). Diversos trabalhos relatam a segurança das chalconas, quando testadas em linhagens não tumorais, sugerindo uma especificidade destes compostos. Kumar et al. (2003) descreveram que as chalconas sintetizadas por seu grupo apresentaram maior toxicidade para as células de carcinoma de mama comparadas as células normais. Cabrera et al. (2007) demonstraram que chalconas foram mais citotóxicas em linhagens tumorais (carcinoma humano de rim e de mama) do que em células epiteliais normais de rim humano. Neste trabalho, ainda, os autores sugerem que as chalconas possuem maior citotoxicidade em linhagens tumorais que seus derivados, as flavonas e flavononas. Sabzevari et al. (2004) investigando a toxicidade de chalconas, observaram que estes compostos foram muito mais efetivos como agentes citotóxicos em células de carcinoma de fígado humano (Hep G2) que em hepatócitos normais, sugerindo sua especificidade antitumoral.

As chalconas são precursoras na biossíntese das flavonas e apresentam atividades antioxidantes e antitumorais, propriedades estas atribuídas principalmente a presença da α,β insaturação da molécula (FURUSAWA et al., 2005). A atividade antitumoral das chalconas tem sido atribuída a diversos mecanismos: atuam como inibidores de tubulina (DUCKI et al., 1998), induzem a via apoptótica mitocondrial (HSU et al., 2006), são potentes antimitóticos (WOODS et al., 1995), atuam como inibidores de topoisomerase (YOON et al., 2007) e angiogênese (KIMURA e BABA, 2003) e estes mecanismos isoladamente ou somados, conduzem à apoptose. As quinoxalinas por

outro lado, são compostos heterocíclicos que muitas vezes são usados na síntese de moléculas biologicamente ativas e podem ser encontradas na estrutura de candidatos a antitumorais, antibacterianos, antimaláricos e antituberculose (DIRLAM e PRESSLITZ, 1978; CARTA et al., 2002; ALDANA et al., 2003; PEREZ-MELERO et al., 2004), entre outros. Desta maneira, na associação destas moléculas, é esperada que a atividade citotóxica em células de linhagem tumoral esteja presente.

Para darmos prosseguimento ao trabalho, optamos em utilizar a linhagem celular tumoral de glioma humano (U-87 MG). Estas células são oriundas de paciente do sexo feminino, identificadas como glioblastoma multiforme (Grau IV), e implantadas como cultura de longo prazo por Ponten e Macintyre (1968). É a linhagem tumoral astrocitária mais utilizada envolvendo diferentes campos da pesquisa científica, principalmente no que concerne a testes de novos agentes antitumorais, justificado pela natureza altamente agressiva e pelas escassas opções terapêuticas disponíveis para o glioblastoma multiforme (RICH e BIGNER, 2004).

O glioblastoma multiforme é o tumor primário do sistema nervoso central mais comum em adultos. Este neoplasma devastador é caracterizado por profunda e progressiva incapacidade física e cognitiva, que culmina com a morte dentro de 1 a 2 anos do diagnóstico em quase todos os casos (REARDON, 2006). As principais dificuldades no tratamento do glioblastoma multiforme envolvem a localização deste neoplasma: o acesso a quimioterapia é o mais restrito de todo o organismo devido a presença da barreira hematoencefálica. Adicionalmente, a taxa de proliferação contribui para caracterizá-lo como um dos mais agressivos tumores humanos. Além disso, a localização do tumor no interior do cérebro, às vezes impossibilita uma ressecção radical. Ademais, independente da massa tumoral destruída, o tumor residual cresce rapidamente (JAIN, 2006). Desta maneira, a cirurgia e a radioterapia constituem os pilares da terapia proporcionando benefícios paliativos neste tipo de câncer. O papel da quimioterapia, centrada especificamente em cloroetilais como a carmustina ou lomustina, tem se mostrado controversa dividindo os clínicos em favoráveis ou contrários ao tratamento (REARDON, 2006).

A carmustina, juntamente com a temozolomida, é uma das poucas opções de antineoplásicos disponíveis para o tratamento do glioblastoma multiforme na clínica (SALGALLER e LIAU, 2006). A carmustina é uma nitrosuréia (*1,3-bis(2-chloroethyl)-1-nitrosourea*), com atividade antitumoral atribuída a seu efeito alquilante sobre o DNA

e RNA, predominando a ação citotóxica e não a metilante como outros alquilantes (por exemplo, temozolomida e procarbazina) que possuem capacidade de mutagênese e carcinogênese (BRUNTON, LAZO e PARK, 2010). Seu efeito antitumoral em gliomas, por via sistêmica se deve principalmente a suas características físico-químicas como alta lipossolubilidade e baixo peso molecular, podendo assim ultrapassar a barreira hematoencefálica. Entretanto, administrada intravenosamente esta droga é rapidamente degradada, não sendo possível a detecção de carmustina após 15 minutos, apenas os fragmentos da molécula padrão no plasma e tecidos (SALVATTI et al., 2009). Para contornar esta instabilidade do fármaco, foram desenvolvidos implantes contendo 3,8% de carmustina para liberação em um período de 2 a 3 semana na cavidade da ressecção do tumor. Em ensaio clínico de fase III foi demonstrado que a carmustina de liberação controlada aumentou a sobrevida dos pacientes tratados, diminuindo o risco de mortalidade em 29% (STEWART, 2002).

Curiosamente, em nossa avaliação *in vitro*, utilizando a linhagem celular de glioblastoma multiforme U-87 MG, verificamos que a carmustina apresentou a mais baixa citotoxicidade em relação aos demais antitumorais testados. Além disso, sua concentração inibitória foi a mais alta dentre todas as substâncias testadas (41,88 µg/mL). Talvez sua pouca efetividade *in vitro* na linhagem celular U-87 MG possa ser devido à instabilidade da molécula, que pode estar sendo hidrolisada no meio de cultura. Há poucos trabalhos utilizando linhagens celulares de gliomas tratadas com carmustina (ALI-OSMAN et al., 1987; IWATA, YUNG e FIELDS, 1988). Nos dois trabalhos que fazem a associação *in vitro*, a carmustina foi utilizada para avaliação do potencial clonogênico das células após os tratamentos. Em um deles, os autores demonstram que a meia vida da carmustina *in vitro* é de 54 minutos e que em nosso ensaio, pode ter sido insuficiente para produzir citotoxicidade na linhagem U-87 MG, comparadas aos outros antitumorais (ALI-OSMAN et al., 1987).

Na avaliação da citotoxicidade da Chalcona N9 e de alguns antitumorais utilizados na clínica, sobre a linhagem celular de glioma humano U-87 MG, verificamos que todos os antitumorais testados reduziram a viabilidade das células U-87 MG, embora a citarabina não tenha mostrado diferença entre as concentrações de 1, 10 e 100 µg/mL. A doxorubicina se mostrou a mais efetiva sobre a linhagem de glioma, diminuindo a viabilidade celular já na concentração mais baixa e com a menor CI_{50} (0,07 µg/mL), dentre os antineoplásicos testados. A

cisplatina e citarabina apresentaram efeito citotóxico maior sobre U-87 MG, comparados com a carmustina. Os antitumorais testados sobre a linhagem celular de glioma têm variados mecanismos de ação. A atuação da carmustina, conforme citado acima, se deve a sua alquilação no DNA. A cisplatina possui ampla atividade antineoplásica sendo efetiva em tumores de ovário, testículo, mama, pulmão, bexiga e cólon. Após entrar na célula por difusão, a cisplatina se torna fortemente hidratada para formar espécies carregadas positivamente que interagem com locais nucleofílicos do DNA e produzindo ligações cruzadas intra e interfilamentares. Os complexos de adição de DNA formados pela cisplatina inibem a replicação e transcrição do DNA e resultam em erros de codificação que levam a apoptose (FLOROS et al., 2003). A doxorrubicina é um antibiótico antraciclínico e possui ampla ação contra tumores sólidos humanos. Sua atividade antitumoral é atribuída a um conjunto de mecanismos: a doxorrubicina é capaz de intercalar-se com o DNA, afetando diretamente a transcrição e replicação, possui também capacidade de interagir com a topoisomerase II, enzima responsável pela abertura das fitas de DNA, formando um complexo com a enzima e o DNA e por fim, levando a apoptose celular. E ainda, é capaz de interagir com as membranas celular e mitocondrial e de produzir radicais de ânion superóxido (MINOTTI et al., 2004). A citarabina é um análogo da citidina e desta maneira, dificulta a rotação da base pirimidina em torno da ligação nucleosídica e interfere no empilhamento das bases. É o mais efetivo agente antitumoral usado no tratamento de leucemia mielóide aguda desde 1960 e também é utilizado em outros cânceres hematológicos como nas leucemias linfoblástica aguda e mielocítica crônica, eritroleucemia linfomas de células B (LAMBA, 2009).

Comparando a potência citotóxica do composto Chalcona N9 com os antineoplásicos, podemos sugerir que sua citotoxicidade apresentou um perfil na curva concentração *versus* viabilidade celular similar ao da cisplatina. Todavia, a CI_{50} da Chalcona N9 sobre a linhagem U-87 MG foi de 0,72 $\mu\text{g/mL}$, enquanto que a concentração inibitória da cisplatina foi de 3,44 $\mu\text{g/mL}$, ou seja, a CI_{50} da Chalcona N9 foi quase 5x menor quando comparada àquela apresentada pela cisplatina.

Em seguida avaliamos, por citometria de fluxo, o efeito do composto Chalcona N9 sobre o perfil do ciclo celular da linhagem de glioma humano U-87 MG. Neste ensaio, verificamos que após 24 horas de tratamento não houve alteração das células tratadas com a N9,

comparadas ao controle. Num período de 48 horas, a pré-incubação com a concentração de 1 µg/mL levou a um acúmulo das células que ocorreu predominantemente na fase G1. Em continuação, passamos à análise da expressão de algumas ciclinas e CDKs que atuam no controle do ciclo celular e verificamos que estes resultados corroboraram aqueles obtidos com a citometria de fluxo. No ensaio de *western blotting*, demonstramos que a Chalcona N9 foi capaz de interferir com as proteínas que atuam na progressão da fase G1 e transição para a fase S.

A progressão das células de um estágio para outro através do ciclo celular é um processo altamente regulado por uma variedade de proteínas que atuam sobre a transcrição de genes das ciclinas, degradação das ciclinas e modificação das subunidades de quinase por fosforilação. Além disso, também contribuem para a progressão, as CDK e suas parceiras as ciclinas, que associadas formam complexos reguladores positivos do ciclo celular. Por outro lado, as proteínas inibitórias de CDKs, as proteínas da família INK, KIP e CIP, são reguladores negativos que agem reduzindo a progressão do ciclo celular em resposta a sinais regulatórios, através da associação direta as CDKs (VERMEULEN, BOCKSTAELE e BERNEMAN, 2003).

