

**Universidade Federal de Pernambuco
Programa de Pós-graduação em Inovação Terapêutica
Núcleo de Pesquisa em Inovação Terapêutica Suely Galdino – NUPIT SG
Laboratório de Imunomodulação e Novas Abordagens Terapêutica- LINAT**

EDUARDO DAVI LIMA DA SILVA

**AVALIAÇÃO *IN VITRO* DA ATIVIDADE ANTICÂNCER DE NOVOS DERIVADOS
DA CHALCONA FRENTE A DIFERENTES LINHAGENS TUMORAIS**

RECIFE

2020

EDUARDO DAVI LIMA DA SILVA

**AVALIAÇÃO *IN VITRO* DA ATIVIDADE ANTICÂNCER DE NOVOS DERIVADOS
DA CHALCONA FRENTE A DIFERENTES LINHAGENS TUMORAIS**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Inovação Terapêutica da Universidade Federal de Pernambuco como parte dos requisitos parciais para a obtenção do título de Mestre em Inovação Terapêutica. Área de concentração: Fármacos, Medicamentos e Isumos Essenciais para a Saúde.

Orientadora Profa. Dra. Maira Galdino da Rocha Pitta

Co-orientadora Profa. Dra. Michelly Cristiny Pereira

Recife

2020

Catálogo na Fonte:
Elaine C Barroso CRB-4/1728

Silva, Eduardo Davi Lima da

Avaliação *in vitro* da atividade anticâncer de novos derivados da chalcona frente a diferentes linhagens tumorais / Eduardo Davi Lima da Silva– 2020.

73 f.: il., fig., tab.

Orientadora: Maira Galdino da Rocha Pitta

Coorientadora: Michelly Cristiny Pereira

Dissertação (mestrado) – Universidade Federal de Pernambuco. Centro de Biociências. Programa de Pós-Graduação em Inovação Terapêutica, Recife, 2020.

Inclui referências.

1. Agentes antineoplásicos 2. Câncer 3. Testes de toxicidade I. Pitta, Maira Galdino da Rocha (orient.) II. Pereira, Michelly Cristiny (coorient.) III. Título

615.58

CDD (22.ed)

UFPE/CB-2022-022

FOLHA DE APROVAÇÃO

Nome: Eduardo Davi Lima da Silva

Título: Avaliação *in vitro* da atividade anticâncer de novos derivados da chalcona frente a diferentes linhagens tumorais

Área de concentração: Fármacos, Medicamentos e Isumos Essenciais para a Saúde.

Qualificação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Inovação Terapêutica da Universidade Federal de Pernambuco

Aprovado em: 15 /04 /2020

Banca Examinadora

Profa. Dra. Maira Galdino da Rocha Pitta.
Departamento de Bioquímica - UFPE

Assinatura: _____

Profa. Dra. Maria Danielly Lima de Oliveira
Departamento de Bioquímica- UFPE

Assinatura: _____

Profa. Dra. Amanda Pinheiro de Barros Albuquerque
Departamento de Bioquímica

Assinatura: _____

Prof. Dr. Antônio Felix da Silva Filho
Núcleo de Pesquisa em Inovação Terapêutica Suelly Galdino (NUPIT-SG)

Assinatura: _____

AGRADECIMENTOS

A Deus, pois sem ele nada disso seria possível.

A minha mãe por cada desejo de vitória, incentivo aos estudos e motivação para continuar.

A Profa. Dra Maira Galdino da Rocha Pitta por sua orientação neste trabalho, e confiança a mim dedicado. Muito obrigado por toda sua dedicação e contribuição nesta jornada. Agradeço as muitas oportunidades pensadas e direcionadas a mim, elas serão sempre lembradas por mim. Foi de extrema importância em minha carreira.

A Profa. Dra. Michelly Cristiny Pereira pela sua confiança, fraternidade e empatia. Você foi fundamental para que eu chegasse até aqui e inclusive seguir em etapas que eu achava que não chegaria. Você é um exemplo de mãe, professora, orientadora, mulher e profissional. Continue assim, você é luz. Você sempre vai ser minha mãe científica.

Ao Prof. Dr. Moacyr Jesus Barreto de Melo Rêgo por todo apoio e palavra de confiança. Sou muito grato pelas palavras a mim direcionadas sempre como apoio e também por todo aprendizado a mim confiado.

A Paulo, secretário do PPGIT, por toda ajuda em momentos de gestão.

A Vanessa Brito, Valécia, Lilia, Antônio e Raquel Vasconcelos pelos momentos divertidos que vivenciamos e cada palavra de apoio conferida. Vocês são importantes para mim. Antônio foi fundamental nesse projeto e devo minha gratidão a ele.

Agradeço imensamente aos amigos do Laboratório de Imunomodulação e Novas Abordagens Terapêutica, Renata, Pablo, Priscila, Amanda Regueira, Amanda Barros, Lidiane, Lucas cabelinho, Wiviane, Clara, Maria Andreza, Matheus, Rodrigo, Vanessa Carvalho, Yasmin, Eraldo e Anderson.

A meu marido Sérgio Rodrigues, por toda confiança e amor depositado em mim. Você foi uma pessoa essencial nessa etapa, partilhou comigo todos meus sentimentos, emoções, aflições, vitórias e por isso, sou extremamente grato. Você é peça chave na minha construção como ser humano.

A minha sogra Georgina e cunhada Lucinha, por toda ajuda, incentivo e apoio, pois sem vocês também, nada seria concretizado. Vocês fazem parte da minha vida e constroem comigo o meu caminho. Vocês são incríveis, de verdade.

Ao Instituto Nacional de Ciência e Tecnologia para Inovação Farmacêutica (INCT_if) e FACEPE, pelo apoio financeiro.

*“A vida não merece que a gente se preocupe tanto.”
(Marie Curie)*

RESUMO

O câncer é composto por um grupo de doenças com desordem no crescimento das células, além de invasão para outras partes do corpo. É uma das principais causas de morte no Brasil e no mundo e uma das principais estratégias de tratamento é a quimioterapia. Embora seja uma alternativa eficiente, ainda se destaca a baixa seletividade, muitos efeitos colaterais, além da resistência aos quimioterápicos em uso. A busca de alternativas terapêuticas mais eficientes e seletivas se torna fundamental e as chalconas são moléculas promissoras por apresentarem diferentes atividades biológicas. Sendo assim, o objetivo deste trabalho foi avaliar a atividade anticâncer de uma série de derivados da chalcona frente a diferentes linhagens de tumorais. Os derivados foram avaliados quanto ao seu perfil citotóxico em células mononucleares do sangue periférico (CMSP) nas concentrações de 1, 10, 20, 50 e 100 μM por 72 horas pelo método MTT. Avaliamos a citotoxicidade dos mesmos derivados frente à diferentes linhagens tumorais nas mesmas concentrações, com seleção dos derivados M7, F8, F9 e F10. Realizamos o ensaio de ciclo celular das células HL-60 através da citometria de fluxo. Os derivados M2, M7, M14 e F3 não apresentaram citotoxicidade frente às células saudáveis (CMSP) nas concentrações até 100 μM , contudo os derivados M8, F7, F8, F9 e F10 apresentaram citotoxicidade. Em relação a atividade anticâncer, os derivados com melhor atividade foram os derivados M7, F8, F9 e F10, na linhagem HL-60, exibindo valores da CI_{50} de $25,91 \pm 0,38 \mu\text{M}$; $28,07 \pm 0,45 \mu\text{M}$, $27,89 \pm 1,09 \mu\text{M}$ e $26,96 \pm 0,12 \mu\text{M}$ respectivamente. Em relação a linhagem de câncer de pâncreas (MIA-PaCa-2), os derivados exibiram valores da CI_{50} entre 30 e 35 μM para a série “F”. Evidenciou-se que dos cinco derivados analisados frente a linhagem HL-60 em razão das CMSP, os derivados F8 e F9 foram os que exibiram melhor seletividade, com índices de 3,18 e 3,33 vezes mais seletivos para a linhagem HL-60, respectivamente. Os derivados F8, F9 promoveram o aumento do percentual de células na fase Sub-G0, exibindo aumento de 16,33% e 20,13% respectivamente. O tratamento das células HL-60 com a CI_{50} dos derivados F8 e F9 promoveu o aumento da porcentagem de células em apoptose inicial no tempo de 72 horas e apoptose final no tempo de 48 e 72h de forma significativa. Conclui-se que em relação a atividade anticâncer, os derivados da chalcona que apresentaram maior atividade foram os derivados M7, F8, F9 e F10. Os derivados F8 e F9 foram os que apresentaram melhor seletividade para a linhagem HL-60, além de induzirem a morte celular por apoptose.

Palavras-chave: Antitumoral; Citotoxicidade; Chalcona; Leucemia.

ABSTRACT

Cancer is a group composed of diseases with a disorder in cell growth besides to invasion to other parts of the body. It's one of the main causes of death both in Brazil and in the world and one of the main cancer treatment strategies is chemotherapy. Although chemotherapy is an effective alternative, it's not very selective, possesses many side effects, and there is high resistance to the drugs used. The search for more efficient and selective therapeutic alternatives becomes essential and chalcones are promising molecules because they have different biological activities. The objective of this project was to evaluate the anticancer activity of a series of chalcone derivatives in different tumor cell lines. The derivatives were evaluated regarding their cytotoxicity in peripheral blood mononuclear cells in concentrations of 1, 10, 20, 50, and 100 μM for 72 hours, using the MTT assay. We evaluated the cytotoxicity of the same derivatives in different tumor cell lines at the same concentrations, with selection of derivatives M7, F8, F9 and F10. We performed the cell cycle assay of HL-60 using flow cytometry. The derivatives M2, M7, M14, and F3 didn't present cytotoxicity regarding the healthy cells in concentrations up to 100 μM , however the derivatives M8, F7, F8, F9, and F10 presented cytotoxicity. Regarding anticancer activity, the derivatives with better activity were the M7, F8, F9, and F10 from the HL-60 cell line, exhibiting values of IC_{50} $25.91 \pm 0.38 \mu\text{M}$, $28.07 \pm 0.45 \mu\text{M}$, $27.89 \pm 1.09 \mu\text{M}$, and $26.96 \pm 0.12 \mu\text{M}$ respectively. Regarding the pancreatic cancer cell line (MIA-PaCa-2), the derivatives exhibited IC_{50} values between 30 and 35 μM for the "F" series. It was evident that of the five derivatives analyzed in the HL-60 cell line with the PBMC ratio, the derivatives F8 and F9 had higher selectivity, being 3.18 and 3.33 times more selective for the HL-60 cell line, respectively. Derivatives F8, F9 increased the percentage of cells in the Sub-G0 phase, showing an increase of 16.33% and 20.13% respectively. The treatment of HL-60 cells with the IC_{50} of derivatives F8 and F9 significantly increased the percentage of cells undergoing initial apoptosis in 72 hours and final apoptosis in 48 and 72 hours. It's concluded that in relation to anticancer activity, the derivatives of chalcone that showed the highest activity were derivatives M7, F8, F9 and F10. Derivatives F8 and F9 showed the best selectivity for the HL-60 cell line, beyond to inducing cell death by apoptosis.

Keywords: Antitumor; Cytotoxicity; Chalcone; Leukemia.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

- Figura 01** – Números de novos casos de câncer em 2018, ambos os sexos e todas as idades no mundo..... 15
- Figura 02** – Distribuição proporcional dos dez tipos de câncer mais incidentes estimados para 2018 por sexo, exceto pelo não melanoma..... 16
- Figura 03** – Capacidades básicas adquiridas pelas células tumorais, de acordo com Hanahan e Weinberg..... 17
- Figura 04** - Número de novos casos de Leucemia em 2018 no mundo, ambos os sexos e todas as idades segundo o BLOBOCAN 19
- Figura 05** – Representação da estrutura química básica de uma chalcona..... 24
- Figura 06** – Fórmula estrutural química da chalcona básica e medicamentos à base da chalcona..... 28
- Figura 07** – Camadas formadas após centrifugação em gradiente de densidade. As CMSP's podem ser encontradas em cima do Ficoll. Eritrócitos, granulócitos e células mortas passam pelo meio e podem ser encontrados no fundo do falcon..... 32
- Figura 08** – Representação visual dos critérios da Regra dos Cinco. Peso molecular (PM), Área de Superfície Polar Topológica (TPSA), Ligações Rotáveis (LR), Aceptores de Ligações de Hidrogênio (ALH), Doadores de Ligações de Hidrogênio (DLH), e o log P..... 35
- Figura 09** – Esquema representativo da avaliação do ciclo celular por marcação com Iodeto de propídeo. A intensidade da fluorescência é proporcional à quantidade de DNA, o que define as células em diferentes fases do ciclo celular..... 36
- Figura 10** - Efeito dos derivados F8 e F9, citarabina (0,03 μ M) e Gemcitabina (0,07 μ M) no ciclo celular das células HL-60 e MIA-PaCa-2 após 48 horas de tratamento. Os asteriscos representam valores de *p* inferiores a 0.05 em relação aos dados da condição não tratado (NT). (A) e (E) Células não tratadas, (B) células tratadas com 0,03 μ M da citarabina, (F) células tratadas com 0,07 μ M da gemcitabina (C) e (G) células tratadas com CI₅₀ do derivado F8 e (D) e (H) células tratadas com CI₅₀

do	derivado
F9.....	44

Figura 11 - Efeito dos derivados F8 e F9 na indução da apoptose das células HL-60. Em cada quadro, o eixo da ordenada é representativo da fluorescência por iodeto de propídio e o eixo da abscissa representativo pela fluorescência da anexina V-APC. (D) e (H) Células não tratadas, (CTR) (E) e (I) células tratadas com 0,03µM do quimioterápico citarabina (CIT), (F) e (J) células tratadas com CI₅₀ do derivado F8 e (G) e (K) células tratadas com CI₅₀ do derivado F9 nos tempos de 48 e 72 horas. As células em apoptose inicial estão no quadrante inferior direito, a apoptose tardia está no quadrante superior direito, as células necróticas estão no quadrante superior esquerdo e as células viáveis estão no quadrante inferior esquerdo. *P < 0.05; **P < 0.01, ***P < 0,001 e P**** < 0,0001 em relação aos dados do controle

positivo.....	45
---------------	----

Figura 12 - Resumo gráfico das etapas realizadas no projeto 53

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

ATRA	Ácido Trans-retinóico
BCRJ	Banco de Células do Rio de Janeiro
CMSP	Células mononucleares do Sangue Periférico
DMSO	Dimethyl sulfoxide (Dimetilsulfóxido)
DNA	Ácido desoxirribonucleico
DO	Densidade óptica
EDTA	Ethylenediamine tetraacetic acid (ácido etilenodiamino tetra-acético)
CI₅₀	Metade da concentração inibitória máxima
IARC	International Agency for Research on Cancer (Agência Internacional de Pesquisa em Câncer)
INCA	Instituto Nacional de Câncer
IS	Índice de seletividade
LMA	Leucemia Mielóide Aguda
LMC	Leucemia Mielóide Crônica
LLA	Leucemia Linfocítica Aguda
LLC	Leucemia Linfocítica Crônica
LINAT	Laboratório de Imunomodulação e Novas Abordagens Terapêuticas
μM	Micromolar
MTT	3-(4,5-dimetil-2-tiazol)-2,5-difenil-2-H-brometo
NIH	National Institutes of Health (Instituto Nacional de Saúde)
Niqfar	Núcleo de Investigações Químico Farmacêuticas
PARP	Poly (ADP-ribose) polymerase (Polimerase poli (ADP-ribose))
PBS	Phosphate Buffered Saline (Tampão Salino de fosfato)
pH	Potencial Hidrogeniônico
RPM	Rotações por minuto
RPMI	Rosewell Park Memorial Institute (Instituto Memorial Parque Rosewell)
TPSA	Área de superfície polar topológica
UFPE	Universidade Federal de Pernambuco
WHO	World Health Organization (Organização Mundial de Saúde)

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	13
1.1	OBJETIVOS.....	14
1.1.1	Objetivo Geral.....	14
1.1.2	Objetivos específicos	14
2	REFERENCIAL TEÓRICO	15
2.1	ASPECTOS DA ONCOLOGIA	15
2.1.1	Epidemiologia e Fatores de Risco	15
2.1.2	Características alteradas do câncer	17
2.2	LEUCEMIAS.....	18
2.3	TRATAMENTO DO CÂNCER	21
2.4	CHALCONA [1,3-DIARIL-2-PROPEN-1-ONA].....	23
2.4.1	Regra dos “5” de Lipinski	28
3	METODOLOGIA	30
3.1	DERIVADOS DA CHALCONA E QUIMIOTERÁPICOS.....	30
3.2	COMITÊ DE ÉTICA	31
3.3	CULTIVO DE CÉLULAS	31
3.4	OBTENÇÃO DAS CÉLULAS MONONUCLEARES DO SANGUE PERIFÉRICO - CMSP	32
3.5	TESTE DE CITOTOXICIDADE EM CÉLULAS MONONUCLEARES DO SANGUE PERIFÉRICO – CMSP	33
3.6	TESTE DE CITOTOXICIDADE EM LINHAGENS DE CÉLULAS NEOPLÁSICA .	34
3.6.1	Índice de seletividade	34
3.6.2	Método teórico – Regra dos 5	34
3.7	ANÁLISE DO CICLO CELULAR.....	35
3.8	AVALIAÇÃO DA MORTE CELULAR.....	36
3.9	ANÁLISE ESTATÍSTICA	37
4	RESULTADOS	38
4.1.	Avaliação <i>in silico</i> dos parâmetros farmacocinéticos	38
4.2	AVALIAÇÃO DA CITOTOXICIDADE DOS DERIVADOS DA CHALCONA EM CÉLULAS MONONUCLEARES DO SANGUE PERIFÉRICO – CMSP E LINHAGENS DE CÉLULAS TUMORAIS	39
4.2.1	Índice de seletividade	41
4.3	AVALIAÇÃO DO EFEITO DOS DERIVADOS DA CHALCONA NO CICLO DAS CÉLULAS HL-60 E MIA-PaCa-2	42
4.4	EFEITO DOS DERIVADOS DA CHALCONA NA INDUÇÃO DE MORTE.....	44
5	DISCUSSÃO	47

6	CONSIDERAÇÕES FINAIS	52
7	PERSPECTIVAS	54
8	REFERÊNCIAL BIBLIOGRÁFICO	55

1 INTRODUÇÃO

O câncer abrange mais de 100 doenças que são caracterizadas pelo crescimento desorganizado e sem limite das células anormais, possibilitando a invasão para porções mais distantes do corpo ou conseguindo formar novos nichos em outros órgãos. Os muitos subtipos dessa patologia, são relacionados com os diferentes tipos celulares, localização e perfil molecular das diferentes subpopulações e sendo assim necessitam de atenção para promover estratégias terapêuticas (WHO, 2019).

Constantes alternâncias demográficas e epidemiológicas em todo o mundo apontam para um número crescente de casos de câncer nas próximas décadas, principalmente em países de renda baixa e média, com mais de 20 milhões de novos casos de câncer esperados anualmente até 2025 (FERLAY *et al.*, 2015).

Muitos sinais que regulam processos essenciais nas células estão voltados para a proliferação. A proliferação e a resistência a morte celular são características que as células tumorais adquirem e muitos quimioterápicos tem como alvo esses processos celulares (HANAHAN; WEINBERG, 2011b).

A quimioterapia se mostra como um tratamento primário para muitos tipos tumorais. No entanto, muitos quimioterápicos causam efeitos colaterais graves nos pacientes incluindo náusea e vômito, anemia, dor e fadiga. Ademais a resistência aos medicamentos e a falta de seletividade enfraquecem a eficácia da quimioterapia antineoplásica. Essas implicações, fornecem subsídio na busca e desenvolvimento de estratégias de tratamento, além de agentes antineoplásicos que sejam mais eficazes no tratamento quimioterápico (WEN *et al.*, 2017).

Os produtos naturais continuam sendo amplamente estudados, pela necessidade de desenvolvimento de novos agentes citotóxicos cada vez mais eficientes e seletivos, promovendo assim a formulação de novos medicamentos. A diversidade de produtos naturais encontrados na flora e seus efeitos biológicos diversos impulsionam o desenvolvimento de novas drogas, (NOBILI, *et al.*, 2009).

As chalconas são um grupo de enonas aromáticas ligadas a dois anéis aromáticos, que formam o núcleo central de uma variedade de importantes compostos biológicos obtidos de plantas. Pertencem a família das fitoalexinas, são produzidas durante a biossíntese de flavonoides na rota metabólica de algumas plantas (ex. açafraão, alcaçuz) e

possuem diversas atividades biológicas relatadas (YADAV, 2011; FONSECA, 2012; MIROSSAY; VARINSKÁ; MOJŽIL, 2017). As chalconas são relatadas por apresentarem baixa propensão em interagir com o DNA das células e com isso diminuem o risco de mutagenicidade. Esse efeito colateral é muito comum em diversos agentes quimioterápicos encontrados atualmente na clínica (LETAFAT *et al.*, 2013).

