

UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ

CAMILA SILVA TAMIELLO

EFEITOS DA 3-NITROCHALCONA

SOBRE CÉLULAS DE HEPATOMA HUMANO (HepG2)

CURITIBA

2013

CAMILA SILVA TAMIELLO

**EFEITOS DA 3-NITROCHALCONA
SOBRE CÉLULAS DE HEPATOMA HUMANO (HepG2)**

Dissertação de mestrado apresentado ao Colegiado do Curso de Pós-Graduação em Ciências-Bioquímica do Setor de Ciências Biológicas da Universidade Federal do Paraná.
Orientação: Profa. Dra. Maria Eliane Merlin Rocha
Co-Orientação: Profa. Dra. Sheila Maria. B. Winnischofer.

CURITIBA

2013

TERMO DE APROVAÇÃO



EFEITOS DA 3-NITROCHALCONA SOBRE CÉLULAS DE HEPATOMA HUMANO (HEPG2).

Dissertação aprovada como requisito parcial para a obtenção do título de Mestre em Ciências-Bioquímica, no Programa de Pós-Graduação em Ciências – Bioquímica, Setor de Ciências Biológicas da Universidade Federal do Paraná, pela seguinte banca Examinadora:

Maria Eliane Merlin Rocha

Prof^a. Dr^a. Maria Eliane Merlin Rocha (Orientadora)
Departamento de Bioquímica e Biologia Molecular – UFPR

Gláucia Regina Martinez

Prof^a. Dr^a. Gláucia Regina Martinez
Departamento de Bioquímica e Biologia Molecular – UFPR

Adriana F. Mercadante

Profa. Dra. Adriana Frohlich Mercadante
Departamento de Patologia Básica – UFPR

Curitiba, Fevereiro de 2013.

AGRADECIMENTOS

É difícil colocar em palavras todo o sentimento que dedico aqueles aos quais agradeço neste trabalho.

Agradeço a Deus pela minha vida, saúde e por iluminar meus pensamentos;

A minha família: pai Waldir, mãe Lara, irmão Felipe, irmã Ana Beatriz e avós Giuseppina, Isildo e Domingos pelo carinho, compreensão, por sempre estar comigo, mesmo a distância, pelo apoio e incentivo para continuar estudando e por me dar a chance de tornar meus objetivos realidade.

Ao meu namorado Alexandre pelo carinho, compreensão e apoio durante todo esse período.

A família do meu namorado, principalmente aos pais: Carlos e Ana pelo carinho, apoio e interesse pelo meu trabalho.

A minha orientadora Dra. Maria Eliane Merlin Rocha pela chance de realizar este trabalho e pela ajuda para concluí-lo, por estar sempre disponível para ensinar e discutir resultados, pela compreensão em situações difíceis, pelo apoio e preocupação com todos no laboratório.

A minha co-orientadora Dra. Sheila Maria B. Winnischofer por estar sempre disponível quando precisei de ajuda para interpretar e discutir resultados, por trazer novas idéias, por todas as nossas conversas, por ser uma pessoa justa e maravilhosa com todos.

Ao programa de Pós-graduação em Bioquímica da UFPR.

A CAPES, CNPq e Fundação Araucária pelo auxílio financeiro.

As professoras do laboratório Dra. Silvia M. S. C. Cadena, Dra. Gulhermina R. Noletto e Dra. Glauca R. Martinez, por acompanhar o trabalho nas reuniões de grupo e seminário de tese trazendo sugestões.

Ao Dr. Alfredo R. M. de Oliveira por sintetizar e ceder o composto para a realização deste trabalho.

A Dra. Mari Cleide Sogayar por ceder as células para os experimentos.

Aos amigos Glaucio Valdameri, Carina T. Scoparo, Cristiane R. Zuconelli por fazerem parte deste trabalho e por toda a ajuda na realização de experimentos, discussões e protocolos emprestados.

Aos demais amigos da pós-graduação e dos laboratórios de Oxidações Biológicas e Cultivo Celular, em especial: Amanda do Rocio, Thiago

Jacomasso, Gustavo Guzi e Monique M. Cunha pela ajuda em muitos momentos.

Aos funcionários do Departamento de Bioquímica e Biologia Molecular – UFPR.

As minhas amigas e família de coração: Anna Paula Brandt e Rafaella Stradiotto Bernadelli pelo carinho e compreensão.

A banca avaliadora: Dra. Adriana Frohlich Mercadante e Dra. Glaucia Regina Martinez.

A todos meus amigos do departamento e de fora que, de alguma forma, contribuíram nesta jornada.

RESUMO

O carcinoma hepatocelular é a 5^a neoplasia mais comum e a 3^a principal causa de morte relacionada ao câncer no mundo. Os tratamentos convencionais apresentam baixas taxas de respostas e causam muitos efeitos colaterais e por estes motivos procuram-se drogas mais eficazes. Os flavonóides são compostos polifenólicos que apresentam promissora atividade antitumoral, dentre eles encontramos a classe das chalconas. Algumas chalconas já foram descritas por induzirem apoptose em diferentes linhagens celulares, entretanto ainda não são conhecidos efeitos das nitrochalconas sobre células de carcinoma hepatocelular humano (HepG2). Neste trabalho foi utilizada a 3-nitrochalcona, uma chalcona sintética e seus efeitos foram testados sobre a viabilidade de células HepG2, progressão do ciclo e análise de morte celular, produção de espécies reativas de oxigênio (EROs) e viabilidade celular na presença da N-acetilcisteína (NAC), expressão e atividade de enzimas antioxidantes. Através do método do MTT verificou-se que a 3-nitrochalcona é capaz de reduzir a viabilidade de células HepG2 de maneira dependente da dose e do tempo de exposição, observando-se uma redução de 9%, 22% e 44% nas doses de 10, 15 e 20 μM , respectivamente após 24 horas de tratamento. Nas doses de 7,5, 10, 15 e 20 μM , após 48h de tratamento a redução da viabilidade foi de 10%, 16%, 49% e 55% e após 72 horas de 25%, 47%, 88% e 94%, respectivamente. Nas análises de ciclo celular, após o tratamento das células HepG2 com a 3-nitrochalcona nas doses de 10 e 15 μM por 48h, observou-se o aumento 28% e 48% de células em SubG1, respectivamente. No experimento com Anexina-V e Iodeto de Propídeo para se avaliar o tipo de morte celular observou-se que a 3-nitrochalcona (15 e 20 μM , 48h) levou ao aumento de 19% e 28%, respectivamente, da população de células em apoptose. Para avaliar os níveis de EROs, utilizou-se a sonda DCFH-DA e foi observado que a 3-nitrochalcona (20 μM , 48h) levou ao aumento de cerca de 200% na geração de EROs. O aumento de EROs pode estar relacionado com a indução da morte celular por estresse oxidativo. Foi realizada a viabilidade celular com a pré-incubação com NAC e observou-se que o tratamento somente com a chalcona (15 e 20 μM , 48h) causou redução de 51% e 59%, respectivamente, na viabilidade celular, porém com a pré-incubação das células HepG2 com 5 e 10 mM de NAC observou-se redução de 47% e 27% na viabilidade celular na dose de 15 μM da 3-nitrochalcona e 48% e 15% na dose de 20 μM , respectivamente, indicando que a adição de NAC protegeu as células contra os efeitos citotóxicos da 3-nitrochalcona. Para avaliar se o aumento nos níveis de EROs estaria sendo causado pela diminuição da expressão e atividade de enzimas antioxidantes foi avaliada a expressão de mRNA das enzimas CAT, SOD e GPx realizando-se o tratamento das células nas doses de 15 e 20 μM do flavonóide por 48 horas e pode-se observar uma diminuição da expressão de mRNA da catalase em 68% e 41%, respectivamente, não sendo observada alteração na expressão das enzimas SOD e GPx. Nas mesmas condições houve redução de 22% e 18% da atividade da CAT. Os resultados obtidos sugerem que 3-nitrochalcona promove indução da morte de células HepG2 por apoptose, cujo o mecanismo pode envolver o aumento de EROs, em especial do H_2O_2 resultante da diminuição da expressão e da atividade da catalase. A 3-nitrochalcona possui efeitos biológicos importantes que poderão futuramente ser utilizados em estudos para o tratamento do hepatocarcinoma.

Palavras-chave: HepG2, 3-nitrochalcona, EROs, NAC.

ABSTRACT

The hepatocellular carcinoma is the fifth most common cancer and the third leading cause of cancer related deaths in the world. The conventional treatments have low rates of efficacy and many cause side effects, in this proposal there is a need to look up for more effective drugs. A promising class of polyphenolic compounds that present antitumor activity are the chalcones, a classe of flavonoids. These compounds have been described to induce apoptosis in different cell lines, however the effects of nitrochalcones on human hepatocellular carcinoma cells (HepG2) are still unknown. In the present work it was synthesized the 3-nitrochalcone and it was tested its cytotoxic effects in HepG2 cells through analysis of cell viability, cell cycle analysis, type of cell death, levels of reactive oxygen species (ROS), cell viability with n-acetylcysteine and the activity and expression of antioxidant enzymes. In the cell viability by MTT assay, it was demonstrated that within 24 hours of treatment with this compound there was a reduction in cell viability of 9%, 22% and 44% at doses of 10, 15 and 20 μM respectively. Within 48h it was observed the reduction of 10%, 16%, 49% e 55% at the doses of 7,5, 10, 15 and 20 μM and in 72 h of treatment the reduction on cell viability was 25%, 47%, 88% and 94% at the doses of 7,5, 10, 15 and 20 μM , respectively. With the cell cycle analysis we observed after 48 hours of exposure an increase of 28% and 48% in the population of cells in SubG1 and a decrease of cell population in the other cycle fases. Then it was observed the type of cell death by using Annexin-V and Propidium Iodide and it was observed within 48 h of treatment an increase of 19% and 28% of cells in apoptosis at the doses of 15 and 20 μM , respectively. To assess the levels of reactive oxygen species (ROS) production it was used the DCFH-DA probe and after treatment with 3-nitrochalcone (20 μM) for 48h it was observed an increase of 209% in ROS levels. The increase of ROS levels can lead cells to oxidative stress and apoptosis. To assess whereas the increase in ROS generation could cause cell death it was used NAC (preincubation with 5 and 10 mM for 2 hours). Without the preincubation with NAC the decrease in cell viability was 51% and 59% in the doses at 15 and 20 μM (48h). With the preincubation with NAC (5 and 10 mM) and than the incubation with 15 μM of chalcone the decrease in cell viability was 47% and 27%, respectively and 48% and 15% at the dose of 20 μM , respectively. These results shows that NAC protected cells against the effects of 3-nitrochalcone. To investigate if ROS levels were being affected by the decrease in antioxidant enzymes expression and activity, it was evaluated the CAT, SOD and GPx mRNA expression and the results showed a decrease of 68% and 41% in CAT mRNA expression at the doses of 15 and 20 μM (48h). It was not observed a decrease in SOD and GPx expressions. At the same conditions it was observed the reduction of 22% and 18% in CAT activity. Analyzing these results, it's proposed that 3-nitrochalcone has relevant promising biological effects that can be used in further studies for the treatment of hepatocarcinoma.

Key words: HepG2, 3-nitrochalcone, ROS, NAC.

LISTA DE FIGURAS

FIGURA - 1: REAÇÃO DE FENTON.....	21
FIGURA - 2: BIOSÍNTESE DA GLUTATIONA: A) REAÇÃO DA γ -GLUTAMIL CISTEÍNA LIGASE E B) REAÇÃO DA GSH SINTASE.....	22
FIGURA - 3: REAÇÃO ENZIMÁTICA DA GLUTATIONA PEROXIDASE (GPX) NA DETOXIFICAÇÃO DE HIDROPERÓXIDOS E REAÇÃO ENZIMÁTICA DA GLUTATIONA REDUTASE(GRED) NA RECICLAGEM DE GSH.....	22
FIGURA - 4: ESQUEMA GERAL PARA A INDUÇÃO DA EXPRESSÃO DE GENES DE ENZIMAS ANTIOXIDANTES ATRAVÉS DA VIA DE SINALIZAÇÃO Keap1-Nrf2.....	24
FIGURA - 5: VIA EXTRÍNSECA E INTRÍNSECA DA APOPTOSE.....	27
FIGURA - 6: A) ESTRUTURA BÁSICA DOS FLAVONÓIDES SEM ANEL C. B) ESTRUTURA BÁSICA DOS FLAVONÓIDES COM ANEL C.....	29
FIGURA - 7: ESTRUTURA BÁSICA DAS CHALCONAS.....	30
FIGURA - 8: CHALCONAS NA INIBIÇÃO DA PROGRESSÃO DO CICLO CELULAR.....	32
FIGURA - 9: ESTRUTURA DA 3-NITROCHALCONA.....	38
FIGURA - 10: FLUXOGRAMA EXPERIMENTAL.....	40
FIGURA - 11: REAÇÃO DA CATALASE.....	50
FIGURA - 12: EFEITOS DA 3-NITROCHALCONA SOBRE A VIABILIDADE DE CÉLULAS HepG2 NOS TEMPOS DE 24, 48 E 72 HORAS UTILIZANDO O MÉTODO DO MTT.....	52
FIGURA - 13: EFEITO DA 3-NITROCHALCONA SOBRE A VIABILIDADE DE CÉLULAS HepG2 NO TEMPO DE 48 HORAS UTILIZANDO O MÉTODO DO CRISTAL VIOLETA.....	53
FIGURA - 14: EFEITOS DA 3-NITROCHALCONA SOBRE AS FASES DO CICLO CELULAR EM CÉLULAS HepG2.....	55
FIGURA - 15: EFEITOS DA 3-NITROCHALCONA SOBRE A MORTE CELULAR.....	57
FIGURA - 16: EFEITO DA 3-NITROCHALCONA SOBRE OS NÍVEIS INTRACELULARES DE EROs EM CÉLULAS HepG2 NOS TEMPO DE 48H.....	60