Nossos resultados demonstraram que a Ciclina D1, específica da fase G1 do ciclo celular, teve a expressão reduzida, em ambas as concentrações da Chalcona N9 testadas, comparadas ao controle. Esta ciclina é responsável pela saída da fase G0, e entrada na fase G1, o início do ciclo celular. Através de estímulos externos ou mitogênicos, os níveis de Ciclina do tipo D1 aumentam, formando um complexo ativo com CDK4/6. Esta associação de Ciclina D-CDK4/6 é capaz de fosforilar e inativar a proteína retinoblastoma (pRB), dissociando-a do fator de transcrição E2F. A fosforilação da pRb, permite a liberação e transcrição dependente de E2F (MASSAGUÉ, 2004). Desta maneira, como os níveis de Ciclina D1 nas células tratadas com a Chalcona N9 estão diminuídos, a progressão do ciclo celular é prejudicada, pois a fosforilação de pRb é dependente do complexo Ciclina D-CDK4/6. Os níveis de CDK6 foram também diminuídos pelo tratamento com a Chalcona N9. Diferentemente, a CDK2 teve sua expressão diminuída apenas na maior concentração da Chalcona N9 (1 µg/mL). Esta quinase dependente de ciclina se associa à Ciclina E no final da fase G1 e, durante a fase de síntese de DNA (fase S), se complexa com a Ciclina A. Em condições normais, no final da fase G1, os níveis da Ciclina E aumentam abruptamente quando a célula passa pelo ponto R e se associam a CDK2 para permitir a fosforilação de substratos apropriados

requeridos para a entrada da fase S (MURRAY, 2004). Em nosso trabalho verificamos que seus níveis são reduzidos significativamente pela Chalcona N9, nas duas concentrações testadas. Mostramos também que tal como a Ciclina E, também os níveis de Ciclina A estão diminuídos nas células tratadas com o composto Chalcona N9. Nesta etapa, podemos sugerir através dos resultados da avaliação em citometria de fluxo e análise da expressão de proteínas que, a Chalcona N9 impede/reduz a progressão das células para a fase S, diminuindo em consequência a expressão das CDKs (2 e 6) ou impedindo a formação do complexo Ciclina/CDK.

As ciclinas são elementos indispensáveis ao ciclo celular, sem as quais, as CDKs não possuem função específica e são inativas. Quando associadas fisicamente com as CDKs, as ciclinas são capazes de orientar as CDKs aos substratos apropriados e ativar suas unidades catalíticas. Este complexo ativo CDKs e ciclinas determinam o avanço da célula através das fases do ciclo celular (LUNDBERG e WEINBERG, 1999). Como a saída das células da fase de quiescência ou fase G0 é em resposta a estímulos mitogênicos, a síntese das ciclinas do tipo D é induzida, funcionando assim como sensores dos fatores de crescimento (SHERR, 2000). As taxas de Ciclina D variam pouco durante todo o ciclo celular, embora haja um pico de expressão em G1/S de modo que quando há diminuição destes sinais estimulatórios, as ciclinas D são rapidamente degradadas. A degradação da Ciclina D1, durante a fase G1 tem importância crucial na vida ou morte celular: se a célula ainda não ultrapassou o ponto de restrição (R), a destruição e/ou inativação desta ciclina impede a célula de prosseguir ao longo do ciclo; caso tenha ultrapassado o ponto R, a célula continuará, mesmo sem receber estes sinais estimulatórios (VIALLARD et al., 2001). Os níveis de expressão destas ciclinas variam conforme o tipo celular, entretanto em muitos cânceres humanos, a Ciclina D1 está superexpressa, admitida assim como um oncogene sendo esta função relacionada à iniciação da carcinogênese e progressão tumoral e metástases (STAMATAKOS et al., 2010). Além da sua função de ativar CDKs, evidências indicam que ciclinas do tipo D possuem propriedades independentes de CDKs. A importância de suas propriedades no crescimento, metabolismo e diferenciação celular são substanciais. Diversos trabalhos relatam que Ciclina D1 se associa com mais de 30 fatores ou co-reguladores de transcrição, demonstrando assim sua função na promoção da proliferação celular (FU et al., 2004).

Devido a seu papel central no câncer, a Ciclina D1 tem se tornado um interessante alvo para a terapia antitumoral. Foi observado que alguns agentes antitumorais convencionais e outros experimentais induzem a degradação de Ciclina D1 em diversas linhagens celulares tumorais, como por exemplo rapamicina, aspirina, lovastatina, troglitazona, entre outros. Compostos de origem natural, tais como a curcumina e resveratrol, além do ácido retinóico, também induzem a degradação de Ciclina D1, em células tumorais. Adicionalmente, o estresse osmótico induzido por cloreto de sódio, cloreto de cálcio ou cloreto de magnésio resulta em rápida proteólise de Ciclina D1. Similarmente, estresse oxidativo induzido por peróxido de hidrogênio também promove a rápida queda nos níveis celulares de Ciclina D1 (ALAO, 2007).

Ciclina D1 é a subunidade regulatória das holoenzimas que fosforilam e, através da fosforilação sequencial por Ciclina E/CKD2, inativam pRb, permitindo a progressão do ciclo celular, com a passagem pelo ponto R e o início da fase S. Na ausência de sinais estimulatórios de proliferação, não há aumento da expressão de Ciclina D1 e pRb permanece hipofosforilado. No estado hipofosforilado, pRb reprime a transcrição de genes requeridos para a síntese de DNA, ativos na fase S do ciclo celular através da repressão da atividade de fatores de transcrição tais como E2Fs. Além disso, pRb também atua através do recrutamento de histonas deacetilases e proteínas de remodelamento de cromatina, que cooperam com pRb e inibem a atividade de E2F. O fator de transcrição E2F é responsável pela ativação de genes requeridos para a progressão para a fase S. Ciclina A, Ciclina E e DNA polimerase estão entre estes genes. Desta maneira, a inibição de E2F resultará na não expressão de Ciclinas E e A (LEE e SICINSKI, 2006; STAMATAKOS et al., 2010). Não há evidências demonstrando que os níveis de Ciclina E são afetados diretamente por sinais extracelulares, mas fatores como a ausência de nutrientes ou estímulos de crescimento que levam ao colapso dos níveis e da atividade do complexo Ciclina D/CDK4/6, em geral, são acompanhados pelo aumento do inibidor de CDK, a proteína p27. A p27, uma vez sintetizada, bloqueia as ações de uma variedade de complexos ciclinas/CDKs, incluindo complexos Ciclina E/CDK2 (LUNDBERG e WEINBERG, 1999).

A maioria dos trabalhos publicados sobre a atividade antitumoral de chalconas relata que estes compostos possuem atividade predominante sobre o ciclo celular (BOUMENDJEL, RNOT e BOUTONNAT, 2009). Os compostos quinoxalínicos também estão

associados a atividade inibitória sobre o ciclo celular, com interrupção do ciclo na fase G2/M (GALI-MUHTASIB, DIAB-ASSAF e HADDADIN, 2005; DIANA et al., 2008) ou inibição de CDKs (KAWANISHI et al., 2006). De acordo com o descrito acima, o mecanismo de ação da N9 poderia estar relacionado à diminuição na expressão das proteínas CDK2 e CDK6, impedindo a formação do complexo ativo Ciclina D/CDK4/6 formado, ou aumentando os níveis das proteínas inibidoras de CDKs (CIP, INK e KIP), que antagonizam a atividade dos complexos Ciclina/CDK. A inibição e/ou não formação adequada deste complexo, impedirá a sinalização para que novas proteínas sejam formadas não permitindo a progressão do ciclo celular, no final da fase G1 para a fase S (DANIAL e KORSMEYER, 2004).

A morte celular programada, ou apoptose, também conhecida como forma silenciosa de morte celular, implica na destruição e fragmentação programada e coordenada de uma célula sem a liberação do conteúdo potencialmente tóxico e imune estimulatório no tecido circundante. Além disto, vias mitogênicas e responsivas ao estresse estão também envolvidas na regulação a sinalização apoptótica. O ajuste fino do balanço entre os fatores antiapoptóticos e pró-apoptóticos dentro de cada uma das duas vias de apoptose nas células é que desencadeará a morte ou a sobrevivência celular (HENGARTNER, 2000).

Em nosso trabalho, a morte celular programada pôde ser evidenciada nos ensaios das células U-87 MG tratadas com o composto Chalcona N9, baseada em duas características importantes no fenômeno de apoptose, a externalização da fosfatidilserina e a fragmentação do DNA. Observamos através de citometria de fluxo, utilizando a marcação com Anexina V-FITC para detectar a fosfatidilserina translocada da membrana interna celular, que a maior proporção das células apoptóticas pode ser detectada no período de 48 horas.

Durante a apoptose, há um período de latência (lag) entre a positividade da fosfatidilserina (detectada com Anexina V-FITC) e a positividade para o iodeto de propídeo, enquanto que em células necróticas, ambos eventos coincidem. Dessa maneira, apenas a combinação de ambos os marcadores poderia não discriminar necrose de apoptose em alguns casos, e por esta razão, mais que um marcador celular deve ser usado para caracterizar os tipos de morte celular (KRYSKO et al., 2008). Para contornar falsas evidências de uma única técnica para detecção de apoptose, optamos por combinar o ensaio de Anexina V e iodeto de propídeo ao teste de TUNEL, que detecta DNA fragmentado *in situ*. Nesta avaliação, observamos a tendência de maior

número de células apoptóticas no período de 48 horas de tratamento. Assim, estes dados nos indicam que na presença da Chalcona N9 há morte apoptótica num período de 24 horas, mas ela é intensificada em 48 horas após o tratamento com a N9. Na análise citomorfológica, as características típicas de apoptose puderam ser visualizadas através da microscopia de fluorescência. Estes resultados mostraram que num período de 24 horas, algumas células já apresentaram morfologia característica da apoptose, corroborando os resultados observados na marcação com Anexina V e pela técnica do TUNEL.

O gene supressor de tumor p53, desempenha um importante papel em prevenir o desenvolvimento do câncer, de modo que mutações em p53 resultam em uma forte predisposição ao câncer. O mecanismo pelo qual a função de p53 proporciona esta proteção parece estar relacionada a sua capacidade em responder ao estresse e contribuir tanto para a reparação do dano quanto em inibir a proliferação destas células. Portanto, os sinais que poderiam constituir alguma ameaça oncogênica, tais como estresse oxidativo, dano ao DNA, hipoxia, ativação oncogênica ou perda do suporte estromal, todos levam a indução da resposta de p53. Contudo, a resposta definitiva da ativação de p53 pode variar desde a interrupção reversível do ciclo celular até a indução de numerosas respostas irreversíveis, como a morte celular programada ou senescência (SHERR, 2000; VOUSDEN, 2006).