A sofalcona e a metochalcona são dois medicamentos a base da chalcona que foram aprovados e são utilizados como medicamentos contra a cólera e úlcera, respectivamente. Embora essas aplicações sejam reveladoras e representem um avanço na pesquisa com essa classe de moléculas, o amplo espectro de bioatividade das chalconas representa uma oportunidade para o desenvolvimento clínico de compostos, principalmente voltados para o tratamento do câncer (GOMES *et al.*, 2017).

Neste contexto, o objetivo do trabalho visou avaliar a atividade anticâncer de duas séries de derivados da chalcona em diferentes linhagens de tumores sólidos e hematopoiéticos.

1.1 OBJETIVOS

1.1.1 Objetivo Geral

Avaliar o efeito anticâncer de duas séries de derivados de chalconas [1,3-diaril-2-propen-1-ona] em diferentes linhagens de tumores sólidos e hematopoiéticos

1.1.2 Objetivos específicos

- Avaliar a citotoxicidade dos derivados em células normais de voluntários sadios e em linhagens de tumores sólidos e hematopoiéticos;
- Avaliar se os derivados da chalcona apresentam efeito no ciclo celular de células de tumores sólidos e hematopoiéticos;
- Investigar se os derivados da chalcona induzem a morte celular por apoptose das células de tumores sólidos e hematopoiéticos;

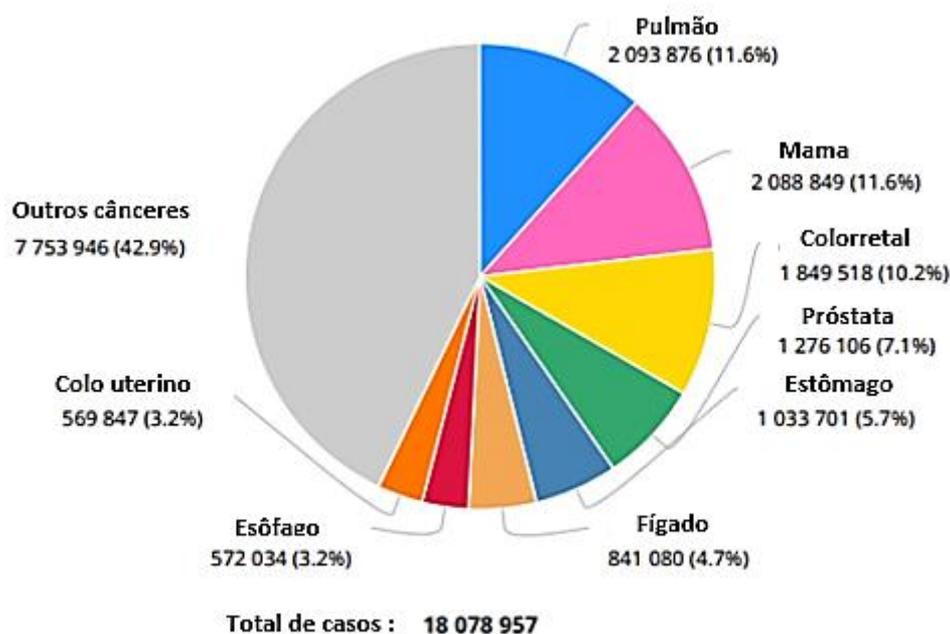
2 REFERENCIAL TEÓRICO

2.1 ASPECTOS DA ONCOLOGIA

2.1.1 Epidemiologia e Fatores de Risco

A Organização Mundial da Saúde, do inglês *World Health Organization* (WHO) estimou que 9,6 milhões de pessoas em todo o mundo morreram de câncer em 2018 e que as neoplasias de pulmão, próstata, colorretal, estômago e fígado foram os mais comuns em homens, enquanto os cânceres de mama, colorretal, pulmão, colo do útero e tireóide foram os mais comuns entre as mulheres. Projeções dessa mesma organização, apontam para o surgimento de mais de 18 milhões de novos casos de câncer em ambos os sexos em todo o mundo no ano de 2018, como apresentado na **Figura 01**.

Figura 01 – Números de novos casos de câncer em 2018, ambos os sexos e todas as idades no mundo.



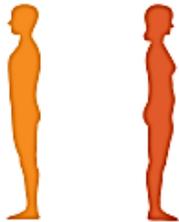
Fonte: Adaptado de WHO, (2018).

O número de novos casos de câncer por ano deverá aumentar para 23,6 milhões até 2030, segundo o Instituto Nacional de Saúde, do inglês *National Institutes of Health* (NIH). No Brasil, entre os anos de 2018 e 2019 são projetados cerca de 590 mil casos

novos de câncer em cada ano. Excetuando-se o câncer de pele não melanoma (cerca de 170 mil casos novos), ocorrerão 420 mil casos novos de câncer (INCA, 2018).

No Brasil, os tipos mais prevalentes de acordo com o Instituto Nacional de Câncer (INCA), em 2018 foram: em homens - próstata (31,7%), pulmão (8,7%), intestino (8,1%), estômago (6,3%) e cavidade oral (5,2%). Já nas mulheres, os cânceres de mama (29,5%), intestino (9,4%), colo do útero (8,1%), pulmão (6,2%), e tireóide (4,0%) são os mais incidentes, como exibido na **Figura 02** abaixo.

Figura 02 – Distribuição proporcional dos dez tipos de câncer mais incidentes estimados para 2018 por sexo, exceto pelo não melanoma.

Localização Primária	Casos	%			Localização Primária	Casos	%
			Homens	Mulheres			
Próstata	68.220	31,7%			Mama Feminina	59.700	29,5%
Traqueia, Brônquio e Pulmão	18.740	8,7%		Cólon e Reto	18.980	9,4%	
Cólon e Reto	17.380	8,1%		Colo do Útero	16.370	8,1%	
Estômago	13.540	6,3%		Traqueia, Brônquio e Pulmão	12.530	6,2%	
Cavidade Oral	11.200	5,2%		Glândula Tireoide	8.040	4,0%	
Esôfago	8.240	3,8%		Estômago	7.750	3,8%	
Bexiga	6.690	3,1%		Corpo do Útero	6.600	3,3%	
Laringe	6.390	3,0%		Ovário	6.150	3,0%	
Leucemias	5.940	2,8%		Sistema Nervoso Central	5.510	2,7%	
Sistema Nervoso Central	5.810	2,7%		Leucemias	4.860	2,4%	

*Números arredondados para múltiplos de 10.

Fonte: INCA, (2018).

Já é bem difundido na literatura, que apenas 5% a 10% de todos os tipos de neoplasias são causados pela herança de genes mutados e mutações somáticas. Os outros 90% a 95% são correlacionados com os fatores associados ao estilo de vida de cada indivíduo e ambiente (YADAV *et al.*, 2011).

Enquanto que os principais motivos e causas que condicionam o desenvolvimento tumoral não são completamente compreendidos, a Agência Internacional para Pesquisa do Câncer, do inglês *International Agency for Research on Cancer* (IARC) identificou vários fatores de risco e entre eles encontra-se o tabagismo, o consumo de álcool, dieta, obesidade e sedentarismo, infecções crônicas, histórico familiar, luz solar, radiação, fatores iatrogênicos (estado de doença, efeitos adversos ou complicações causadas por ou resultantes do tratamento médico), fatores reprodutivos e menstruais, fatores ambientais e o envelhecimento populacional (CASTLES; WAINER; JAYASEKARA, 2016; LACINA *et al.*, 2018).

Dentre os fatores de risco existentes, o tabagismo se apresenta como um dos mais importantes, além de ser um fator predominante dentre os casos de câncer. O consumo de tabaco é responsável por milhões de mortes anualmente. Podemos citar como

consequência desse fator, o câncer de pulmão, da cavidade oral, faringe, laringe, esôfago, bexiga, renal, pélvis e pâncreas (KUMAR *et al.*, 2016).

2.1.2 Características alteradas do câncer

Hanahan e Weinberg publicaram no ano de 2000, um artigo de revisão onde, apresentam as características alteradas do câncer. Foram determinadas 6 características principais, dentre elas a sustentação de uma sinalização proliferativa, evasão de supressores tumorais, resistência à morte celular, habilitação da imortalidade replicativa, indução de angiogênese e ativação de invasão e metástase (FOUAD; AANEI, 2017). Todas essas novas habilidades que alteram a fisiologia celular, representam a violação de um mecanismo de defesa antineoplásico (HANAHAN; A WEINBERG, 2000a).

Uma década mais tarde, outras características foram incluídas e a evasão do sistema imune, reprogramação do metabolismo energético, aumento da instabilidade genômica e promoção dos mecanismos de inflamação foram inseridas como novas (**Figura 03**) (HANAHAN; A WEINBERG, 2011b).

Figura 03 - Capacidades básicas adquiridas pelas células tumorais, de acordo com Hanahan e Weinberg.



Fonte: Adaptado de HANAHAN E WEINBERG, (2011b).

As características são oriundas de alterações em diversos genes que conferem a célula, a capacidade de perdurar e proliferar em condições que comumente seriam danosas e induziriam a morte celular (VOGELSTEIN, *et al.*, 2013). Os genes alterados os quais possuem alterações são divididos em duas classes: genes supressores tumorais e oncogenes. Os fatores que derivam desses genes, trabalham em conjunto para controlar a proliferação, diferenciação e a sobrevivência das células tumorais (MCCARTHY, 2016).

Os oncogenes são responsáveis por eventos genéticos que condicionam funções novas as células e se caracterizam como efeito dominante, além disso, codificam proteínas muito importantes para a proliferação celular (VICENTE-DUEÑAS, *et al.*, 2013). Os oncogenes, são provenientes da ativação de proto-oncogenes, que através de translocações e ampliações gênicas, conseguem promover essa desregulação e garantem que a célula efetive sua proliferação de forma vantajosa, além de sobrevivência (BAEISSA, *et al.*, 2016).

Já os genes supressores de tumor, estão relacionados com funções críticas e altamente conservadas. Esses genes estão envolvidos na regulação do ciclo celular e da indução de morte, diferenciação celular, a vigilância da integridade genômica e reparo de erros no material genético, transdução de sinais e adesão celular (VOGELSTEIN, *et al.*, 2013). A união de eventos genômicos e epigenéticos, desempenham importante função na caracterização do desenvolvimento dos tumores e metástases. Os avanços e achados, conduzem e possibilitam um melhor entendimento dos processos de iniciação, progressão e sinalização do câncer, substanciando um melhor direcionamento terapêutico (CHAKRAVARTHI, NEPAL e VARAMBALLY, 2016).

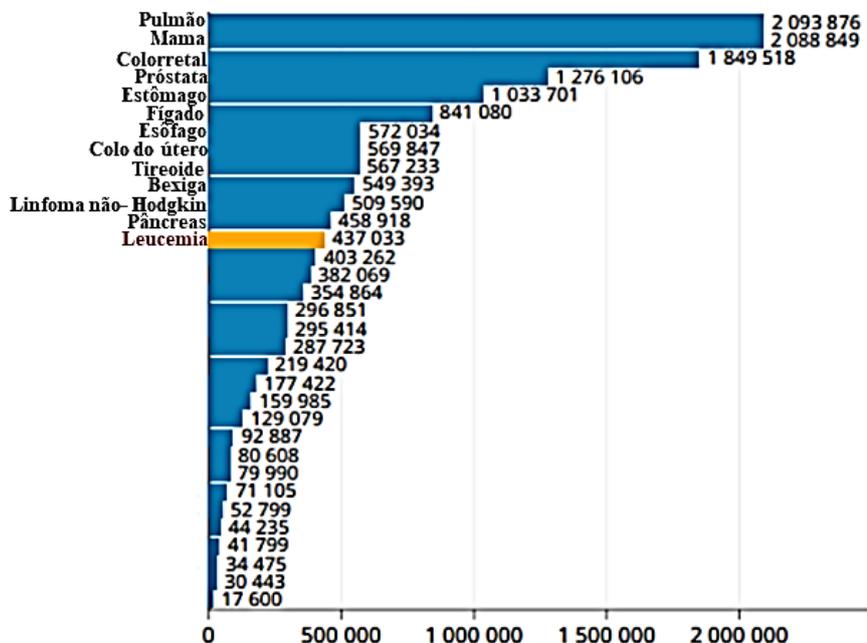
2.2 LEUCEMIAS

As células-tronco hematopoiéticas são responsáveis por produzir cerca de 10^{12} células sanguíneas efectoras todos os dias e não deixando de lado a capacidade de diferenciação. Essa alta capacidade de produção e demanda pode levar a um acúmulo de células imaturas e assim culminar em uma leucemia ou resultar em exaustão prematura de células-tronco e insuficiência hematopoiética (GALEEV; LARSSON, 2018).

Leucemia é um termo comum para designar vários distúrbios malignos relacionados com o maior número de leucócitos, também referidos como glóbulos brancos, no sangue ou na medula óssea (INCA, 2020). Segundos dados do GLOBOCAN, no ano de 2018, são projetados no mundo mais 437 mil novos casos de leucemia, sendo

o décimo tumor mais incidente dentre todos os tipos de cânceres, como mostrado na **Figura 04** (BRAY *et al.*, 2018; FERLAY *et al.*, 2018).

Figura 04 – Número de novos casos de Leucemia em 2018 no mundo, ambos os sexos e todas as idades segundo o BLOBOCAN.



Fonte: Adaptado de WHO, (2020).

Segundo o INCA, no Brasil, são projetados para cada ano do triênio 2020-2022 cerca de 5.920 casos de leucemia em homens e 4.890 casos em mulheres. Correspondendo a um risco estimado de 5,67 novos casos para cada 100 mil homens e 4,56 novos casos para cada 100 mil mulheres (INCA, 2020).

Os diferentes tipos de Leucemia estão relacionados com base na velocidade em que a doença evolui e nos tipos de glóbulos brancos que elas afetam. Com relação a velocidade, elas se classificam em crônica (a doença agrava-se lentamente) e aguda (a doença costuma piorar de maneira rápida). Em relação aos tipos de glóbulos brancos que são afetados, destaca-se os linfóides e os mielóides (INCA, 2020; JULIUSSON; HOUGH, 2016).

Sendo assim, podemos destacar 4 tipos mais comumente diagnosticados de Leucemias: Leucemia Mieloide Aguda (LMA), Leucemia Mieloide Crônica (LMC), Leucemia Linfocítica Aguda (LLA) e Leucemia Linfocítica Crônica (LLC) (WIDICK; WINER, 2016).

A LMC possui um percentual de acometimento em crianças e adolescentes de 2-3%. Quando acomete crianças e adolescentes, geralmente apresenta características mais agressivas, exibindo maior número de glóbulos brancos, maior tamanho do baço em proporção ao tamanho do corpo e maior frequência de casos com fases avançadas no diagnóstico (HIJIYA; SUTTORP, 2019).

A LMA é outro tipo de leucemia caracterizada por ser uma doença heterogênea e por apresentar a expansão clonal dos blastos mielóides, destacando a idade média dos pacientes de 68 anos (JULIUSSON *et al.*, 2016; KUCUKYURT; ESKAZAN, 2019).

A LLA é um subtipo de Leucemia mais frequente em crianças (YAMANAKA; HAYANO, 2016). Esse subtipo se caracteriza por uma proliferação das células linfóides imaturas na medula óssea, no sangue periférico e em outros órgãos (MARINESCU; VLADAREANU; MIHAI, 2015).

Por último, mas não menos importante, a LLC é caracterizada pela desenfreada proliferação de linfócitos B na medula óssea, sangue periférico e tecidos linfóides (SHIBAYAMA *et al.*, 2019). Infelizmente a LLC ainda é incurável e mesmo com a possibilidade de transplante alogênico de células tronco, muitos jovens não podem ser adequados para esse tipo de tratamento. Atualmente as pesquisas voltadas para o desenvolvimento de um tratamento para esse tipo de Leucemia estão em curso na clínica e as perspectivas aumentam a cada ano (MUNIR, 2015).

Um outro tipo de Leucemia mais raro, conhecido como LPA (Leucemia Promielocítica Aguda), que representa apenas 2,7% de todas as leucemias agudas, tende a acometer indivíduos mais jovens, apresentando uma média de idade de 44 anos quando comparada com a idade média de 68 anos para pacientes não LPA- LMA (ROSE-INMAN; KUEHL, 2014). O APL representa uma pequena fração do total de casos de Leucemias agudas, mas esse percentual representa uma proporção maior do total de casos de Leucemia Mielóide Aguda em pacientes com menos de 30 anos de idade (ODONNELL *et al.*, 2012).

Dentro do espectro total de pacientes com LPA, entre 7% a 14% desses pacientes estão mortos dentro de 30 dias após o diagnóstico. Esse curto prazo é em função de hemorragias e coagulação intravascular disseminada, com uma outra grande porcentagem devido à síndrome de falha e diferenciação de muitos órgãos (LEHMANN *et al.*, 2011).

Atualmente a LPA está associada à risco grave de sangramento e morte precoce e por isso, é de extrema importância iniciar o tratamento de imediato com ácido trans-retinóico (ATRA) e total atendimento de suporte (JULIUSSON *et al.*, 2016).

2.3 TRATAMENTO DO CÂNCER

As principais terapias voltadas ao tratamento dos diversos tipos de câncer existentes são: a terapia cirúrgica, radioativa, a imunoterapia, a terapia hormonal, o transplante de células tronco, a terapia alvo dirigida e a quimioterapia. A estratégia através da remoção cirúrgica é bastante eficiente no diagnóstico, estadiamento e tratamento do câncer e em muitos casos precisa ser pareada a outras terapias, como a radioterapia e a quimioterapia (ALMEIDA *et al.*, 2005). Quando o diagnóstico aponta a existência de um tumor maligno, o tratamento padrão se dá pela remoção do tumor através de uma ressecção cirúrgica, com posterior uso da quimioterapia e radioterapia (CAO *et al.*, 2013; (GHIRINGHELLI; APETOH, 2013a).

A radioterapia, outra estratégia de tratamento, se utiliza de ondas de alta energia, como raios-X, raios gama, feixes de elétrons ou prótons, com o propósito de eliminar ou danificar as células cancerosas. Essa estratégia consegue curar ou reduzir o tamanho do tumor em estágios mais iniciais, além de impedir o desenvolvimento de metástases ou a recidiva tumoral (AMERICAN CANCER SOCIETY, 2019; INCA, 2019b).

A resposta as estratégias iniciais (cirurgia por exemplo) apresentam boa resposta com o uso das medidas locais, onde cerca de um terço dos pacientes respondem de forma satisfatória, no entanto, os casos que não se encaixam nesse quadro, precisam de atenção e necessidade de intervenção sistêmica, trazendo a quimioterapia como alternativa (ALMEIDA *et al.*, 2005).

A quimioterapia é um tratamento com um ou uma combinação de medicamentos que pode ser administrado via oral, intravenosa, intramuscular, subcutânea, intracranial ou tópica. Tem como principal função, impedir a progressão tumoral e induzir a morte das células tumorais. No entanto, essa estratégia não objetiva aspectos como a progressão tumoral que tem como vertentes a invasão tecidual, a angiogênese e a metástase (GALLIMORE, 2016). Essa estratégia, faz uso de muitos tipos diferentes de agentes citotóxicos, no entanto, esses mesmos agentes podem não exibir muito potencial em causar morte celular através do seu mecanismo de ação, embora possuam a capacidade de induzir mutações nas células tumorais (PAYNE; MILES, 2008).

As alterações desencadeadas por esses agentes conseguem facilitar o reconhecimento pelo sistema imunológico e assim desencadear as respostas fisiológicas

responsáveis pelo processo de indução de morte conhecido por apoptose (PAYNE; MILES, 2008). Embora seja uma técnica que consiga impedir a proliferação celular, a quimioterapia ainda traz consigo efeito adversos, inclusive sobre as células normais de crescimento rápido, como as do sistema imunológico, as gastrointestinais e capilares, induzindo a efeitos colaterais como diarreia, náuseas, vômitos, alopecia (perda de cabelo) e diminuição da resposta imunológica (KATZUNG; TREVOR, 2017; INCA, 2019c).

Os quimioterápicos amplamente usados no tratamento do câncer são classificados de acordo com a forma como atuam no ciclo celular das células tumorais. Os quimioterápicos que atuam em uma determinada fase do ciclo celular, são caracterizados como específicos do ciclo celular, já aqueles que atuam em todo o ciclo celular, possuem a capacidade de eliminar as células tumorais independentemente de estarem completando o ciclo ou de estarem em repouso na fase G₀ (ALMEIDA, 2005; BAUDINO, 2015).

O uso das plantas tidas como medicina possuem um histórico bastante pertinente, que reflete nos dias atuais, com a demanda de novos princípios ativos (KAUR; KAPOOR; KAUR, 2011). Dentre as muitas drogas comumente utilizadas na quimioterapia, muitas foram isoladas de espécies de plantas ou derivadas de um protótipo natural. Deve-se aqui também destacar a importância do estudo dos constituintes e das principais interações envolvidas nos processos fisiológicos desencadeados por esses novos princípios ativos, afim de se desenvolver cada vez mais fármacos mais seguros (MORAES; ALONSO; OLIVEIRA-FILHO, 2011; KHAZIR, *et al.*, 2014).

Um estudo realizado por Newman e Cragg (2016) destaca a importância das pesquisas com produtos naturais. O trabalho aponta o registro de novas drogas entre os anos de 1981 e 2014, e ainda discutem o registro de um total de 136 drogas contra o câncer no mundo. Dentre essas novas drogas, um percentual muito expressivo delas (83%) era de origem natural ou copiados de produtos naturais.