FIGURA - 17: EFEITO DA 3-NITROCHALCONA E NAC SOBRE A VIABILIDADE DE CÉLULAS HepG2 APÓS DE 24 HORAS DE TRATAMENTO.....	62
FIGURA - 18: A) EFEITOS DA 3-NITROCHALCONA NOS DE EXPRESSÃO DE mRNA DA CATALASE, MnSOD E GPX. B) ATIVIDADE DA CATALASE.....	65

LISTA DE TABELAS

TABELA 1 - SEQÜÊNCIAS NUCLEOTÍDICAS DOS PRIMERS UTILIZADOS PARA RT- PCR QUANTITATIVO EM TEMPO REAL.....	49
--	----

LISTA DE ABREVIATURAS, SÍMBOLOS, SIGLAS E TERMOS

SFB – Soro Fetal Bovino

DMSO – Dimetilsulfóxido

CHC – Carcinoma Hepatocelular

GPx - Glutathione peroxidase

Gred - Glutathione reductase

GSH - Glutathione reduzida

GCL - Glutathione S-transferase

GSSG - Glutathione oxidada

CAT - Catalase

SOD - Superóxido dismutase

H₂O₂ - Peróxido de hidrogênio

cDNA – DNA complementar

DCFDA – 2',7'-Dichlorodihidrofluoresceína diacetato

EROs – Espécies reativas de oxigênio

MTT - Brometo de [3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difeniltetrazólio]

Nrf2 - fator nuclear eritróide 2

Keap1 - ECH Kelch associando proteína 1

ERA – Elemento de resposta antioxidante

PBS – Tampão fosfato-salino

VHB – Vírus da hepatite B

VHC – Vírus da hepatite C

mRNA – RNA mensageiro

BSA - Albumina bovina sérica

O₂^{•-} - Radical superóxido

TRIS - Tris (hidroximetil) amino metano

NAC - N-acetilcisteína

NADH - Nicotinamida adenina dinucleotideo reduzida

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	14
2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA.....	17
2.1 CARCINOMA HEPATOCELULAR	17
2.2 ALVOS CELULARES DE COMPOSTOS ANTITUMORAIS	19
2.2.1 Ciclo Celular.....	19
2.2.2 Radicais Livres e Defesas Antioxidantes	21
2.3 MORTE CELULAR.....	25
2.3.1 Tipos de morte celular	25
2.3.2 As vias de regulação da apoptose	26
2.4 FLAVONÓIDES	28
2.4.1 Chalconas	30
2.4.2 Chalconas e a via Keap 1/ Nrf2.....	35
2.4.3 Relação estrutura – atividade.....	37
3. OBJETIVOS.....	40
4. ESTRATÉGIA EXPERIMENTAL	41
5. MATERIAIS E MÉTODOS	42
5.1 REAGENTES	42
5.2 PREPARO DA 3-NITROCHALCONA.....	42
5.3 CÉLULAS	42
5.4 ESTERILIZAÇÃO DE MATERIAIS	43
5.5 SOLUÇÕES E MEIOS DE CULTURA	43
5.5.1 Solução Salina Tamponada (PBS).....	43
5.5.2 Meio de Cultura	43
5.5.3 Solução de Tripsina-EDTA	44
5.5.4 Solução de iodeto de propídeo (PI)	44
5.5.5 Solução tampão de ligação Anexina V- FITC.....	44
5.6 PROCEDIMENTOS DE CULTIVO.....	44
5.7 ENSAIOS EM CÉLULAS	45
5.7.1 Viabilidade de células HepG2 verificados pelo método do MTT	45
5.7.2 Efeitos da 3-nitrochalcona na viabilidade de células HepG2 verificados pelo método do Cristal Violeta.....	45
5.7.3 Análise do Ciclo Celular	46
5.7.4 Análise de morte celular	47
5.7.5 Níveis de ERO Intracelular.....	47
5.7.6 Viabilidade celular com N-acetilcisteína (NAC).....	48
5.7.7 Avaliação da expressão das enzimas antioxidantes.....	48
5.7.8 Determinação da atividade da catalase	50
5.7.9 Determinação da dosagem de proteínas	51
5.7.10 Análise Estatística	51
6. RESULTADOS E DISCUSSÕES.....	52
6.1 EFEITOS DA 3-NITROCHALCONA NA VIABILIDADE DE CÉLULAS DE CARCINOMA HEPATOCELULAR (HepG2).	52
6.1.1 Efeitos da 3-nitrochalcona sobre a viabilidade de células HepG2 verificados pelo método do MTT.....	52
6.1.2 Efeitos da 3-nitrochalcona sobre a viabilidade de células HepG2 verificados pelo ensaio do Cristal Violeta.....	53
6.2 Análise do Ciclo Celular.....	55
6.3 Análise da Morte Celular.....	57
6.4 Avaliação dos níveis intracelulares de EROs	60

6.5 Viabilidade celular na presença de N-acetilcisteína (NAC).....	62
6.6 Níveis de expressão de mRNA das enzimas antioxidantes e atividade da catalase	64
7. DISCUSSÃO FINAL	67
8. CONCLUSÕES.....	70
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	71

1. INTRODUÇÃO

O carcinoma hepatocelular (CHC) é o tumor maligno hepático mais comum e normalmente é de origem primária. No Brasil, no ano de 2010 foi responsável por 7.720 mortes (INCA, 2012). No mundo ele é responsável por mais de 500 mil novos casos de câncer por ano (INCA, 2012; Abdel-Hamid *et al.*, 2011). O HCC está entre as neoplasias consideradas mais agressivas e com prognóstico muito ruim por ser normalmente detectada já num estágio intermediário ou avançado. Essa neoplasia afeta um número maior de homens do que mulheres e está também relacionada à área geográfica sendo muito incidente na Ásia e na África subsaariana (TAN *et al.*, 2011; BOSCH *et al.*, 2004; ACS, 2013).

Os fatores de risco mais comuns que podem levar ao hepatocarcinoma são as infecções crônicas pelos vírus das hepatites B e C. A hepatite C é a mais preocupante devido à falta de vacinas e ao aumento do número de pessoas que desenvolvem seu quadro crônico. A cirrose hepática é responsável pela metade dos casos de CHC e é causada principalmente pelas hepatites e pelo consumo abusivo de álcool. Além desses fatores de risco encontram-se outros como: a obesidade, diabetes melitus tipo 2, doenças metabólicas hereditárias, aflatoxinas, uso de esteróides anabolizantes, entre outros (SVS, 2009; INCA, 2012; ACS, 2013). No Brasil, a região sul do Brasil está entre as regiões com maior número de casos de hepatite B e C notificados (WHO, 2013; SVS, 2012).

Os tratamentos para esta neoplasia estão divididos entre curativos e paliativos e hoje a droga quimioterápica mais utilizada é a Doxorubicina. Os tratamentos para o carcinoma hepatocelular além de apresentarem baixas taxas de resposta, aproximadamente 10%, também causam muitos efeitos colaterais como náuseas, vômitos, alopecia, mucosite, ulcerações, anorexia, diarreia, entre outros (NOVIELLO, *et al.*, 1994; HE, *et al.*, 2011; GISH *et al.*, 2010). Devido a estes fatos, atualmente procuram-se terapias mais eficazes para o tratamento do hepatocarcinoma e que apresentem menos efeitos colaterais. Na busca por novos medicamentos, os fitoterápicos têm sido cada vez mais estudados devido às suas inúmeras atividades biológicas, dentre elas, a antineoplásica (CRAGG *et al.*, 2000; OZEKI; NATORI, 2010) . Os

flavonóides fazem parte deste grupo de compostos e são na sua maioria polifenóis encontrados em muitos vegetais e possuem diversas atividades biológicas já descritas como a antineoplásica, antioxidante, antiinflamatória, entre outras (SZLISZKA *et al.*, 2010; KANDASWAMI *et al.*, 2005; NOWAKOWSKA *et al.*, 2007). Os flavonóides são divididos em classes de acordo com a sua estrutura (HARBONE; WILLIAMS, 1992; CERQUEIRA *et al.*, 2007; GUZZO, 2007). Dentre as diversas classes de flavonóides estão as chalconas, encontradas em diversos vegetais, sendo abundantes em frutas cítricas e maçãs, em outros vegetais como tomate batata, licorice e losna. As chalconas são precursoras para síntese de outros flavonóides e podem ser obtidas sinteticamente (ORLIKOVA, *et al.*, 2011; HSU, *et al.*, 2004). Hoje são conhecidos inúmeros efeitos biológicos de chalconas naturais e seus derivados sintéticos como: pró e antioxidante, antibacteriano, antiinflamatório, antileishmanicida, antiulcerativo, antifúngico, hipolipidêmico, entre outros (KANDASWAMI *et al.*, 2005; ECHEVERRIA *et al.*, 2009; KIM *et al.*, 2001; KROMANN *et al.*, 2004; BATOVSKA, 2009; HERENCIA *et al.*, 2002; KOLBE, 2006; NOWAKOWSKA, 2007; BOECK, *et al.*, 2006; GUZZI *et al.*, 2010; ZHANG *et al.*, 1997; KOSHY; VIJAYALAKSHMI, 2001; COOK; SAMMAN, 2004; DAMAZZIO *et al.*, 2009). São descritos na literatura também os efeitos de chalconas com diferentes substituintes em várias linhagens celulares como HepG2 (hepatocarcinoma), HCT116 (câncer de cólon), MCF7 (câncer de mama), K562 (leucemia), B16-F10 (melanoma), IMR-32 (neuroblastoma) (KUO *et al.*, 2010; HSU *et al.*, 2010; MOON *et al.*, 2010; ROMAGNOLI *et al.*, 2010; NAVARINI, 2009; MONTANI *et al.*, 2008). Recentemente foram descritos efeitos hipoglicemiantes de nitrochalconas substituídas em ratos hiperglicêmicos (ALBERTON *et al.*, 2008; DAMAZIO *et al.*, 2009; CHIRARDIA *et al.*, 2009) e de aumento da captação de glicose em células adiposas (3T3-L1) (KAMEI *et al.*, 2003), entretanto, até o momento não foram descritos efeitos de chalconas contendo somente grupamentos nitro na sua estrutura em linhagens de células tumorais, em especial, sobre células de carcinoma hepatocelular. Dessa maneira, observando-se a necessidade de desenvolver estudos para busca de novos compostos que sejam mais eficazes para o tratamento do carcinoma hepatocelular e a deficiência de dados descritos na literatura sobre efeitos antitumorais das nitrochalconas, neste trabalho foram

avaliados os efeitos da 3-nitrochalcona, uma chalcona sintética, sobre células HepG2.

2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2.1 CARCINOMA HEPATOCELULAR

As neoplasias são a segunda causa de morte no mundo. O carcinoma hepatocelular (CHC) é a quinta neoplasia mais comum e a terceira principal causa de morte relacionada a câncer no mundo (THOPPIL; BISHAYEE, 2011). No Brasil em 2010 o número de mortes ocasionadas pelo CHC foi 7.720, sendo 4.409 homens e 3.311 mulheres. No mundo ele é responsável por mais de 500 mil novos casos de câncer por ano (INCA, 2012; Abdel-Hamid *et al.*, 2011).

Os tumores hepáticos podem ser divididos em dois tipos, primários (origina-se no próprio órgão) e secundários (células tumorais que atingem o fígado através do processo de metástase). O tumor hepático mais agressivo hoje é o hepatocarcinoma celular (CHC) de origem primária (INCA 2012).

Os fatores de risco mais citados para CHC são: etnia racial, sexo, infecção crônica pelo vírus da hepatite B (HBV) e da hepatite C (HCV), cirrose hepática, tabagismo, alcoolismo, obesidade, diabetes melitus tipo 2, exposição à aflatoxina e uso de esteróides anabolizantes (ACS, 2012; INCA, 2012; SHERMAN *et al.*, 2011; CONTE, 2000).

Juntos, os vírus das hepatites são responsáveis por 78% dos casos de CHC no mundo todo. No Brasil, a estimativa de portadores de hepatite B é de 600 mil pessoas e de hepatite C é de 1,5 milhões de pessoas e a região sul está entre as duas regiões com maior número de casos notificados. Para o HBV (vírus da hepatite B) existem vacinas desde 1982, já para o HCV (vírus da hepatite C) não existem vacinas disponíveis. (WHO, 2013; SVS, 2012). A hepatite C é transmitida principalmente através do contato percutâneo de objetos contaminados como agulhas, seringas, alicates de unha entre outros, mas também pode ser transmitida sexualmente e de forma vertical (da mãe para o filho). A diferença dela para as hepatites A e B é que, além de ainda não existir vacina para a hepatite C ela é responsável por 70% das hepatites crônicas, 40% dos casos de cirrose hepática em fase terminal e 60% dos casos de hepatocarcinoma, sendo a maior responsável pelos casos de transplantes hepáticos no mundo (SVS, 2011). A cirrose hepática é apontada como o principal fator de risco para o desenvolvimento do CHC, sendo responsável por

metade dos casos e, por sua vez, está associado também ao alcoolismo e a hepatite crônica (RAOUL, 2008; INCA, 2013).

O prognóstico para pacientes com CHC geralmente é ruim e requer alta complexidade no seu diagnóstico. O hepatocarcinoma é uma neoplasia de evolução muito rápida. O tempo de duplicação do tamanho do tumor é de aproximadamente quatro meses e, devido a este fato, na maioria dos casos diagnosticados os tumores já se encontram em estágios intermediários ou avançados. Existem alguns exames que auxiliam na confirmação do diagnóstico, como a Tomografia computadorizada, a Ressonância Nuclear Magnética (RNM) e a Laparoscopia (TAN *et al.*, 2011; INCA, 2013).