Alguns trabalhos demonstraram que a apoptose mediada por p53 tem seguimento, principalmente, através da via intrínseca apoptótica (SOENGAS et al., 1999; SCHULER et al., 2000). Além de controlar fatores que agem regulando a mitocôndria, p53 pode também transativar vários componentes da maquinaria efetora apoptótica, um dos quais Apaf-1 que é coativador de caspase 9 e auxilia a iniciar a cascata de caspases. Este ponto de controle parece não ser crucial na inicialização da apoptose, mas potencializa a morte celular na presença da liberação do citocromo *c* (JUN et al., 2002), através da ação de transcrição de p53 sobre os membros pró-apoptóticos da família BCL-2, como BAX ou PUMA (SHULER e GREEN, 2001).

Mdm2 (do inglês *mouse double minute 2*), uma proteína nuclear, parece ser crucial no controle e ter ativa participação no acúmulo de p53 em resposta ao estresse. Mdm2 não só bloqueia a atividade biológica, mas também atua na destruição desta proteína supressora de tumor, agindo num mecanismo de controle negativo sobre os níveis de p53. A ativação de p53 também pode ser efetuada através da superexpressão de p19^{ARF}, que inibe a proteína Mdm2. Do mesmo

modo, a resposta ao dano no DNA induz a elevação da expressão de p53, mediado por proteínas quinases como CHK1/2 e ATM/ATR. Além disso, p53 pode ativar a apoptose induzindo a expressão de proteínas pró-apoptóticas, como BAX e PUMA (POLAGER e GINSBERG, 2009).

Desde a descoberta da sua potente atividade como supressor de crescimento e atividade pró-apoptótica, p53 tem sido o centro de atenção dos pesquisadores, principalmente após a demonstração que os níveis celulares dessa proteína determina sua função. Uma nova perspectiva consiste em estimular p53 inibindo sua interação com Mdm2, e desse modo impedindo a progressão do ciclo celular ou induzindo a morte celular programada (MOLL e PETRENKO, 2003). Stoll et al. (2001) utilizou chalconas como antagonistas não peptídico de Mdm2, porém os valores da CI_{50} foram altos, na ordem de μM , conforme revelados por RMN. Baseado neste trabalho, Kumar et al. (2003) hipotetizou que derivados de chalconas associados a boro poderiam ser mais ativos no impedimento da ligação Mdm2-p53. Além de sugerir essa atuação, eles demonstraram que estas substâncias promoveram um aumento da proteína p21, responsável por regular negativamente o ciclo celular e induzir a apoptose por via independente de p53 (CHENE, 2003).

A apoptose pode ser iniciada por meio dos receptores de morte, ativados na superfície celular quando ligantes específicos se unem a estes receptores ou mediada pela mitocôndria, na chamada via intrínseca. Como a ativação da via mitocondrial é considerada um ponto crucial no processo apoptótico, a manipulação desta via com interesse na apoptose tem sido apontada como uma estratégia terapêutica (GALLUZZI, BLOMGREN e KROEMER, 2009). A via de apoptose dependente da mitocôndria envolve a translocação do citocromo *c* do espaço intermembrana mitocondrial para o citoplasma. Os fatores pró-apoptóticos liberados da mitocôndria após o colapso do potencial de membrana, incluem as procaspases, citocromo *c*, Apaf-1 (do inglês *apoptotic protease-activating factor 1*) e endonuclease G (KIM, 2005).

Em diversos modelos de morte celular, a mitocôndria representa o verificador central da apoptose. Semelhante ao que ocorre no ciclo celular, que é conduzido por pontos de verificação, parece que o processo apoptótico é controlado por alguns pequenos eventos, porém limitantes, um dos quais é a permeabilização da membrana mitocondrial (KROEMER, GALLUZZI e BRENNER, 2007).

A eficiência da produção de energia mitocondrial é dependente principalmente do $\Delta\psi_m$ que é gerado metabolicamente pela bomba de prótons da cadeia de transporte mitocondrial. Desta maneira, a integridade da membrana mitocondrial é estritamente controlada para manter a osmolaridade, facilitar o transporte de nucleotídeos de adenina e preservar o $\Delta\psi_m$ que é requerido para a produção de ATP. A perda do controle sobre a membrana mitocondrial implica na formação de poros ou canais que neutralizam o potencial de membrana ($\Delta\psi_m$) através da membrana mitocondrial interna. Diferentes marcadores fluorescentes catiônicos podem ser utilizados para determinar o potencial de membrana mitocondrial ($\Delta\psi_m$), tais como rodamina 123, DIOC₆ (3,3-dihexyloxycarbocyanine iodide) e JC-1 (KROEMER, 2003; KROEMER, GALLUZZI e BRENNER, 2007).

No presente trabalho, avaliamos também o potencial de membrana mitocondrial. Neste ensaio de captação mitocondrial utilizando o corante fluorescente JC-1, verificamos que o tratamento com a Chalcona N9 foi capaz de neutralizar o gradiente eletroquímico mitocondrial. Este sensível marcador fluorescente pode ser usado para aferir a perda do potencial de membrana mitocondrial associada a apoptose. A razão entre as fluorescências (verde e vermelha) é dependente somente do potencial de membrana mitocondrial ($\Delta\psi_m$) e não de outros fatores tais como o tamanho, forma e densidade mitocondrial que poderiam influenciar os sinais de fluorescência utilizando apenas um único marcador. Esta carbocianina catiônica lipofílica (JC-1) não afeta as células vivas, tampouco a respiração celular. Em células viáveis, os monômeros de JC-1 acumulam seletivamente na mitocôndria e conseqüentemente, agregam quando a concentração crítica é excedida como resultado do alto potencial de membrana. Esta reação é independente do pH no âmbito da variação fisiológica, o gradiente eletroquímico é o único responsável por esta agregação (SMILEY et al., 1991).

Nossos resultados demonstram que nas células controle (0,1% de DMSO), a fluorescência predominante é vermelha indicando o alto potencial de membrana mitocondrial, típico de células saudáveis (não apoptóticas) e com poucas mitocôndrias coradas de verde. A Chalcona N9 na concentração de 1 $\mu\text{g}/\text{mL}$ induziu alteração no potencial de membrana mitocondrial, nas células tratadas em apenas duas horas de incubação. Nestas células pró-apoptóticas, com baixo potencial de membrana a N9 foi capaz de interferir com o $\Delta\psi_m$, de modo sustentado,

sugerindo que a apoptose possa estar sendo induzida direta ou indiretamente através da via mitocondrial.

A ação das chalconas sobre o potencial de membrana mitocondrial foi relatada por Sabzevari et al. (2004). Os autores demonstraram que o colapso na membrana mitocondrial provocado pelas chalconas ocorreu antes da citotoxicidade e, segundo os autores, a citotoxicidade em hepatócitos ocorreu como consequência do colapso no potencial da membrana mitocondrial. As mitocôndrias estão integradas aos diferentes tipos de vias de sobrevivência e morte celular. Portanto, é natural que compostos que interfiram na função mitocondrial possam estar envolvidos nos processos que levam à morte celular. Este papel central faz da mitocôndria um alvo importante para o desenvolvimento de drogas para tratamento de doenças metabólicas ou hiperproliferativas, como o câncer (TOOGOOD, 2008).

A transição da permeabilidade mitocondrial é um dos primeiros eventos apoptóticos e um passo importante para a indução da apoptose celular, através do colapso do gradiente eletroquímico da membrana mitocondrial. Esta alteração está associada a formação de poros na mitocôndria através da dimerização de BAX ou pelas proteínas BID, BAK ou BAD ativadas. A ativação dessas proteínas é acompanhada pela liberação de citocromo *c* no citoplasma e sabidamente, um evento irreversível na apoptose (NARITA et al., 1998; LUO et al., 1998; DESAGHER et al., 1999; BASANEZ et al., 1999).

Recentes trabalhos têm demonstrado a regulação coordenada entre o metabolismo mitocondrial e a progressão do ciclo celular. A passagem através da fase G1 foi associada com um aumento significativo no potencial de membrana mitocondrial e na produção aeróbica de ATP. Além disso, foi demonstrado que a transição das fases G-S e os níveis de Ciclina E parecem ser regulados pelo estado mitocondrial, abrindo uma nova área de exploração na vetorização do ciclo celular e agentes que atuam diretamente na mitocôndria (SCHIEKE, MCCOY e FINKEL, 2008; MITRA et al, 2009).

Como complemento aos dados relacionados à apoptose, e visando avaliarmos os efeitos do tratamento da Chalcona N9 sobre o potencial proliferativo das células U-87 MG utilizamos o teste de clonogenicidade (FRANKEN et al., 2006). Este ensaio é amplamente utilizado para estimar a sobrevivência celular reprodutiva de linhagens celulares tumorais após a exposição aos antineoplásicos ou à radiação ionizante (BROWN e ATTARDI, 2005). Verificamos neste ensaio que o tratamento com a Chalcona N9 é capaz de reduzir o potencial

reprodutivo das células de glioblastoma humano em até 92% num período de tratamento de 24 horas. Observamos que a concentração da Chalcona N9, bem como o tempo de exposição a esse composto, determinaram a sobrevivência das células tumorais U-87 MG, sobrevivência essa relacionada diretamente pelo número de suas células filhas, seus clones. Demonstramos ainda que após o tempo de 48 horas de tratamento, na concentração de 1 µg/mL de N9, a capacidade de proliferação destas células é reduzida a quase 98%. Como este ensaio é realizado por um longo período após o tratamento (10 a 15 dias), é possível identificar células que mantiveram sua capacidade de divisão ilimitada e através deste mimetizar a fisiologia celular *in vivo* (BROWN e ATTARDI, 2005; SALEEM et al., 2009).

Resumidamente, sugerimos que a sequência dos eventos que levam à apoptose nas células tratadas com a Chalcona N9 parece ocorrer na ordem que segue: despolarização da membrana mitocondrial, diminuição na expressão das proteínas do ciclo celular, interrupção do ciclo na transição G1/S, retração das células e translocação da fosfatidilserina e o último fenômeno observado e evidenciado pela marcação com a técnica do TUNEL, a fragmentação internucleossomal do DNA.

Após verificarmos o efeito citotóxico da Chalcona N9 *in vitro*, prosseguimos o estudo com a avaliação de seu efeito antitumoral *in vivo*. Como primeira etapa, utilizamos o modelo do tumor ascítico de Ehrlich em camundongos BALB/c. Devido a simplicidade deste modelo e a rápida progressão do tumor, ele se tornou a ferramenta ideal para avaliação da resposta *in vivo* para várias moléculas. Avaliamos a eficácia antitumoral da Chalcona N9 através da administração oral, intraperitoneal e intravenosa. A Chalcona N9 foi capaz de diminuir o volume tumoral, medido em função do peso do animal, e de aumentar a sobrevivência nos animais tratados pela via oral e pela via intraperitoneal. Nos animais tratados pela via intraperitoneal esta diminuição no volume foi significativa. Além de não se mostrar significativamente efetiva, a dose de 1 mg/Kg por via intravenosa foi a dose limitante para o tratamento por esta via. Em um ensaio piloto, observamos morte e convulsão nos animais tratados por esta via de administração na dose de 5 mg/Kg. A administração por via oral se mostrou eficaz nas doses de 30 e 100 mg/Kg, entretanto optamos por seguir utilizando a via intraperitoneal para os experimentos seguintes, devido a pouca quantidade do composto disponível para os ensaios e a facilidade de administração da droga, na manipulação dos animais.