Destacando o Brasil como uma potência em diversidade de fauna e principalmente de flora, o país apresenta uma gama diversificada de espécies com potencial ainda não identificado. Menos de 10% dessas espécies foram avaliadas e sendo assim, suas atividades biológicas não foram descritas, tão pouco compreendidas. A grande diversidade dessas espécies não condiz com o percentual delas em estudo e sendo assim, são escassamente estudadas (FERREIRA *et al.*, 2011).

Sendo assim destaca-se a importância e necessidade de se desenvolver novas estratégias terapêuticas, que atuem sobre as células tumorais e diminuam os efeitos colaterais promovidos por muitas drogas já desenvolvidas e como atribuição crucial,

elimine a massa tumoral. Essa necessidade tem promovido muitas pesquisas voltadas para a química medicinal com o objetivo de desenvolver novas moléculas com atividade biológica otimizada e direcionada, exibindo pouca toxicidade e bom índice terapêutico (ANDRICOPULO; SALUM; ABRAHAM, 2009).

2.4 CHALCONA [1,3-DIARIL-2-PROPEN-1-ONA]

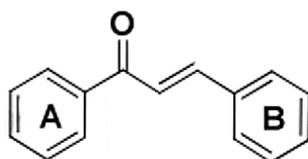
Ao longo dos anos, agentes dietéticos naturais presentes nas frutas, condimentos e verduras, despertaram a atenção da academia e da sociedade como um todo devido a suas propriedades (YADAV *et al.*, 2011).

Os trabalhos direcionados as propriedades antitumorais, trazem a importante ingestão desses flavonoides através de uma alimentação regular e saudável, evidenciando a redução de vários tipos de câncer, como o cervical (BAI; MA; ZHANG, 2015), osteossarcoma (SHEN *et al.* 2019b), glioblastoma (BITTENCOURT *et al.* 2016), gástrico (WANG *et al.* 2019b), fígado (DONG *et al.* 2018), ovário (CHEN *et al.* 2017), mama (SANTOS *et al.* 2019b), pulmão (DONG *et al.* 2018), próstata (LI *et al.* 2018) e desenvolvimento e progressão da leucemia (ISHIKAWA; SENBA; MORI, 2017; QUAGLIO *et al.* 2019).

Os flavonoides podem estimular respostas imunes, cascatas inflamatórias e inclusive a apoptose de células cancerosas. A pesquisa constante para melhorar a eficácia da quimioterapia por medicamentos já utilizados e conter a resistência multidrogas são mecanismos que podem ser relacionados aos compostos naturais dietéticos (SARAEI *et al.*, 2018).

Kostanecki e Tambor foram os primeiros a evidenciar e sintetizar uma série de produtos com esse tipo de cromóforo natural no século XIX (MAHAPATRA; ASATI; BHARTI, 2019a). As chalconas ou 1,3-diaril-2-propen-1-onas são intermediários cruciais da via de síntese de compostos flavonoides naturais, possuindo uma cadeia aberta em que uma estrutura central com 2 anéis aromáticos ligados a uma ponte carbonila α , β -insaturada de três carbonos, como apresentado na **Figura 05** (MIRZAEI; EMAMI, 2016).

Figura 05 – Representação da estrutura química básica de uma chalcona.



Fonte: Adaptado de MAHAPATRA *et al.*, (2019a).

O seu esqueleto estrutural possui dois estereoisômeros, sendo o isômero E, termodinamicamente mais estável e mais comumente encontrado entre as chalconas. O outro isômero, conhecido como Z é instável devido aos efeitos estéricos entre o anel β e o grupo carbonila (CORRÊA *et al.*, 2001; CAMPOS-BUZZI *et al.*, 2007; EVRANOS AKSÖZ; ERTAN, 2011).

Constituído por uma estrutura simples, com fácil disponibilidade, variedade e diferentes formas de ciclização, as chalconas surgiram a partir da busca por novas moléculas com potencial terapêutico e inovador. A mais simples das chalconas sintéticas, pode ser produzida a partir de uma condensação de um benzaldeído entre um aldol e uma acetofenona na presença de hidróxido de sódio como catalisador principal (YADAV *et al.*, 2011).

Tais compostos são amplamente estudados devido ao seu vasto espectro de atividades biológicas relatadas. Podem ser citadas como atividades biológicas, a antimicrobiana (PANDHURNEKAR *et al.*, 2013; KUCEROVA-CHLUPACOVA *et al.*, 2016), antifúngica (LAHTCHEV *et al.*, 2008; DE CARVALHO TAVARES *et al.*, 2011), antiviral (TRIVEDI *et al.*, 2007), antileishmania (MIRANDA-SAPLA *et al.*, 2019), anti-inflamatória (BANO *et al.*, 2013; SHIH *et al.*, 2018), antiagregante plaquetário (REDDY *et al.*, 2011), osteogênica e antioxidante (ORTOLAN *et al.*, 2014, 2017), antimalárica (YADAV *et al.*, 2012; SHARMA *et al.*, 2014), anti-obesidade (LIOU *et al.*, 2019) e antitumoral (CHUANG *et al.*, 2019; HOU *et al.*, 2019; JI *et al.*, 2019).

Diferentes derivados da chalcona já são bem conhecidos devido a sua ampla aplicação no âmbito farmacológico. Os derivados da chalcona são relatadas por apresentarem baixa interação com o DNA e sendo assim, diminuem o risco de mutagenicidade. Muitos medicamentos anticâncer utilizados na clínica apresentam efeitos genotóxicos consequentemente devido a interações com os grupos amino e ácidos nucleicos. As chalconas podem não apresentar tais efeitos, uma vez que possuem

flexibilidade estrutural bastante evidente, demonstrado por sua ampla capacidade de ciclização (DAS; MANNA, 2016).

Muitas drogas testadas não conseguem expressar eficiência no tratamento das doenças metastáticas, como os taxanos (a exemplo, o docetaxel) e os alcaloides da vinca (a exemplo, vimblastina e vincristina) e sendo assim, os pesquisadores decidiram desenvolver novos compostos à base de chalconas com características para promover a alteração da divisão celular, suprimir a propagação metastática e induzir a morte celular precoce no tumor primário (MAHAPATRA; ASATI; BHARTI, 2019a).

As chalconas possuem analogia estrutural com o estilbeno (resveratrol), definido como um sítion, e constituinte de diversos moduladores seletivos de receptores de estrogênio, como o tamoxifeno. Uma chalcona básica possui uma ligação do tipo enona, o qual é reativa e tem capacidade de ligação com receptores, podendo levar ao aumento das atividades das enzimas de conjugação de fase 2, como a glutationa S-transferase e a quinona redutase, uma vez que são envolvidas no metabolismo dos xenobióticos (YADAV *et al.*, 2011).

Uma porção do esqueleto da chalcona é similar à curcumina e à quercetina, tais compostos são quimioprotetores de origem natural. Além disso, as diferentes formas de ciclização, no qual dão origem à diferentes compostos, proporcionaram a diferentes grupos de pesquisa, a síntese de derivados da chalcona como hidroxil e metoxi-chalconas, chalconas halogenadas, chalconas borônicas e aminochalconas (SRINIVASAN *et al.*, 2009).

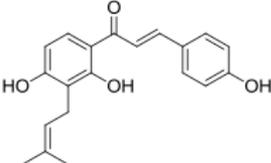
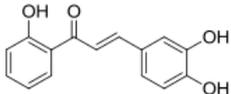
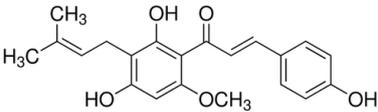
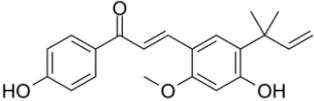
A Isobavachalcona (**Quadro 1**) é uma chalcona natural, e foi relatada por apresentar a indução à apoptose de células tumorais de ovário, pulmão, dentre outras. A Isobavachalcona foi apontada para ser uma ótima escolha de medicamento antitumoral, evidenciando sua baixa toxicidade, no entanto, seu mecanismo de ação não está completamente compreendido (JIN; SHI, 2015).

O xanthohumol, (**Quadro 01**) é classificado com uma chalcona natural e estudos relatam a indução da apoptose em células cancerígenas através da indução inicial da clivagem de PARP, levando a ativação e clivagem das caspases efetoras (3 e 7), induzidas pela ativação das caspases iniciadoras (8 e 9). Além disso, possui importante papel na regulação negativa na expressão da proteína anti-apoptórica Bcl-2 (HARIKUMAR *et al.*, 2009). O xanthohumol também consegue inibir a proliferação das células de Leucemia mielóide crônica (K562), induzindo a morte programada (apoptose), regulando

positivamente a expressão de p21 e p53 e diminuindo os níveis da proteína anti-apoptótica survivina (PAN; BECKER; GERHÄUSER, 2005).

O **Quadro 01** exhibe resumidamente algumas chalconas e suas atividades antitumorais encontradas na literatura, reforçando assim o potencial dessa classe de moléculas (flavonoides) na pesquisa pré-clínica de novos agentes terapêuticos potenciais.

Quadro 01 – Representação de algumas chalconas, estrutura química e atividades anticâncer relatadas na literatura.

Chalcona	Estrutura química	Atividade anticâncer relatada
Isobavachalcona		Aumento da apoptose nas linhagens IMR-32 e NB-39 (Neuroblastoma), acompanhada do efeito antiproliferativo em diferentes linhagens tumorais como e (OVCAR)-8 (Carcinoma de Ovário), PC-3 (Carcinoma de próstata, MCF-7 Carcinoma de mama e A549 (Carcinoma de pulmão) (KUETE; SANDJO, 2012).
Buteína		Ativação de vias citotóxicas e apoptóticas mediadas pelo ligante indutor de apoptose relacionado ao TNF (TRAIL), do inglês <i>TNF-related apoptosis-inducing ligand</i> (SZLISZKA <i>et al.</i> , 2009).
Xanthohumol		Exibe propriedades antiproliferativas e antiangiogênicas através de mecanismo indefinido. Xanthohumol parece regular negativamente a ativação constitutiva e induzível de NF-κB (YADAV <i>et al.</i> , 2011).
Licochalcona-A		A licochalcona-A induz apoptose nas linhagens celulares MCF-7 e HL-60, demonstrado pela clivagem de PARP (YADAV <i>et al.</i> , 2011).

Fonte: AUTOR, (2019).

A literatura apresenta diversos mecanismos de ação envolvidos com diferentes chalconas naturais e sintéticas. Aqui, vamos destacar alguns dos principais.

Os fatores de transcrição NF- κ B são os principais fatores das vias de sinalização e sendo assim, conectam a sinalização pró-inflamatória à proliferação, evasão a resposta imune e produção de citocinas. Pode-se destacar também um importante papel das IKK β (IKKs) na regulação do NF- κ B (GÖKTUNA; DIAMANTI; CHAU, 2018).

As chalconas demonstram atividade inibidora de NF- κ B através da modificação covalente das proteínas IKK induzida pela porção cetona α , β -insaturada das chalconas. Pandey em 2007, conseguiu avaliar a buteína (chalcona natural) a partir de ensaios bioquímicos e em cultivo celular e conseguiu evidenciar a inibição da IKK β .

Outras chalconas naturais como a isoliquiritigenina, flavokawain A e B, licochalcone A e xanthohumol também possuem atividades anti-inflamatórias e anticâncer e é importante destacar que essas duas atividades em sinergismo resultam na inibição da IKK β , através da modificação covalente da cisteína (ZHUANG et al., 2017). As chalconas naturais e sintéticas também conferem efeitos na inibição da formação de microtúbulos através da ligação à tubulina no local da colchicina e assim induzir o arrasto das células na fase G2 / M, característica importante de agentes antimicrotúbulos (SHEN et al., 2007a).

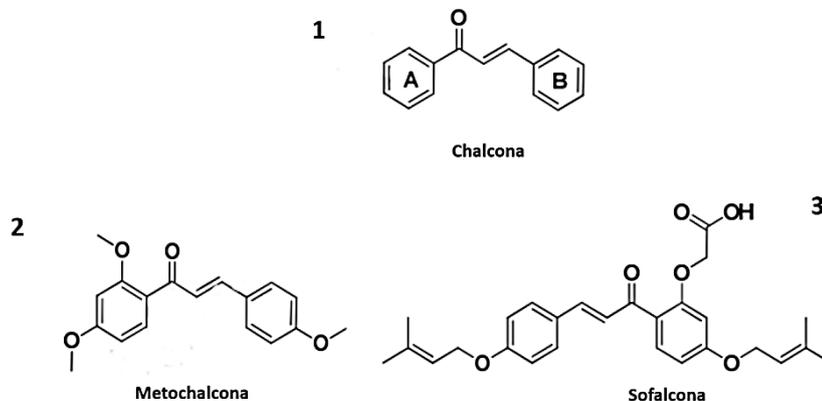
Também há relatos da atuação das chalconas em outras vias de sinalização celular, como a JAK/STAT (PINZ et al., 2014), ROS/MAPK (WANG et al., 2015a), p38 (HARA et al., 2014) e Notch (GUAGLIO et al., 2019).

As chalconas são relatadas por promoverem a inibição da via de sinalização Notch. A família Notch inclui quatro receptores trans-membranas (Notch 1–4) e cinco ligantes canônicos (Jagged-1 e -2, Delta-like-1, -3 e -4). Essa via de transdução de sinal é reconhecida como um alvo na terapia anticâncer, pois desencadeia efeitos proliferativos e pró-apoptóticos em muitas linhagens de Leucemia linfoblástica aguda (MORI *et al*, 2017).

Alguns medicamentos à base de chalcona foram aprovados para uso clínico. Seus nomes e fórmulas estruturais são apresentados na **Figura 06**. Como exemplo temos a (2) chalcona 1- (2,4-dimetoxifenil) -3- (4 metoxifenil) prop-2-en-1-ona (metochalcona), que foi comercializada como uma droga colerética, enquanto a 3 chalcona 2- [5- (3-metilbut-2-enoxi) -2 - [(E) -3- [4- (3-metilbut-2-enoxi) fenil] prop-2-enoil] fenoxi] ácido acético

(sofalcona) foi aprovada como droga antiúlcera e droga mucoprotetora (MAHAPATRA *et al.*, 2019b).

Figura 06- Fórmula estrutural química da chalcona básica e medicamentos à base da chalcona.



Fonte: Adaptado de MAHAPATRA *et al.*, (2019b).

2.4.1 Regra dos “5” de Lipinski

O desenvolvimento e planejamento de fármacos concentra parâmetros importantes que conduzem os fármacos a terem boas características físico-químicas. A lipofilia está relacionada com a permeabilidade e biodisponibilidade do fármaco no meio aquoso extracelular ou nos tecidos celulares e é uma das características mais importantes em um planejamento. Muitos estudos a partir dessa característica identificam padrões moleculares fundamentais que potencializam moléculas com promissora atividade biológica (NOGUEIRA *et al.*, 2008).

Lipinski *et al.*, (2001) estabeleceram algumas regras importantes baseadas na observação de determinados parâmetros físico-químicos de moléculas biologicamente ativas. A regra que foi denominada de regra dos 5, tem sido chamada dessa forma, pois todos os valores envolvidos na regra são múltiplos do número cinco. Em 2002, Veber e colaboradores adicionaram mais duas propriedades físico-químicas (disponibilidade oral = TPSA <140Å (Área de superfície polar topológica) e menos que 10 ligações rotáveis) e discutiram a respeito da sua influência na biodisponibilidade oral de candidatos à fármacos. (CHAGAS; MOSS; ALISARAIE, 2018).

Lipinski conclui que moléculas com bom perfil teórico de absorção e permeabilidade precisam apresentar menos de 5 doadores de ligação hidrogênio, abaixo de 10 aceptores de ligação hidrogênio, peso molecular inferior a 500 g/mol, e valores de log P (Log P maiores estão relacionados com maior hidrossolubilidade) abaixo de 5.

A regra auxilia de forma simples, mais fundamental, estimar a solubilidade e a permeabilidade dos fármacos através da administração oral, considerando a influência dos substituintes/radicaís na absorção do candidato à fármaco. Embora seja um método simples e clássico da prospecção de moléculas, ainda continua sendo uma estratégia fundamental no desenvolvimento de estudos Relação Estrutura Atividade - SAR (SANTOS, 2008a).

3 METODOLOGIA

3.1 DERIVADOS DA CHALCONA E QUIMIOTERÁPICOS

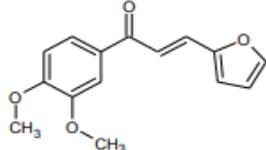
Os derivados da chalcona estudados no presente trabalho foram previamente sintetizados e cedidos pelo Prof. Rogério Correia do Núcleo de Investigações Químico Farmacêuticas – Niqfar, da Universidade do Vale do Itajaí. Os derivados da chalcona que foram avaliados são denominados por: **M2** (C₁₅H₁₄O₄), **M7** (C₁₄H₁₂O₂), **M8** (C₁₄H₁₂O₃), **M14** (C₁₃H₁₁NO₂), **F3** (C₁₃H₁₀O₂), **F7** (C₁₄H₁₂NO₂), **F8** (C₁₄H₁₂O₃), **F9** (C₁₃H₉ClO₂) e **F10** (C₁₃H₈Cl₂O₂). No **Quadro 02**, são listados os derivados e seus respectivos nomes químicos e no **Quadro 03**, são listados os nomes dos derivados, as fórmulas moleculares e respectivas fórmulas estruturais. Os quimioterápicos Gemcitabina, Citarabina e Doxorrubicina foram utilizados como controle positivo.

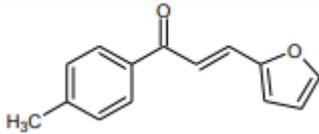
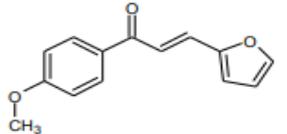
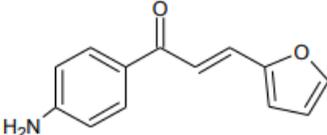
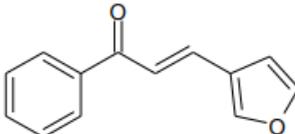
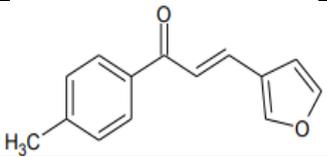
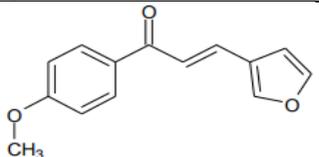
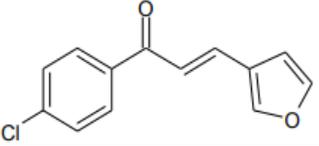
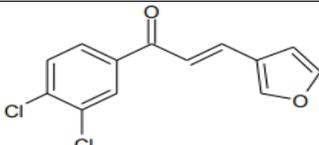
Quadro 02 - Nome químico dos derivados da chalcona em estudo.

M2	(2E)-1-(3,4-dimetoxifenil)-3-(furan-2-il)prop-2-en-1-ona
M7	(2E)-3-(furan-2-il)-1-(4-metilfenil)prop-2-en-1-ona
M8	(2E)-3-(furan-2-il)-1-(4-metoxifenil)prop-2-en-1-ona
M14	(2E)-1-(4-aminofenil)-3-(furan-2-il)prop-2-en-1-ona
F3	(2E)-3-(furan-3-il)-1-fenilprop-2-en-1-ona
F7	(2E)-3-(furan-3-il)-1-(4-metilfenil)prop-2-en-1-ona
F8	(2E)-3-(furan-3-il)-1-(4-metoxifenil)prop-2-en-1-ona
F9	2E)-1-(4-clorofenil)-3-(furan-3-il)prop-2-en-1-ona
F10	(2E)-1-(3,4-diclorofenil)-3-(furan-3-il)prop-2-en-1-ona

Fonte: AUTOR, (2019).

Quadro 03 - Fórmula molecular e fórmula estrutural dos derivados de chalconas utilizados no estudo.

Nome do composto	Fórmula Molecular	Fórmula estrutural
M2	C ₁₅ H ₁₄ O ₄	

M7	$C_{14}H_{12}O_2$	
M8	$C_{14}H_{12}O_3$	
M14	$C_{13}H_{11}NO_2$	
F3	$C_{13}H_{10}O_2$	
F7	$C_{14}H_{12}NO_2$	
F8	$C_{14}H_{12}O_3$	
F9	$C_{13}H_9ClO_2$	
F10	$C_{13}H_8Cl_2O_2$	

Fonte: AUTOR, (2019).

3.2 COMITÊ DE ÉTICA

O presente trabalho foi submetido ao Comitê de Ética da Universidade Federal de Pernambuco e foi aprovado sob número do CAAE: 16346419.0.0000.5208 para a realização dos ensaios de citotoxicidade a partir das células mononucleares do sangue periférico (CMSP) de voluntários sadios. O parecer substanciado é apresentado nos Anexos.