Os tratamentos são divididos entre curativos e paliativos. Dentre eles encontram-se o transplante hepático, hepatectomia parcial, ablação por radiofrequência, quimioembolização, crioterapia, quimioterapia e radioterapia. A radioterapia tornou-se um tratamento apenas paliativo devido à baixa tolerância do parênquima hepático à radiação necessária para que a radioterapia seja considerada um tratamento efetivo (LLOVET *et al.*, 2008; ARII, 2000). A cirurgia e a quimioterapia são os tratamentos mais indicados para a maioria dos casos (INCA, 2013). A droga hoje mais utilizada como quimioterápico para o tratamento de tumores hepáticos primários é Doxorubicina e, no entanto, sua taxa de resposta é de aproximadamente 10% (HE *et al.*, 2011). Entre os efeitos colaterais provocados por ela temos: mielossupressão, cardiotoxicidade, neurotoxicidade, náuseas, vômito, diarreia, mucosite, dor epigástrica, alopecia, hiperpigmentação cutânea e hiperuricemia (SOUZA *et al.*, 2000).

Desta forma, os tratamentos atuais são restritos para esse tipo de neoplasia, além de apresentarem uma baixa porcentagem de resposta e diversos efeitos colaterais. Muitos medicamentos vêm sendo desenvolvidos para que se alcancem resultados mais favoráveis para o tratamento dessa neoplasia e os fitoterápicos, dentre eles alguns polifenóis, têm mostrado efeitos promissores na prevenção e tratamento de vários tipos de neoplasias, especialmente as do trato gastrointestinal (THOPPIL; BISHAYEE, 2011; KAY, 2010). Dentre os polifenóis mais estudados para esses fins encontram-se os flavonóides (AHCÈNE BOUMENDJEL *et al.*, 2008; VINCENZO *et al.*, 2000). Alguns flavonóides, assim como alguns quimioterápicos utilizados na clínica podem interferir na replicação e no ciclo celular ou mesmo promover redução

de defesas antioxidantes e aumento de EROs, levando a morte de células neoplásicas (CHOI *et al.*, 2007; JUNIOR *et al.*, 2001).

2.2 ALVOS CELULARES DE COMPOSTOS ANTITUMORAIS

Com o avanço do conhecimento sobre o metabolismo de células tumorais, novos alvos para agentes quimioterápicos têm sido estudados. Compostos antitumorais, como vários flavonoides, podem atuar em vários estágios da carcinogênese modificando o metabolismo de células tumorais através de alterações progressão do ciclo celular e formação de espécies reativas de oxigênio induzindo a morte destas células (ORLIKOVA *et al.*, 2011).

2.2.1 Ciclo Celular

O ciclo celular é um processo caracterizado pela replicação do DNA e segregação dos cromossomos (crescimento e divisão). A divisão celular acontece em duas etapas: Mitose (fase M), na qual ocorre o processo de divisão nuclear; e interfase (incluindo a fase S), que é intermediária entre duas fases M. A mitose inclui etapas como: prófase, metáfase, anáfase e telófase. A interfase possui três fases distintas: G1, S e G2. G1 e G2 são lacunas (*gaps*) que conectam as fases S e M. G1 ocorre logo após a divisão celular (fase M) e é nessa fase que muitos genes são transcritos e traduzidos em proteínas importantes para a síntese do DNA (fase S - *synthesis* em inglês). Após a fase S inicia-se G2 na qual ocorre a preparação das células para a mitose. Células na fase G1 podem ainda comprometer a replicação do DNA entrando num estado de quiescência denominado G0, onde a célula pára de crescer e se proliferar (GARRETT, 2001; VERMUELEN *et al.*, 2003; NURSE, 2000).

Existem controles no ciclo celular que regulam a progressão pelas diferentes fases, garantindo que esses eventos ocorram numa seqüência correta e sejam coordenados com o crescimento celular e, ainda, que erros sejam corrigidos na sua execução. Esses controles são realizados através de proteínas celulares conhecidas como quinases ciclina-dependentes (CDKs) e ciclinas que são proteínas ativadoras das CDKs. Até o presente momento

foram identificados nove tipos diferentes de CDKs e três tipos de ciclinas (A, B D e E) (MORGAN, 1997; SHERR, 1999). As CDKs se mantêm em um nível constante durante todo o ciclo celular, diferentemente das ciclinas, que oscilam durante as fases do ciclo em que são requeridas. Quando ativadas pelas ciclinas, as CDKs promovem fosforilação de proteínas alvo. As atividades das CDKs também são controladas por proteínas celulares inibitórias do ciclo (CKI), que se ligam a CDK sozinha ou ao complexo CDK-ciclina e regulam sua atividade. A mais estudada e bem compreendida CKI é a proteína p21 (reguladora da passagem da fase G1 para S). A transcrição de p21 é controlada pela proteína p53, supressor tumoral, conhecida como “guardião do genoma”, que reconhece sinais de estresse como danos ao DNA, hipóxia ou ativação de oncogenes (VOUSDEN, 2006; VERMEULEN *et al.*, 2003). Uma vez detectado o dano ao DNA, p53 promove a parada do ciclo celular até que o dano seja reparado e caso isso não seja possível, p53 ativa uma via de sinalização que leva a morte celular, impedindo que na replicação celular esse dano passe para outras células (LANGERAK, P.; RUSSELL, P., 2011).

Além desses controles, o ciclo celular possui pontos de checagem conhecidos como *checkpoints*, que garantem que a progressão do ciclo celular ocorra de maneira correta e caso haja algum dano irreparável no DNA a célula seja conduzida a apoptose (LABIB; PICOLI, 2011).

Quando esses mecanismos de controle do ciclo celular são afetados, as células podem se replicar com falhas no DNA, levando ao aparecimento de células neoplásicas. Uma das características de células neoplásicas são as modificações que ocorrem na divisão celular incluindo mutações nos reguladores do ciclo, levando à proliferação celular desregulada. Uma das mutações mais importantes é a inativação de genes supressores tumorais, como p53 e pRb (proteína retinoblastoma que atua na supressão do ciclo celular na transição das fases G1 e S, até que a célula esteja pronta para se dividir) (MCDONALD; EL DEIRY, 2000; GARRETT, 2001). O entendimento desses pontos reguladores do ciclo celular e como eles podem estar alterados em células neoplásicas torna-se importante para novas estratégias que possam levar a morte dessas células. Flavonóides já foram descritos por promoverem alterações na progressão do ciclo de várias linhagens de células tumorais (HSU *et al.*, 2011, SHEN *et al.*, 2007).

2.2.2 Radicais Livres e Defesas Antioxidantes

Radicaís livres são átomos ou moléculas que possuem um ou mais elétrons desemparelhados e são capazes de desencadear diversos danos ao organismo (WOJNÁROVITS, 2011). Entretanto, existem compostos que não são radicaís livres e que também podem ocasionar danos oxidativos às estruturas biológicas. Espécies reativas de oxigênio (ERO) e de nitrogênio (ERNs) abrangem espécies radicalares como o ânion superóxido, radical hidroxila e óxido nítrico ($O_2^{\bullet-}$, OH^{\bullet} , NO^{\bullet} respectivamente) e espécies não radicalares como peróxido de hidrogênio e peróxinitrito (H_2O_2 , $ONOO^-$) (HALLIWELL, 2006). Essas espécies reativas são capazes de interagir com proteínas, lipídeos e DNA, podendo causar inatividade de enzimas importantes, peroxidação lipídica de membranas celulares e mutações no DNA causando danos às estruturas biológicas (NAKAMURA *et al.*, 2003). Esses danos causados estão sendo cada vez mais relacionados com o processo de envelhecimento, câncer, doenças inflamatórias crônicas e degenerativas (BARNETT; KING, 1995, THANNICKAL; FANBURG, 2000).

Os seres vivos possuem defesas contra os efeitos de espécies reativas e assim contribuíram para o desenvolvimento da vida e sobrevivência (AUGUSTO, 2006; CERQUEIRA, 2007). As defesas antioxidantes podem ser divididas em algumas classes: defesas antioxidantes primárias, de natureza enzimática e não enzimática; defesas auxiliares que ajudam a função das defesas primárias reciclando ou sintetizando substratos de enzimas antioxidantes; proteínas ou enzimas que se complexam com metais como a ferritina e a ceruloplasmina, diminuindo a livre circulação de metais como ferro e cobre e suas reações com espécies reativas, bem como compostos de baixo peso molecular e o sistema de reparo enzimático que reparam os danos causados por EROs e ERN (FERREIRA; MATSUBARA, 1997; ZAFARULLAHA, 2003). Uma reação muito conhecida que envolve ferro livre e que pode gerar radical hidroxila *in vivo* e *in vitro* é a reação de Fenton (figura 1).

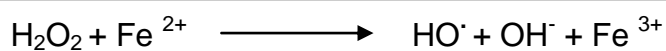


FIGURA 1: Reação de Fenton

FONTE: O autor (2013)

Dentre os antioxidantes enzimáticos temos: as enzimas superóxido dismutases (SOD), como a CuZnSOD e a MnSOD que atuam na reação para remoção do radical superóxido; a catalase (CAT), presente em todos os organismos aeróbicos, que neutraliza os efeitos tóxicos do H₂O₂; Tioredoxina (Trx) que reduz pontes dissulfeto, a glutaciona peroxidase (GPx), que catalisa a redução do H₂O₂ e hidroperóxidos utilizando a glutaciona reduzida (GSH) e formando como produtos glutaciona oxidada (GSSG) e água, entre outras. Esse último processo catalítico depende diretamente da redução da glutaciona oxidada pela glutaciona redutase (GR), para manter os níveis de glutaciona reduzida (GSH). A GR também é constituinte das defesas auxiliares (FERREIRA; MATSUBARA,1997; VALKO *et al.*, 2006; BABIOR, 1997; FRIDOVICH 1995).

As defesas antioxidantes não enzimáticas são compostas pela glutaciona (GSH), ubiquinona ou coenzima Q (CoQ) e ácido úrico, que são compostos produzidos endogenamente. Além deles, também existem compostos de baixo peso molecular que são obtidos através da dieta: vitamina E (tocoferol), vitamina C (ascorbato), β-caroteno, selênio e flavonóides (polifenóis) (FERREIRA; MATSUBARA,1997).

A glutaciona (L-γ-glutamil-L-cistenil-glicina) é a mais importante defesa antioxidante não enzimática intracelular porque envolve diferentes sistemas enzimáticos como a glutaciona peroxidase (GPx), a glutaciona-S-transferase (GST), e a glutaciona redutase (GR). É sintetizada no citosol pelas enzimas γ-glutamilcisteína ligase e por GSH sintetase (figura 2). Sua forma oxidada é a GSSG (glutaciona dissulfeto) (HIRAGI *et al.*, 2011; JUNIOR *et al.*, 2001, BALLATORI *et al.*, 2009; JÚNIOR *et al.*, 200; NAVARRO *et al.*, 1999).

A glutaciona redutase é uma enzima que atua em conjunto com a glutaciona peroxidase (figura 3). Essa enzima é responsável por manter os níveis de glutaciona reduzida utilizando para isso NADPH que, por sua vez, é obtido pela via das pentoses fosfato (FERREIRA; MATSUBARA *et al.*, 1997).

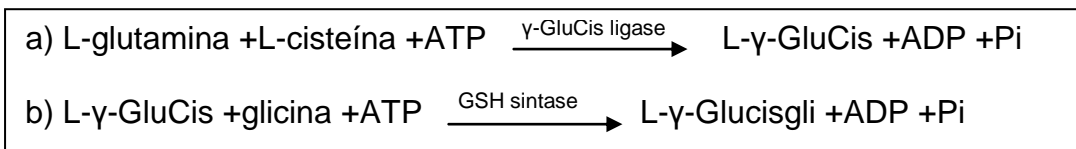


FIGURA 2: BIOSÍNTESE DA GLUTATIONA: A) REAÇÃO DA γ -GLUTAMIL CISTEÍNA LIGASE E B) REAÇÃO DA GSH SINTASE

FONTE: O Autor (2013)

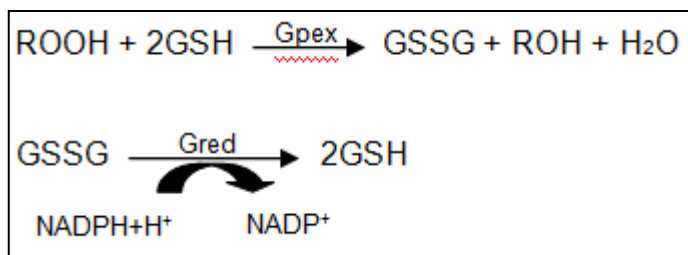


FIGURA 3: REAÇÃO ENZIMÁTICA DA GLUTATIONA PEROXIDASE (GPX) NA DETOXIFICAÇÃO DE HIDROPERÓXIDOS E REAÇÃO ENZIMÁTICA DA GLUTATIONA REDUTASE (GR) NA RECICLAGEM DE GSH.

FONTE: O AUTOR (2013).

Na tentativa de investigar os efeitos causados pelas espécies reativas de oxigênio em células é utilizada a N-acetilcisteína (NAC), precursora da L-cisteína e da glutatona reduzida (LIU *et al.*, 2006; KUO *et al.*, 2010; MOON *et al.*, 2010). Por ser um tiol, NAC é uma fonte de grupos sulfidríla para células e é sequestrador de radicais livres interagindo com EROs tais como $\bullet\text{OH}$ e H_2O_2 , diminuindo a disponibilidade desses agentes oxidantes, bem como seus efeitos biológicos (ZAFARULLAHA, 2003).

O desequilíbrio entre a produção de espécies reativas e defesas antioxidantes pode causar alterações na sinalização e no controle redox, podendo levar ao acúmulo excessivo de espécies reativas e conduzir a célula ao estresse oxidativo que pode causar danos ao DNA, proteínas e lipídeos, induzindo a morte celular ou carcinogênese (VALKO *et al.*, 2006; JONES, 2006; HALLIWELL, 2006).