Há que se ponderar que embora efetiva no modelo de tumor ascítico, a Chalcona N9 poderia não ser capaz de atuar em outros modelos tumorais *in vivo*. Seu maior efeito no modelo de tumor ascítico de Ehrlich foi por via intraperitoneal, e isso poderia ser atribuído a atividade *in situ*, já que a dispersão da Chalcona foi injetada diretamente no local do tumor. Para dirimir qualquer dúvida utilizamos outro modelo tumoral, o modelo de melanoma B16-F10 em camundongos C57BL/6.

Tumores de melanoma raramente se desenvolvem espontaneamente em camundongos. O melanoma B16 é um dos três melanomas originado naturalmente em camundongos e que pode ser propagado como linhagem celular ou como tumor transplantável. Esta linhagem celular surgiu espontaneamente em camundongos C57BL/6, em 1954 e como a maioria dos tumores, é de origem monoclonal. Os subclones da linhagem B16 foram desenvolvidos em experimentos realizados no laboratório de J. Fidler, nos anos de 1970 e atualmente os mais comumente empregados em sistemas experimentais em roedores são B16F1 (baixo potencial metastático) e B16F10 (alto potencial metastático) (NAKAMURA et al., 2002; TEICHER, 2011).

Utilizamos o modelo de melanoma B16-F10 em camundongos, conduzido por 2 semanas de tratamento com a Chalcona N9, nas doses de 3, 10 e 30 mg/Kg administradas diariamente por via intraperitoneal. Na avaliação da eficácia antitumoral, demonstramos que o tamanho do tumor foi reduzido nas maiores doses testadas e que a sobrevivência foi aumentada em consequência destes tratamentos. Destacamos que nenhum sinal evidente de efeitos adversos nos animais foi observado durante o tratamento com a Chalcona N9 tais como desconforto, mudanças comportamentais, diarreia, perda de pelos ou de peso. A ausência de efeitos adversos visíveis foi igualmente observado por Padhye et al. (2009). Os autores referem que nos animais tratados com chalconas da Garcínia não foram observadas alterações patológicas em órgãos como fígado, rim, pulmão e coração, tampouco a perda de peso foi verificada.

Modelos animais proporcionam um modelo experimental para avaliar os efeitos antitumorais de novos agentes terapêuticos, porém sua pertinência no câncer humano pode estar superestimada. Quase 30% dos compostos que foram desconsiderados pelos modelos singênicos, estavam ativos em pelo menos um modelo xenográfico humano, por exemplo o paclitaxel. O primeiro bem sucedido tumor humano xenográfico em camundongo *nude* foi registrado no final dos anos de 1960. Atualmente, estes modelos são extensivamente utilizados no

desenvolvimento de potenciais agentes antitumorais e estudos da biologia do tumor. Camundongos com várias imunodeficiências combinadas têm aumentado o espectro de possíveis modelos e tornado ativos tumores humanos de difícil explante, tais como os do sistema hematopoiético. Assim, os explantes humanos têm se tornado uma ferramenta de trabalho no desenvolvimento de drogas antitumorais e seu uso é altamente recomendado por várias agências regulatórias (TEICHER, 2011).

Como última etapa, testamos a Chalcona N9 nas células de glioblastoma humano U-87 MG em um modelo xenográfico. Utilizamos camundongos *nude* para a inoculação das células U-87 MG e demonstramos que o tratamento com a N9 reduziu o crescimento tumoral *in vivo*, e apesar de não evidenciados, os efeitos observados *in vitro*, pelo menos em parte, poderiam ser responsáveis por inibir a progressão do tumor *in vivo*. Neste modelo tumoral, o experimento foi encerrado no 30º dia após a inoculação subcutânea das células, sem observação de morte nos animais, independente do grupo estudado. É importante registrar que, embora este modelo tumoral tenha apresentado maior homogeneidade nos volumes dos tumores, após o 7º dia da inoculação (data do início do tratamento) foi observado que três animais possuíam tumores menores que a média de todos os outros. Curiosamente um destes animais, randomizado para o grupo tratado com 30 mg/Kg, desde o início do tratamento não apresentou crescimento do tumor, enquanto que os outros dois animais (um no grupo controle e o outro no grupo de 10 mg/Kg) apresentaram crescimento no volume tumoral. Mais significativo ainda, foi a observação que este animal após os 21 dias de tratamento apresentou o volume do tumor menor do que no início do tratamento, indicando uma regressão do crescimento tumoral. Ademais, no modelo xenográfico também não foi observado nenhum sinal evidente de efeitos adversos nos animais tratados com a Chalcona N9, tais como desconforto, diarreia, mudanças comportamentais ou perda de peso. A ausência da toxicidade *in vivo* nos animais com os tumores xenográficos também foi avaliada através dos hemogramas (dados não apresentados) realizados nos animais tratados por 21 dias com a Chalcona N9. Não foram observadas diferenças nos valores das células sanguíneas entre os grupos tratados com 10 ou 30 mg/Kg da Chalcona ou no grupo controle.

Analisados em conjunto, os resultados dos experimentos *in vivo* demonstraram que a Chalcona N9 é capaz de reduzir o crescimento

tumoral, independente do modelo, além de prolongar a sobrevivência dos animais.

Em uma avaliação ampla dos efeitos antitumorais da Chalcona N9, podemos sugerir que seu efeito sobre o ciclo celular implica na interrupção da fase G1 ou transição G1/S. Atribuímos que esse efeito possa ser devido a diminuição da expressão das CDK 4 e 6, ou a não formação do complexo ativo ciclina/CDK. Supomos que a apoptose demonstrada nos experimentos *in vitro*, possa ser resultante da diminuição da expressão destas proteínas ou a não passagem pelo ponto de restrição, com ativação de proteínas pró-apoptóticas. Propomos ainda que, a apoptose possa também estar sendo desencadeada pela Chalcona N9, através de alterações no potencial de membrana mitocondrial, que pode por sua vez, induzir a ativação da apoptose pela via intrínseca (Figura 22). Todos estes efeitos em conjunto resultam assim, na diminuição da capacidade proliferativa das células U-87 MG após o tratamento com a Chalcona. Os efeitos *in vitro* podem então ser estendidos a sua ação *in vivo*, demonstrados pela redução no crescimento tumoral em modelos de tumor ascítico e melanoma em camundongos e glioma humano xenográfico.

Desta maneira, os resultados obtidos neste trabalho sugerem que a Chalcona N9 parece estar envolvida na inibição do ciclo celular e indução de apoptose e que poderia ser uma ferramenta de estudo, para futuramente, constituir uma alternativa de tratamento para o câncer, associada aos antitumorais convencionais já utilizados na prática clínica.

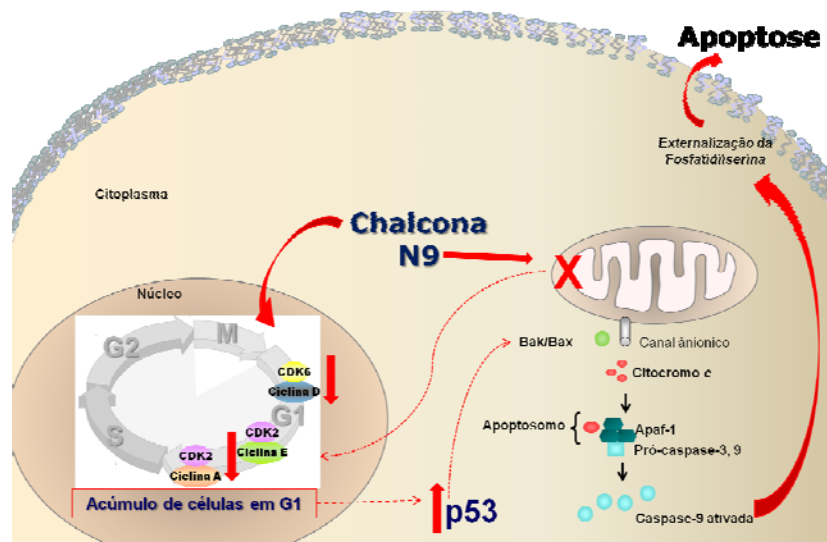


Figura 22. Possível mecanismo da Chalcona N9 sobre a linhagem de glioblastoma humano U-87 MG. A Chalcona N9 diminui a expressão de Ciclina D1 e Ciclina E, além de CDK 2 e CDK6, proteínas específicas da Fase G1 do ciclo celular. A não passagem pelo ponto R e consequente acúmulo das células em G1 pode induzir o aumento dos níveis da proteína p53, que por sua vez pode ativar as proteínas apoptóticas BAK/BAX, que induzem a liberação do citocromo c e juntamente com outras proteínas citoplasmáticas, clivam caspase 9 e caspase 3 e desta maneira a morte celular por apoptose por via mitocondrial é efetuada. Além disso, a Chalcona N9 atua diminuindo o potencial de membrana mitocondrial, que através da despolarização mitocondrial também atua na indução de apoptose pela via intrínseca. Estes dois efeitos somados têm como resultado final a morte celular programada por apoptose.

6. CONCLUSÕES

Considerações Finais:

- A Chalcona N9 demonstrou ser citotóxica nas linhagens celulares tumorais de carcinoma de pulmão humano A549, melanoma de camundongos B16-F10, glioma de rato C6, carcinoma de próstata humano DU 145, carcinoma de mama humano MCF7 e glioblastoma humano U-87 MG e com citotoxicidade menor na linhagem imortalizada de fibroblastos L929.

- Nos ensaios de citometria de fluxo para avaliação do ciclo celular foi demonstrado que a Chalcona N9 induziu o acúmulo de células na transição das fases G1-S. Ensaios de *Western blotting* demonstraram que a Chalcona N9 foi capaz de interferir na expressão de proteínas que participam do ciclo celular, reduzindo a expressão das ciclinas A, D1 e E, e quinases dependentes de ciclina CDK 2 e 6. Estes resultados corroboram as análises de citometria de fluxo e sugerem que a Chalcona N9 pode interferir no ciclo celular, promovendo um retardo na transição de G1/S e entrada em S.

- Os ensaios de incorporação de Anexina V-FITC demonstraram que as duas concentrações utilizadas da Chalcona N9 induziram a morte por apoptose nas células U-87 MG ao final de 24 horas, e aumento no número de células apoptóticas ao final de 48 horas de tratamento com a Chalcona N9. A morte por apoptose foi confirmada pelo ensaio de TUNEL, sugerindo que os estágios finais de apoptose após o tratamento com a Chalcona N9 são alcançados ao final de 48 horas de tratamento.