3.3 CULTIVO DE CÉLULAS

Todas as linhagens foram obtidas do banco de células do Rio de Janeiro (BCRJ). As linhagens neoplásicas foram suplementadas com 10% de Soro Fetal Bovino ou 2,5% de Soro Fetal de Cavalo quando exigidas pelo data sheet de cada célula. A troca de meio foi realizada sempre que necessário para manter a viabilidade das células e para a deadesão das células foi utilizado tripsina/EDTA (0,25%).

Quadro 04 - Informações suplementares para cada linhagem neoplásica cultivada no estudo

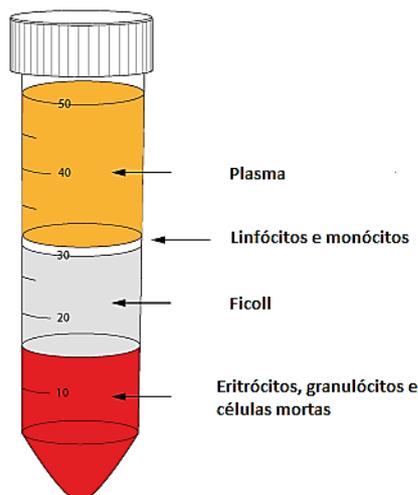
Linhagem celular	HL-60	MM.1S	MM.1R	DU-145	PANC-1	MIA-PaCa-2	SK-MEL-28
Meio de cultivo	RPMI	RPMI	RPMI	DMEN LOW	DMEN LOW	DMEN HIGH	DMEN LOW
Doença	Leucemia promielocítica aguda	Mieloma Múltiplo	Mieloma Múltiplo	Adenocarcinoma de próstata	Adenocarcinoma de pâncreas	Adenocarcinoma de pâncreas	Melanoma maligno
Propriedades da cultura	Suspensão	Suspensão	Suspensão	Aderida	Aderida	Aderida	Aderida

Fonte: AUTOR, (2019).

3.4 OBTENÇÃO DAS CÉLULAS MONONUCLEARES DO SANGUE PERIFÉRICO - CMSP

As células mononucleares do sangue periférico - CMSP, do inglês (*peripheral blood mononuclear cells*) - linfócitos e monócitos, foram obtidas a partir de sangue periférico de voluntários saudáveis (n=9). A coleta foi realizada em tubos heparinizados por profissionais capacitados, no Laboratório de Imunomodulação e Novas Abordagens Terapêuticas – LINAT, localizado na Universidade Federal de Pernambuco – UFPE. Utilizou-se seringas esterilizadas e descartáveis totalizando um volume de 27 mL por voluntário. O material assim que obtido foi transferido para a sala de cultura, onde foram realizados os procedimentos de separação. As etapas até o isolamento incluíram a adição de 15 mL de Ficoll-Paque Plus em um falcon de 50 mL, sobreposto do volume de sangue de cada voluntário identificado, em seguida todo material biológico foi centrifugado à 650 G, durante 45 minutos. Após a centrifugação, uma nuvem foi formada (**Figura 07**) entre o plasma e o ficoll e aspirada para posteriores lavagens.

Figura 07 - Camadas formadas após centrifugação em gradiente de densidade. As CMSP's podem ser encontradas em cima do Ficoll. Eritrócitos, granulócitos e células mortas passam pelo meio e podem ser encontrados no fundo do falcon.



Fonte: Adaptado de PLURISELECT, (2019).

As células aspiradas foram lavadas com tampão fosfato-salino, do inglês *phosphate buffered saline* (PBS) e centrifugadas a 1500 rpm, por 20 minutos. Uma segunda lavagem com os mesmos parâmetros foi realizada com o propósito de retirar quaisquer resíduos de ficoll das células. O sobrenadante foi ressuspensionado em meio completo (RPMI 1640 suplementado com 10% de Soro Fetal Bovino, 1% de antibiótico (penicilina-estreptomicina) e contado em câmara de Neubauer para posterior diluição e plaqueamento.

3.5 TESTE DE CITOTOXICIDADE EM CÉLULAS MONONUCLEARES DO SANGUE PERIFÉRICO – CMSP

As CMSPs foram plaqueadas numa densidade de 5×10^5 células/poço em placas de 96 poços, contendo 5 diferentes concentrações dos compostos (1, 10, 20, 50 e 100 μM) e as condições-controle (\emptyset , \emptyset + DMSO 0,1% e os controles brancos, que contém apenas o meio de cultura e o composto); cada condição foi plaqueada em triplicata. As placas foram incubadas em estufa a 37°C e atmosfera de 5% de CO_2 por 48 horas. Decorrido esse tempo, foi adicionado o 3-(4,5-dimetil-2-tiazol)-2,5-difenil-2-H-brometo (MTT) (0,5 mg/ml), com retorno das placas para a estufa em incubação nas condições supracitadas durante 3 horas. As células viáveis convertem o MTT em formazan (produto da redução do MTT) de coloração roxa. Em seguida, foi adicionado o dodecil sulfato de sódio (SDS) e incubado por 24 horas. Esse surfactante facilita a extrusão do conteúdo

intracelular. No dia seguinte, as densidades ópticas (DO) dos poços foram obtidas numa leitora de microplacas a 570nm (Modelo Elx808, Biotek, EUA). O percentual de células viáveis foi obtido através da seguinte fórmula:

$$\frac{\text{Média DO células} - \text{média DO controle branco} \times 100}{\text{Média DO DMSO } 0,1\%}$$

3.6 TESTE DE CITOTOXICIDADE EM LINHAGENS DE CÉLULAS NEOPLÁSICAS

As células foram semeadas em diferentes densidades de acordo com o NCI-60. A citotoxicidade celular também foi avaliada pelo método colorimétrico baseado na conversão do sal MTT em cristais de formazan; os derivados foram testados nas seguintes concentrações: 1, 10, 50 e 100 μ M e os que apresentaram atividade, foram selecionados para elucidação da metade da concentração inibitória máxima CI_{50} . As células foram incubadas com os compostos por 72 horas e após esse período, foi adicionado 20 μ M do sal MTT e levado novamente para a estufa por 3 horas. Em seguida, foi adicionado o dodecil sulfato de sódio (SDS) para incubação por 24 horas. As leituras foram feitas em espectrofotômetro, a 570 nm Modelo Elx808, Biotek, EUA).

3.6.1 Índice de seletividade

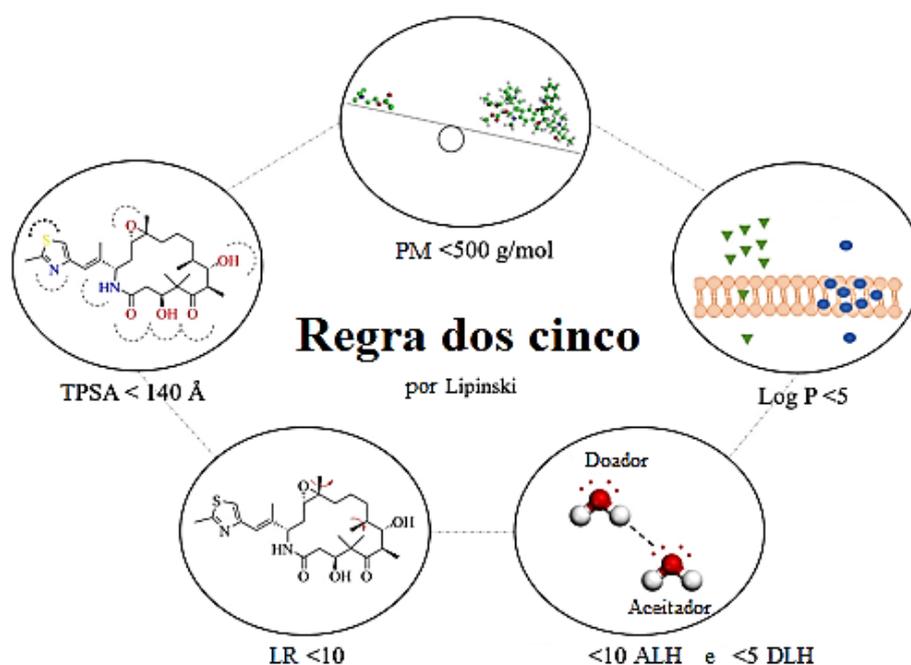
A citotoxicidade para as células mononucleares do sangue periférico (CMSP) e para as linhagens tumorais foi comparada utilizando o índice de seletividade (IS), que consiste na razão entre a metade da concentração inibitória máxima (CI_{50}) para as CMSP e para a CI_{50} encontrada nas linhagens tumorais.

3.6.2 Método teórico – Regra dos 5

Foi utilizado uma ferramenta computacional para estimar a solubilidade e permeabilidade de todos os nove derivados da chalcona, de acordo com alguns parâmetros físico-químicos. A regra dos cinco, esquematizada na **Figura 08**, prediz moléculas com

baixa absorção e permeabilidade quando as mesmas apresentam mais de 5 doadores de ligação hidrogênio, acima de 10 aceptores de ligação hidrogênio, peso molecular superior a 500, e valores de log P acima de 5. Todos os valores referentes ao peso molecular (PM), aceptores de ligação hidrogênio (N + O), doadores de ligação hidrogênio (NH + OH), número de ligações rotáveis, área de superfície polar topológica e log de P encontrados foram obtidos a partir da plataforma SwissADME, Disponível em: <http://www.swissadme.ch/> (LIPINSKI *et al.* 2001).

Figura 08 – Representação visual dos critérios da Regra dos Cinco. Peso molecular (PM), Área de Superfície Polar Topológica (TPSA), Ligações Rotáveis (LR), Aceptores de Ligações de Hidrogênio (ALH), Doadores de Ligações de Hidrogênio (DLH), e o log P.



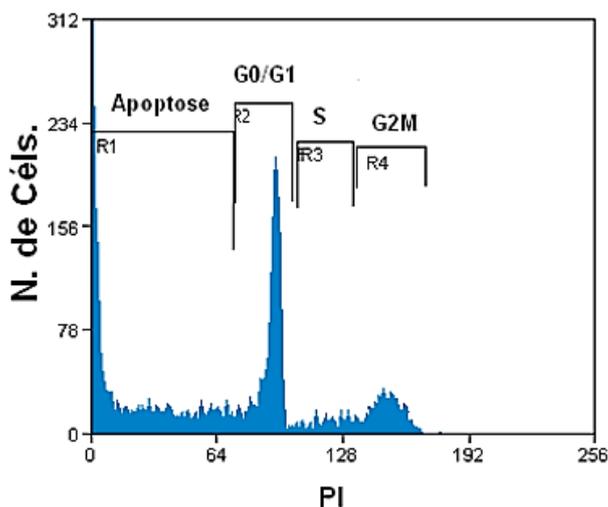
Fonte: Adaptado de CHAGAS; MOSS; ALISARAIE, (2018).

3.7 ANÁLISE DO CICLO CELULAR

Para a análise do ciclo celular as células HL-60 (Leucemia promielocítica aguda) foram cultivadas até a confluência entre 70 e 80% e então plaqueadas em uma densidade de 2×10^5 células por poço em placas de 24 poços e incubadas por 24 horas. No outro dia, os poços foram tratados com a metade da concentração inibitória máxima de cada derivado da chalcona selecionado previamente pelo ensaio da viabilidade celular – MTT. As células voltaram a estufa por 48 horas e após esse tempo, foram centrifugadas a 1500 rpm por 7 minutos, lavadas com PBS 1x e armazenadas a -20°C . Em um período de até

20 dias, as amostras foram descongeladas e lavadas 2x com PBS 1x e em seguida marcadas com o marcador nuclear fluorescente Iodeto de Propídeo (eBioscience), de acordo com as especificações do fabricante e incubadas por 20 minutos no gelo e no escuro. Finalizado esse tempo, as células foram centrifugadas e lavadas com PBS 1x para retirar o Iodeto de propídeo. O conteúdo de DNA foi quantificado através de citometria de fluxo utilizando o citômetro Accuri (BD Biosciences), onde a porcentagem de DNA em cada fase do ciclo foi calculada utilizando o programa C6 software (Becton, Dickinson and Company, USA). Um esquema da avaliação do ciclo celular através da marcação com Iodeto de propídeo é apresentada na **Figura 09**.

Figura 09 – Esquema representativo da avaliação do ciclo celular por marcação com Iodeto de propídeo. A intensidade da fluorescência é proporcional à quantidade de DNA, o que define as células em diferentes fases do ciclo celular.



Fonte: Instituto Oswaldo Cruz, (2010).

3.8 AVALIAÇÃO DA MORTE CELULAR

A avaliação quantitativa da morte celular foi realizada por citometria de fluxo por meio da marcação das células com Anexina V conjugada ao fluoróforo APC (Biolegend) em conjunto com iodeto de propídeo (Sigma-aldrich, Missouri, EUA). As células foram plaqueadas a uma densidade de 2×10^5 cél/mL, em placas de 24 poços e após 24 horas os poços foram tratados com a concentração inibitória máxima (CI_{50}) dos derivados F8 e F9. Após 48h e 72h de tratamento, as células foram centrifugadas a 2.500 rpm por 5 minutos e ressuspendidas em solução binding buffer 1X (BD biosciences) e incubadas com 5 μ L de Anexina V-APC e 2,5 μ L de iodeto de propídeo (1mg/mL/) no escuro por 15 min. As

células foram lavadas com PBS 1X e ressuspendidas no binding buffer 1X para aquisição no citômetro de fluxo BD Accuri C6. As condições que alcançaram o patamar mínimo de 1×10^3 na população P1 foram incluídos na análise. Apenas a dupla marcação positiva de Anexina V-APC e iodeto de propídeo foi considerado constatação de apoptose.

3.9 ANÁLISE ESTATÍSTICA

Os cálculos de média, desvio padrão e viabilidade foram realizados utilizando o programa Excel. A CI_{50} foi calculada a partir da média dos resultados da viabilidade celular dos compostos, utilizando o programa OriginPro v 8.0725(B725). Todos os resultados foram analisados em triplicata e em três experimentos independentes pelo teste *t* (Student), utilizando o programa GraphPad Prism 5 (GraphPad Software Inc., San Diego, CA, EUA). A diferença foi considerada estatisticamente significativa quando $p < 0,05$.

4 RESULTADOS

4.1. Avaliação *in silico* dos parâmetros farmacocinéticos

Todos os parâmetros físico-químicos relevantes na regra dos “5” abordados por Lipinski, foram calculados para os derivados da chalcona (LIPINSKI *et al.*, 2001). De acordo com a **Tabela 01**, todos os derivados apresentam valores que se encaixam nos limites propostos por Lipinski. Os dois parâmetros indicados por Veber *et al.* (2002) - número de ligações rotáveis e área de superfície polar topológica também foram avaliados. Todos os derivados da chalcona apresentaram valores perfil teórico de biodisponibilidade oral adequado, aumentando as chances de absorção e permeabilidade quando administrados via oral. Sendo assim, todos os derivados foram inclusos na avaliação quanto ao perfil citotóxico nas células mononucleares do sangue periférico e em diferentes linhagens de tumores sólidos e hematopoiético.

Tabela 01 - Previsão teórica da solubilidade e permeabilidade dos derivados [1,3-diaril-2-propen-1-ona] segundo a “Regra dos 5” de Lipinski.

Derivado	logP	PM	n° N+O	n° OH+NH	n° lig. rot	TPSA
M2	2,59	258,27	4	0	5	48,67
M7	3,04	212,24	2	0	3	30,21
M8	2,68	228,24	3	0	4	39,44
M14	2,14	213,23	2	1	3	56,23
F3	2,62	198,22	2	0	3	30,21
F7	2,97	212,24	2	0	3	30,21
F8	2,61	228,24	3	0	4	39,44
F9	3,16	232,66	2	0	3	30,21
F10	3,66	267,11	2	0	3	30,21

Fonte: Autor, (2019).

Método de predição do logP a partir do Swiss Institute of Bioinformatics, 2019 (SwissADME).

n° N+O - Somatório das ligações aceptores de hidrogênio (N e O).

n° OH+NH - Somatório das ligações doadores de hidrogênio (NH e OH).

n° lig rot - Número de Ligações Rotáveis.

TPSA - Área de Superfície Polar Topológica.

4.2 AVALIAÇÃO DA CITOTOXICIDADE DOS DERIVADOS DA CHALCONA EM CÉLULAS MONONUCLEARES DO SANGUE PERIFÉRICO – CMSP E LINHAGENS DE CÉLULAS TUMORAIS

Os derivados da chalcona M2, M7, M14 e F3 não apresentaram citotoxicidade frente as células normais nas concentrações até 100 μM , como apresentado na **Tabela 02**. Os demais derivados apresentaram toxicidade frente as células normais e, portanto, apresentaram metade da concentração inibitória máxima (CI_{50}).

Todos os derivados da chalcona, exceto o derivado M14, obtiveram atividade antitumoral frente as diferentes linhagens do estudo. Com destaque para a atividade dos derivados nas linhagens leucêmicas e pancreáticas, apresentando para quase todos os derivados valores da CI_{50} entre 25 e 40 μM .

Tabela 02- Atividade citotóxica expressa em CI_{50} (μM) dos nove derivados da chalcona frente a células mononucleares do sangue periférico – CMSP e diferentes linhagens tumorais. nr – não realizado

DERIVADOS LINHAGEM	M2	M7	M8	M14	F3	F7	F8	F9	F10	Citarabina	Gencitabina	Doxo
CMSP	>100	>100	94,41±2,46	>100	>100	46,98±6,40	89,53±6,35	92,90±3,14	55,34±3,54	30,27±5,89	>50	32,17±2,12
HL-60	28,60±0,51	25,91±0,38	32,70±3,62	>100	30,12±1,81	28,33±0,45	28,07±1,28	27,89±1,09	26,96±0,12	3,0±0,21		
MM.1R	37,34±3,55	31,39±6,10	34,43±1,64	>100	33,14±3,01	31,05±0,15	31,02±1,45	31,60±0,93	32,86±1,14			nr
MM.1S	71,69	72,9	79,52	>100	79,32	36,53	75,06	67,33	54,40			nr
MIA-PaCa-2	39,01±3,54	74,13	38,35	>100	34,61±0,45	28,98±2,77	34,28±3,76	32,31±1,04	31,12		0,07	
SK-MEL-28	>100	72,93±3,47	>100	>100	72,72±1,12	63,42±1,76	73,52±1,72	42,89±2,69	67,05±1,29			9,07±4,34
PANC-1	>100	>100	>100	>100	>75,52±1,62	48,84±2,58	74,37±5,50	>100	48,03±2,48		nr	
DU – 145	>100	62,76±24,65	>100	>100	>100	nr	nr	nr	nr			6,5±2,2

Fonte: Autor, (2019).

CMSP – Células Mononucleares do Sangue Periférico

HL-60 – Leucemia Promielocítica Aguda

MM.1R – Mieloma Múltiplo Resistente a Dexametasona

MM.1S – Mieloma Múltiplo

MIA-PaCa-2 – Adenocarcinoma Pancreático

SK-MEL-28 – Melanoma Maligno

PANC-1 – Adenocarcinoma Pancreático

DU-145 – Adenocarcinoma de Próstata

nr – Ensaios não realizados

A seleção dos quimioterápicos como controle positivo foi baseada no fármaco mais utilizado para cada tipo tumoral.

Os derivados M7, F8, F9 e F10 foram os que obtiveram os melhores efeitos contra a proliferação das células da linhagem Leucêmica -HL-60, exibindo valores da CI_{50} de $25,91 \pm 0,38$; $28,07 \pm 0,45$, $27,89 \pm 1,09$ e $26,96 \pm 0,12$ respectivamente. Efeitos similares foram observados para a linhagem de Mileoma Múltiplo resistente à Dexametasona (MM.1R). Com exceção do derivado M14, todos os demais derivados foram capazes de inibir a proliferação das células da linhagem MM.1R, com valores da CI_{50} entre 30 e 35 μ M.

Em relação as linhagens de câncer de pâncreas, os derivados apresentaram melhores resultados frente a linhagem MIA-PaCa-2, exibindo valores da CI_{50} entre 30 e 35 μ M para os derivados denominados de “F”. Os mesmos derivados também apresentaram atividade anti-proliferativa na linhagem PANC-1, contudo os valores da CI_{50} foram superiores e, portanto, evidenciam maior seletividade dos derivados frente MIA-PaCa-2. O derivado M14 não apresentou nenhum efeito antitumoral, uma vez que não apresentou atividade frente a nenhuma linhagem neoplásica em estudo.

4.2.1 Índice de seletividade

Após os ensaios citotóxicos, consideramos estabelecer o potencial dos derivados da chalcona a partir do índice de seletividade (IS). Esse parâmetro revela o efeito mais direcionado dos derivados diante das células tumorais e com menor efeito/influência sobre as células normais (CMSP). Sendo assim, podemos expressar esse efeito pela razão da citotoxicidade (CI_{50}) entre as células normais (CMSP) e a citotoxicidade das células de diferentes linhagens tumorais.

Decidimos selecionar 4 dos 9 derivados do estudo, devido a sua atividade significativa frente a três linhagens tumorais. O índice de seletividade (IS), para os compostos M8, F7, F8, F9 e F10, considerando três das setes linhagens tumorais, está apresentado na **Tabela 03**.

Tabela 03- Índice de seletividade para os compostos mais ativos [razão entre as citotoxicidades expressa em CI_{50} (μM), contra CMSP e três linhas celulares de câncer]. nr – Não realizado.