A relação GSH/GSSG fornece informações sobre o estado redox da célula. Algumas células tumorais apresentam níveis de glutatona total alterados, possivelmente como uma forma de sobrevivência contra o estresse oxidativo. Agentes que causem diminuição desta razão GSH/GSSG tem sido estudados com a tentativa de diminuir a sobrevivência de células tumorais (KIM *et al.*, 2010; SCHNELLDORFER, 2000).

2.2.2.1 A via Keap1/Nrf2 e sua importância na defesa antioxidante.

Nrf2 (fator nuclear eritróide 2) é um fator de transcrição localizado no citoplasma que regula a expressão da maioria das enzimas que participam do sistema antioxidante. Sob condições normais, Nrf2 é mantido inativo pela proteína Keap1 (ECH Kelch associando proteína 1) sendo constantemente degradado pela via ubiquitina–proteasoma dependente de Keap1 (MOTOHASHI; YAMAMOTO 2004; TAGUCHI *et al.*, 2011; MCMAHON *et al.*, 2003)

Keap1 humano contém 27 resíduos de cisteína e alguns desses resíduos agem como sensores de estímulos eletrofílicos, inflamatórios e oxidativos, atuando como reguladores dessa via. Quando a célula sofre um desses estímulos, Keap1 sofre oxidação dos grupos SH de resíduos de cisteína, levando a uma alteração na estrutura de Keap1 que causa sua dissociação de Nrf2 que é, então, estabilizado e translocado para núcleo onde se liga a pequenas proteínas Maf (fatores de transcrição que ativam o Elemento de Resposta Antioxidante (ERA)) e ativa genes alvos que apresentam ERA no seu promotor, assim iniciando-se a transcrição de novas enzimas. A via Keap1/Nrf2 é responsável por regular genes citoprotetores e de defesas antioxidantes, entre eles os genes da superóxido dismutase (MnSOD e CuZnSOD), catalase, e das enzimas do metabolismo da glutatona (glutaciona peroxidase (GPx), glutaciona redutase (GR), e γ -glutamil cisteína ligase (γ -GCL)), da detoxificação de xenobióticos (NAD(P)H desidrogenase, quinona 1 (Nqo1)), genes da família da Glutaciona S-transferase e do transporte de drogas (genes da família da proteína associada a resistência de multidrogas (Mrp)) (figura 4) (HOLLAND; FISHBEIN, 2010; KUMAR *et al.*, 2011; TAGUCHI *et al.*, 2011; OKAWA *et al.*, 2006; YATES *et al.* 2009; NITURE *et al.*, 2009; CHENG *et al.*, 2010).

Mutações que causam estabilização de Nrf2 foram encontradas em células de câncer de pulmão, cabeça e pescoço e de vesícula, o que pode garantir a esses tumores citoproteção permanente contra o estresse oxidativo, fazendo com que o tumor tenha o ambiente ideal para se desenvolver (PERERA; BARDEESY, 2011; KENSLER, *et al.*, 2007; HAYES; MACMAHON, 2009).

Foi demonstrado que alguns flavonoides como as chalconas, são capazes de ativar essa via Keap1/Nrf2 em células tumorais devido ao seu domínio α,β insaturado altamente eletrofílico e por aumentar os níveis de espécies reativas de oxigênio (LIU *et al.*, 2007; KUMAR *et al.*, 2011).

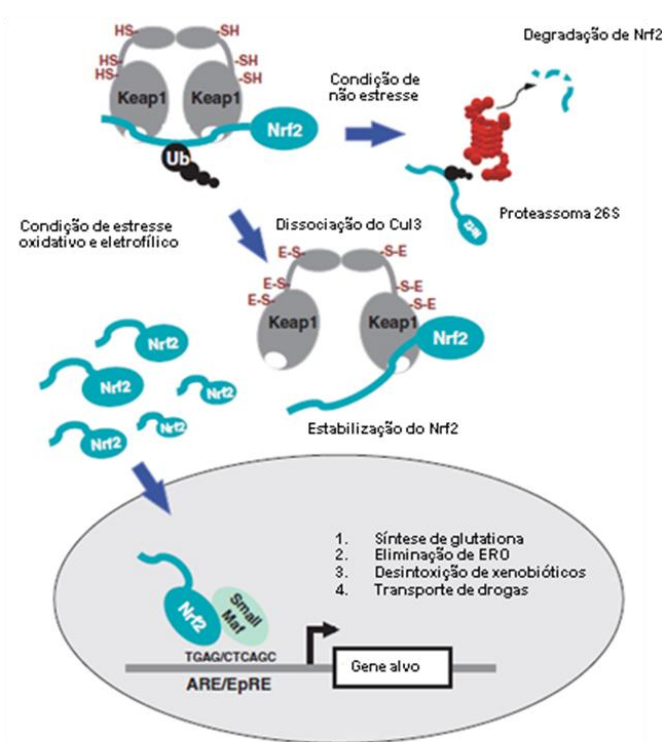


FIGURA 4: ESQUEMA GERAL PARA A INDUÇÃO DA EXPRESSÃO DE GENES DE ENZIMAS ANTIOXIDANTES ATRAVÉS DA VIA DE SINALIZAÇÃO Keap1/Nrf2. FONTE: Modificado de Taguchi *et al.*, (2011); Scoparo (2012).

2.3 MORTE CELULAR

2.3.1 Tipos de morte celular

A morte celular pode ser caracterizada por critérios morfológicos e hoje é definida por várias nomenclaturas. Entretanto, os termos mais utilizados e descritos para definir a morte celular são: apoptose, necrose, autofagia e catástrofe mitótica (KROEMER, *et al.*, 2009).

A apoptose é conhecida como morte celular programada que envolve a eliminação celular determinada geneticamente. Está presente nos tecidos desde a embriogênese e é muito importante em tecidos pluricelulares para a

eliminação de células e renovação (AMARANTE-MENDES, 2003). Durante os primeiros estágios de apoptose ocorre o encolhimento celular que acarreta a perda de aderência entre as células e a matriz extracelular e a condensação da cromatina. Depois ocorre a formação de “blebs” na membrana, formação de corpos apoptóticos e exposição de fosfolípídeos de membranas (fosfatidilserina). Os corpos apoptóticos são reconhecidos e fagocitados por fagócitos ou células vizinhas (WHELAN *et al.*, 2009; BOATRIGT *et al.*, 2003)

A necrose envolve um processo inflamatório no qual se formam vacúolos no citoplasma, ocorre o aumento do volume celular e das organelas, perda da integridade das membranas celulares e extravasamento do conteúdo intracelular para o meio extracelular e isso induz um processo inflamatório do tecido ao redor da célula. Evidências indicam que a necrose pode ocorrer também por processos regulados como danos no DNA e moléculas que se ligam aos receptores de morte e sinalizam para a morte celular de forma semelhante a apoptose (HITOMI *et al.*, 2008; LONG; RYAN *et al.*, 2012).

A autofagia é outro mecanismo de morte celular programada e apresenta um papel importante em processos de desenvolvimento de doenças humanas e respostas celulares ao estresse metabólico (privação de nutrientes) resultando na degradação de organelas, proteínas e lipídeos (DEBNATH *et al.*, 2005; GALLUZZI *et al.*, 2012).

A catástrofe mitótica é um processo que ocorre durante a mitose mediante a um erro que sinaliza a célula à senescência ou morte, prevenindo a oncogênese (GALLUZZI *et al.*, 2012).

2.3.2 As vias de regulação da apoptose

A apoptose ocorre através de uma cascata de ativação de moléculas executoras e pode ocorrer tanto pela via intrínseca quanto pela via extrínseca. A via extrínseca envolve receptores de morte celular presentes na membrana celular (Fas) e mediadores solúveis que se ligam a Fas, são eles: ligante de Fas (Fas-L) e Fator de necrose tumoral α (TNF α) e o ligante indutor de apoptose relacionado ao TNF (TRAIL) (GALLUZZI *et al.*, 2012).

A ligação dos mediadores solúveis ao ligante leva a uma mudança conformacional de Fas e permite que seu domínio de morte intracelular se ligue

ao domínio de morte da proteína adaptadora FADD (domínio de morte associado a Fas) permitindo que FADD recrute as pró-caspases-8 e/ou 10. Essa interação entre as proteínas forma um complexo chamado DISC (*death-inducing signalling complex*) que ativa as pró-caspases à caspases. Ativas, essas caspases sinalizam para a morte celular através da ativação da caspase-3 e também pela ativação da via intrínseca (figura 5) (CIRCU; AW, 2010; BOATRRIGHT *et al.*, 2003).

A via intrínseca depende ou não da ativação das caspases, porque outros eventos podem ativar essa via como: danos no DNA, hipóxia, estresse oxidativo, o acúmulo de cálcio no citosol, entre outros. Esses sinais de morte com envolvimento ou não das caspases são recebidos pela mitocôndria através de proteínas pró-apoptóticas: Bax e Bak que induzem a liberação de apoptógenos como o citocromo *c* da mitocôndria para o citosol, induzindo a célula à morte. Existem também proteínas antiapoptóticas Bcl-2 e Bcl-xl que previnem a liberação de citocromo *c* para o citosol. Dessa maneira a morte celular mediada pela mitocôndria é controlada por essas duas famílias de proteínas que são expressas via estímulos diferentes (figura 5) (HENGARTNER *et al.*, 2000; WHELAN *et al.*, 2009;).

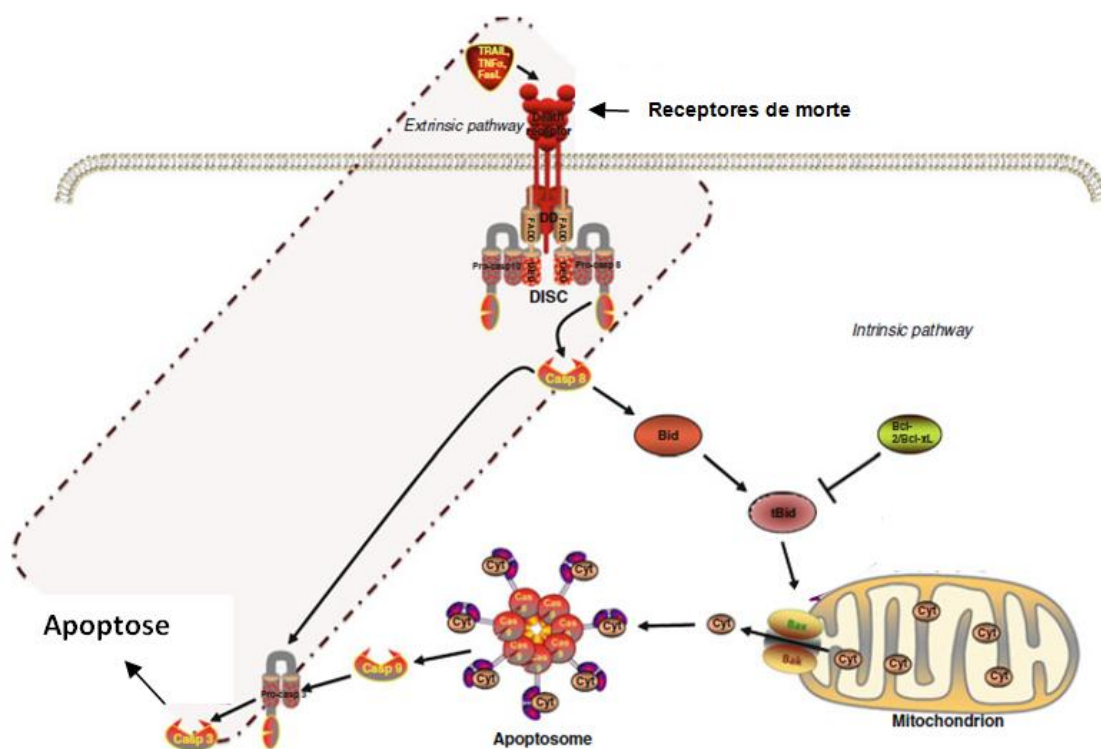


FIGURA 5: VIA EXTRÍNSECA E INTRÍNSECA DA APOPTOSE.

FONTE: Adaptado (ORLIKOVA *et al.*, 2010).

NOTA: DISC, complexo indutor de morte; DD, domínio de morte; DED, domínio efetor de morte; FADD, domínio de morte associado à Fas; Fas-L, ligante de Fas; TNF α , fator de necrose tumoral; TRAIL, ligante indutor de apoptose relacionado ao TNF α ; Bid, proteína pró-apoptótica; tBid, forma truncada de Bid; Bcl2/Bcl-xL, proteínas anti-apoptóticas; Bax/Bak, proteínas pró-apoptóticas; Casp, caspase; Cyt, citocromo c.

2.4 FLAVONÓIDES

Os flavonóides são metabólitos secundários, encontrados em plantas e em produtos obtidos a partir de plantas: maçã, cebola, brócolis, suco de maçã, frutas cítricas, cacau, chá preto, chá verde, vinhos, azeite de oliva entre outros, sendo consideradas fontes muito importantes de antioxidantes na dieta humana (HERTOG *et al.*, 1993). Os flavonóides estão presentes em grande quantidade nas folhas verdes de plantas, principalmente na face superior das folhas ou em células epidermais, auxiliando na proteção contra raios UV-B, além de conferir resistência microbiana, permitindo a sobrevivência dos vegetais (HARBONE; WILLIAMS, 2000).

São em sua maioria polifenóis compostos por uma estrutura básica de fenilbenzopirona, com um ou mais substituintes hidroxil (BIRT *et al.*, 2001; CABRERA *et al.*, 2007; REN *et al.*, 2003). Possuem geralmente 15 átomos de carbono na sua estrutura principal sendo constituídos por dois anéis aromáticos e uma cadeia carbonada entre eles, que pode ou não formar um anel heterocíclico (anel C) na sua estrutura química (figura 6), podendo ainda apresentar ou não resíduos de açúcar ligados a sua estrutura (agliconas) (GUZZO, 2007; HARBONE; WILLIAMS, 2000).