- Através da utilização da sonda fluorescente JC-1, foi possível verificar que a Chalcona N9 alterou o potencial de membrana mitocondrial, num período de 2 até 24 horas, sugerindo um efeito sustentado sobre a permeabilidade mitocondrial.

- Alterações morfológicas da U-87 MG, como células arredondadas e fragmentação no núcleo, puderam ser visualizadas quando observadas por microscopia de fluorescência após o período de 24 horas de incubação com a Chalcona N9 na concentração de 1 µg/mL.

- O tratamento com a Chalcona N9 nas concentrações de 0,1 µg/mL e 1 µg/mL reduziu significativamente o número de colônias das células U-87 MG, após 24 horas de incubação. O número de clones das células de glioblastoma multiforme após 48 horas de tratamento com 1 µg/mL da

N9, foi significativamente reduzido, comparado com os clones das células do grupo controle.

- No modelo de tumor ascítico de Ehrlich em camundongos BALB/c, a Chalcona N9, administrada i.p. e v.o. foi capaz de reduzir a progressão tumoral.

- No modelo experimental de melanoma *in vivo* o tratamento com a Chalcona N9, via i.p., foi capaz de reduzir o crescimento tumoral em camundongos C57Bl/6 inoculados com células B16-F10.

- No modelo xenográfico de glioblastoma multiforme o tratamento com a Chalcona N9, via i.p., foi capaz de reduzir o crescimento do tumor em camundongos *nude*, inoculados com as células U-87 MG.

Conclusões:

Em resumo, podemos concluir que a Chalcona N9 promove um atraso no ciclo celular, especialmente na fase de transição G1/S, além de promover o desencadeamento do processo apoptótico. O tratamento com a Chalcona N9 também altera o potencial de membrana mitocondrial e diminui o potencial proliferativo das células U-87 MG. Em adição a estes resultados, demonstramos ainda que a Chalcona N9 diminuiu o crescimento do tumor ascítico, do melanoma e do tumor xenográfico de glioma humano em camundongos. Assim, nossos resultados sugerem que a Chalcona N9 apresenta potencial atividade antitumoral, constituindo, portanto, uma molécula promissora para uma eventual utilização no tratamento do câncer.

7. REFERÊNCIAS

- ADAMS, J.M.; CORY, S. Bcl-2-regulated apoptosis: mechanism and therapeutic potential. *Current Opinion in Immunology*, 19: 488-496, 2007.
- AGGARWAL, B.B. Targeting inflammation-induced obesity and metabolic diseases by curcumin and other nutraceuticals. *Annual Review of Nutrition*; 30: 173–99, 2010.
- AGGARWAL, S. Targeted cancer therapies. *Nature Reviews Drug Discovery*, 9: 427-428, 2010.
- ALAO, J.P. The regulation of cyclin D1 degradation: roles in cancer development and the potential for therapeutic invention. *Molecular Cancer*, 6: 24-39, 2007.
- ALBERTS, B.; et al. The mechanics of cell division. In: *Molecular Biology of the Cell*, 4rd ed. New York: Garland Science, p. 983-1026, 2002.
- ALDANA, I.; et al. Anti-malarial activity of some 7-chloro-2-quinoxalinecarbonitrile-1,4-di-N-oxide derivatives. *Pharmazie*, 58: 68-69, 2003.
- ALI-OSMAN, F.; et al. Application of in Vivo and in Vitro Pharmacokinetics for Physiologically Relevant Drug Exposure in a Human Tumor Clonogenic Cell Assay. *Cancer Research*, 47: 3718-3724, 1987.
- ANDERSEN, M.H.; BECKER, J.C.; STRATEN, P.T. Regulators of apoptosis: suitable targets for immune therapy of cancer. *Nature Reviews Drug Discovery*, 4: 399-409, 2005.
- ANDRÉ, N. Hippocrates of Cos and apoptosis. *Lancet*, 361: 1306, 2003.
- ASHKENAZI, A.; DIXIT, V.M. Death receptors: signaling and modulation. *Science*, 281: 1305–1308, 1998.
- AUFDERHEIDE, A.C.; RODRIGUEZ-MARTIN, C. *Human paleopathology. Cambridge Encyclopedia*. Cambridge: The Cambridge University Press, 371–392,1988.

- BADN, W.; et al. Low-dose combretastatin A4 phosphate enhances the immune response of tumor hosts to experimental colon carcinoma. *Clinical Cancer Research* 12: 4714–4719, 2006.
- BALZARINI, J.; et al. Resistance Pattern of Human Immunodeficiency Virus Type 1 Reverse Transcriptase to Quinoxaline S-2720. *Journal of Virology*, 68: 7986-7992, 1994.
- BAN, H.S.; et al. Inhibition of lipopolysaccharide-induced expression of inducible nitric oxide synthase and tumor necrosis factor- α by 2'-hydroxychalcone derivatives in RAW 264.7 cells. *Biochemical Pharmacology*, 67: 1549-1557, 2004.
- BASANEZ, G.; et al. Bax, but not Bcl-XL decreases the lifetime of planar phospholipid bilayer membranes at subnanomolar concentrations. *Proceedings of the National Academy of Sciences USA*, 96: 5492-5497, 1999.
- BATOVSKA, D.I.; TODOROVA, I.T. Trends in utilization of the pharmacological potential of chalcones. *Current Clinical Pharmacology*, 5: 1-29, 2010.
- BERTRAM, J.S. The molecular biology of cancer. *Molecular Aspects of Medicine*, 21: 167-223, 2001.
- BOATRIGT, K.M.; SALVESEN, G.S. Mechanisms of caspase activation. *Current Opinion in Cell Biology*, 15: 725-731, 2003.
- BONETI, T. Sepulchretum sive Anatomia Practica ex Cadaveribus Morbo Denatis Proponens Historias et Observationes. Geneva: Cramer & Perachon; 1700.
- BOUMENDJEL, A.; RONOT, X.; BOUTONNAT, J. Chalcones Derivatives Acting as Cell Cycle Blockers: Potential Anti Cancer Drugs? *Current Drug Targets*, 10: 363-371, 2009.
- BOYE, E.; GRALLERT, B. The 2001 Nobel Prize in Physiology or Medicine. *Tidsskr Nor Laegeforen*, 121, 3500, 2001.

- BRADFORD, M. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Analytical Biochemistry*, 72: 248-254, 1976.
- BRASIL. Ministério da Saúde. Secretaria de Atenção à Saúde. Instituto Nacional de Câncer. *TNM: classificação de tumores malignos*. Tradução de Ana Lúcia Amaral Eisenberg. 6. ed. - Rio de Janeiro: INCA, 2004. 254p.
- BROWN, J.M.; ATTARDI, L.D. The role of apoptosis in cancer development and treatment response. *Nature Reviews Cancer*, 5: 231-237, 2005.
- BRUNTON, L.L.; LAZO, J.S.; PARK, K.L. *Goodman e Gilman: Manual de Farmacologia e Terapêutica*, 1ª Ed. Porto Alegre: Artmed, 2010.
- BURGUETE, A.; et al. Synthesis and anti-inflammatory/antioxidant activities of some new ring substituted 3-phenyl-1-(1,4-di-N-oxide quinoxalin-2-yl)-2-propen-1-one derivatives and of their 4,5-dihydro-(1H)-pyrazole analogues. *Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters*, 17: 6439-6443, 2007.
- CABELLO, C.M.; et al. Antimelanoma activity of the redox dye DCPIP (2,6-dichlorophenolindophenol) is antagonized by NQO1. *Biochemical Pharmacology*, 78: 344-354, 2009.
- CABRERA, M.; et al. Synthetic chalcones, flavanones, and flavones as antitumoral agents: Biological evaluation and structure-activity relationships. *Bioorganic & Medicinal Chemistry*, 15: 3356-3367, 2007.
- CAPASSO, L.; MARIANI-COSTANTINI, R. Paleopatologia dei tumori umani. *Medicina nei secoli arte e scienza*, 4: 1-51, 1994.
- CAPASSO, L. Antiquity of cancer. *International Journal of Cancer*, 113: 2-13, 2005.
- CARTA, A.; et al. Novel substituted quinoxaline 1,4-dioxides with *in vitro* antimycobacterial and anticandida activity. *European Journal of Medicinal Chemistry*, 37: 355-366, 2002.

CATARZI, D.; et al. 1,2,4-Triazolo[1,5-*a*]quinoxaline as a Versatile Tool for the Design of Selective Human A3 Adenosine Receptor Antagonists: Synthesis, Biological Evaluation, and Molecular Modeling Studies of 2-(Hetero)aryl- and 2-Carboxy-Substituted Derivatives. *Journal of Medicinal Chemistry*, 48: 7932–7945, 2005.

CERECETTO, H.; et al. Phenazine 5,10-Dioxide Derivates as Hypoxic Selective Cytotoxins. *Journal of Medicinal Chemistry*, 48: 21-23, 2005.

CHÈNE, P. Inhibition the p53–MDM2 interaction: an important target for cancer therapy. *Nature Reviews Cancer*, 3: 102-109, 2003.

CHENG, E.H.; et al. BCL-2, BCL-xL sequester BH3 domain-only molecules preventing BAX- and BAK-mediated mitochondrial apoptosis. *Molecular Cell*, 8: 705-711, 2001.

COLLINS, J. Letters from editor: The hystory of cancer. *Seminars in Roentgenology*, 39: 341-342, 2004.

COSMIC, Catalogue Of Somatic Mutations In Cancer. Trust Sanger Institute. [homepage on the internet]. [cited 2011 Jan 25]. Available from: <http://www.sanger.ac.uk/genetics/CGP/cosmic/>

COSSARIZZA, A., et al. A new method for the cytofluorimetric analysis of mitochondrial membrane potential using the J-aggregate forming lipophilic cation 5,5',6,6'-tetrachloro-1,1',3,3'-tetraethylbenzimidazolcarbocyanine iodide (JC-1). *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 197:40-45, 1993.

COTRAN, R.S.; KUMAR, V.; COLLINS, T. *Robbins: Patologia Estrutural e Funcional*. 6ª Ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan. p.233-239, 2000.

CRAWFORD, K.W.; BOWEN, W.D. Sigma-2 Receptor Agonists Activate a Novel Apoptotic Pathway and Potentiate Antineoplastic Drugs in Breast Tumor Cell Lines. *Cancer Research*, 62: 313–322, 2002.

DA SILVA,S.; CHAAR, J.S.; YANO, T. Chemotherapeutic potential of two gallic acid derivative compounds from leaves of *Casearia sylvestris*

Sw (Flacourtiaceae). *European Journal of Pharmacology*, 608: 76-83, 2009.

DANIAL, N.N.; KORSMEYER, S.J. Cell Death: Critical Control Points. *Cell*, 116: 205-219, 2004.

DAVID, A.R.; ZIMMERMAN, M.R. Cancer: an old disease, a new disease or something in between? *Nature Reviews Cancer*, 10: 728-733, 2010.