Compostos	CMSP vs. HL-60	CMSP vs. MM.1R	CMSP vs. MIA PaCa-2
M8	2,88	2,74	2,46
F7	1,65	1,51	1,62
F8	3,18	2,88	2,61
F9	3,33	2,93	2,87
F10	2,05	1,68	1,77
Doxorrubicina	-	10,02	-
Citarabina	10,09	-	-
Gencitabina	-	-	nr

Fonte: Autor, (2019).

Os resultados dos IS apresentados mostram que dos cinco derivados analisados frente a linhagem HL-60 em razão das CMSP, dois apresentaram índice de seletividade maior que três, sendo o IS do F8 de 3,18 e o IS do F9 de 3,33 vezes. Índices superiores são comuns as outras duas linhagens (MM.1R e MIA-PaCa-2), quando comparado com os outros derivados em questão. Sendo assim, os derivados F8 e F9 exibiram melhores índices de seletividade e, portanto, foram selecionados para continuarem o estudo com os ensaios biológicos.

4.3 AVALIAÇÃO DO EFEITO DOS DERIVADOS DA CHALCONA NO CICLO DAS CÉLULAS HL-60 E MIA-PaCa-2

Para investigar os efeitos dos derivados da chalcona em relação a sua atuação antitumoral, realizamos o estudo dos derivados na progressão do ciclo das células das linhagens HL-60 e MIA-PaCa-2. Para a realização da análise do ciclo celular, escolhemos os derivados que apresentaram o melhor potencial na inibição da proliferação celular, apresentado pelo valor da CI_{50} e de acordo com os melhores índices de seletividade.

Como pode ser observado na **Tabela 04**, os derivados induzem modificações no ciclo celular. Com relação a linhagem HL-60, observou-se que 3,36% das células não tratadas (NT) se encontravam na fase Sub-G0 do ciclo celular e os derivados da chalcona F8 e F9 induziram significativamente a morte celular, pelo aumento do percentual de células nesta fase para 16,33% e 20,13%, com $p < 0,01$ e $p < 0,05$, respectivamente

(Figura 10A-H). A avaliação do ciclo celular dos derivados M7 e F10 também foi efetivada e seus resultados são exibidos na Tabela 05, nos anexos.

Tabela 04 - Efeito dos derivados F8 e F9, citarabina (0,03 μ M) e Gemcitabina (0,07 μ M) no ciclo celular das células HL-60 e MIA-PaCa-2 após 48 horas de tratamento. (A) e (E) Células não tratadas, (B) células tratadas com 0,03 μ M da citarabina, (F) células tratadas com 0,07 μ M da gemcitabina (C) e (G) células tratadas com CI₅₀ do derivado F8 e (D) e (H) células tratadas com CI₅₀ do derivado F9. *P < 0,05; **P < 0,01, ***P < 0,001 e P**** < 0,0001 em relação aos dados da condição não tratado (NT) para cada linhagem.

		NT	CIT	GEM	F8	F9
HL-60	Sub-G0	3,36 \pm 0,15%	10,2 \pm 2,09%	-	16,33 \pm 0,83% ***	20,13 \pm 4,14% *
	G0-G1	64,1 \pm 5,02%	80,56 \pm 1,46%	-	53,13 \pm 2,85% *	58,26 \pm 4,99% *
	S-G2/M	31,1 \pm 4,59%	7,8 \pm 1,9%	-	29,06 \pm 3,85%	20,63 \pm 1,66%
MIA-PaCa-2	Sub-G0	12,70 \pm 7,91%	-	18,59 \pm 9,00% **	16,91 \pm 10,06% *	9,47 \pm 7,80%
	G0-G1	65,52 \pm 13,49%	-	75,62 \pm 9,96% ****	56,32 \pm 8,51%	69,73 \pm 12,12%
	S-G2/M	20,17 \pm 5,52%	-	4,84 \pm 1,38%	25,12 \pm 1,79%	18,52 \pm 3,87%

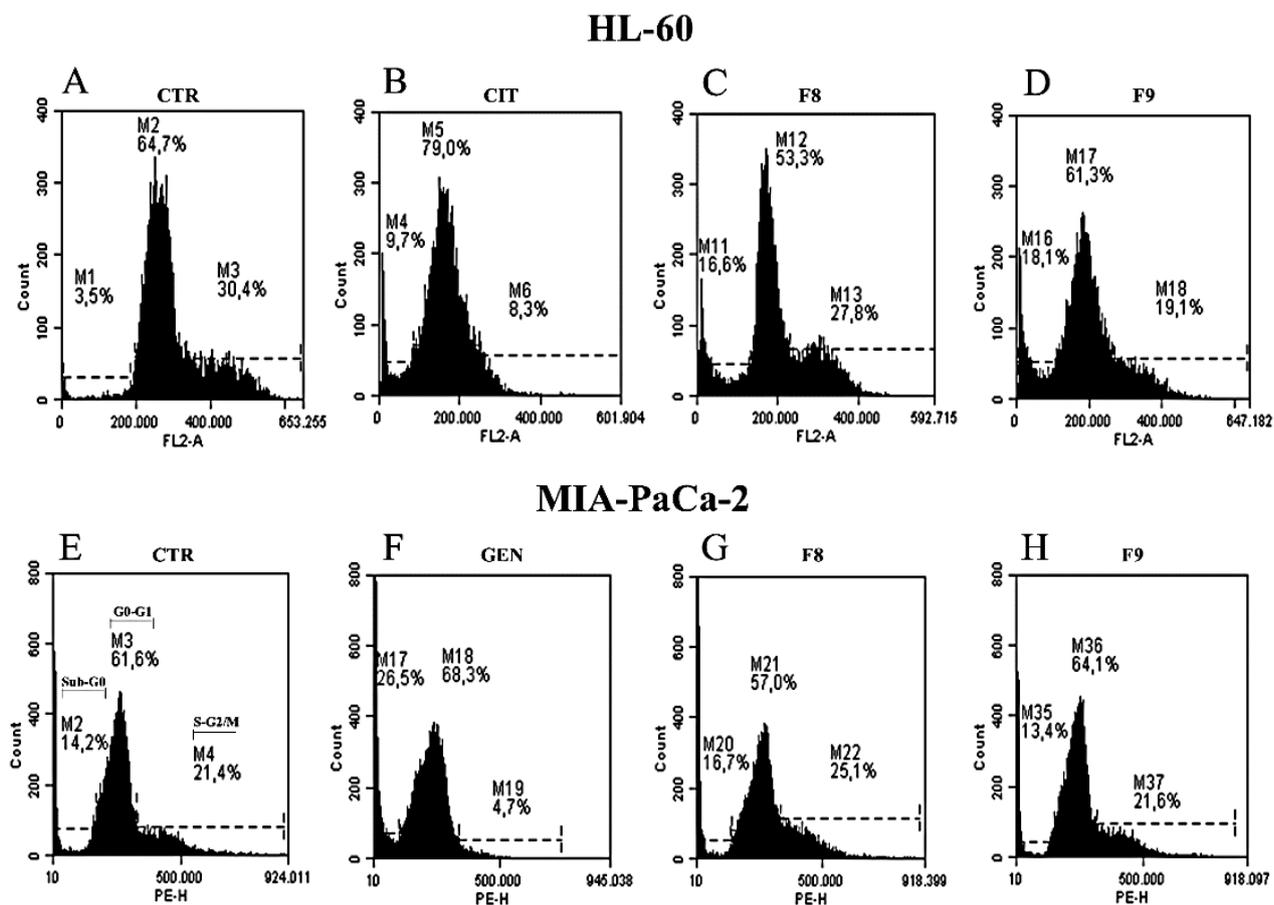
Fonte: Autor, (2019).

O derivado F8 induziu a uma redução significativa na porcentagem de células na fase G0-G1. Considerando que 64,1% das células (NT) se encontravam na fase G0-G1 do ciclo celular, foi possível observar que o derivado F8 reduziu significativamente a porcentagem de células nessa fase para 53,13%, sendo $p < 0,05$.

Também foi possível evidenciar que o derivado F9 promoveu uma diminuição no percentual de células na fase S-G2/M. Uma vez que 31,1% de células não tratadas se encontravam na fase S-G2/M. O derivado F9 promoveu uma diminuição significativa das células desta fase, para 20,63% com $p < 0,05$.

Em relação a avaliação do efeito dos derivados F8 e F9 na linhagem MIA-PaCa-2, observou-se que o derivado F8 conseguiu promover alguma alteração no ciclo. Considerando que 65,53% das células (NT) se encontravam na fase G0-G1 do ciclo celular, podemos observar que o derivado F8 reduziu de maneira significativa a porcentagem de células nessa fase para 56,32% com $p < 0,05$. Uma vez que os derivados conseguiram promover efeitos no ciclo das células de ambas linhagens tumorais, mas com maior potencial na linhagem Leucêmica, decidimos realizar os ensaios para a avaliação da indução de morte apenas na linhagem HL-60.

Figura 10 - Efeito dos derivados F8 e F9, citarabina ($0,03\mu\text{M}$) e Gemcitabina ($0,07\mu\text{M}$) no ciclo celular das células HL-60 e MIA-PaCa-2 após 48 horas de tratamento. (A) e (E) Células não tratadas, (B) células tratadas com $0,03\mu\text{M}$ da citarabina, (F) células tratadas com $0,07\mu\text{M}$ da gemcitabina (C) e (G) células tratadas com CI_{50} do derivado F8 e (D) e (H) células tratadas com CI_{50} do derivado F9.



Fonte: Autor, (2019)

4.4 EFEITO DOS DERIVADOS DA CHALCONA NA INDUÇÃO DE MORTE

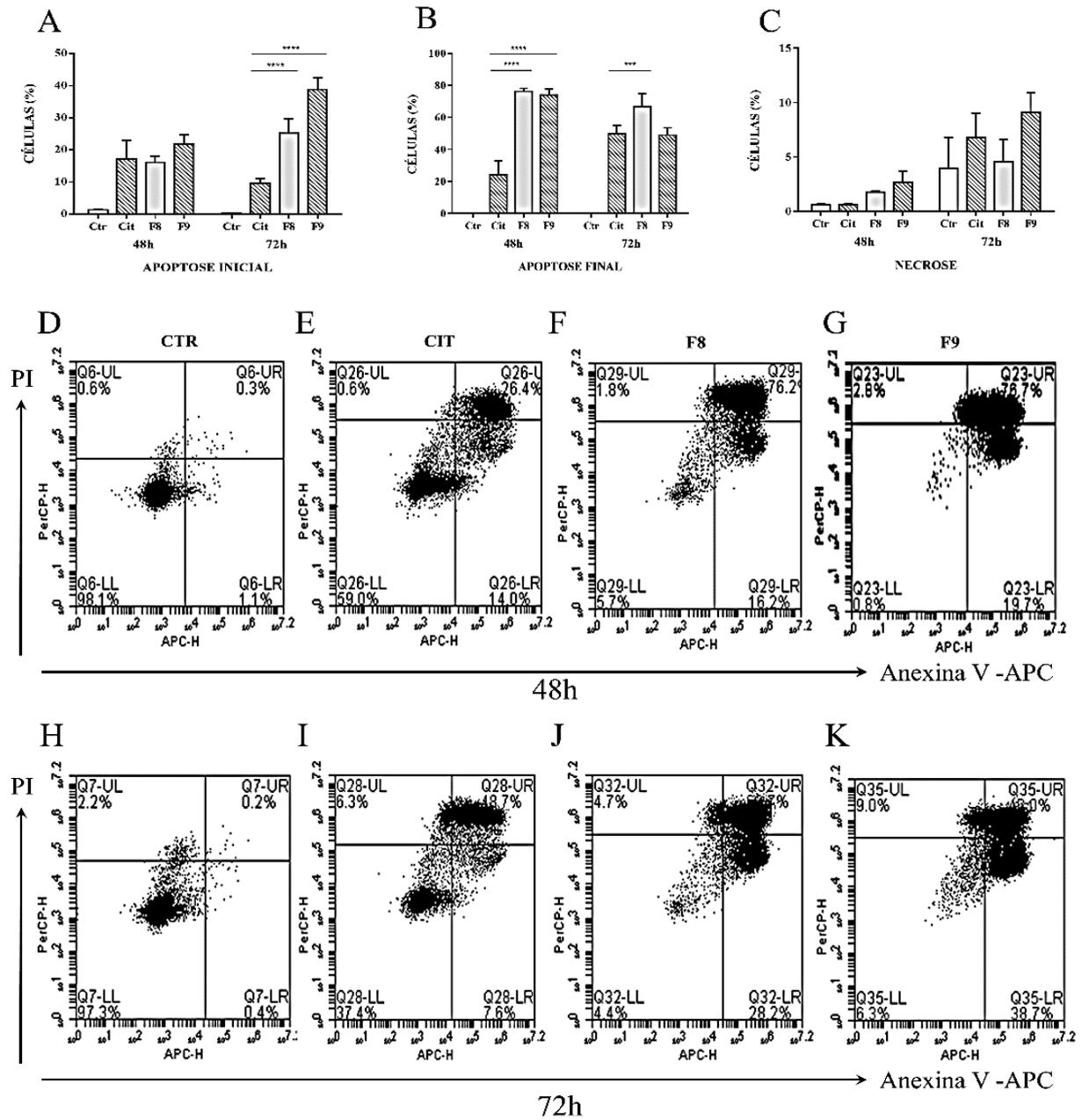
Na tentativa de elucidar o mecanismo de morte celular promovido pelos derivados da chalcona (F8 e F9) em células HL-60, foi realizado o ensaio de dupla marcação com Anexina V-APC (que reconhece a fosfatidilserina) e Iodeto de Propídeo (Intercalante de DNA). Como exibido na **Figura 11**, a incubação com a CI_{50} dos derivados F8 e F9 aumentou a porcentagem de células em apoptose inicial no tempo de 72 horas e apoptose final no tempo de 48 e 72h.

Os derivados F8 e F9 induziram a um aumento significativo no percentual de células em apoptose inicial no tempo de 72 horas com valores de 25,21% e 38,85% com $p < 0,05$ respectivamente, quando comparadas a citarabina 9,68% (**Figura 11A, I, J, K**).

Para a apoptose final, foi possível observar que no tempo de 48 horas, os derivados F8 e F9 comparadas a citarabina (24,09%), conseguiram de forma significativa induzir a morte celular pelo aumento do percentual das células em 76,32% e 73,99% com $p < 0,05$ respectivamente (**Figura 11B, E, F e G**) Para a apoptose final no tempo de 72 horas, podemos observar que comparada a citarabina 49,83%, apenas o derivado F8 conseguiu de forma significativa induzir a morte celular pelo aumento do percentual das células em 66,84% com $p < 0,05$. É preciso destacar que o percentual de células em apoptose final só aumenta para a citarabina no tempo de 72 horas, mostrando assim a eficiência dos derivados em relação ao quimioterápico. Ademais, as alterações na indução da necrose celular não foram significativas, embora outros experimentos precisem ser realizados (**Figura 11C**).

Figura 11 - Efeito dos derivados F8 e F9 na indução da apoptose das células HL-60. Em cada quadro, o eixo da ordenada é representativo da fluorescência por iodeto de propídio e o eixo da abscissa representativo pela fluorescência da anexina V-APC. (D) e (H) Células não tratadas (CTR), (E) e (I) células tratadas com $0,03\mu\text{M}$ do quimioterápico citarabina (CIT), (F) e (J) células tratadas com CI_{50} do derivado F8 e (G) e (K) células tratadas com CI_{50} do derivado F9 nos tempos de 48 e 72 horas. As células em apoptose inicial estão no quadrante inferior direito, a apoptose tardia está no quadrante superior direito, as células necróticas estão no quadrante superior esquerdo e as células viáveis estão no quadrante inferior esquerdo. * $P < 0.05$; ** $P < 0.01$, *** $P < 0,001$ e P**** $< 0,0001$ em relação aos dados do controle positivo

HL-60



Fonte: Autor, (2020)

5 DISCUSSÃO

Os derivados da chalcona apresentaram citotoxicidade em linhagens de tumores sólidos e hematopoiéticos, foram mais seletivos para linhagens tumorais e induziram a morte celular programada do tipo apoptose em uma linhagem Leucêmica.

O desenvolvimento de novos agentes antitumorais enfrenta o obstáculo de combater os danos causados (mutagenicidade) por esses agentes não só as células tumorais, mas também as células normais dos pacientes. Em decorrência da falta de seletividade da grande maioria dos quimioterápicos, o processo de inserção de um novo agente em fases mais avançadas da pesquisa é algo raro e por vezes sem sucesso terapêutico esperado (ISMAEL *et al.*, 2008).

A síntese de derivados é um processo comum na tentativa de descobrir os grupamentos essenciais que condicionam a atividade biológica e essa tentativa pode ser contribuída através dos estudos entre a estrutura e a atividade biológica (WILSON & DANISHEFSKY, 2007). Nove derivados da chalconas foram sintetizados e avaliados quanto a sua atividade antitumoral frente a linhagens de tumores sólidos e hematopoiéticos.

Os primeiros derivados denominados de “M” possuem a estrutura básica da chalcona, no entanto apresentam substituições nas posições 4 do anel A e o anel B não se caracteriza mais como um benzeno e sim como furano. Além disso, os principais substituintes da série “M” são: metoxil, metil e amino. Já os derivados da série “F”, continuam com o furano característica da série “M”, no entanto as ligações do oxigênio no furano (Anel B) passam a ser na posição 3. Os substituintes que se destacam na fórmula estrutural dos derivados da série “F” são: metil, metoxil e cloro.

Os ensaios iniciais para a avaliação dos derivados frente as células normais (CMSP) demonstraram que quatro dos nove derivados não apresentaram diminuição da viabilidade celular, no entanto os outros cinco, exibiram perfil mais citotóxico. Estudo conduzido com quinze derivados da chalcona foram avaliados quanto ao seu efeito citotóxico na linhagem normal de fibroblastos de camundongo (M2-10B4). Dentre os quinze derivados, sete não apresentaram efeito citotóxico na linhagem normal até a concentração de 100µM (BRUNHOFER-BOLZER *et al.*, 2015).

A variação observada entre os efeitos promovidos por cada derivado pode ocorrer devido as distintas substituições realizadas nos anéis aromáticos da estrutura básica das

chalconas avaliadas (NEVES *et al.*, 2012). A exemplo, temos o derivado M2, que não apresentou efeito na viabilidade das células normais. O derivado M2 possui como substituintes, dois grupos metoxil nas posições 3 e 4 do Anel A, os quais não foram capazes de conferir potencial citotóxico ao derivado. Já o derivado M8, o qual possui apenas um grupo metoxil, exibiu efeito sobre a viabilidade das células normais. Sendo assim, a adição do segundo substituinte metoxil conseguiu diminuir o efeito citotóxico que apenas um dos substituintes metoxil conseguiu apresentar.

Os derivados F9 e F10 apresentam em sua estrutura, o substituinte cloro (Cl), no entanto, o derivado F9 possui apenas um substituinte cloro na posição 4 do anel A e o derivado F10 exibe dois cloros nas posições 3 e 4 do mesmo anel. A adição de um segundo grupamento cloro no derivado F10, promoveu maior efeito citotóxico nas células normais (CMSP), potencializando em quase 2 vezes o seu efeito. A adição de apenas um grupamento cloro se destaca como eficiente na síntese desses derivados.

Os ensaios de citotoxicidade são utilizados para definir a capacidade inerente de um composto/princípio ativo/extrato em causar morte celular como consequência de danos às funções básicas da célula (ROGERO *et al.* 2003). A atividade antitumoral dos derivados frente a diferentes linhagens neoplásicas também foi avaliada, e os derivados M7, F7, F9 e F10 foram os que apresentaram melhores efeitos contra a viabilidade das células da linhagem de leucemia promielocítica aguda (HL-60), assim como na linhagem de Mieloma Múltiplo Resistente a Dexametasona (MM.1R). Essa atividade citotóxica mais pronunciada nos derivados M7, F7, F9 e F10 na linhagem HL-60 e na MM.1R pode ser parcialmente atribuída à lipofilicidade elevada dos compostos, com valores de logP de 3,04, 2,97, 3,16 e 3,66 respectivamente.

Diversos agrupamentos químicos podem ser utilizados para a síntese de moléculas e assim, promoverem a ativação ou inativação de propriedades da molécula. Essas variações de molécula para molécula podem fazer com o que os derivados possuam atividades biológicas semelhantes e assim muitas moléculas podem exercer a mesma função com potencial diferenciado (MOUSINHO, 2010).

Mori *et al.*, (2017), avaliaram derivados da chalcona com substituições diversas, onde se incluem no geral hidroxilas e grupos metoxil. Dentre todas as chalconas da série, o derivado intitulado de “8”, exibiu o melhor efeito contra as células de Leucemia linfoblástica aguda de células T (DND-41) exibindo valor da CI_{50} de $1,92 \pm 0,14$. Esse derivado possui em sua estrutura um grupo metoxil na posição 4 do anel A, assim como

os derivados M8 e F8. Sendo assim, esse substituinte está potencializando o efeito citotóxico antiproliferativo dos derivados nessas linhagens.