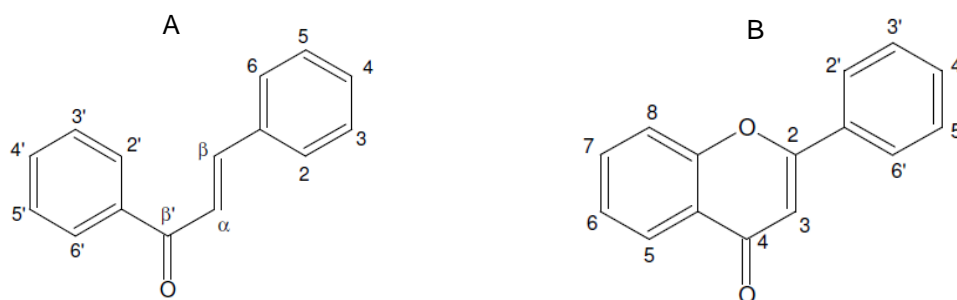


FIGURA 6: A) ESTRUTURA BÁSICA DOS FLAVONÓIDES SEM ANEL C. B) ESTRUTURA BÁSICA DOS FLAVONÓIDES COM ANEL C.

FONTE: O autor (2013)

Sua classificação é realizada através de suas estruturas químicas, sendo divididos em subgrupos como: chalconas, dihidrochalconas, flavanóis, flavonas, dihidroflavonas, isoflavonóides, antocianinas, entre outros (CORRADINI *et al.*, 2011).

A estrutura química básica dos flavonóides pode conferir respostas biológicas diferentes que dependem das substituições nos anéis A e B, como grupamentos metil, metoxil, hidroxil, nitro, bromo, entre outros, além da presença ou ausência do anel heterocíclico C na sua estrutura (HARBORNE; WILLIAMS, 2000; CERQUEIRA *et al.*, 2007)

Hoje já se conhecem mais de 8000, flavonóides identificados de acordo com suas estruturas químicas, sendo aproximadamente 4000 de origem natural. Dentre os flavonóides já identificados, mais de 6000 possuem efeitos biológicos já descritos (GUZZO, 2007; HARBONE; WILLIAMS, 2000). Dentre esses efeitos já descritos encontramos: o antitumoral (BIRT *et al.*, 2001), antibacteriano (KROMANN *et. al.*, 2004), antiulcerativo (GUZZI *et al.*, 2010)

antiinflamatório (MIDDLETON *et al.*, 2000), hipolipdêmico, (CERQUEIRA *et al.*, 2007), antioxidante (KANDASWAMI *et al.*, 2005).

Os flavonóides são defesas antioxidantes não enzimáticas, responsáveis por quelar metais de transição, diminuindo disponibilidade desses metais evitando a formação de ERO por reações como as de Fenton e de Haber Weiss, catalisada por ferro. Essa propriedade está relacionada à presença, número e posição de diversos grupamentos hidroxila que podem estar presentes nas estruturas de alguns flavonóides (CHOI *et al.*, 2007; SUN *et al.*, 2002).

Os flavonóides são capazes de reagir com radicais alcoxila (RO[•]), alquilperoxila (ROO[•]), superóxido (O₂^{•-}), radical hidroxila (HO[•]), óxido nítrico (NO[•]), além do peroxinitrito (ONOO⁻/ONOOH) (CHOI *et al.*, 2007). Os flavonóides que possuem anel catecol podem atuar também como pró-oxidantes pela formação de semiquinonas e peróxido de hidrogênio na presença de radical superóxido (CHOI *et al.*, 2007; DUTHIE, 2000).

O consumo de alimentos que contenham flavonóides apresenta inúmeros efeitos benéficos para a saúde humana dentre elas, a prevenção contra o aparecimento de alguns tipos de tumores como o pancreático (THOPPIL; BISHAYEE, 2011; HERTOOG *et al.*, 2009, Block *et al.*, 2009; ROSSI *et al.*, 2011). Muitos autores ainda discutem sobre a quantidade que deve ser consumida desses polifenóis quanto aos seus efeitos benéficos, no entanto, hoje se preconiza consumo de aproximadamente 1g/dia de uma combinação de flavonóides (antocianinas, flavonóis, catequinas, proantocianidinas, flavanonas, entre outros), não sendo evidenciados efeitos adversos quando o consumo excede pouco esse valor (MANACH *et al.*, 2004).

2.4.1 Chalconas

As chalconas são um grupo de enonas aromáticas com estrutura básica de 1,3-difenil-2-en-1-ona (figura 7). Essa estrutura é base para a síntese de outros flavonóides como as flavonas (YADAV *et al.*, 2011). Constituem um grupo de flavonóides de cadeia aberta onde dois anéis aromáticos (A e B) são ligados por três carbonos (uma carbonila e dois carbonos α,β -insaturados) sem a presença do anel C. São classificadas de acordo com suas estruturas químicas

e suas atividades biológicas dependem da presença de diferentes grupamentos nos anéis A e B (KOZLOWSKI *et al.*, 2007).

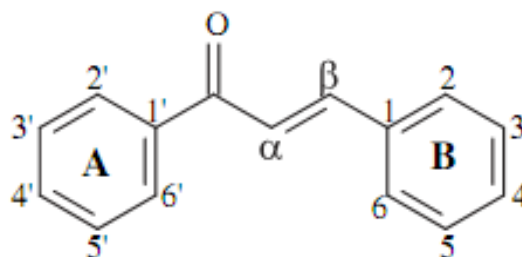


FIGURA 7: ESTRUTURA BÁSICA DAS CHALCONAS

Os compostos derivados de chalconas possuem muitas atividades biológicas incluindo propriedades antioncogênicas, antiinflamatória, antibacteriana, analgésica, antiviral, antifúngica (NOWAKAWSKA, 2007), antimalárica, antioxidantes, antiulcerativa (YADAV *et al.*, 2011), de inibição da atividade de CYP1A (MONOSTROY *et al.*, 2003), análogo da insulina, estimulação da captação da glicose pelos adipócitos (DAMAZIO *et al.*, 2009) atividade estrogênica, entre outras.

Algumas dihidrochalconas naturais presentes em plantas como *Kalmia latifolia* (EL-NAGGAR *et al.*, 1980) e *Myrica gale* (MATHIESEN *et al.*, 1997) apresentam atividades antioxidantes.

Floretina é uma dihidrochalcona é uma dihidrochalcona encontrada nas maçãs e exibe potente atividade antioxidante como *scavenger* de peroxinitrito e promove inibição da peroxidação lipídica (REZK *et al.*, 2002).

A dihidrochalcona neohesperidina (1-(4-((2-O-[6-Deoxy- α -L-mannopyranosyl]- β -D-glucopyranosyl)oxy)-2,6-dihydroxyphenyl)-3-[3-hydroxy-4-methoxyphenyl]-1-propanone)), um glicosídeo composto por neohesperidose e hesperitina aglicona obtida através de hidrogenação (sintética ou biológica) da neohesperidina é um flavonóide presente na maioria das frutas cítricas na dose de 100 μ M e *in vitro* apresenta atividade de *scavenger* de radicais livres (ânions superóxido, radical hidroxila, peróxido de hidrogênio, ácido hipocloroso) mais elevada que a do ácido ascórbico e BHT (CHOI *et al.*, 2007).

Outros estudos evidenciaram que a neohesperidina, em eritrócitos, inibe a atividade da xantina oxidase e a peroxidação lipídica (ZAHNG *et al.*, 2012; SUAREZ *et al.*, 1998) e ainda reage com o radical estável DPPH em experimentos de atividade antioxidante (NAKAMURA *et al.*, 2003).

REDDY *et al.*, (2011) verificaram que algumas chalconas sintéticas promovem potente inibição na produção de NO em neutrófilos humanos com valores de IC₅₀ entre 10,5 e 0,018 µM.

Além dos efeitos citados, algumas chalconas possuem atividade antitumoral cujos mecanismos serão descritos a seguir.

2.4.1.1 Mecanismos de ação antitumoral das chalconas

Muitos estudos descrevem os efeitos antitumorais das chalconas por diferentes mecanismos: por alterar a progressão do ciclo celular, por ativar as vias intrínseca e extrínseca da apoptose (KIM *et al.*, 2008; *et al.*, 2008; JUNG *et al.*, 2006) e por aumentar a geração das espécies reativas de oxigênio (NAVARINI *et al.*, 2009; ROMAGNOLI *et al.*, 2009). Elas podem atuar alterando o metabolismo celular até levar a célula à senescência ou morte (2010; HSU *et al.*, 2006; SHEN *et al.*, 2007).

2.4.1.1.1 Efeitos das chalconas no ciclo celular e na apoptose

Um dos efeitos antitumorais das chalconas se baseia em interferir na progressão do ciclo celular (figura 8), por alterar a expressão de alguns de seus reguladores chave e recrutar moléculas capazes de induzir a morte celular (ORLIKOVA *et al.*, 2010). Várias chalconas demonstram capacidade de induzir a morte celular por apoptose utilizando as vias intrínseca e/ou extrínseca (JUNG *et al.*, 2006; TABATA, *et al.*, 2005).

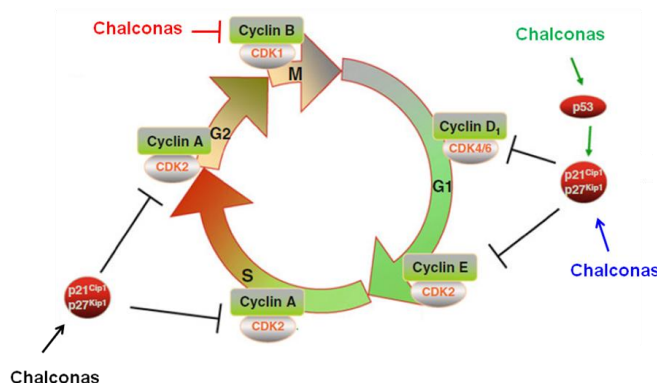


FIGURA 8: CHALCONAS NA INIBIÇÃO DA PROGRESSÃO DO CICLO CELULAR

FONTE: Adaptado de Orlikova *et al.* (2010).

NOTA: As chalconas podem induzir parada do ciclo e morte celular por aumenta a expressão de inibidores de Cdk's (p21 e p27), diminui a expressão de Cdk2, diminuir expressão e atividade de ciclinas A e B.

Foi observado que o tratamento de células MCF-7 e MDA-MB-231 (câncer de mama) com a chalcona (1,3-difenil-2-en-1-ona) promoveu parada do ciclo celular em G2/M por aumentar a expressão de p21 e p27 e reduzir níveis de ciclinas. Os mesmos efeitos foram observados com a chalcona em linhagem T24 e HT-1376 (câncer de bexiga) (HSU *et al.*, 2006; SHEN *et al.*, 2007).

Isoliquiritigenin ((E)-1-(2,4-dihidroxifenil)-3-(4-hidroxifenil)prop-2-en-1-ona), uma chalcona extraída a partir da planta *Glycyrrhiza glabra* conhecida como licorice (no Brasil, alcaçuz) e utilizada como um fitoterápico. Esta chalcona na dose de 20 μM após 2 horas de tratamento promoveu em células DU145 (câncer de prostata) a diminuição nos níveis de ciclinas, aumento nos níveis de p27 e parada do ciclo na fase G1 e em 24 horas de tratamento promoveu a parada do ciclo em G2/M (Lee *et al.*, 2009). Foi observado em células HepG2, tratadas com a mesma chalcona (40 μM por 16 horas), o aumento da expressão de p21 e p27 e parada do ciclo na fase G2/M (PARK *et al.*, 2009).

A 2',4'-dihidroxichalcona isolada da *Herba oxytropis*, encontrada no Tibete, foi testada na dose de 20 μM por 48 horas em células MGC-803 (tumor gástrico) e verificou-se o aumento da atividade da caspase 3, levando a célula à apoptose (LOU *et al.*, 2010).

Szliszka *et al.* (2010) observaram que a chalcona e outros três análogos naturais (licochalcona-A, isobavachalcona, xantohumol e buteína) nas dose de

50 μM por 48 horas em células LNCaP (tumor de próstata) promovem a indução da apoptose por potencializar os efeitos de TRAIL (ligante indutor de apoptose relacionado ao TNF).

Moon *et al.* (2010) analisou os efeitos da buteína (3, 4, 2', 4'-tetrahidroxichalcona) em células HepG2 na dose de 30 μM por 48 horas e observou o aumento de 36% de células com DNA fragmentado. Outros estudos mostraram o efeito da buteína em células de leucemia (HL-60) e verificaram a morte celular induzida pela modulação positiva da caspase-3 e diminuição da expressão de Bcl-2 (anti-apoptótica) e aumento da expressão de Bax (pró-apoptótica) (KIM *et al.*, 2001).

BOUMENDJEL *et al.*, (2008) demonstraram o efeito de chalconas sintéticas polimetoxiladas, e em menor escala hidroxiladas em linhagem celulares K562 (leucemia). As chalconas metoxiladas nas posições 2, 4 e 6 (anel A e B) nas doses de 10 μM por 24h induziram a parada do ciclo celular e esse efeito foi maior quando comparado com a Vincristina, droga referência que induz na parada do ciclo celular na fase G2/M e é utilizada como medicamento antineoplásico. Echeverria *et al.* (2009) verificaram, utilizando 2'-hidroxichalconas metoxiladas, que a eletrofolicidade encontrada nas chalconas no carbono 3 (C 3) do grupamento 2-propen-1-ona pode ser modulado pela presença de grupos metóxi no anel aromático em C3. O grupamento metóxi é um doador de elétrons que pode agir estabilizando cargas geradas em C3.

2.4.1.1.2 Relação entre Chalconas e a produção de espécies reativas de oxigênio (EROs)

Evidências indicam o papel das espécies reativas de oxigênio na sinalização de alguns processos celulares, dentre eles a apoptose (BARBIOR 1997).