DEBATIN, K.M.; FULDA, S. *Apoptosis and Cancer Therapy: From Cutting-edge Science to Novel Therapeutic Concepts*. 1^a Ed. Weinheim: Wiley-VCH, 2006

DEEP G.; AGARWAL, R. New Combination Therapies with Cell Cycle Agents. *Current Opinion in Investigational Drugs*, 9: 591-604, 2008.

DEGTEREV, A.; BOYCE, M.; YUAN, J. A decade of caspases. *Oncogene*, 22, 8543-8567, 2003.

DENOIX, P.F. Tumor, node, and metastasis (TNM). *Bulletin de L'Institut National D'Hygiene*, 1: 1-69, 1944.

DESAGHER, S.; et al. Bid-induced conformational change of Bax is responsible for mitochondrial cytochrome c release during apoptosis. *The Journal of Cell Biology*, 144: 891-901, 1999.

DIAMANDOPOULUS, G.T. Cancer: An historical perspective. *Anticancer Research*, 16: 1595-1602, 1996.

DIANA, P.; et al. Isoindolo[2,1-a]quinoxaline Derivatives, Novel Potent Antitumor Agents with Dual Inhibition of Tubulin Polymerization and Topoisomerase I. *Journal of Medicinal Chemistry*, 51: 2387-2399, 2008.

DIMMOCK, J.R.; et al. Bioactivities of chalcones. *Current Medicinal Chemistry*, 6: 1125-1149, 1999.

DIRLAM, J. P.; PRESSLITZ, J. E. Synthesis and antibacterial activity of isomeric 6 and 7-acetyl-3-methyl-2-quinoxalinecarboxamide 1,4-dioxides. *J. Med. Chem.* **1978**, 21, 483-485.

DUCKI S. The development of chalcones as promising anticancer agents. *IDrugs*. Vol 10(2007), pp. 42-46.

DUCKI, S.; et al. Potent antimitotic and cell growth inhibitory properties of substituted chalcones. *Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters*, 8: 1051-1056, 1998.

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

EGGERT, U.S.; MITCHISON, T.J.; FIELD, C.M. Animal Cytokinesis: From Parts List to Mechanisms. *The Annual Review of Biochemistry*, 75: 543-66, 2006.

EHRlich, P. *Beiträge zur experimentellen Pathologie und Chemotherapie*. Leipzig: Akad Verlag, 1909.

FESIK, S. W. Promoting apoptosis as a strategy for cancer drug discovery. *Nature Reviews Cancer*, 5: 876 – 885, 2005.

FINKEL, T.; SERRANO, M.; BLASCO, M.A. The common biology of cancer and ageing. *Nature*, 448: 767-774, 2007.

FLEMING, W.W.; et al. Log-normal distribution of equieffective doses of norepinephrine and acetylcholine in several tissues. *Journal of Pharmacological and Experimental Therapeutics*, 181: 339-345, 1972.

FLOROS, K.V.; et al. Cisplatin-induced apoptosis in HL-60 human promyelocytic leukemia cells: differential expression of BCL2 and novel apoptosis-related gene BCL2L12. *Annals of the New York of Academy of Sciences*, 1010:153-158, 2003.

FRANKEN, N.A.P.; et al. Clonogenic assay of cells in vitro. *Nature Protocols*, 1: 2315- 2319, 2006.

FROSINA, G. DNA repair and resistance of gliomas to chemotherapy and radiotherapy. *Molecular Cancer Research*, 7: 989-99, 2009.

FU, M.; et al. Minireview: Cyclin D1: Normal and Abnormal Functions. *Endocrinology*, 145: 5439-5447, 2004.

- FULDA, S.; GALLUZZI, L.; KROEMER, G. Targeting mitochondria for cancer therapy. *Nature Reviews Drug Discovery*, 9: 447-464, 2010.
- FURUSAWA, M.; et al. Antioxidant Activity of Hydroxyflavonoids, *Journal of Health Science*, 51: 376-378, 2005.
- GALI-MUHTASIB, H.U.; DIAB-ASSAF, M.; HADDADIN, M.J. Quinoxaline 1,4-dioxides induce G2/M cell cycle arrest and apoptosis in human colon cancer cells. *Cancer Chemotherapy and Pharmacology*, 55: 369–378, 2005.
- GALLUZZI, G.; BLOMGREN, K.; KROEMER, G. Mitochondrial membrane permeabilization in neuronal injury. *Nature Reviews Neuroscience*, 10: 481-494, 2009.
- GANLEY, B.; et al. Redox-Activated, Hypoxia-Selective DNA Cleavage by Quinoxaline 1,4-di-N-Oxide. *Bioorganic & Medicinal Chemistry*, 9; 2395-2401, 2001.
- GOODMAN, L.S.; et al. Nitrogen mustard therapy. Use of methyl-bis (beta-chloroethyl) amine hydrochloride and tris (beta-chloroethyl) amine hydrochloride for Hodgkin's disease, lymphosarcoma, leukemia, and certain allied and miscellaneous disorders. *JAMA*, 105: 475–476, 1946.
- GREEN, D.R.; REED, J.C. Mitochondria and Apoptosis. *Science*, 281: 1309-1312, 1998.
- HAJDU, S.I. A Note From History: Landmarks in History of Cancer, Part 1. *Cancer*, Oct 19, 2010a. [Epub ahead of print].
- HAJDU, S.I. A Note From History: Landmarks in History of Cancer, Part 2. *Cancer*, Dec 19, 2010b. [Epub ahead of print].
- HAJDU, S.I. 2000 years of chemotherapy of tumors. *Cancer*, 103: 1097–1102, 2005.
- HAJDU, S.I. Greco-Roman thought about cancer. *Cancer*, 100: 2048–2051, 2004.

- HANAHAHAN, D.; WEINBERG, R.A. The hallmarks of cancer. *Cell*, 100: 57-70, 2000.
- HANS, R.H.; et al. Synthesis, antimalarial and antitubercular activity of acetylenic chalcones. *Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters*, 20: 942-944, 2010.
- HARAGUCHI, H.; et al. Mode of Antibacterial Action of Retrochalcones from *Glycyrrhiza inflata*. *Phytochemistry*, 48: 125-129, 1998.
- HARBOUR, J.W.; et al. Abnormalities in structure and expression of the human retinoblastoma gene in SCLC. *Science*, 241: 353-357, 1988.
- HARPER, J.; BROOKS, G. The mammalian cell cycle. In: Humphrey, T.; Brooks, G. *Cell Cycle Control: Mechanisms and Protocols*. New York: Springer Verlag, 2004. p 113-153.
- HATANO, T.; et al. Phenolic Constituents of Licorice. VIII.1) Structures of Glicophenone and Glicoisoflavanone, and Effects of Licorice Phenolics on Methicillin-Resistant *Staphylococcus aureus*. *Chemical & Pharmaceutical Bulletin*, 48: 1286-1292, 2000.
- HAYFLICK, L.; MOORHEAD, P.S. The limited *in vitro* lifetime of human diploid cell strains. *Experimental Cell Research*, 25: 585-621, 1961.
- HE, W.; et al. Potent quinoxaline-based inhibitors of PDGF receptor tyrosine kinase activity. Part 2: the synthesis and biological activities of RPR127963 an orally bioavailable inhibitor. *Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters*, 13: 3097-3100, 2003.
- HEILIG, R.; et al. The DNA sequence and analysis of human chromosome 14. *Nature*, 421: 601-607, 2003.
- HENGARTNER, M.O. The biochemistry of apoptosis. *Nature*, 407: 770-776, 2000.
- HERR, I.; DEBATIN, K.M. Cellular stress response and apoptosis in cancer therapy. *Blood*, 98: 2603-2614, 2001.

- HIRSCHI, A.; et al. An overlapping kinase and phosphatase docking site regulates activity of the retinoblastoma protein. *Nature Structural & Molecular Biology*, 17: 1051-1057, 2010.
- HOCHEGGER, H.; TAKEDA, S.; HUNT, T. Cyclin-dependent kinases and cell-cycle transitions: does one fit all? *Nature Reviews Molecular Cell Biology*, 9: 910-916, 2008.
- HSU, Y.L.; et al. Chalcone inhibits the proliferation of human breast cancer cell by blocking cell cycle progression and inducing apoptosis. *Food and Chemical Toxicology*, 44: 704-713, 2006.
- HSU, Y.; WU, L.; KUO, P. Dehydrocostuslactone, a Medicinal Plant-Derived Sesquiterpene Lactone, Induces Apoptosis Coupled to Endoplasmic Reticulum Stress in Liver Cancer Cells. *The Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics*, 329: 808–819, 2009.
- INCA. Ministério da Saúde. Instituto Nacional de Câncer. *Estimativa 2010: incidência de câncer no Brasil*. Cordeiro, B.P.V.; et al. Rio de Janeiro: INCA, 2009.
- ISOMOTO, H.; et al. Sofalcone, a mucoprotective agent, increases the cure rate of Helicobacter pylori infection when combined with rabeprazole, amoxicillin and clarithromycin. *World Journal of Gastroenterology*, 11: 1629–1633, 2005.
- IWATA, K.; YUNG, W.K.A.; FIELDS, W.S. In Vitro Effects of ACNU, BCNU, CDDP, and Bleomycin on Human Glioma Cells. *Neurologia Medico-Chirurgica*, 28: 965-969, 1988.
- JAIN, K.K. Future prospects for the cure of brain câncer. *Technology in Cancer Research and Treatment*, 5: 183-184, 2006.
- JARVILL-TAYLOR, K.J.; ANDERSON, R.A.; GRAVES, D.J. A hydroxychalcone derived from cinnamon functions as a mimetic for insulin in 3T3-L1 adipocytes. *Journal of the American College of Nutrition*, 20: 327–336, 2001.
- JAYAPAL, M.R.; PRASAD, K.S.; SREEDHAR, N.Y. Synthesis and characterization of 2,5-dihydroxy substituted Chalcones using

socl2/etoh. *International Journal of Pharma and Bio Sciences*, 1: 361-366, 2010.

JIN, Z.; EL-DEIRY, W.S. Overview of cell death signaling pathways. *Cancer Biology & Therapy*, 4: 139-163, 2005.

JUIN, P.; et al. c-Myc functionally cooperates with Bax to induce apoptosis. *Molecular Cellular and Biology*, 22: 6158–6169, 2002.

KAWANISHI, N.; et al. Structure-based drug design of a highly potent CDK1,2,4,6 inhibitor with novel macrocyclic quinoxalin-2-one structure. *Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters*, 16: 5122–5126, 2006.

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

KIM, R. Recent advances in understanding the cell death pathways activated by anticancer therapy. *Cancer*, 103, 1551–1560, 2005.

KIMURA, Y.; BABA, K. Antitumor and antimetastatic activities of *Angelica keiskei* roots, part 1: Isolation of an active substance, xanthoangelol. *International Journal of Cancer*, 106: 429–437, 2003.