Além da atividade do derivado F8 ser potencializada pelo grupo metoxil, fica evidente um aumento não tão potente, mas expressivo da ação do derivado F8 em todas as linhagens tumorais, devido possivelmente a mudança da ligação do carbono no grupo funcional furano. A ligação do carbono com o furano no derivado M8 é na posição 2, já o derivado F8, essa ligação passa a ser na posição 3 do furano.

Um trabalho de Saito *et al.* (2015), avaliou a importância do anel furano fusionado a chalconas e seu potencial antiproliferativo na linhagem HL-60. A série sintetizada (24 compostos) exibiu o furano ligado a estrutura básica da chalcona e dessa forma conseguiram promover a inibição da proliferação da linhagem HL-60. A maioria dos derivados apresentou valores de CI_{50} satisfatórios, embora alguns derivados como o 6e, 6f e o 6g se destacaram com valores abaixo de $20\mu M$.

Em relação a atividade dos derivados da chalcona frente às células tumorais de adenocarcinoma pancreático (PANC-1 e MIA-PaCa-2), evidenciou-se efeito desejável nas células da linhagem MIA-PaCa-2, com destaque para os derivados F7 e F9. Gaur *et al.*, 2016 investigaram o potencial citotóxico de uma série de derivados de monômeros e dímeros de dihidroartemisinina contendo chalconas substituídas como ligantes e destacaram o potencial do derivado denominado de “8” e “15” na linhagem MIA-PaCa-2. Os derivados “8” e “15” possuem uma hidroxila – C4 no anel B e apresentaram efeito na proliferação dessas células com valor da CI_{50} de $22\mu M$ e $39\mu M$ respectivamente.

A pesquisa a partir de compostos ativos com provável potencial terapêutico contra o câncer, possui um importante critério que é o índice de seletividade. Esse parâmetro determina a capacidade dos compostos de serem mais seletivos contra as células tumorais e assim também identificar os efeitos desses compostos nas células normais (MOURA, 2017).

Os resultados do índice de seletividade mostraram que dos cinco derivados analisados frente a linhagem HL-60 em razão das CMSP, dois derivados (F8 e F9) apresentaram índice de seletividade maior que três e esses mesmos derivados exibiram maior seletividade também para as outras linhagens. Esse achado corrobora com o trabalho de Nam e colaboradores em 2003, no qual apresentam 25 derivados da chalcona que foram sintetizados e avaliados frente a diferentes linhagens tumorais e uma linhagem normal de células endoteliais da veia umbilical humana (HUVEC). Nove dos 25 compostos sintetizados, exibiram valores de índice de seletividade maiores que 2. Assim

como o derivado 2-18 e 2-19, o derivado F8 possui um grupamento metoxil, o qual se caracteriza aqui como o principal grupamento, conferindo potencial citotóxico e seletividade. Já o derivado 2-3 apresenta como substituinte um cloro e assim como esse, o derivado F9 do nosso estudo apresenta também esse grupo, conferindo também efeito citotóxico e maior seletividade.

Os derivados da chalcona foram capazes de induzir modificações no ciclo celular. Os derivados F8, F9 induziram a morte celular, pelo significativo aumento do percentual de células na fase Sub-G0. O aumento do percentual de células na fase Sub-G0 indica a fragmentação do DNA (BECCENERI, 2015). Outro estudo demonstrou que a chalcona 2',4'-dihidroxi-6'-metoxi-3',5'-dimetil induziu a um aumento das células K562 (Leucemia mielóide crônica) na fase Sub-G0 do ciclo celular. Após 48 h de incubação com 1, 2, 4, 8 e 16 μM , as porcentagens de células na fase Sub-G0 foram de $10,57 \pm 1,94\%$, $14,73 \pm 1,86\%$, $43,43 \pm 3,52\%$, $66,25 \pm 2,81\%$ e $76,15 \pm 3,22\%$, respectivamente (YE *et al.*, 2005).

As células tumorais quando expostas a condições estressantes, a partir da ação de compostos, podem ativar pontos de verificação com o propósito de garantir a sua integridade e promover a sua sobrevivência. Essa verificação pode induzir a célula a permanecer em uma determinada fase do ciclo celular, aguardando que o dano seja reparado e a célula continue com as suas funções. Caso esse dano não consiga ser reparado por mecanismos próprios da célula, os pontos de verificação do ciclo ativam vias que podem conduzir a célula a morte celular programada, a exemplo, a apoptose. (CABRAL, 2016).

A apoptose é um evento celular fundamental e crítico para a citotoxicidade induzida pelas drogas anticâncer, além de ser de grande importância para a validação de medicamentos em estudos clínicos (COTTER, 2009; CARNEIRO; EL-DEIRY, 2020). Induzir a apoptose em lesões pré-cancerosas pode remover as células potencialmente malignas, bloqueando assim o desenvolvimento do tumor (PISTRITTO *et al.*, 2016). Os derivados F8 e F9 induziram a um aumento no percentual de células em apoptose inicial no tempo de 72 horas e apoptose final no tempo de 48 e 72h.

Saavedra *et al.*, (2019) avaliaram um derivado da chalcona denominado de CHAL frente a sete diferentes linhagens tumorais de Leucemia, no entanto selecionaram a linhagem U-937 (Leucemia Mielóide isolada de um linfoma histiocítico) para os ensaios da avaliação da apoptose. A CHAL possui um segundo anel aromático ligado ao anel A e uma hidroxila ligada ao anel B -C4 e conseguiu promover a apoptose das células U-937

pelo aumento do percentual de células em apoptose (40,1%) quando comparadas ao controle. Vale ressaltar que as alterações estruturais dos derivados F8 e F9 também são na posição C-4 dos anéis, embora seja o anel A. Essa inserção química pode conferir potencial a molécula.

As chalconas são relatadas por promoverem a inibição da via de sinalização Notch. A família Notch inclui quatro receptores trans-membranas (Notch 1–4) e cinco ligantes canônicos (Jagged-1 e -2, Delta-like-1, -3 e -4). Essa via de transdução de sinal é reconhecida como um alvo na terapia anticâncer, pois desencadeia efeitos proliferativos e pró-apoptóticos em muitas linhagens de Leucemia linfoblástica aguda (MORI *et al*, 2017). Os derivados F8 e F9 podem estar atuando na inibição desses receptores e ligantes e sendo assim, se comportando como antagonistas.

Um trabalho conduzido por Ko *et al*, (2015), avaliou a atividade de uma trans-chalcona denominada de DPEP na linhagem HL-60. A DPEP possui alterações na sua porção α - β insaturada, o qual potencializou a sua atividade na linhagem HL-60, aumentando para 53,3% o percentual de células em apoptose no tempo de 12 horas e na concentração de 40 μ M.

Terapias anticâncer que visam as vias de morte celular são extremamente complexas devido ao grande porte de alvos terapêuticos, onde cada um possui mecanismos de resistência específicos para diferentes tipos de tumores e perfis variados de toxicidade de agentes (CARNEIRO; EL-DEIRY, 2020).

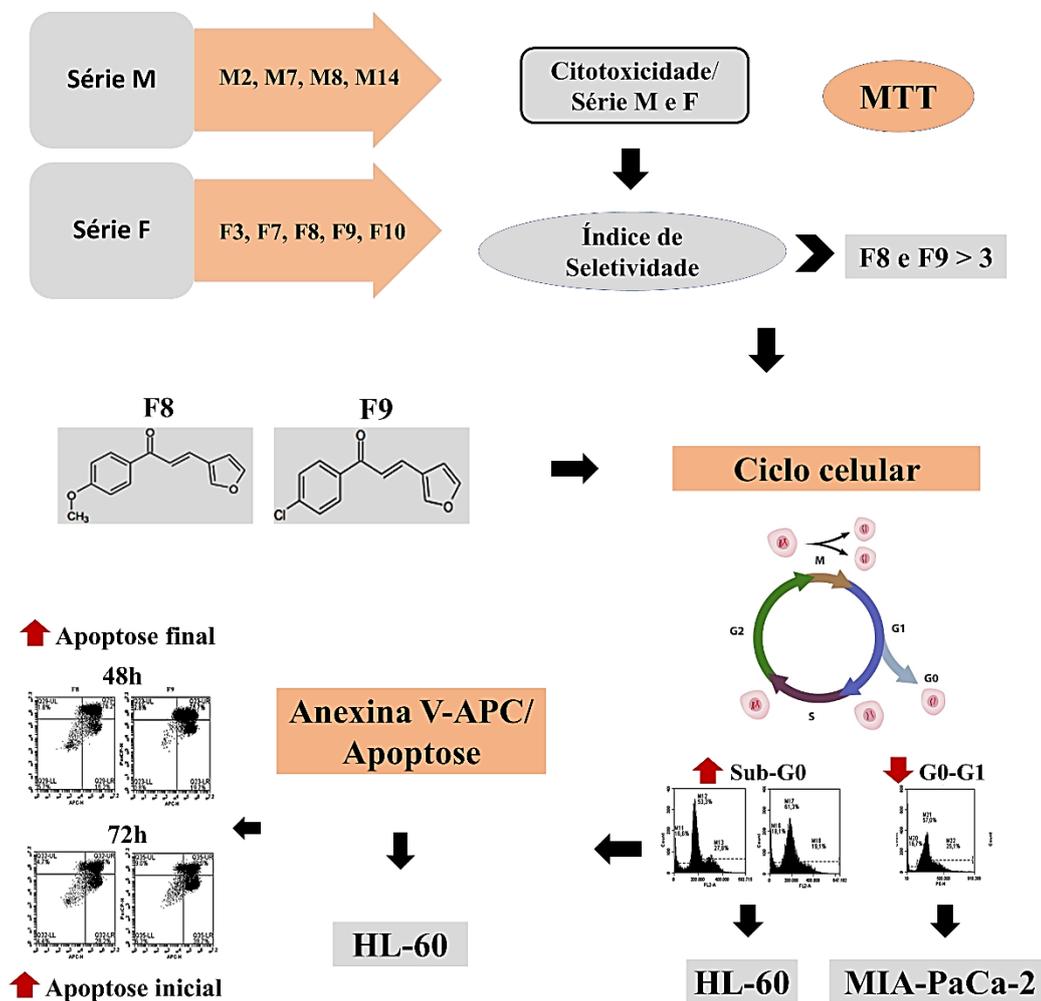
Em conclusão, os derivados F8 e F9 exibiram potencial atividade na inibição da proliferação das células HL-60 e indução da morte celular programada por apoptose. Esses achados podem fornecer uma compreensão mais profunda dos mecanismos subjacentes à atividade anticâncer dos derivados F8 e F9.

6 CONSIDERAÇÕES FINAIS

- Os derivados da chalcona M2, M7, M14 e F3 não apresentaram citotoxicidade frente as células mononucleares do sangue periférico (CMSP) nas concentrações até 100 μ M. Os derivados M8, F7, F8, F9 e F19 exibiram um perfil citotóxico e sendo assim apresentaram suas concentrações inibitórias máximas (CI₅₀).
- Dos 9 derivados, 8 obtiveram significativa atividade frente as diferentes linhagens do estudo, destacando-se os derivados M7, F8, F9 e F10, que exibiram maior efeito na linhagem celular HL-60 (Leucêmica promielocítica aguda) e MIA-PaCa-2 (Adernocarcinoma Pancreático). Ademais, identificamos melhores índices de seletividade para os derivados F8 e F9 frente as linhagens HL-60, MM1.R e MIA-PaCa-2.
- Observamos que os derivados da chalcona F8 e F9 induziram a um aumento do percentual das células HL-60 na fase Sub-G0 e induziram significativamente a morte celular programada do tipo apoptose.

Figura 12 – Resumo gráfico das etapas realizadas no projeto

Resumo Gráfico



Fonte: Autor, (2020)

7 PERSPECTIVAS

- ✓ Analisar se os derivados apresentam efeito inibitório na migração das células das linhagens MIA-PaCa-2;
- ✓ Investigar o efeito destes derivados na inibição da proliferação de clones em células das linhagens MIA-PaCa-2;
- ✓ Investigar possíveis alvos das chalconas em vias da apoptose através de Western Blotting frente a células da leucemia promielocítica aguda (HL-60) e células tumorais pancreáticas (MIA-PaCa-2 e PANC-1).

REFERENCIAL BIBLIOGRÁFICO

ACHANTA, Geetha *et al.* A Boronic-Chalcone Derivative Exhibits Potent Anticancer Activity through Inhibition of the Proteasome. **Molecular Pharmacology**, [s.l.], v. 70, n. 1, p.426-433, 24 abr. 2006.

ALMEIDA, Vera Lúcia de *et al.* Câncer e agentes antineoplásicos ciclo-celular específicos e ciclo-celular não específicos que interagem com o DNA: uma introdução. **Química Nova**, [s.l.], v. 28, n. 1, p.118-129, fev. 2005.

CHAMMAS, R.; ONUCHIC, A. C. Câncer e o microambiente tumoral. **Revista Médica**, v. 89, n. 1, p. 21–31, 2010.

AMERICAN CANCER SOCIETY. **Treatment types**. Disponível em: <https://www.cancer.org/treatment/treatments-and-side-effects/treatment-types/radiation/basics.html>. Acesso em 24 out 2019.

ANDRICOPULO, Adriano; SALUM, Livia; ABRAHAM, Donald. Structure-Based Drug Design Strategies in Medicinal Chemistry. **Current Topics In Medicinal Chemistry**, [s.l.], v. 9, n. 9, p.771-790, 1 jun. 2009.

BAEISSA, H. M. *et al.* Mutational patterns in oncogenes and tumour suppressors. **Biochemical Society Transactions**, [s.l.], v. 44, n. 3, p.925-931, 9 jun. 2016.

BAI, Xue; MA, Yaxin; ZHANG, Guobin. Butein suppresses cervical cancer growth through the PI3K/AKT/mTOR pathway. **Oncology Reports**, [s.l.], v. 33, n. 6, p. 3085-3092, 24 abr. 2015.

BANO, Sameena *et al.* Synthesis of some novel chalcones, flavanones and flavones and evaluation of their anti-inflammatory activity. **European Journal Of Medicinal Chemistry**, [s.l.], v. 65, p.51-59, jul. 2013.

BAUDINO, Troy. Targeted Cancer Therapy: The Next Generation of Cancer Treatment. **Current Drug Discovery Technologies**, [s.l.], v. 12, n. 1, p.3-20, 22 jul. 2015.

BECCENERI, A. B. **Mecanismo de ação da cedrelona na morte celular programada de células de câncer de mama** (Dissertação). Universidade Federal de São Carlos, UFSCar, 2015.

BIRARI, Rahul B. *et al.* Antiobesity and lipid lowering effects of Glycyrrhiza chalcones: Experimental and computational studies. **Phytomedicine**, [s.l.], v. 18, n. 8-9, p.795-801, jun. 2011.

BITTENCOURT, Lucas Felipe Fernandes *et al.* Novel synthetic chalcones induces apoptosis in human glioblastoma cells. **Chemico-biological Interactions**, [s.l.], v. 252, p. 74-81, maio 2016.

- BOUYSSOU, Juliette M.c. *et al.* Regulation of microRNAs in cancer metastasis. **Biochimica Et Biophysica Acta (bba) - Reviews On Cancer**, [s.l.], v. 1845, n. 2, p.255-265, abr. 2014.
- BRAY, F. *et al.* Global cancer statistics 2018: GLOBOCAN estimates of incidence and mortality worldwide for 36 cancers in 185 countries. **CA: a cancer journal for clinicians**, Hoboken, v. 68, n. 6, p. 394-424, Nov. 2018.
- BRUNHOFER-BOLZER, Gerda *et al.* SAR-Guided Development and Characterization of a Potent Antitumor Compound toward B-Cell Neoplasms with No Detectable Cytotoxicity toward Healthy Cells. **Journal Of Medicinal Chemistry**, [s.l.], v. 58, n. 3, p.1244-1253, 20 jan. 2015.
- BUSSARD, Karen M. *et al.* Tumor-associated stromal cells as key contributors to the tumor microenvironment. **Breast Cancer Research**, [s.l.], v. 18, n. 1, p.1-11, 11 ago. 2016.
- CABRAL, B. L. S. **Investigação de citotoxicidade, mecanismo de morte e toxicidade de análogos de chalconas: lqfm064, lqfm157 e lqfm178**. Dissertação (Mestrado em Ciências Farmacêuticas) Programa de Pós- graduação em Ciências Farmacêuticas da Universidade Federal de Goiás. 2016.
- CAMPOS-BUZZI, F. *et al.* 4'-Acetamidochalcone derivatives as potential antinociceptive agents. **Molecules**, v. 12, p. 896-906, 2007.
- CAO, Wei *et al.* The Combination of Chemotherapy and Radiotherapy towards More Efficient Drug Delivery. **Chemistry - An Asian Journal**, [s.l.], v. 9, n. 1, p.48-57, 20 nov. 2013.
- CARNEIRO, Benedito A.; EL-DEIRY, Wafik S.. Targeting apoptosis in cancer therapy. **Nature Reviews Clinical Oncology**, [s.l.], p. 01-23, 23 mar. 2020.
- CARVALHO, A. T.; RIBEIRO, G.A.; NOGUEIRA, R. F. **Citometria de Fluxo no estudo das doenças infecto-parasitárias**. Curso de inverno. Data completa 2010. Pós graduação em Biologia Celular e Molecular.
- CASTLE, John C. *et al.* Mutation-Derived Neoantigens for Cancer Immunotherapy. **Frontiers In Immunology**, [s.l.], v. 10, p.01-07, 7 ago. 2019.
- CASTLES, Simon; WAINER, Zoe; JAYASEKARA, Harindra. Risk factors for cancer in the Australian Aboriginal and Torres Strait Islander population: a systematic review. **Australian Journal Of Primary Health**, [s.l.], v. 22, n. 3, p.190-197, 2016.
- CHAKRAVARTHI, Balabhadrapatruni V.s.k.; NEPAL, Saroj; VARAMBALLY, Sooryanarayana. Genomic and Epigenomic Alterations in Cancer. **The American Journal Of Pathology**, [s.l.], v. 186, n. 7, p.1724-1735, jul. 2016.
- CELIÀ-TERRASSA, Toni; KANG, Yibin. Distinctive properties of metastasis-initiating cells. **Genes & Development**, [s.l.], v. 30, n. 8, p.892-908, 15 abr. 2016.

CERWENKA, Adelheid; LANIER, Lewis L. Natural killer cell memory in infection, inflammation and cancer. **Nature Reviews Immunology**, [s.l.], v. 16, n. 2, p.112-123, 25 jan. 2016.

CHAFFER, C. L.; WEINBERG, R. A.. A Perspective on Cancer Cell Metastasis. **Science**, [s.l.], v. 331, n. 6024, p.1559-1564, 24 mar. 2011.

CHAGAS, Caroline Manto; MOSS, Sara; ALISARAIE, Laleh. Drug metabolites and their effects on the development of adverse reactions: Revisiting Lipinski's Rule of Five. **International Journal Of Pharmaceutics**, [s.l.], v. 549, n. 1-2, p.133-149, out. 2018.

CHEN, Hsin-yuan *et al.* Isoliquiritigenin Induces Autophagy and Inhibits Ovarian Cancer Cell Growth. **International Journal Of Molecular Sciences**, [s.l.], v. 18, n. 10, p. 2025-2040, 21 set. 2017.

CHUANG, Chun-yi *et al.* Licochalcone A induces apoptotic cell death via JNK/p38 activation in human nasopharyngeal carcinoma cells. **Environmental Toxicology**, [s.l.], v. 34, n. 7, p.853-860, 14 abr. 2019.

CORRÊA, R. *et al.* Antinociceptive properties of chalcones. Structure activity relationships. *Archiv der Pharmazie*, v. 10, p. 332- 334, 2001.

COTTER, Thomas G.. Apoptosis and cancer: the genesis of a research field. : the genesis of a research field. **Nature Reviews Cancer**, [s.l.], v. 9, n. 7, p. 501-507, jul. 2009.

DAINA, Antoine; MICHIELIN, Olivier; ZOETE, Vincent. SwissADME: a free web tool to evaluate pharmacokinetics, drug-likeness and medicinal chemistry friendliness of small molecules. **Scientific Reports**, [s.l.], v. 7, n. 1, p.01-13, 3 mar. 2017.

DANTAS, B.B. **Avaliação do efeito anticâncer de compostos sintéticos derivados do núcleo tetraidropirano.** (Dissertação). Universidade Federal da Paraíba, UFPB, 2014.

DAS, Manik; MANNA, Kuntal. Chalcone Scaffold in Anticancer Armamentarium: A Molecular Insight. **Journal Of Toxicology**, [s.l.], v. 2016, p.1-14, 2016.

DIEU-NOSJEAN, Marie-caroline *et al.* Long-Term Survival for Patients With Non-Small-Cell Lung Cancer With Intratumoral Lymphoid Structures. **Journal Of Clinical Oncology**, [s.l.], v. 26, n. 27, p.4410-4417, 20 set. 2008.

DONG, Naiwei *et al.* Apoptosis-inducing effects and growth inhibitory of a novel chalcone, in human hepatic cancer cells and lung cancer cells. **Biomedicine & Pharmacotherapy**, [s.l.], v. 105, p. 195-203, set. 2018.