Em alguns estudos utilizando chalconas, o aumento de EROs é apontado como principal responsável por induzir morte celular em diferentes linhagens tumorais: células HCT116 (câncer de cólon) incubadas com a Flavokavaína B (KUO *et al.*, 2010), células HepG2 incubadas com buteína (MOON *et al.*, 2010) e células de melanoma incubadas com hidroxichalconas (NAVARINI *et al.*, 2007). Moon *et al.* (2010) demonstraram a pré-incubação de

células HepG2 com 10 mM de N-acetilcisteína (NAC: precursor de GSH) por 1 hora antes do tratamento com a buteína (30 μ M por 48 horas) promoveu uma diminuição dos efeitos citotóxicos causados pela buteína. Os autores sugeriram que o aumento de EROs seriam os responsáveis pelos efeitos citotóxicos promovidos pela buteína.

Winter *et al.*, 2010 observou os efeitos de chalconas obtidas através da 3,4-metilenodioxiacetofenona nas doses de IC₅₀ de 23, 37 e 36 μ M em células de leucemia (L1210) e observou, utilizando a sonda DCFH-DA, o aumento de espécies reativas de oxigênio. Com esse resultado os autores sugeriram o envolvimento do H₂O₂ já que esses efeitos foram inibidos com a co-incubação das células com a catalase por 24 horas.

Xantohumol (1-(2,4-dihidroxi-6-methoxi-3-(3-metilbut-2-enil)fenil)-3-(4-hidroxifenil)prop-2-en-1-ona), uma chalcona obtida através de flores da planta do lúpulo, nas doses de 12,5 μ M por 10 min foi responsável por inibir a passagem de elétrons pelos complexos da cadeia respiratória mitocondrial e levar ao aumento dos níveis de anions superóxido na mitocôndria, causando redução do potencial de membrana mitocondrial e liberação de citocromo c para o citosol e conseqüente morte celular (STRATHMANN *et al.*, 2010). A indução da apoptose por EROs também foi observada por Montani *et al.* (2008) em células de neuroblastoma (IMR-32) incubadas por 1 hora com 10 μ M de xantoangelol, uma chalcona obtida da espécie *Angelica keiskei*, planta medicinal conhecida como Ashitaba no Japão cujos efeitos obtidos foram aumento de EROs causando liberação de citocromo c para o citosol e ativação da caspase-9.

2.4.2 Chalconas e a via Keap 1/ Nrf2

As chalconas também foram descritas por atuarem sobre a via Keap 1/ Nrf2 (LIU *et al.*, 2007). As chalconas possuem um grupamento carbonil α,β -insaturado na sua estrutura capaz de causar estresse eletrofílico em células de câncer e agir como um eletrófilo que atrai nucleófilos como grupos tióis (LIU *et al.*, 2007; KUMAR *et al.*, 2011). Keap 1 possui resíduos de cisteína em sua estrutura, dessa maneira, o grupamento carbonil α,β -insaturado das chalconas são capazes de reagir com grupos tióis dos resíduos de cisteína de Keap 1,

induzindo uma alteração em sua estrutura, o que permite sua dissociação de Nrf2 (figura 4) (KACHADOURIAN *et al.*, 2012; GUZY *et al.*, 2010, DIMMOCK *et al.*, 1999). Nrf2 livre pode atuar aumentando a expressão de enzimas antioxidantes como destacado no item 2.2.2.1.

O aumento da atividade de Nrf2 foi observado em células Beas-2B (células epiteliais de pulmão) tratadas com 2,5 - 20 μ M da 2-trifluorometil-2'-metoxichalcona por 24 horas (KUMAR *et al.*, 2011).

Estudos mostram que a ativação de Nrf2 pode estar relacionada a recuperação do balanço redox das células após certo tempo de exposição as chalconas (KACHADOURIAN *et al.*, 2012; LIU *et al.*, 2007; KUMAR *et al.*, 2011). Em células endoteliais, o tratamento com a chalcona na dose de 25 μ M reduziu os níveis de GSH intracelular nos primeiros 30 minutos e após 6 horas de tratamento, foi observado o aumento dos níveis de GSH. Quando utilizado um inibidor (BSO – butionina sulfoxamina) da enzima glutamato cisteína ligase (participa da síntese de GSH), o aumento de GSH não foi observado. Foi demonstrado também no mesmo trabalho que a chalcona induziu translocação e acúmulo de Nrf2 no núcleo. A partir desses resultados os autores sugeriram que, num primeiro momento, a chalcona causa depleção dos níveis de glutathiona reduzida (GSH) para depois levar ao aumento da atividade de Nrf2 e assim aumentar a expressão de enzimas antioxidantes, como a glutamilcisteína ligase, que por sua vez seriam responsáveis por elevar os níveis de GSH como observado num tempo maior de tratamento das células com a chalcona (LIU *et al.*, 2007).

Também foi observado por Kachadourian *et al.* (2012) em células MCF-7 (câncer de mama) tratadas com uma chalcona com grupamentos nitro (posição 2) e metoxil (posições 2' e 6') na dose de 10 μ M por 24h, o aumento dos níveis de GSH e da expressão da formação da holoenzima glutamato cisteína ligase. Foi observado também neste estudo o aumento da atividade de Nrf2 e com esses resultados os autores sugeriram que a chalcona induz uma resposta adaptativa ao estresse oxidativo por ativar, principalmente, a via Keap1/Nrf2.

2.4.3 Relação estrutura – atividade

Nos flavonóides em geral, o grupamento hidroxila aromático possui caráter redutor que leva a redução de radicais livres reativos, produzindo radical fenoxila, que pode ser estabilizado por ressonância. A característica antioxidante desses polifenóis é influenciada especialmente pela posição dos grupamentos hidroxilas ao redor dos anéis (SUN *et al.*, 2002).

Alguns estudos mostram diferenças de efeitos promovidos pela presença desses grupamentos em diferentes posições no anel básico das chalconas. Algumas substituições podem conferir maior efeito às chalconas e estudos têm sido desenvolvidos com intuito de identificar compostos com efeitos biológicos mais pronunciados através de substituições e adições de novos grupamentos na cadeia lateral, como bromo, cloro, nitro, metoxil, hidroxil, entre outros (ECHEVERRIA *et al.*, 2009, TRISTÃO, 2008; BATOVSKA *et al.*, 2009; NOWAKOWSKA, 2007).

A adição de grupamentos metóxi no anel A tem sido relacionados com o aumento da citotoxicidade de chalconas (NEPALI *et al.*, 2011). Duas chalconas polimetoxiladas e com grupamentos OH (posição 3) ou NH₂ (posição 3) sintetizadas a partir da tangeretina (5,6,7,8-tetrametoxi-2-(4-metoxifenil)-4H-1-benzopiran-4-ona), uma flavona presente em frutas cítricas, apresentaram citotoxicidade (método do MTT) em células KB (carcinoma bucal) nas doses de IC₅₀ de 0,017 e 0,031 µM, respectivamente, após 72 horas de tratamento (Quintin *et al.*, 2009).

Echeverria *et al.* (2009) observaram que a 2'-hidroxichalcona, uma chalcona sintética, na dose de 50 µM por 24 horas inibiu em 50% a proliferação de células HepG2.

Quanto a adição do grupamento nitro em chalconas substituídas, Winter *et al.* (2010) observaram em células L1210 (leucemia) que uma chalcona derivada de 2-naftilcetofenona com o grupamento 3 nitrofenil no anel B, após 24 horas de incubação apresentou IC₅₀ de 24 µM, e portanto, menor que a chalcona que possuía somente o grupamento fenil na mesma posição (37 µM). Os autores verificaram fato semelhante após 48 de tratamento, sendo o IC₅₀ de 13 e 20 µM para a chalcona nitrada e a substituída apenas com o grupamento fenil, respectivamente.

Pelo fato dos efeitos das chalconas serem observados em concentrações muito baixas (micromolares e até nanomolares) e por apresentarem baixa toxicidade quando presentes no plasma, faz deste grupo de moléculas fontes promissoras de novos medicamentos (OPLETALOVA *et al.*, 2003; YADAV *et al.*, 2011).

2.4.3.1 Chalconas Nitradas

A presença de diferentes grupamentos em chalconas conferem diferentes atividades biológicas como citado anteriormente, porém muito pouco se conhece sobre os efeitos de chalconas nitradas. Atualmente estudos envolvendo chalconas nitradas têm mostrado efeitos similares aos da insulina. Alberton *et al.*, (2007) verificaram em ratos hiperglicêmicos que chalconas com grupamentos nitro (posições 4' e 3') na dose de 10mg/kg (administradas por gavagem) levaram a um efeito hipoglicemiante, causando redução nos níveis de glicose sérica nestes animais.

Damazio *et al.*, (2009) avaliaram duas chalconas nitradas sintetizadas a partir da 3,4-metilenedioxichalcona como potenciais secretagogos de insulina *in vivo*. Estes autores observaram que quando administradas chalconas com grupamentos nitro nas posições 3' e 4' juntamente com glucose em ratos Wistar machos hiperglicêmicos, a secreção de insulina nesses animais foi significativamente aumentada (325% e 265%) em relação aos controles que recebiam somente glucose.

A 3-nitro-2'-benziloxichalcona, análogo sintético da 2'-benziloxichalcona estimulou a captação de glicose em células adiposas 3T3-L1 nas doses entre 6,25 a 10 μ M de maneira dependente da dose. Os resultados sugeriram que esse composto possui efeito estimulatório na via de sinalização da insulina e pode funcionar como um sensibilizador de insulina, assim como do agonista de PPAR γ (receptor ativado por proliferadores de peroxissoma gama) (KAMEI *et al.*, 2003).

Também foi observado que a adição do grupamento nitro melhora o efeito antileishmanicida de chalconas. A 2',6'-dihidroxi-4'-methoxichalcona (DMC) é uma chalcona extraída da inflorescência do vegetal *Piper aduncum* (matico ou pimenta-de-macaco), encontrada no estado do Paraná e na região

sudeste onde é utilizada para tratar inflamações e dor de estômago. Verificou-se que esta chalcona possui IC_{50} de 25 μM para a atividade antileishmanicida, entretanto, ao ser adicionado o grupamento nitro na posição 3 do anel B, o valor de IC_{50} passou para 0,7 μM . Testes realizados *in vivo* (camundongos infectados) mostraram que esta chalcona nitrada também foi mais eficaz que a droga Pentostan, utilizada como tratamento convencional (BOECK *et al.*, 2006).

Até o presente momento ainda não são conhecidos os efeitos de nitrochalconas sem outros grupamentos substituintes em células tumorais, em especial sobre células HepG2. A 3-nitrochalcona (figura 9), objetivo de estudo deste trabalho, é um derivado sintéticos da chalcona (1,3-difenil-2-en-1-ona) e seus efeitos antitumorais ainda não são conhecidos.

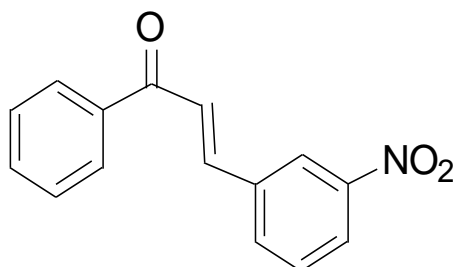


FIGURA 9: ESTRUTURA DA 3-NITROCHALCONA.
Fonte: O autor (2013).

3. OBJETIVOS

Tendo em vista a alta incidência e a agressividade do hepatocarcinoma, o impacto mundial que representa para saúde pública e a baixa eficácia dos tratamentos convencionais aliados aos efeitos colaterais, há uma forte necessidade de buscar tratamentos mais eficazes, mais seletivos e que proporcionem menos efeitos colaterais aos pacientes. Novas pesquisas têm sido desenvolvidas com esse intuito e os flavonóides têm mostrado resultados promissores na prevenção e tratamento de diversos tipos de neoplasias.

Sabendo-se que as nitrochalconas com diferentes grupamentos têm demonstrado efeitos biológicos mais acentuados quando comparadas com chalconas semelhantes não nitradas e que, além disso, não são conhecidos os efeitos de nitrochalconas sem outros grupamentos na sua estrutura sobre linhagens tumorais, em especial, sobre células HepG2, torna-se importante estudar o efeito da 3-nitrochalcona sobre estas células, visando a possibilidade de aplicação deste flavonóide no tratamento do CHC.

O objetivo geral deste trabalho é estudar os efeitos da 3-nitrochalcona em células de hepatoma humano (HepG2) com a finalidade de contribuir para o entendimento do seu mecanismo de ação. Para tanto, temos como objetivos específicos verificar os efeitos da 3-nitrochalcona sobre :

1. Viabilidade celular
2. Progressão do Ciclo Celular
3. Mecanismo de Morte celular
4. Níveis de ERO intracelular
5. Viabilidade celular na presença de NAC
6. Expressão das enzimas antioxidantes e atividade da catalase

4. ESTRATÉGIA EXPERIMENTAL

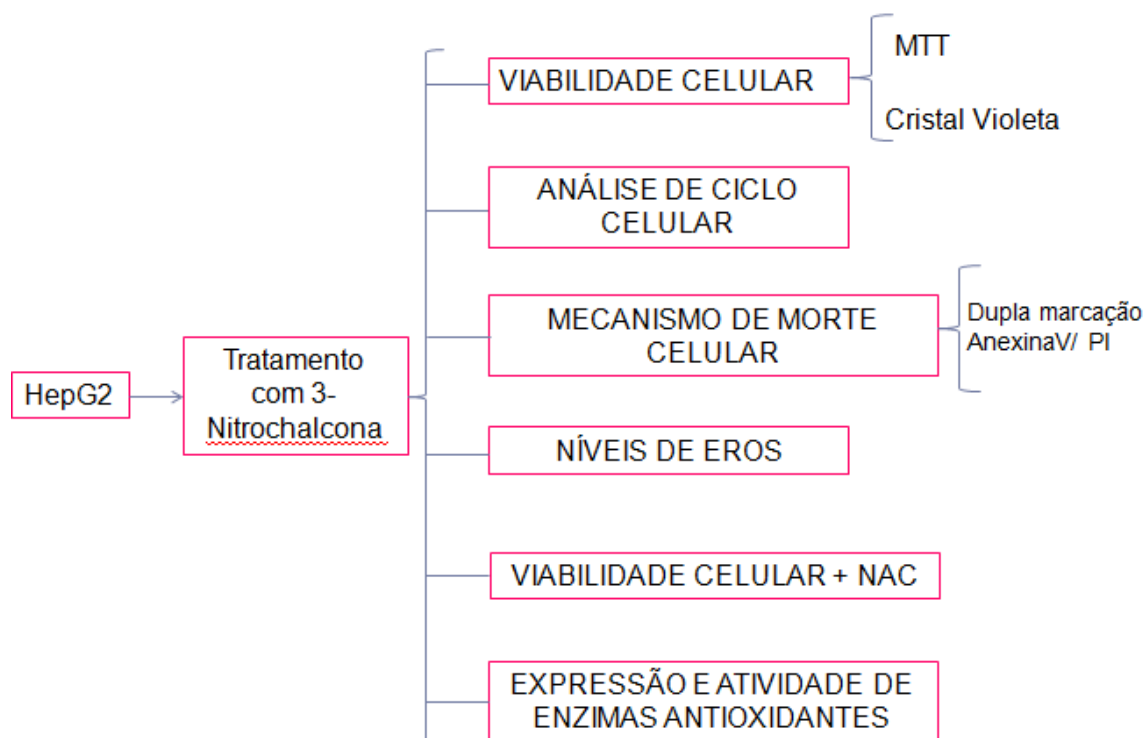


FIGURA 10: FLUXOGRAMA EXPERIMENTAL.