KLEIHUES, P.; CAVANEE, W. *World Health Organization Classification of Tumors: Tumors of the nervous system-Pathology and Genetics*. Lyon: IRAC Press; 2000.

KOCKX, M.M.; et al. RNA synthesis and splicing interferes with DNA *in situ* end labeling techniques used to detect apoptosis. *The American Journal of Pathology*, 152: 885–888, 1998.

KOOPMAN, G.; et al. Annexin V for flow cytometric detection of phosphatidylserine expression on B cells undergoing apoptosis. *Blood*, 84: 1415-1420, 1994.

KORSMEYER, S.J. Bcl-2 initiates a new category of oncogenes: regulators of cell death. *Blood*, 80: 879- 886, 1992.

- KOSTANECKI, S.V.; TAMBOR, J. *Chemische Berichte*, 32: 1921, 1899.
- KROEMER, G. Mitochondrial control of apoptosis: an introduction. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 304: 433–435, 2003.
- KROEMER, G.; GALLUZZI, L.; BRENNER, C. Mitochondrial Membrane Permeabilization in Cell Death. *Physiological Reviews*, 87: 99-163, 2007.
- KRYSKO, D.V.; et al. Apoptosis and necrosis: Detection, discrimination and phagocytosis. *Methods*, 44: 205-221, 2008.
- KUMAR, S.K.; et al. Design, synthesis, and evaluation of novel boronic–chalcone derivatives as antitumor agents. *Journal of Medicinal Chemistry*, 46: 2813–2815, 2003.
- KVIECINSKI, M.R.; et al. Study of the antitumor potential of *Bidens pilosa* (Asteraceae) used in Brazilian folk medicine. *Journal of Ethnopharmacology*, 117: 69-75, 2008.
- LAMBA, J.K. Genetic factors influencing cytarabine therapy. *Pharmacogenomics*, 10: 1657–1674, 2009.
- LAPENNA, S.; GIORDANO, A. Cell cycle kinases as therapeutic targets for cancer. *Nature Reviews Drug Discovery*, 8: 547-566, 2009.
- LAZEBNIK, Y. What are the hallmarks of cancer? *Nature Reviews Cancer*, 10, 232-233, 2010.
- LEE, Y.M.; et al. Induction of Cell Cycle Arrest in Prostate Cancer Cells by the Dietary Compound Isoliquiritigenin. *Journal of Medicinal Food*, 12: 8-14, 2009.
- LEE Y.M.; SICINSKI, P. Targeting Cyclins and Cyclin- Dependent Kinases in Cancer. Lessons from Mice, Hopes for Therapeutic Applications in Human. *Cell Cycle*, 5: 2110-2114, 2006.

- LEE, Y.S.; et al. Suppression of tumor growth by a new glycosaminoglycan isolated from the African giant snail *Achatina fulica*. *European Journal of Pharmacology*, 465: 191–198, 2003.
- LEIST, M.; JÄÄTTELÄ, M. Four deaths and a funeral: From caspases to alternative mechanisms. *Nature Reviews Molecular Cell Biology*, 2: 1-10, 2001.
- LIAN, Z.; CRISTOFANO, A. Class reunion: PTEN joins the nuclear crew. *Oncogene*, 24: 7394-7400, 2005.
- LOHMANN, C.; et al. Induction of Tumor Cell Apoptosis or Necrosis by Conditional Expression of Cell Death Proteins: Analysis of Cell Death Pathways and In Vitro Immune Stimulatory Potential. *The Journal of Immunology*, 182: 4538-4546, 2009.
- LOPEZ, S.N.; et al. In vitro antifungal evaluation and structure-activity relationships of a new series of chalcone derivatives and synthetic analogues, with inhibitory properties against polymers of the fungal cell wall. *Bioorganic & Medicinal Chemistry*, 9: 1999–2013, 2001.
- LOUIS, D.N. Molecular pathology of malignant gliomas. *Annual Review of Pathology*, 1: 97-117, 2006.
- LUNDBERG, A.S.; WEINBERG, R.A.. Control of the Cell Cycle and Apoptosis. *European Journal of Cancer*, 35: 531-539, 1999.
- LUO, X.; et al. Bid, a Bcl-2 interacting protein, mediates cytochrome c release from mitochondria in response to activation of cell surface death receptors. *Cell*, 94: 481-490, 1998.
- MALUMBRES, M.; BARBACID, M. Cell cycle, CDKs and cancer: a changing paradigm. *Nature Reviews Cancer*, 9: 153-167, 2009.
- MALUMBRES, M.; BARBACID, M. Mammalian cyclin-dependent kinases. *Trends in Biochemical Sciences*, 30: 630-641, 2005.
- MALUMBRES, M.; BARBACID, M. To cycle or not cycle: a critical decision in cancer. *Nature Reviews Cancer*, 1: 222-231, 2001.

MALUMBRES, M.; et al. CDK inhibitors in cancer therapy: what is next? *Trends in Pharmacological Sciences*, 29: 16-21, 2008.

MANSON, M.M. Cancer prevention – the potential for diet to modulate molecular signalling. *Trends in Molecular Medicine*, 9: 11–18, 2003

MASON, W.P. Emerging drugs for malignant glioma. *Expert Opinion on Emerging Drugs*, 13: 81-94, 2008.

MASSAGUÉ, J. G1 cell-cycle control and cancer. *Nature*, 432, 298-306, 2004.

MATSURA, T.; et al. Phosphatidylserine peroxidation/externalization during staurosporine-induced apoptosis in HL-60 cells. *FEBS Letters*, 524: 25-30, 2002.

MINOTTI, G.; et al. Anthracyclines: molecular advances and pharmacologic developments in antitumor and cardiotoxicity. *Pharmacological Reviews*, 56: 185 – 229, 2004.

MIRANDA CL.; et al. Prenylated chalcones and flavanones as inducers of quinone reductase in mouse Hepa 1c1c7 cells. *Cancer Letters*, 149: 21-29, 2000.

MITRA, K.; et al. A hyperfused mitochondrial state achieved at G1–S regulates cyclin E buildup and entry into S phase. *Proceedings of the National Academy of Sciences USA*, 106: 11960–11965, 2009.

MOLL, U.M.; PETRENKO, O. The MDM2-p53 Interaction. *Molecular Cancer Research*, 1: 1001-1008, 2003.

MONGE, A.; et al. Novel antagonists of 5-HT₃ receptors. Synthesis and biological evaluation of piperazinylquinoxaline derivatives. *Journal of Medicinal Chemistry*, 36: 2745-275, 1993.

MOSMANN, T. Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: application to proliferation and cytotoxicity assays. *Journal of Immunological Methods*, 65: 55–63, 1983.

MOTANI, K.; et al. Proteomic analysis of apoptosis induced by xanthoangelol, a major constituent of *Angelica keiskei*, in

- neuroblastoma. *Biological & Pharmaceutical Bulletin*, 31: 618–626, 2008.
- MOUSTAFA, O.S . Synthesis of Some New Heterocycles of Pharmaceutical Interest: Pyridinyl and Isoxazolyl Quinoxaline Derivatives. *Journal of the Chinese Chemical Society*, 50: 1205-1208, 2003.
- MURRAY, A.W. Recycling the cell cycle: cyclins revisited. *Cell*, 116: 221–234, 2004.
- NAKAMURA K; et al. Characterization of mouse melanoma cell lines by their mortal malignancy using an experimental metastatic model. *Life Sciences*, 70: 791-798, 2002.
- NARITA, M.; et al. Bax interacts with the permeability transition pore to induce permeability transition and cytochrome c release in isolated mitochondria. *Proceedings of the National Academy of Sciences USA*, 95: 14681-14686, 1998.
- NICHOLAS, M.K. Glioblastoma multiforme: evidence-based approach to therapy. *Expert Review of Anticancer Therapy*, 7: S23-S27, 2007.
- NOBILI, S.; et al. Natural compounds for cancer treatment and prevention. *Pharmacological Research*, 59: 365-378, 2009.
- NUNEZ, R. DNA Measurement and Cell Cycle Analysis by Flow Cytometry. *Current Issues in Molecular Biology*, 3: 67-70, 2001.
- NUPPONEN, N.N.; JOENSUU, H. Molecular pathology of gliomas. *Current Diagnostic Pathology*, 12: 394-402, 2006.
- OHGAKI, H.; KLEIHUES, P. Genetic pathways to primary and secondary glioblastoma. *The American Journal of Pathology*, 170: 1445-1453, 2007.
- OKADA, H.; MAK, T.W. Pathways of apoptotic and non-apoptotic death in tumor cells. *Nature Reviews Cancer*, 4: 592-603, 2004.

- OPLETALOVA, V.; SEDIVY, D. Chalcones and their heterocyclic analogs as potential antifungal chemotherapeutic agents. *Ceska a Slovenska Farmacie*, 48: 252–255, 1999.
- ORIMO, A.; WEINBERG, R.A. Stromal Fibroblasts in Cancer: A Novel Tumor-Promoting Cell Type. *Cell Cycle*, 5: 1597-1601, 2006.
- ORTEGA, M.A.; et al. Pyrazolo[3,4-b]quinoxalines. A New Class of Cyclin-Dependent Kinases Inhibitors. *Bioorganic & Medicinal Chemistry*, 10: 2177-2184, 2002.
- ORTNER, D.J. *Identification of pathological conditions in human skeletal remains*. New York: Academic Press, 503–544, 2003.
- PADHYE, S.; et al. Emerging role of Garcinol, the antioxidant chalcone from *Garcinia indica* Choisy and its synthetic analogs. *Journal of Hematology & Oncology*, 2: 38-50, 2009.
- PARDEE, A.B. A restriction point for control of normal animal cell proliferation. *Proceedings of the National Academy of Sciences USA*, 71: 1286-1290, 1974.
- PARK, M. T.; LEE, S. J. Cell cycle and cancer. *Journal of Biochemistry and Molecular Biology*, 36: 60 – 65, 2003.
- PATIL, C.B.; MAHAJAN, S.K.; KATTI, S.A. Chalcone: A Versatile Molecule. *Journal of Pharmaceutical Sciences & Research*, 1: 11-22, 2009.
- PAVLETICH, N.P. Mechanisms of cyclin-dependent kinase regulation: structures of Cdks, their cyclin activators, and Cip and INK4 inhibitors. *Journal of Molecular Biology*, 287: 821-828, 1999.
- PEREZ-MELERO, C.; et al. A new family of quinoline and quinoxaline analogues of combretastatins. *Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters*, 14: 3771-3774, 2004.
- POLAGER, S.; GINSBERG, D. P53 and E2F, partners in life and death. *Nature Reviews Cancer*, 9: 738-748, 2009.