EVANOS AKSÖZ, B.; ERTAN, R. Chemical and Structural Properties of Chalcones I. *Journal of Pharmaceutical Sciences*, v. 36, p. 223-242, 2011.

FERLAY, J. *et al.* Cancer incidence and mortality worldwide: sources, methods and

major patterns in GLOBOCAN 2012. **Int J Cancer**, v. 136, n. 5, p. E359-386, 2015.

FERLAY, J. et al. Cancer today. Lyon, France: **International Agency for Research on Cancer**, 2018. (IARC CAnceRBase, n. 15). Disponível em: <https://publications.iarc.fr/Databases/Iarc-Cancerbases/Cancer-Today-Powered-By-GLOBOCAN-2018--2018>. Access em: 9 Sep. 2019.

FERREIRA, Paulo Michel P. et al. Study of the antiproliferative potential of seed extracts from Northeastern Brazilian plants. **Anais da Academia Brasileira de Ciências**, [s.l.], v. 83, n. 3, p.1045-1058, 15 jul. 2011.

FIDLER, Isaiah J.; KRIPKE, Margaret L.. The challenge of targeting metastasis. **Cancer And Metastasis Reviews**, [s.l.], v. 34, n. 4, p.635-641, 2 set. 2015. ROBERT, Jacques. Biology of cancer metastasis. **Bulletin Du Cancer**, [s.l.], v. 100, n. 4, p.333-342, abr. 2013.

FONSECA, Pâmela, S. **Síntese e Caracterização de Chalconas e Dichalconas contendo unidades 1,2,3-triazólicas**. Dissertação (Doutorado em Química). Programa de Pós graduação em Química. Universidade de Brasília, 2012.

FOUAD, Y. A.; AANEI, C. Revisiting the hallmarks of câncer. **Am J Cancer Res**, v. 7(5), p. 1016–1036, 2017.

FRANKEN, Nicolaas A P *et al.* Clonogenic assay of cells in vitro. **Nature Protocols**, [s.l.], v. 1, n. 5, p.2315-2319, dez. 2006.

GALEEV, Roman; LARSSON, Jonas. **Cohesin in haematopoiesis and leukaemia**. **Current Opinion In Hematology**, [s.l.], v. 25, n. 4, p.259-265, jul. 2018.

GALLIMORE, Elizabeth. Infusion-related risks associated with chemotherapy. **Nursing Standard**, [s.l.], v. 30, n. 25, p.51-60, 17 fev. 2016.

GANGULY, Kirat Kumar *et al.* Integrins and metastasis. **Cell Adhesion & Migration**, [s.l.], v. 7, n. 3, p.251-261, 5 maio 2013.

GAUR, Rashmi *et al.* Synthesis of a series of novel dihydroartemisinin monomers and dimers containing chalcone as a linker and their anticancer activity. **European Journal Of Medicinal Chemistry**, [s.l.], v. 122, p.232-246, out. 2016.

GHIRINGHELLI, Francois; APETOH, Lionel. Chemotherapy and immunomodulation: from immunogenic chemotherapies to novel therapeutic strategies. **Future Oncology**, [s.l.], v. 9, n. 4, p.469-472, abr. 2013.

GÖKTUNA, Serkan I.; DIAMANTI, Michaela A.; CHAU, Tieu Lan. IKK s and tumor cell plasticity. **The Febs Journal**, [s.l.], v. 285, n. 12, p. 2161-2181, 17 abr. 2018.

GOMES, Marcelo *et al.* Chalcone Derivatives: Promising Starting Points for Drug Design. **Molecules**, [s.l.], v. 22, n. 8, p.01-25, 25 jul. 2017.

GONZALEZ, Hugo; ROBLES, Isabella; WERB, Zena. Innate and acquired immune surveillance in the postdissemination phase of metastasis. **The Febs Journal**, [s.l.], v. 285, n. 4, p.654-664, 24 nov. 2017.

GOODSPEED, A. *et al.* Tumor-Derived Cell Lines as Molecular Models of Cancer Pharmacogenomics. **Molecular Cancer Research**, [s.l.], v. 14, n. 1, p.3-13, 6 ago. 2015.

HANAHAN, D.; COUSSENS, L. Accessories to the Crime: Functions of Cells Recruited to the Tumor Microenvironment. **Cancer Cell**, [s.l.], v. 21, n. 3, p.309-322, mar. 2012.

HANAHAN, D.; WEINBERG, R. A. Hallmarks of Cancer: The Next Generation. **Cell**, v.144, n. 4, p. 646-674, 2011b.

HANAHAN, D.; WEINBERG, R. A. The Hallmarks of Cancer. **Cell**, [s.l.], v. 100, n. 1, p.57-70, jan. 2000a.

HARA, Hirokazu *et al.*. Newly Synthesized 'Hidabeni' Chalcone Derivatives Potently Suppress LPS-Induced NO Production via Inhibition of STAT1, but Not NF- κ B, JNK, and p38, Pathways in Microglia. **Biological And Pharmaceutical Bulletin**, [s.l.], v. 37, n. 6, p. 1042-1049, 2014.

HIJIYA, Nobuko; SUTTORP, Meinolf. **How I treat chronic myeloid leukemia in children and adolescents**. **Blood**, [s.l.], v. 133, n. 22, p.2374-2384, 30 maio 2019.

HARIKUMAR, Kuzhuvelil B. *et al.* Modification of the cysteine residues in I κ B α kinase and NF- κ B (p65) by xanthohumol leads to suppression of NF- κ B-regulated gene products and potentiation of apoptosis in leukemia cells. **Blood**, [s.l.], v. 113, n. 9, p.2003-2013, 26 fev. 2009.

HIRATA, Eishu; SAHAI, Erik. Tumor Microenvironment and Differential Responses to Therapy. **Cold Spring Harbor Perspectives In Medicine**, [s.l.], v. 7, n. 7, p.1-15, 17 fev. 2017.

HOU, Gaochao *et al.* Cardamonin, a natural chalcone, reduces 5-fluorouracil resistance of gastric cancer cells through targeting Wnt/ β -catenin signal pathway. **Investigational New Drugs**, [s.l.], p.1-11, 17 maio 2019.

HUI, Lanlan; CHEN, Ye. Tumor microenvironment: Sanctuary of the devil. **Cancer Letters**, [s.l.], v. 368, n. 1, p.7-13, nov. 2015.

INSTITUTO NACIONAL DE CÂNCER. **Estimativa | 2018 Incidência de Câncer no Brasil**. Rio de Janeiro: 2018a.

_____. **Estimativa | 2018 Incidência de Câncer no Brasil**. Rio de Janeiro: 2020.

_____. **Tratamento do câncer**. Disponível em: <https://www.inca.gov.br/tratamento>. Acesso em 24 out 2019b.

_____. **Quais os efeitos colaterais da quimioterapia.** Disponível em: <https://www.inca.gov.br/perguntas-frequentes/quais-os-efeitos-colaterais-da-quimioterapia>. Acesso em 01 out 2019c.

_____. **Leucemia.** Disponível em: <https://www.inca.gov.br/tipos-de-cancer/leucemia>. Acesso em 02 abril 2020.

ISHIKAWA, Chie; SENBA, Masachika; MORI, Naoki. Butein inhibits NF- κ B, AP-1 and Akt activation in adult T-cell leukemia/lymphoma. **International Journal Of Oncology**, [s.l.], v. 51, n. 2, p. 633-643, 2 jun. 2017.

ISMAEL, Gustavo F.v. *et al.* Novel cytotoxic drugs: Old challenges, new solutions. **Cancer Treatment Reviews**, [s.l.], v. 34, n. 1, p.81-91, fev. 2008.

Jl, Xiang *et al.* 2',4'-Dihydroxy-6'-methoxy-3',5'-dimethylchalcone induced apoptosis and G1 cell cycle arrest through PI3K/AKT pathway in BEL-7402/5-FU cells. **Food And Chemical Toxicology**, [s.l.], v. 131, p.1-11, set. 2019.

JIN, Xiaohong; SHI, Yi. Isobavachalcone induces the apoptosis of gastric cancer cells via inhibition of the Akt and Erk pathways. **Experimental And Therapeutic Medicine**, [s.l.], v. 11, n. 2, p.403-408, 1 dez. 2015.

JONES, Corey L.; TEPE, Jetze J.. Proteasome Activation to Combat Proteotoxicity. **Molecules**, [s.l.], v. 24, n. 15, p.2841-2869, 5 ago. 2019.

JULIUSSON, Gunnar; HOUGH, Rachael. **Leukemia. Progress In Tumor Research**, [s.l.], p.87-100, 2016.

KATZUNG, Bertram G.; TREVOR, Anthony J. **Farmacologia básica e clínica**. 13. ed. Porto Alegre: AMGH, 2017.

KAUR, Rajandeep; KAPOOR, Karan; KAUR, Harpreet. Plants as a source of anticancer agents. **J Nat Prod Plant Resour**, v. 1, n. 1, p. 119-24, 2011.

KHAZIR, Jabeena *et al.* Role of plants in anticancer drug discovery. **Phytochemistry Letters**, [s.l.], v. 7, p.173-181, fev. 2014.

KO, Eun-Yi *et al.* Trans-1,3-Diphenyl-2,3-Epoxypropan-1-One, A Chalcone Derivative, Induces Apoptosis Via Ros-Mediated Downregulation Of Bcl-Xl In Human Leukemia HI-60 Cells. **EXCLI Journal**. v. 14, p. 900-907, Ago, 2015.

KUCEROVA-CHLUPACOVA, Marta *et al.* Novel Halogenated Pyrazine-Based Chalcones as Potential Antimicrobial Drugs. **Molecules**, [s.l.], v. 21, n. 11, p.1421-1436, 27 out. 2016.

KUCUKYURT, Selin; ESKAZAN, Ahmet Emre. **New drugs approved for acute myeloid leukaemia in 2018. British Journal Of Clinical Pharmacology**, [s.l.], v. 85, n. 12, p.2689-2693, dez. 2019.

KUETE, Victor; SANDJO, Louis P.. Isobavachalcone: An overview. **Chinese Journal Of Integrative Medicine**, [s.l.], v. 18, n. 7, p.543-547, jul. 2012.

KUMAR, Malay *et al.* Oral cancer: Etiology and risk factors. **Journal Of Cancer Research And Therapeutics**, [s.l.], v. 12, n. 2, p.458-463, 2016.

LACINA, Lukáš *et al.* Evolution of Cancer Progression in the Context of Darwinism. **Anticancer Research**, [s.l.], v. 39, n. 1, p.1-16, 27 dez. 2018.

LAHTCHEV, K. L. *et al.* Antifungal activity of chalcones: A mechanistic study using various yeast strains. **European Journal of Medicinal Chemistry**, v. 43, p. 2220-2228, 2008.

LAVIN, Yonit *et al.* Regulation of macrophage development and function in peripheral tissues. **Nature Reviews Immunology**, [s.l.], v. 15, n. 12, p.731-744, 25 nov. 2015.

LEHMANN, S *et al.* Continuing high early death rate in acute promyelocytic leukemia: a population-based report from the Swedish Adult Acute Leukemia Registry. **Leukemia**, [s.l.], v. 25, n. 7, p.1128-1134, 19 abr. 2011.

LETAFAT, Bahram *et al.* Synthesis and In Vitro Cytotoxic Activity of Novel Chalcone-Like Agents, **Iran J Basic Med Sci**, v. 16, n. 11, p. 1155-1162, 2013.

LI, Kai *et al.* Isobavachalcone Induces ROS-Mediated Apoptosis via Targeting Thioredoxin Reductase 1 in Human Prostate Cancer PC-3 Cells. **Oxidative Medicine And Cellular Longevity**, [s.l.], v. 2018, p. 1-13, 16 out. 2018.

LIU, Chian-jiun *et al.* Protective Effects of Licochalcone A Ameliorates Obesity and Non-Alcoholic Fatty Liver Disease Via Promotion of the Sirt-1/AMPK Pathway in Mice Fed a High-Fat Diet. **Cells**, [s.l.], v. 8, n. 5, p.447-467, 11 maio 2019.

LIPINSKI, Christopher A. *et al.* Experimental and computational approaches to estimate solubility and permeability in drug discovery and development settings IPII of original article: S0169-409X(96)00423-1. The article was originally published in *Advanced Drug Delivery Reviews* 23 (1997) 3–25. 1. **Advanced Drug Delivery Reviews**, [s.l.], v. 46, n. 1-3, p.3-26, mar. 2001.

LIU, R. B. *et al.* Densely Granulated Murine NK Cells Eradicate Large Solid Tumors. **Cancer Research**, [s.l.], v. 72, n. 8, p.1964-1974, 28 fev. 2012.

MAHAPATRA, Debarshi Kar; ASATI, Vivek; BHARTI, Sanjay Kumar. An updated patent review of therapeutic applications of chalcone derivatives (2014-present). **Expert Opinion On Therapeutic Patents**, [s.l.], v. 29, n. 5, p.385-406, 4 maio 2019a.

MAHAPATRA, Debarshi Kar *et al.* Perspectives of medicinally privileged chalcone based metal coordination compounds for biomedical applications. **European Journal Of Medicinal Chemistry**, [s.l.], v. 174, p.142-158, jul. 2019b.

MANNING, G. The Protein Kinase Complement of the Human Genome. **Science**, [s.l.], v. 298, n. 5600, p.1912-1934, 6 dez. 2002.

MARCUS, Assaf et al. Recognition of Tumors by the Innate Immune System and Natural Killer Cells. **Advances In Immunology**, [s.l.], p.91-128, 2014.

MARINESCU, Cristina; VLADAREANU, Ana-maria; MIHAI, Felicia. Acute Lymphocytic Leukemia in Adults. Pathologic Features and Prognosis. **Romanian Journal Of Internal Medicine**, [s.l.], v. 53, n. 1, p. 33-38, 1 mar. 2015.

MCCARTHY, Nicola. Turning a negative into a positive. **Nature Reviews Cancer**, [s.l.], v. 16, n. 5, p.272-273, 15 abr. 2016.

MIRANDA-SAPLA, Milena Menegazzo *et al.* Trans-Chalcone modulates *Leishmania amazonensis* infection in vitro by Nrf2 overexpression affecting iron availability. **European Journal Of Pharmacology**, [s.l.], v. 853, p.275-288, jun. 2019.

MIRZAEI, Hassan; EMAMI, Saeed. Recent advances of cytotoxic chalconoids targeting tubulin polymerization: Synthesis and biological activity. **European Journal Of Medicinal Chemistry**, [s.l.], v. 121, p.610-639, out. 2016.

MIROSSAY, Ladislav; VARINSKÁ, Lenka; MOJŽIL, Ján. Antiangiogenic Effect of Flavonoids and Chalcones: An Update. **International Journal Of Molecular Sciences**, [s.l.], v. 19, n. 1, p.01-28, 22 dez. 2017.

MOURA, H. M. M. **Avaliação in vitro da atividade antitumoral e antiviral frente ao Zika vírus de naftoquinonas sintéticas**. Dissertação (Mestrado em concentração de Química e Farmacologia de Substâncias Bioativas) Programa de Pós-graduação em Ciências Farmacêuticas da Universidade Federal de Ouro Preto. 2017.

MOUSINHO K.C. **Estudo do potencial anticâncer de um derivado de chalcona, 1-(4-Nitrofenil)-3-fenilprop-2-em-1-ona, in vitro e in vivo**. Tese (Doutorado em Farmacologia) Programa de Pós graduação em Farmacologia da Universidade Federal do Ceará. 2010.

MORAES, Lorena Gomes de; ALONSO, Araci Molnar; OLIVEIRA-FILHO, Eduardo Cyrino. Plantas medicinais no tratamento do câncer: uma breve revisão de literatura. **Universitas: Ciências da Saúde**, [s.l.], v. 9, n. 1, p.01-24, 29 jul. 2011.

MORI, Mattia *et al.* Identification of a novel chalcone derivative that inhibits Notch signaling in T-cell acute lymphoblastic leukemia. **Scientific Reports**, [s.l.], v. 7, n. 1, p.01-13, 19 maio 2017.

MUNIR, Talha. Chronic lymphocytic leukemia. **Hematology**, [s.l.], v. 20, n. 4, p. 245-246, 23 abr. 2015.

NAM, Nguyen-hai *et al.* Cytotoxic 2',5'-dihydroxychalcones with unexpected antiangiogenic activity. **European Journal Of Medicinal Chemistry**, [s.l.], v. 38, n. 2, p.179-187, fev. 2003.

NARYZHNY, S.n.; LEGINA, O.k.. Structural-functional diversity of p53 proteoforms. **Biomeditsinskaya Khimiya**, [s.l.], v. 65, n. 4, p.263-276, 2019.

NATIONAL CANCER INSTITUTE. **Cancer statistics**. Disponível em: <https://www.cancer.gov/about-cancer/understanding/statistics>. Acesso em 21 març 2019.

NEVES, Marta Perro *et al.* Solid-phase synthesis of 2'-hydroxychalcones. Effects on cell growth inhibition, cell cycle and apoptosis of human tumor cell lines. **Bioorganic & Medicinal Chemistry**, [s.l.], v. 20, n. 1, p.25-33, jan. 2012.

NEWMAN, David J.; CRAGG, Gordon M.. Natural Products as Sources of New Drugs from 1981 to 2014. **Journal Of Natural Products**, [s.l.], v. 79, n. 3, p.629-661, 7 fev. 2016.

NOBILI, Stefania *et al.* Natural compounds for cancer treatment and prevention. **Pharmacological Research**, [s.l.], v. 59, n. 6, p.365-378, jun. 2009.

NOGUEIRA, Luciano J.; MONTANARI, Carlos A.; DONNICI, Claudio L. Histórico da evolução da química medicinal e a importância da lipofilia: de Hipócrates e Galeno a Paracelsus e as contribuições de Overton e de Hansch. **Rev. Virtual de Quim.** v. 1, n. 3, p 227-240, 2009.

O'DONNELL, Margaret R *et al.* Acute Myeloid Leukemia. **Journal Of The National Comprehensive Cancer Network**, [s.l.], v. 10, n. 8, p.984-1021, ago. 2012.

ORTOLAN, Xana Raquel *et al.* Osteogenic potential of a chalcone in a critical-size defect in rat calvaria bone. **Journal Of Cranio-maxillofacial Surgery**, [s.l.], v. 42, n. 5, p.520-524, jul. 2014.

ORTOLAN, Xana Raquel *et al.* Osteogenic potential of different chalcones in an in vivo model: A preliminary study.. **Journal Of Oral Research**, [s.l.], v. 6, n. 8, p.209-215, 31 ago. 2017.

ÖZDEMİR, Berna c. *et al.* Depletion of Carcinoma-Associated Fibroblasts and Fibrosis Induces Immunosuppression and Accelerates Pancreas Cancer with Reduced Survival. **Cancer Cell**, [s.l.], v. 25, n. 6, p.719-734, jun. 2014.

PALUCKA, A. karolina; COUSSENS, Lisa m. The Basis of Oncoimmunology. **Cell**, [s.l.], v. 164, n. 6, p.1233-1247, mar. 2016.

PAN, Lydiá; BECKER, Hans; GERHÄUSER, Clarissa. Xanthohumol induces apoptosis in cultured 40-16 human colon cancer cells by activation of the death receptor- and mitochondrial pathway. **Molecular Nutrition & Food Research**, [s.l.], v. 49, n. 9, p.837-843, set. 2005.

PANDEY, Manoj K. *et al.* Butein, a Tetrahydroxychalcone, Inhibits Nuclear Factor (NF)- κ B and NF- κ B-regulated Gene Expression through Direct Inhibition of I κ B α Kinase β on Cysteine 179 Residue. **Journal Of Biological Chemistry**, [s.l.], v. 282, n. 24, p. 17340-17350, 17 abr. 2007.

PANDHURNEKAR, C. P. *et al.* Synthesis, characterization and biological activity of 4-(2-hydroxy-5-(aryldiazenyl)phenyl)-6-(aryl)pyrimidin-2-ols derivatives. **Organic Chemistry International**, 2013.

PAYNE, Sarah; MILES, David. Mechanisms of anticancer drugs. In: PAYNE, Sarah; MILES, David. **Mechanisms of anticancer drugs**. 7. ed. London: Taylor & Francis, 2008. Cap. 4. p. 34-46.

PINZ, Sophia *et al.* The Synthetic α -Bromo-2',3,4,4'-Tetramethoxychalcone (α -Br-TMC) Inhibits the JAK/STAT Signaling Pathway. **Plos One**, [s.l.], v. 9, n. 3, p. 01-13, 3 mar. 2014.

PISTRITTO, Giuseppa *et al.* Apoptosis as anticancer mechanism: function and dysfunction of its modulators and targeted therapeutic strategies. : function and dysfunction of its modulators and targeted therapeutic strategies. **Ageing**, [s.l.], v. 8, n. 4, p. 603-619, 27 mar. 2016.

QUAGLIO, Deborah *et al.* Chalcones and Chalcone-mimetic Derivatives as Notch Inhibitors in a Model of T-cell Acute Lymphoblastic Leukemia. **Acs Medicinal Chemistry Letters**, [s.l.], v. 10, n. 4, p. 639-643, 26 fev. 2019.

RAUSCH, Oliver. High content cellular screening. **Current Opinion In Chemical Biology**, [s.l.], v. 10, n. 4, p.316-320, ago. 2006.