FONTE: O Autor (2013)

5. MATERIAIS E MÉTODOS

5.1 REAGENTES

DCFDA, iodeto de propídeo, DMSO, soro fetal bovino, DEMEM alta glucose, gentamicina, RNaseA, antimicina, e Tris foram adquiridos da Sigma Chemical Co. (EUA). Hidróxido de potássio, cloreto de potássio, fosfato monobásico de potássio, fosfato dibásico de potássio, ácido clorídrico, foram adquiridos da Merck do Brasil.

Os demais reagentes utilizados são do melhor grau analítico comercialmente disponível. As soluções dos reagentes foram preparadas com água deionizada através de sistema purificador Millipore Milli Q.

5.2 PREPARO DA 3-NITROCHALCONA

A chalcona foi sintetizada pelo Professor Dr. Alfredo Ricardo Marques de Oliveira do Departamento de Química da UFPR e gentilmente cedida para a realização deste trabalho.

Para a solução estoque a 3-nitrochalcona foi solubilizada em dimetilsulfóxido (DMSO). As concentrações de chalcona utilizadas foram aquelas determinadas em experimentos preliminares: 2,5; 5; 7,5; 10; 15 e 20 μM . Para a realização dos experimentos de viabilidade celular, as células foram incubadas durante 24, 48 e 72 horas com as diferentes concentrações da chalcona (2,5 - 20 μM) e posteriormente foram selecionadas as doses de 10, 15 e 20 μM no tempo de 48 horas para os demais experimentos. Foram realizados em todos os experimentos controles com e sem o uso do solvente DMSO.

5.3 CÉLULAS

Foram utilizadas células da linhagem HepG2 (células de hepatoma humano) cedidas pela Professora Dra. Mari Sogayar do Departamento de Química da USP. As células foram cultivadas no laboratório de Oxidações

Biológicas e Cultivo Celular do Departamento de Bioquímica e Biologia Molecular da UFPR.

5.4 ESTERILIZAÇÃO DE MATERIAIS

Todo material de vidro utilizado para os procedimentos de cultivo de células foram esterilizados em autoclave a 120°C, durante 45 minutos, a 1 atm. Material de plástico como garrafas, tubos cônicos e rodos foram esterilizados em microondas, durante 40 minutos na potência média.

5.5 SOLUÇÕES E MEIOS DE CULTURA

5.5.1 Solução Salina Tamponada (PBS)

A solução salina-fosfato tamponada (PBS) foi preparada como solução estoque concentrada 5 vezes. Foi esterilizada em autoclave (120°C, 45 minutos) e armazenada a 4°C. Para o uso, a solução foi diluída com água ultra pura estéril, recém obtida.

5.5.2 Meio de Cultura

O meio de cultura utilizado foi o DMEM – alta glucose, que é uma modificação do Meio Basal Eagle (BME) que contém quatro vezes a concentração de aminoácidos e vitaminas. O meio foi reconstituído em água ultra pura e esterilizados em membrana de acetato-nitrato de celulose com poros de 0,22 µm (Millipore) sob pressão em aparelho Sartorius. Após o procedimento de filtração, alíquotas do meio foram deixadas em estufa a 37 °C, para o acompanhamento de eventuais contaminantes. O meio foi mantido em geladeira a 4°C. Para os experimentos, o meio foi suplementado com 10% de soro bovino fetal estéril inativado. Foi utilizado HEPES 20 mmol/L (pH 7) e o pH do meio ajustado com quantidades adequadas de solução de bicarbonato de sódio para pH 7,4 e então esterilizado em autoclave a 120°C por 45 minutos.

5.5.3 Solução de Tripsina-EDTA

A solução de tripsina-EDTA foi constituída de NaCl 137 mmol/L, KCl 5,4 mmol/L, glucose 5 mmol/L, Na₂HPO₄ 0,42 mmol/L, KH₂PO₄ 0,44 mmol/L, NaHCO₃ 2,3 mmol/L, EDTA 0,53 mmol/L, 50 mg% tripsina (1:250) e 2 mg% de vermelho de fenol, sendo o pH ajustado para 7,4 com bicarbonato de sódio. A solução foi esterilizada por filtração e armazenada a -20°C.

5.5.4 Solução de iodeto de propídeo (PI)

A solução desnaturante de iodeto de propídeo foi preparada em 200 mL de PBSA usando 50 µg/mL de PI (estoque: 1 mg/mL de água ultra-pura); 0,1% m/v de citrato de sódio; 0,1% v/v de Triton X-100. Sendo armazenado a 4°C ao abrigo da luz.

5.5.5 Solução tampão de ligação Anexina V- FITC

O tampão de ligação de Anexina V-FITC foi preparado em 300 mL de HEPES 10 mmol/L (pH 7.4) contendo NaCl 150 mmol/L, KCl 5 mmol/L, MgCl₂ 1 mmol/L e CaCl₂ 1,8 mmol/L. O tampão foi conservado a 4°C.

5.6 PROCEDIMENTOS DE CULTIVO

As células foram cultivadas em garrafas estéreis com meio DMEM - alta glucose, acrescido de soro fetal bovino 10% e gentamicina. As culturas foram mantidas em estufa (Sanyo), em atmosfera contendo 5% de CO₂, com umidade controlada de 95% e temperatura constante de 37°. Os repiques foram realizados utilizando-se solução de tripsina-EDTA para soltar as células na proporção de 1:3. Para armazenamento das linhagens, as células (10⁶ células/mL) foram suspensas em meio de cultura e DMSO 10% (v/v), congeladas inicialmente a -70°C e mantidas durante 48 horas, a seguir estocadas em nitrogênio líquido (-196°C). Para uso as células foram descongeladas a 37°C e colocadas em garrafas pequenas (50mL) contendo meio adequado como já descrito. Após adesão das células à superfície da

garrafa (~3h), o meio foi trocado, eliminando-se o meio de congelamento contendo o DMSO e eventuais células mortas. A monocamada de células foi diariamente observada em microscópio invertido (Olympus, modelo CK2).

5.7 ENSAIOS EM CÉLULAS

5.7.1 Viabilidade de células HepG2 verificados pelo método do MTT

A viabilidade celular foi testada em células HepG2 pelo método do MTT. O ensaio do MTT é baseado na redução de MTT à formazan, um produto azul púrpura formado através da atividade de redutases, enzimas mitocondriais presentes em células viáveis. O sal de formazan é posteriormente solubilizado em DMSO para quantificação em 550 nm. A leitura das absorbâncias foi realizada em leitor de microplacas (TECAN-Infinite M200).

As células foram desaderidas das garrafas de cultivo assepticamente, contadas e plaqueadas em placas de 96 poços com aproximadamente 1×10^4 células por poço. Após a aderência (24 h), foram retirados 200 μ L do sobrenadante e adicionada a 3-nitrochalcona nas suas diferentes concentrações (2,5 μ M – 20 μ M), nos tempos de 24, 48 e 72 horas. O volume final foi completado com meio DMEM - alta glucose completo. Após o término dos tratamentos, o sobrenadante foi retirado e adicionou-se 200 μ L da solução de MTT (HBSS + 5 mg/ml de MTT), a seguir foi feita incubação por 37°C, 3 h e 5% de CO₂. Após 3h retirou-se o MTT que não reagiu, adicionou-se 200 μ L de DMSO para solubilizar os cristais formazan formados. Os resultados foram obtidos em leitor de microplacas (TECAN-Infinite M200) em 540 nm contra um branco de DMSO. Os resultados foram expressos em percentagem de células viáveis em relação ao controle com DMSO(100%).

5.7.2 Efeitos da 3-nitrochalcona na viabilidade de células HepG2 verificados pelo método do Cristal Violeta

Devido a possíveis interferências dos flavonóides sobre as atividades de enzimas mitocondriais que poderiam afetar os resultados utilizando o método do MTT, torna-se importante também a realização da medida pelo método do

Cristal Violeta para confirmar e comparar os resultados obtidos pelas duas técnicas. O ensaio cristal violeta é útil para obter informação quantitativa sobre a densidade relativa de células aderidas em placas de cultura. As células aderidas são as viáveis (SANTOS *et. al.*, 2005)

As células foram plaqueadas em placas de 96 poços, $1,0 \times 10^4$ células por poço, mantidas por 24 h em estufa de CO_2 a 37°C para adesão e aumento no número de células. Após a aderência (24 h), foram retirados 200 μL do sobrenadante e adicionada a 3-nitrochalcona nas suas diferentes concentrações (2,5 μM – 20 μM), por 48 horas de tratamento. O volume final foi completado para 200 μL com meio DMEM alta glucose completo. Após o término do tratamento, o sobrenadante foi retirado, as células foram lavadas com PBS e fixadas com 50 μL de metanol por 10 min. Após fixadas, as células foram coradas com 50 μL cristal violeta 0,2% em etanol 2% por 2 min. O cristal violeta foi retirado e as células lavadas exaustivamente (5x) com PBS, eluídas com 200 μL de citrato de sódio 0,05 mol/L em etanol 50% por 10min e realizada homogeneização das amostras. Foi utilizado citrato de sódio em etanol 50% como branco para as determinações de absorvância em leitor de microplaca microplacas (TECAN-Infinite M200) em 540 nm. Os resultados foram expressos em percentagem de células viáveis em relação ao controle (100%). O cálculo da viabilidade proporcional foi determinado em relação à absorvância média dos controles com o DMSO.

5.7.3 Análise do Ciclo Celular

Células HepG2 ($1,2 \times 10^5$ células) foram plaqueadas em placas de 12 poços. As células foram tratadas com as diferentes concentrações da 3-nitrochalcona por 48 horas (37°C sob atmosfera de 5% de CO_2). A seguir, as células foram lavadas com PBS, tripsinizadas, coletadas por centrifugação, ressuspensas em 1 mL de PBS duas vezes, coradas com iodeto de propídeo e tratadas com RNaseA. O conteúdo de DNA de cada amostra foi analisado utilizando um citômetro de Fluxo (BD FACScalibur).

5.7.4 Análise de morte celular

Foram plaqueadas 1×10^6 células em placas de plástico de 60 mm em meio DMEM alta glucose suplementado com 10% de SFB. Após 24 horas de adesão, o sobrenadante foi retirado e as células foram tratadas com a 3-nitrochalcona nas concentrações de 10, 15 e 20 μM por 48 horas (37°C sob atmosfera de 5% de CO_2). A seguir, procedeu-se a coleta da amostra para análise. Primeiramente foi coletado o sobrenadante e colocado em um tubo de centrífuga. Após a retirada e coleta do meio, as células foram lavadas duas vezes com PBS, sendo que o PBS também foi adicionado ao tubo de coleta. As células aderidas foram tripsinizadas, e a suspensão obtida foi adicionada ao mesmo tubo anteriormente citado. O tubo contendo a amostra para análise foi centrifugado (3.000 g por 2-3 minutos), e o sobrenadante foi descartado, o pellet de células foi ressuspensão em 0,2 mL de tampão de ligação Anexina V-FITC, as amostras foram centrifugadas (3.000 g por 3 minutos). O tampão de ligação foi retirado e sobre o pellet adicionou 100 μL de tampão de ligação contendo anexina V-FITC diluída (1:1000). As amostras foram incubadas no escuro, por no mínimo 30 minutos. Após foi adicionado 0,3 mL de PBS e 20 μL de solução de iodeto de propídeo não desnaturante logo antes da análise no citômetro de fluxo.

No aparelho FACScalibur (BD) os 10.000 eventos foram adquiridos usando os filtros FL1 (anexina V) e FL2 (iodeto de propídeo), e as análises foram feitas usando um gráfico do tipo dot-plot (eixo X: filtro FL1, eixo Y: filtro FL2) pelo software WinMDI version 2.9 (desenvolvido por Joseph Trotter, disponível na Web).