- PONTEN, J.; MACINTYRE, E.H. Long term culture of normal and neoplastic human glia. *Acta Pathologica et Microbiologica Scandinavica*, 74: 465-486, 1968.
- PRIYADARSINI, I.K.; et al. Free Radical Intermediates in the Reduction of Quinoxaline N-Oxide Antitumor Drugs: Redox and Prototropic Reactions. *Advanced ACS Abstracts*, 12: 73-82, 1996.
- RAK, J.; et al. Oncogenes as inducers of tumor angiogenesis. *Cancer Metastasis Reviews*, 14: 263-277, 1995.
- RAMAZZINI, B. *De Morbis Artificum*. Aufl Mutinae: A. Capponi; 1700.
- REARDON, D.A. Glioblastoma—more questions than answers? *Nature Reviews Clinical Oncology*, 3: 60-61, 2006.
- REDDY, L.; ODHAV, B.; BHOOLA, K.D. Natural products for cancer prevention: a global perspective. *Pharmacology & Therapeutics*, 99: 1-13, 2003.
- REERS, M.; SMITH, T.W.; CHEN, L.B. J-aggregate formation of a carbocyanine as a quantitative fluorescent indicator of membrane potential. *Biochemistry*, 30: 4480-4486, 1991.
- REGINA, A.; et al. Antitumour activity of ANG1005, a conjugate between paclitaxel and the new brain delivery vector Angiopep-2. *British Journal of Pharmacology*, 155: 185-197, 2008.
- REINERS, J.J.; et al. The Chemotherapeutic Agents XK469 (2-{4-[(7-Chloro-2-quinolinyloxy]phenoxy}propionic acid) and SH80 (2-{4-[(7-Bromo-2-quinolinyloxy]phenoxy}propionic acid) Inhibit Cytokinesis and Promote Polyploidy and Induce Senescence. *The Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics*, 328: 796-806, 2009.
- RICH, J.N.; BIGNER, D.D. Development of novel targeted therapies in the treatment of malignant glioma. *Nature Reviews Drug Discovery*, 3: 430-446, 2004.

- RIEDL, S.J.; SALVESEN, G.S. The apoptosome: signalling platform of cell death. *Nature Reviews Molecular Cell Biology*, 8: 405-413, 2007.
- SABZEVARI, O.; et al. Molecular cytotoxic mechanisms of anticancer hydroxychalcones. *Chemico-Biological Interactions*, 148: 57-67, 2004.
- SAGONA, A.P.; STENMARK, H. Cytokinesis and cancer. *FEBS Letters*, 584: 2652-2661, 2010.
- SAKAI, M.; et al. Translocator protein (18 kDa) mediates the pro-growth effects of diazepam on Ehrlich tumor cells in vivo. *European Journal of Pharmacology*, 626: 131-138, 2010.
- SALEEM, M.; et al. Lupeol inhibits proliferation of human prostate cancer cells by targeting β -catenin signaling. *Carcinogenesis*, 30: 808-817, 2009.
- SALGALLER, M.L.; LIAU, L.M. Current status of clinical trials for glioblastoma. *Reviews on Recent Clinical Trials*, 1: 265-281, 2006.
- SALINAS-JAZMÍN, N.; FUENTE, M.; JAIMEZ, R. Antimetastatic, antineoplastic, and toxic effects of 4-hydroxycoumarin in a preclinical mouse melanoma model. *Cancer Chemotherapy & Pharmacology*, 65: 931-940, 2010.
- SALVATI, M.; et al. Insights into pharmacotherapy of malignant glioma in adults. *Expert Opinion on Pharmacotherapy*, 10: 2279-2290, 2009.
- SATHORNSUMETEE, S.; RICH, J.N.; REARDON, D.A. Diagnosis and treatment of high-grade astrocytoma. *Neurologic Clinics*, 25: 1111-1139, 2007.
- SAWYERS, C. Targeted cancer therapy. *Nature*, 432: 294-297, 2004.
- SCHIEKE, S.M.; McCOY, J.P.Jr.; FINKEN, T. Coordination of mitochondrial bioenergetics with G1 phase cell cycle Progression. *Cell Cycle*, 7: 1782-1787, 2008.

SCHULER, M.; et al. p53 induces apoptosis by caspase activation through mitochondrial cytochrome c release. *The Journal of Biological Chemistry*, 275: 7337–7342, 2000.

SCHULER, M.; GREEN, D.R. Mechanisms of p53-dependent apoptosis. *Biochemical Society Transactions*, 29: 684–687, 2001.

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

SHACKELFORD, R.E.; KAUFMANN, W.K.; PAULES, R.S. Cell Cycle Control, Checkpoint Mechanisms, and Genotoxic Stress. *Environmental Health Perspectives*, 107: 5-24, 1999.

SHERR, C.J. The Pezcoller Lecture: Cancer Cell Cycles Revisited. *Cancer Research*, 60, 3689-3695, 2000.

SIMÕES, C.M.O.; et al. *Farmacognosia: da Planta ao Medicamento*. 6ª Ed. Porto Alegre: Editora da UFSC e UFRGS, 2007.

SINGH, S.K.; et al. Synthesis and biological evaluation of 2,3-diarylpyrazines and quinoxalines as selective COX-2 inhibitors. *Bioorganic & Medicinal Chemistry*, 12: 1881-1893, 2004.

SMILEY, S.T.; et al. Intracellular heterogeneity in mitochondrial membrane potentials revealed by a J-aggregate forming lipophilic cation JC-1. *Proceedings of the National Academy of Sciences USA*, 88: 3671–3675, 1991.

SOENGAS, M.S.; et al. Apaf-1 and Caspase-9 in p53-Dependent Apoptosis and Tumor Inhibition. *Science*, 284: 156–159, 1999.

SOENGAS, M.S.; LOWE, S.W. *Oncogene*, 22: 3138–3151, 2003.

SOGAWA, S.; et al. Protective effects of hydroxychalcones on free radical induced cell damage. *Biological & Pharmaceutical Bulletin*, 17: 251-256, 1994.

SOGAWA, S.; et al. 3,4-Dihydroxy chalcones as potent 5- lipoxygenase and cyclooxygenase inhibitors. *Journal of Medicinal Chemistry*, 36: 3904-3909, 1993.

SRIDEVI, C.H.; et al. Antimicrobial Evaluation and Synthesis of Some Phenylpyrazolo benzothiazolo quinoxaline Derivatives. *E-Journal of Chemistry*, 6, 866-870, 2009.

SRIDEVI, C.H.; et al. Synthesis of Some Phenylpyrazolo Benzimidazolo Quinoxaline Derivatives as Potent Antihistaminic Agents. *E-Journal of Chemistry*, 7: 234-238, 2010.

STAMATAKOS, M.; et al. Cell cyclins: triggering elements of cancer or not? *World Journal of Surgical Oncology*, 8: 111-118, 2010.

STATHOPOULOS, G. Kanam mandible's tumour. *Lancet*, 1: 165–167, 1975.

STEWART, L.A. Chemotherapy in adult high-grade glioma: a systematic review and meta-analysis of individual patient data from 12 randomised trials. *Lancet*, 359: 1011-1018, 2002.

STOLL, R.; et al. Chalcone derivatives antagonize interactions between the human oncoprotein MDM2 and p53. *Biochemistry*, 40: 336–344, 2001.

TAIT, S.W.G.; GREEN, D.R. Mitochondria and cell death: outer membrane permeabilization and beyond. *Nature Reviews Molecular Cell Biology*, 11: 621-632, 2010.

TAPAS, A.R.; SAKARKAR, D.M.; KAKDE, R.B. Flavonoids as Nutraceuticals: A Review. *Tropical Journal of Pharmaceutical Research*, 7: 1089-1099, 2008.

TEICHER, B.A. Tumor Models in Cancer Research. 2nd Ed. New York: Springer, 2011, 693 p. Series: Cancer Drug Discovery and Development.

TOBIAS, P.V. The Kanam jaw. *Nature*, 195: 946–947, 1960.

TOOGOOD, P.L. Mitochondrial drugs. *Current Opinion in Chemical Biology*, 12: 1–7, 2008.

TOZER, G.M.; PRISE, V.E.; WILSON, J. Combretastatin A-4 phosphate as a tumor vascular-targeting agent: early effects in tumors and normal tissues. *Cancer Research*, 59: 1626–1634, 1999.

TSUKIYAMA, R.Y.; et al. Antibacterial Activity of Licochalcone A against Spore-Forming Bacteria. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 46: 1226–1230, 2002

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

VIALLARD, J.F.; et al. Mécanismes moléculaires contrôlant le cycle cellulaire : aspects fondamentaux et implications en cancérologie. *Cancer/Radiothérapie*, 5: 109-129, 2001.

VOUSDEN, K.H. Outcomes of p53 activation - spoilt for choice. *Journal of Cell Science*, 119: 5015-5020, 2006.

WANG, X. The expanding role of mitochondria in apoptosis. *Genes & Development*, 15: 2922-2933, 2001.

WEINBERG, R.A. The retinoblastoma protein and cell cycle control. *Cell*, 81: 323-330, 1995.

WEINBERG, R.A. *A Biologia do Câncer*. Porto Alegre: Artmed, 2008.

WOODS, J.A.; et al. The interaction with tubulin of a series of stilbenes based on combretastatin A-4. *British Journal of Cancer*, 71: 705–711, 1995.

WORLD HEALTH ORGANIZATION. *Cancer: diet and physical activity's impact*. [homepage on the internet]. Geneva: World Health Organization; c2007 [cited 2011 Fev 01]. Available from: <http://www.who.int/dietphysicalactivity/publications/facts/cancer/en/print.html>.

WORLD HEALTH ORGANIZATION. *Cancer Prevention*. [homepage on the internet]. Geneva: World Health Organization; c2007 [cited 2011 Jan 20]. Available from: <http://www.who.int/cancer/prevention/en/>

YADAV, V.R.; et al. The role of chalcones in suppression of NF- κ B-mediated inflammation and cancer. *International Immunopharmacological*, doi:10.1016/j.intimp.2010.12.006. [Epub ahead of print]. 2011.

YANG, E.B.; et al. Inhibition of epidermal growth factor receptor tyrosine kinase by chalcone derivatives. *Biochimica et Biophysica Acta*, 1550: 144–150, 2001.

YOON G, KANG BY, CHEON SH. Topoisomerase I Inhibition and Cytotoxicity of Licochalcones A and E from *Glycyrrhiza inflata*. *Archives of Pharmacal Research*, 30: 313-316, 2007.

YOULE, R.J.; STRASSER, A. The BCL-2 protein family: opposing activities that mediate cell death. *Nature Reviews Molecular Cell Biology*, 9: 47-59, 2008.

ZAMZAMI, N.; KROEMER, G. Apoptosis: Mitochondrial Membrane Permeabilization - The (W)hole Story? *Current Biology*, 13: R71–R73, 2003,

ZWAAL, R.F.A.; SCHROIT, A.J. Pathophysiologic Implications of Membrane Phospholipid Asymmetry in Blood Cells. *Blood*, 89: 1121-1132, 1997.