REDDY, M. Vijaya Bhaskar *et al.* Structure–activity relationships of chalcone analogs as potential inhibitors of ADP- and collagen-induced platelet aggregation. **Bioorganic & Medicinal Chemistry**, [s.l.], v. 19, n. 24, p.7711-7719, dez. 2011.

RHIM, Andrew d. *et al.* Stromal Elements Act to Restrain, Rather Than Support, Pancreatic Ductal Adenocarcinoma. **Cancer Cell**, [s.l.], v. 25, n. 6, p.735-747, jun. 2014.

ROETEN, Margot S. F.; CLOOS, Jacqueline; JANSEN, Gerrit. Positioning of proteasome inhibitors in therapy of solid malignancies. **Cancer Chemotherapy And Pharmacology**, [s.l.], v. 81, n. 2, p.227-243, 28 nov. 2017.

ROGERO *et al.* Teste in vitro de Citotoxicidade: Estudo Comparativo entre Duas Metodologias. **Materials Research**. v. 6, n. 3, p. 317-320, 08 jan. 2003.

ROSE-INMAN, Hayley; KUEHL, Damon. **Acute Leukemia. Emergency Medicine Clinics Of North America**, [s.l.], v. 32, n. 3, p.579-596, ago. 2014.

SAAVEDRA, Ester *et al.* 6'-Benzyloxy-4-bromo-2'-hydroxychalcone is cytotoxic against human leukaemia cells and induces caspase-8- and reactive oxygen species-dependent apoptosis. **Chemico-biological Interactions**, [s.l.], v. 298, p. 137-145, jan. 2019.

SAITO, Y. *et al.* Synthesis and Structure–Activity Relationship Studies of Furan-ring Fused Chalcones as Antiproliferative Agents. **Anticancer Research**. v. 35, p. 811-818, nov. 2015.

SANTOS, Lorena. **Síntese, caracterização e avaliação do potencial biológico de Derivados obtidos a partir de chalconas**. Doutorado (Doutorado em Química) Programa de Pós graduação em Química da Universidade Federal de Santa Catarina. 2008.

SANTOS, Mariana Bastos *et al.* Antiproliferative activity and p53 upregulation effects of chalcones on human breast cancer cells. **Journal Of Enzyme Inhibition And Medicinal Chemistry**, [s.l.], v. 34, n. 1, p. 1093-1099, 1 jan. 2019.

SARAEI, Raedeh *et al.* Leukemia therapy by flavonoids: Future and involved mechanisms. **Journal Of Cellular Physiology**, [s.l.], v. 234, n. 6, p.8203-8220, 30 nov. 2018.

SEMAAN, Josiane *et al.* Resistance to 3-HTMC-Induced Apoptosis Through Activation of PI3K/Akt, MEK/ERK, and p38/COX-2/PGE2 Pathways in Human HT-29 and HCT116 Colorectal Cancer Cells. **Journal Of Cellular Biochemistry**, [s.l.], v. 117, n. 12, p.2875-2885, 26 maio 2016.

SHARMA, Nandini *et al.* Design, economical synthesis and antiplasmodial evaluation of vanillin derived allylated chalcones and their marked synergism with artemisinin against chloroquine resistant strains of Plasmodium falciparum. **European Journal Of Medicinal Chemistry**, [s.l.], v. 79, p.350-368, maio 2014.

SHEN, Kun-hung *et al.* Chalcone Arrests Cell Cycle Progression and Induces Apoptosis through Induction of Mitochondrial Pathway and Inhibition of Nuclear Factor Kappa B Signalling in Human Bladder Cancer Cells. **Basic & Clinical Pharmacology & Toxicology**, [s.l.], v. 101, n. 4, p. 254-261, out. 2007a.

SHEN, Tai-shan *et al.* Licochalcone A Suppresses the Proliferation of Osteosarcoma Cells through Autophagy and ATM-Chk2 Activation. **Molecules**, [s.l.], v. 24, n. 13, p. 2435-2447, 2 jul. 2019b.

SHIBAYAMA, Hirohiko *et al.* Phase I study of ibrutinib in Japanese patients with treatment-naïve chronic lymphocytic leukemia/small lymphocytic lymphoma. **Journal Of Clinical And Experimental Hematopathology**, [s.l.], v. 59, n. 4, p. 179-186, 2019.

SHIH, Tzenge-lien *et al.* Halo-Substituted Chalcones and Azachalcones Inhibited Lipopolysaccharide-Stimulated Pro-Inflammatory Responses through the TLR4-Mediated Pathway. **Molecules**, [s.l.], v. 23, n. 3, p.597-611, 7 mar. 2018.

SRINIVASAN, Balasubramanian *et al.* Structure–Activity Relationship Studies of Chalcone Leading to 3-Hydroxy-4,3',4',5'-tetramethoxychalcone and Its Analogues as Potent Nuclear Factor κ B Inhibitors and Their Anticancer Activities. **Journal Of Medicinal Chemistry**, [s.l.], v. 52, n. 22, p.7228-7235, 26 nov. 2009.

STOLL, Raphael *et al.* Chalcone Derivatives Antagonize Interactions between the Human Oncoprotein MDM2 and p53[†]. **Biochemistry**, [s.l.], v. 40, n. 2, p.336-344, jan. 2001.

SZLISZKA, Ewelina et al. Chalcones Enhance TRAIL-Induced Apoptosis in Prostate Cancer Cells. **International Journal Of Molecular Sciences**, [s.l.], v. 11, n. 1, p.1-13, 24 dez. 2009.

TAVARES, Luciana de Carvalho *et al.* Quinolinyl and quinolinyl N-oxide chalcones: Synthesis, antifungal and cytotoxic activities. **European Journal Of Medicinal Chemistry**, [s.l.], v. 46, n. 9, p.4448-4456, set. 2011.

TENG, Michele W.I. et al. From mice to humans: developments in cancer immunoediting. **Journal Of Clinical Investigation**, [s.l.], v. 125, n. 9, p.3338-3346, 4 ago. 2015.

TRIVEDI, Jalpa C. *et al.* Improved and rapid synthesis of new coumarinyl chalcone derivatives and their antiviral activity. **Tetrahedron Letters**, [s.l.], v. 48, n. 48, p.8472-8474, nov. 2007.

VALASTYAN, Scott; WEINBERG, Robert a.. Tumor Metastasis: Molecular Insights and Evolving Paradigms. **Cell**, [s.l.], v. 147, n. 2, p.275-292, out. 2011.

VEBER, Daniel F. et al. Molecular Properties That Influence the Oral Bioavailability of Drug Candidates. **Journal Of Medicinal Chemistry**, [s.l.], v. 45, n. 12, p.2615-2623, jun. 2002.

VICENTE-DUEÑAS, Carolina *et al.* Function of oncogenes in cancer development: a changing paradigm. **The Embo Journal**, [s.l.], v. 32, n. 11, p.1502-1513, 30 abr. 2013.

VOGELSTEIN, B. *et al.* Cancer Genome Landscapes. **Science**, [s.l.], v. 339, n. 6127, p.1546-1558, 28 mar. 2013.

WANG, L.-h. *et al.* SL4, a chalcone-based compound, induces apoptosis in human cancer cells by activation of the ROS/MAPK signalling pathway. **Cell Proliferation**, [s.l.], v. 48, n. 6, p. 718-728, 26 out. 2015a.

WANG, Zheng *et al.* Cardamonin exerts anti-gastric cancer activity via inhibiting LncRNA-PVT1-STAT3 axis. **Bioscience Reports**, [s.l.], v. 39, n. 5, p. 01-09, maio 2019b.

WEVER, Olivier de *et al.* Stromal myofibroblasts are drivers of invasive cancer growth. **International Journal Of Cancer**, [s.l.], v. 123, n. 10, p.2229-2238, 15 nov. 2008.

WIDICK, Page; WINER, Eric S. **Leukocytosis and Leukemia. Primary Care: Clinics in Office Practice**, [s.l.], v. 43, n. 4, p.575-587, dez. 2016.

WILSON, Rebecca M.; DANISHEFSKY, Samuel J. Applications of total synthesis toward the discovery of clinically useful anticancer agents. **Chemical Society Reviews**, [s.l.], v. 36, n. 8, p.1207-1226, 2007.

WORLD HEALTH ORGANIZATION. **Cancer**. Disponível em: <https://www.who.int/news-room/fact-sheets/detail/cancer>. Acesso em 05 set 2019.

WU, Peng; NIELSEN, Thomas E.; CLAUSEN, Mads H.. FDA-approved small-molecule kinase inhibitors. **Trends In Pharmacological Sciences**, [s.l.], v. 36, n. 7, p.422-439, jul. 2015.

YADAV, Neesha *et al.* Antimalarial Activity of Newly Synthesized Chalcone Derivatives In Vitro. **Chemical Biology & Drug Design**, [s.l.], v. 80, n. 2, p.340-347, 13 abr. 2012.

YADAV, Vivek R. *et al.* The role of chalcones in suppression of NF- κ B-mediated inflammation and cancer. **International Immunopharmacology**, [s.l.], v. 11, n. 3, p.295-309, mar. 2011.

YAMANAKA, Ryuya; HAYANO, Azusa. Secondary glioma following acute lymphocytic leukemia: therapeutic implications. : therapeutic implications. **Neurosurgical Review**, [s.l.], v. 40, n. 4, p. 549-557, 10 maio 2016.

YE, Chun-lin *et al.* Induction of apoptosis in K562 human leukemia cells by 2',4'-dihydroxy-6'-methoxy-3',5'-dimethylchalcone. **Leukemia Research**, [s.l.], v. 29, n. 8, p.887-892, ago. 2005.

YEUNG, Kay T.; YANG, Jing. Epithelial-mesenchymal transition in tumor metastasis. **Molecular Oncology**, [s.l.], v. 11, n. 1, p.28-39, 9 dez. 2016.

YUAN, Yao *et al.* Role of the tumor microenvironment in tumor progression and the clinical applications (Review). **Oncology Reports**, [s.l.], v. 35, n. 5, p.2499-2515, 2016a.

YUAN, Yinyin. Spatial Heterogeneity in the Tumor Microenvironment. **Cold Spring Harbor Perspectives In Medicine**, [s.l.], v. 6, n. 8, p.01-17, ago. 2016b.

ZEESHAN, Rabia; MUTAHIR, Zeeshan. Cancer metastasis - tricks of the trade. **Bosnian Journal Of Basic Medical Sciences**, [s.l.], p.172-182, 9 mar. 2017.

ZHU, Cuige *et al.* Synthesis and evaluation of anticancer activity of BOC26P, an ortho-aryl chalcone sodium phosphate as water-soluble prodrugs in vitro and in vivo. **Biomedicine & Pharmacotherapy**, [s.l.], v. 96, p.551-562, dez. 2017.

ZHUANG, Chunlin *et al.* Chalcone: a privileged structure in medicinal chemistry. : A Privileged Structure in Medicinal Chemistry. **Chemical Reviews**, [s.l.], v. 117, n. 12, p. 7762-7810, 10 maio 2017.

ANEXOS

PARECER CONSUBSTANCIADO DO CEP

DADOS DO PROJETO DE PESQUISA

Título da Pesquisa: AVALIAÇÃO IN VITRO DA ATIVIDADE ANTICÂNCER DE NOVOS DERIVADOS DE CHALCONAS FRENTE A DIFERENTES LINHAGENS TUMORAIS

Pesquisador: EDUARDO DAVI LIMA DA SILVA

Área Temática:

Versão: 1

CAAE: 16346419.0.0000.5208

Instituição Proponente: CENTRO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS

Patrocinador Principal: Financiamento Próprio

DADOS DO PARECER

Número do Parecer: 3.564.137

Apresentação do Projeto:

Trata-se do projeto de dissertação de mestrado de Eduardo Davi Lima da Silva a ser realizado sob a orientação da Profa Maira Galdino da Rocha Pitta e co-orientação da Profa Michelly Cristiny Pereira no Programa de Pós-graduação em Inovação Terapêutica. O trabalho traz consigo a importância de se identificar potenciais alvos que aumentem a gama de medicamentos utilizados para diferentes tipos de cânceres, fazendo com que haja diferentes formas de tratamento e assim melhore a qualidade de vida do paciente com câncer.

Objetivo da Pesquisa:

Avaliação da atividade anticâncer de novos derivados de chalconas frente a diferentes linhagens tumorais. Avaliar a citotoxicidade das chalconas em células não tumorais e em linhagens de tumores sólidos e hematopoiéticos

Avaliar se os derivados apresentam efeito no ciclo e morte celular de células de tumores sólidos e hematopoiéticos

Analisar se os derivados apresentam efeito inibitório na migração de células de tumores sólidos

Investigar o efeito destes derivados na inibição da proliferação de clones em células de tumores sólidos Investigar possíveis alvos das chalconas em vias da apoptose frente a células de tumores sólidos e hematopoiéticos.

Avaliação dos Riscos e Benefícios:

RISCOS: A coleta de sangue pode ser desconfortável e o braço pode ficar um pouco dolorido e apresentar um pequeno hematoma, que é uma área arroxeadada no local da coleta. Antes de iniciar a coleta, nós limparemos o braço com álcool, e todo material usado na coleta é descartável. A coleta será feita por profissionais treinados e competentes e orientados para reduzir os riscos. Caso ocorra a formação do hematoma, será aplicada compressa gelada para reduzir a vermelhidão.

• **BENEFÍCIOS:** Os benefícios da pesquisa não são individuais. Toda e qualquer descoberta e desenvolvimento de princípios ativos com atividade anticâncer, devem beneficiar a sociedade com essa importante descoberta. Os resultados obtidos poderão propiciar avanços para terapia anticâncer e assim fornecer mais uma alternativa capaz de apresentar menos efeitos colaterais ao paciente em tratamento.

Comentários e Considerações sobre a Pesquisa:

Os dados da pesquisa serão coletados no Laboratório de Imunomodulação e Novas Abordagens Terapêuticas, localizado na Universidade Federal de Pernambuco, prédio da DINE - Av. Jornalista Aníbal Fernandes - Cidade Universitária - Recife - PE, 50740-540. Para a realização do estudo com a amostra biológica (sangue) dos voluntários sadios, espera-se coletar cerca de 16ml de sangue – 1 colher das de sopa – por punção de veia do braço. A realização desse procedimento será feito por um biomédico qualificado. Com isso, para que o resultado venha a ser estatisticamente significativo, terá que ser coletado o sangue de cerca de 15 voluntários sadios. Os voluntários do estudo, receberão o Termo de Consentimento Livre e Esclarecido e terão uma breve conversa com o pesquisador responsável no propósito de esclarecer de forma rápida o procedimento para a coleta. O voluntário irá decidir por sua adesão a coleta ou não e em seguida a coleta será realizada nos voluntários que assim optaram por participar do estudo com posterior assinatura do Termo. Os dados coletados nesta pesquisa, o que inclui as viabilidades celulares e doses respostas, ficarão devidamente armazenados em arquivos digitais em computadores ou impressos em pastas de arquivos, sob a responsabilidade do pesquisador Eduardo Davi Lima da Silva, localizado no endereço Rua Oscar Steiner, nº 24 – CEP: 54789205, Aldeia – Camaragibe, – PE, por um período mínimo 5 anos.

Considerações sobre os Termos de apresentação obrigatória:

Folha de rosto, carta de anuência, termo de compromisso e confidencialidade e termo de consentimento livre e esclarecido estão de acordo com o preconizado

Recomendações:

Recomenda-se excluir o ter voluntário e inserir o termo participante de pesquisa - indivíduo que, de forma esclarecida e voluntária, ou sob o esclarecimento e autorização de seu(s) responsável(is) legal(is), aceita ser pesquisado. A participação deve se dar de forma gratuita, ressalvadas as pesquisas clínicas de Fase I ou de bioequivalência (Resolução CNS 466 de 12 de dezembro de 2012);

Conclusões ou Pendências e Lista de Inadequações:

Somos de parecer favorável à aprovação do projeto.

Considerações Finais a critério do CEP:

O Protocolo foi avaliado na reunião do CEP e está APROVADO para iniciar a coleta de dados. Informamos que a APROVAÇÃO DEFINITIVA do projeto só será dada após o envio da Notificação com o Relatório Final da pesquisa. O pesquisador deverá fazer o download do modelo de Relatório Final para enviá-lo via “Notificação”, pela Plataforma Brasil. Siga as instruções do link “Para enviar Relatório Final”, disponível no site do CEP/UFPE. Após apreciação desse relatório, o CEP emitirá novo Parecer Consubstanciado definitivo pelo sistema Plataforma Brasil.

Informamos, ainda, que o (a) pesquisador (a) deve desenvolver a pesquisa conforme delineada neste protocolo aprovado, exceto quando perceber risco ou dano não previsto ao voluntário participante (item V.3., da Resolução CNS/MS N° 466/12).

Eventuais modificações nesta pesquisa devem ser solicitadas através de EMENDA ao projeto, identificando a parte do protocolo a ser modificada e suas justificativas.

Para projetos com mais de um ano de execução, é obrigatório que o pesquisador responsável pelo Protocolo de Pesquisa apresente a este Comitê de Ética, relatórios parciais das atividades desenvolvidas no período de 12 meses a contar da data de sua aprovação (item X.1.3.b., da Resolução CNS/MS N° 466/12). O CEP/UFPE deve ser informado de todos os efeitos adversos ou fatos relevantes que alterem o curso normal do estudo (item V.5., da Resolução CNS/MS N° 466/12). É papel do/a pesquisador/a assegurar todas as medidas imediatas e adequadas frente a evento adverso grave ocorrido (mesmo que tenha sido em outro centro) e ainda, enviar notificação à ANVISA – Agência Nacional de Vigilância Sanitária, junto com seu posicionamento.

Tipo Documento	Arquivo	Postagem	Autor	Situação
Informações Básicas do Projeto	PB_INFORMAÇÕES_BÁSICAS_DO_PROJETO_1284495.pdf	27/06/2019 10:29:21		Aceito
Outros	Comprovante_vinculo.docx	27/06/2019 10:26:12	EDUARDO DAVI LIMA DA SILVA	Aceito
Projeto Detalhado / Brochura Investigador	ModelodeProjetoparaoCEP.docx	26/06/2019 19:46:59	EDUARDO DAVI LIMA DA SILVA	Aceito
Outros	CartaAnuencia.doc	26/06/2019 19:39:46	EDUARDO DAVI LIMA DA SILVA	Aceito
Folha de Rosto	FolhadeRosto.pdf	19/06/2019 00:33:45	EDUARDO DAVI LIMA DA SILVA	Aceito
Outros	TermodeConfidencialidade.pdf	17/06/2019 22:31:44	EDUARDO DAVI LIMA DA SILVA	Aceito
Outros	CurriculoTaniaMariBelleBresolin.pdf	31/05/2019 00:44:45	EDUARDO DAVI LIMA DA SILVA	Aceito
Outros	CurriculoRogerioCorrea.pdf	31/05/2019 00:43:37	EDUARDO DAVI LIMA DA SILVA	Aceito
Outros	CurriculoMichellyCristinyPereira.pdf	31/05/2019 00:43:18	EDUARDO DAVI LIMA DA SILVA	Aceito
Outros	CurriculoMairaGaldinodaRochaPitta.pdf	31/05/2019 00:43:00	EDUARDO DAVI LIMA DA SILVA	Aceito
Outros	CurriculoEduardoDaviLimadaSilva.pdf	31/05/2019 00:42:42	EDUARDO DAVI LIMA DA SILVA	Aceito
Outros	CurriculoDanyelaFrancineBenvenuti.pdf	31/05/2019 00:41:20	EDUARDO DAVI LIMA DA SILVA	Aceito
Outros	CurriculoDanieleReginaSonza.pdf	31/05/2019 00:40:51	EDUARDO DAVI LIMA DA SILVA	Aceito
TCLE / Termos de Assentimento / Justificativa de Ausência	TCLEMaiores18.doc	31/05/2019 00:34:19	EDUARDO DAVI LIMA DA SILVA	Aceito

Situação do Parecer:

Aprovado

Necessita Apreciação da CONEP:

Não

RECIFE, 10 de Setembro de 2019

Assinado por:
LUCIANO TAVARES MONTENEGRO
(Coordenador(a))

Tabela 05 - Efeito dos derivados M7, F10 e citarabina (0,03 μ M) no ciclo celular das células HL-60 após 48 horas de tratamento. (A) e (E) Células não tratadas, (B) células tratadas com 0,03 μ M da citarabina, (F) células tratadas com 0,07 μ M da gemcitabina (C) e (G) células tratadas com CI₅₀ do derivado F8 e (D) e (H) células tratadas com CI₅₀ do derivado F9. *P < 0.05; **P < 0.01, em relação aos dados da condição não tratado (NT).

HL-60	NT	CITARABINA	M7	F10
				**
Sub-G0	3,36 \pm 0,15	10,2 \pm 2,09	7,63 \pm 1,95	24,19 \pm 10,15
G0-G1	64,1 \pm 5,02	80,56 \pm 1,46	75,2 \pm 6,91	56,16 \pm 8,58
			*	**
S-G2-M	31,1 \pm 4,59	7,8 \pm 1,9	15,76 \pm 5,25	18,07 \pm 6,04

Fonte: Autor, (2020)