5.7.5 Níveis de ERO Intracelular

As mudanças relativas na geração de EROS intracelular em células HepG2 foram monitoradas através de uma sonda fluorescente, DCFH-DA (LABEL *et al.*, 1992). DCFH-DA difunde-se através da membrana celular e prontamente é hidrolisada por esterases intracelulares para a não fluorescente 2', 7'-diclorofluorescina (DCFH), que depois é rapidamente oxidada a altamente fluorescente 2', 7'-diclorofluoresceína (DCF), na presença de EROS. A

intensidade de fluorescência do DCF é proporcional à quantidade de EROS formada intracelularmente (Shen *et al.*, 1996). Para o ensaio, as células foram plaqueadas (1×10^4 células/poço) em placas de 96 poços, deixadas por 24 horas em estufa de CO₂ a 37°C para aderirem. Após os tratamentos no tempo e nas concentrações definidas, o meio foi retirado e adicionado 5µL da solução de DCF-DA (2 mmol/L) e 200 µL de PBS. Como controle positivo foi utilizado peróxido de hidrogênio (H₂O₂) na concentração de 200 µM dissolvido em PBS, com volume total de 200 µL por poço. Então foi deixado incubando em estufa de CO₂ a 37°C por 30 minutos. A fluorescência foi monitorada em 480 nm de excitação, e 520 nm de emissão.

5.7.6 Viabilidade celular com N-acetilcisteína (NAC)

Para os ensaios de viabilidade na presença de NAC, foi utilizado o método do MTT, assim como foi descrito do item 5.7.1, realizado o pré-tratamento com NAC (5 e 10 mM) por 2 horas, retirado o sobrenadante e realizado o tratamento com a 3-nitrochalcona (10, 15 e 20 µM). Os resultados foram expressos como percentagem em relação ao controle.

5.7.7 Avaliação da expressão das enzimas antioxidantes

5.7.7.1 PCR Real Time

A técnica de RT-PCR possibilita a análise de expressão genica. A síntese de DNA é realizada com uma transcriptase reversa que atua em RNA total ou numa fração enriquecida de RNA poliadenilado e sintetiza uma cadeia de DNA complementar (cDNA). A reação de PCR é feita com uma polimerase de DNA, tendo como molde o cDNA da reação anterior. Para que cada uma dessas enzimas atue, é necessária a presença de iniciadores de síntese (“primers”) cuja sequência vai levar à especificidade do fragmento amplificado. Na reação da transcriptase reversa foram usados “primers” oligo(dT) e oligonucleótidos de constituição aleatória. No PCR subsequente são sempre usados “primers” específicos para o gene em análise.

5.7.7.2 Isolamento de RNA e síntese de cDNA

As células foram plaqueadas em uma densidade de 1×10^6 células por 60 milímetros da placa. Após a incubação durante 24 horas, as culturas foram tratadas com a 3-nitrochalconas nas concentrações e tempo determinados. O RNA total foi isolado usando o kit de isolamento spin Mini RNA (Qiagen), de acordo com as instruções do fabricante e armazenadas a $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$. Um micrograma de RNA foi transcrito reversamente usando oligo (dT) e Superscript III Reverse Transcriptase (Invitrogen). A síntese do cDNA foi realizada de acordo com as instruções do fabricante e o cDNA resultante foi armazenado a $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$.

5.7.7.3 Quantificação dos níveis de mRNA por real-time RT-PCR

Usando cDNAs como modelo, PCR quantitativo em tempo real foi realizado utilizando o *SYBR Green PCR Master Mix (Applied Biosystems)* em um *StepOnePlus™ Real-Time PCR Detection System (Applied Biosystems)*, de acordo com as instruções do fabricante, utilizando-se primers específicos para genes humanos MnSOD, CAT, GPx1. Um ciclo de dissociação foi realizado após cada corrida para verificar se houve amplificação não-específica ou contaminação. Os níveis de expressão de mRNA foram normalizados utilizando o software de 3,4 geNorm, e os correspondentes níveis de expressão gênica HPRT, HMBS e GAPDH. Níveis de expressão relativa foram estimados utilizando o método descrito no Pfaffl, 2001. Conjuntos de *primers* específicos foram desenhados, utilizando o software Primer Express (Applied Biosystems), e validadas através de BLAST e BLAT, e suas seqüências são mostradas na Tabela 1.

Tabela 1 - Seqüências nucleotídicas dos primers utilizados para RT- PCR quantitativo em tempo real

Gene	Primers oligonucleotídeos
hMnSOD	F: 5' - GGACACTTACAAATTGCTGCTTGT - 3'
	R: 5' - AGTAAGCGTGCTCCCACACAT - 3'
	F: 5' - GATAGCCTTCGACCCAAGCA - 3'

hCAT	R: 5' - ATGGCGGTGAGTGTCAGGAT - 3'
	F: 5' - TGCTGGCCTCCCCTTACAG - 3'
hGPx1	R: 5' - GCACACATGGCGCAATTG - 3'
	F: 5'-ACCCACTCCTCCACCTTTGA-3'
hGAPDH	R: 5'-CTGTTGCTGTAGCCAAATTCGT-3'
	F: 5'-GAACGTCTTGCTCGAGATGTGA-3'
hHPRT	R: 5'-TCCAGCAGGTCAGCAAAGAAT-3'
	F: 5'-TGGACCTGGTTGTTCACTCCTT-3'
hHMBS	R: 5'-CAACAGCATCATGAGGGTTTTTC-3'

5.7.8 Determinação da atividade da catalase

As células (1×10^6) foram incubadas nos tempos e doses previamente determinadas, lavadas com PBS para eliminar células mortas, foram desaderidas com tripsina, centrifugadas 2000 rpm por 3 min, ressuspensas em PBS e sonicadas em gelo por três vezes (20V/20s). A solução foi centrifugada por 10 minutos a 13000 rpm a 4°C em microcentrífuga e o sobrenadante utilizado para os ensaios de atividade enzimática. Para o experimento foi utilizado espectrofotômetro Shimadzu UV-2450 e a atividade da catalase foi determinada pela queda na absorvância (240 nm) correspondente ao consumo peróxido de hidrogênio, conforme previamente descrito por Aebi (1984). Foi utilizado um sistema de reação constituído de tampão fosfato 50 mmol/L (pH7), H_2O_2 10 mmol/L e o extrato celular de HepG2 100 μg de proteína. mL^{-1} . O ensaio foi iniciado pela adição de H_2O_2 e acompanhado durante 5 minutos. Os resultados expressos como porcentagem em relação ao controle, foram calculados considerando-se o coeficiente de extinção molar do H_2O_2 ($43,6 \text{ mol}^{-1} \cdot L \cdot cm^{-1}$).

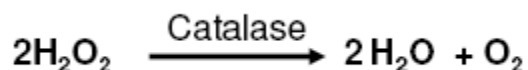


FIGURA 11: REAÇÃO DA CATALASE

FONTE: O Autor (2013).

5.7.9 Determinação da dosagem de proteínas

A dosagem de proteína foi realizada através de metodologia descrita por Bradford (1976), utilizando soluções de BSA como padrão nas concentrações: 0,0625; 0,125; 0,25; 0,5; 1 mg/ml

5.7.10 Análise Estatística

Os resultados foram expressos como média \pm desvio padrão e submetidos à análise de variância (ANOVA) e teste de Tukey para comparação das médias. Foram considerados estatisticamente significativos os valores comparados ao nível de significância de $p < 0,05$.

6. RESULTADOS E DISCUSSÕES

6.1 EFEITOS DA 3-NITROCHALCONA NA VIABILIDADE DE CÉLULAS DE CARCINOMA HEPATOCELULAR (HepG2).

6.1.1 Efeitos da 3-nitrochalcona sobre a viabilidade de células HepG2 verificados pelo método do MTT.

Para verificar os efeitos da 3-nitrochalcona sobre a viabilidade de células HepG2 as células foram tratadas com doses entre 2,5; 5; 7,5; 10; 15 e 20 μM do flavonóide nos tempos de tratamento de 24, 48 e 72 horas. A figura 12 demonstra os efeitos da 3-nitrochalcona sobre a viabilidade de células HepG2 utilizando-se o método do MTT. Quando realizado o tratamento das células HepG2 com doses de 10, 15 e 20 μM da 3-nitrochalcona por 24 horas, observou-se redução de 9, 22 e 44% da viabilidade celular respectivamente, quando comparados com o controle no qual foi utilizado somente o veículo da droga (DMSO). Nas doses menores que 10 μM da 3-nitrochalcona não foram observadas alterações celular estatisticamente significativas após 24 horas de tratamento. No tempo de tratamento de 48 horas, verificou-se redução de 10, 16, 49 e 55% da viabilidade celular nas concentrações de 7,5; 10; 15 e 20 μM , respectivamente. Após o tratamento de 72 horas, observou-se redução da viabilidade celular de 25, 47, 88 e 94% nas doses de 7,5; 10; 15 e 20 μM , respectivamente. Nas demais doses testadas não se verificou redução estatisticamente significativa da viabilidade celular.

Os resultados obtidos demonstram que a 3-nitrochalcona é capaz de reduzir a viabilidade de células HepG2 de maneira dependente do tempo e da dose de tratamento. A partir dos resultados obtidos, foram definidas as doses e os tempos de tratamento para os próximos experimentos.

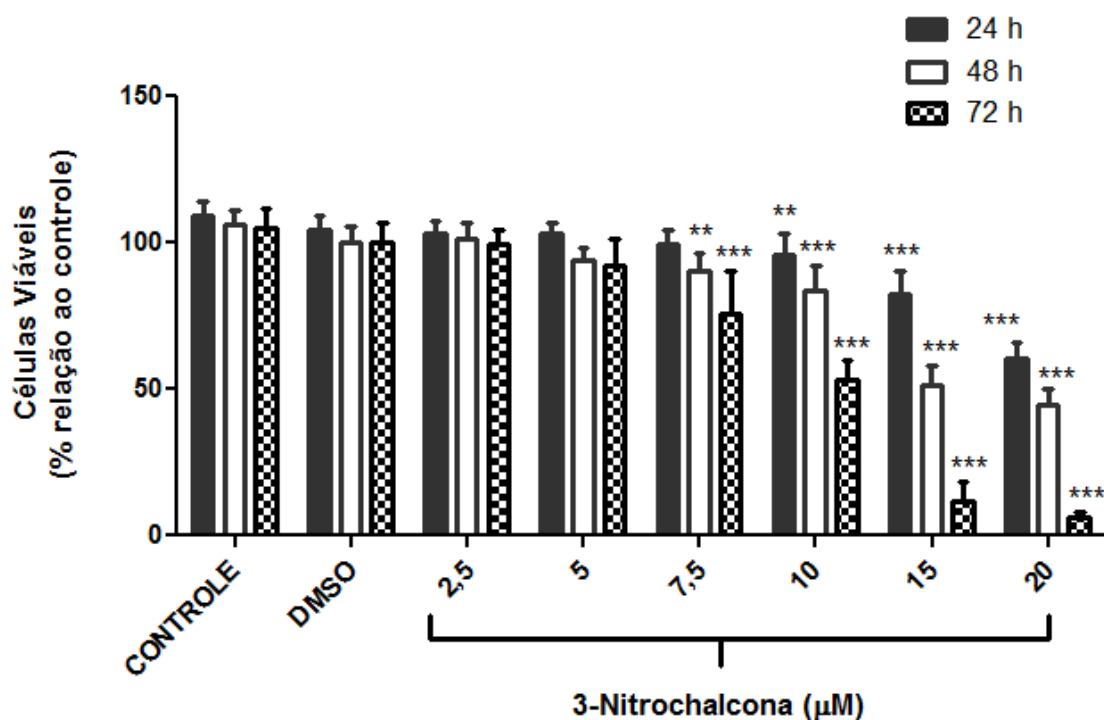


FIGURA 12: EFEITOS DA 3-NITROCHALCONA SOBRE A VIABILIDADE DE CÉLULAS HepG2 NOS TEMPOS DE 24, 48 E 72 HORAS UTILIZANDO O MÉTODO DO MTT

FONTE: O Autor (2011)

NOTA: Os experimentos foram realizados conforme procedimento descrito em Materiais e Métodos no item 5.7.1., em volume final de 200μL em meio DMEM alta glucose completo. No controle somente foi adicionado o meio e no controle com DMSO o volume utilizado foi de 0,1% (v/v). A 3-nitrochalcona foi incubada nas doses e tempos indicados a 37°C. Os resultados estão expressos como porcentagem em relação ao controle com DMSO (100%) e são média ± desvio padrão de três experimentos independentes realizados em triplicata. **p<0,01;***p<0,001.

6.1.2 Efeitos da 3-nitrochalcona sobre a viabilidade de células HepG2 verificados pelo ensaio do Cristal Violeta

Para efeito comparativo, foram realizadas análises dos efeitos da 3-nitrochalcona sobre a viabilidade celular utilizando o método Cristal Violeta. Para este experimento foram escolhidas as doses de 5, 10, 15 e 20 μM da 3-nitrochalcona no tempo de 48 horas e os resultados foram apresentados na figura 13.

O tratamento das células HepG2 com as doses de 10, 15 e 20 μM da 3-nitrochalcona por 48 horas promoveu redução da viabilidade celular de 17, 44 e

56%, respectivamente, confirmando assim os resultados obtidos através do método do MTT.

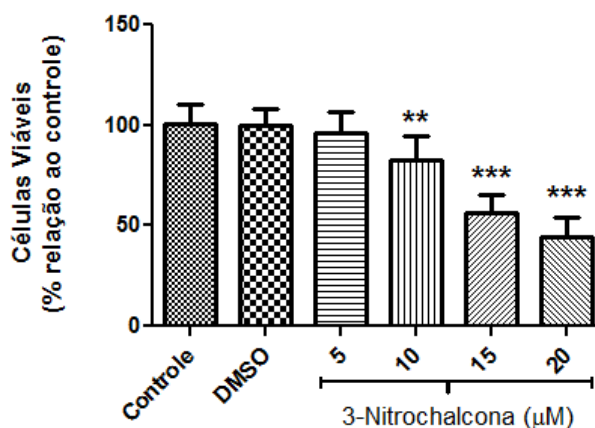


FIGURA 13: EFEITO DA 3-NITROCHALCONA SOBRE A VIABILIDADE DE CÉLULAS HepG2 NOS TEMPOS DE 48 HORAS UTILIZANDO O MÉTODO DO CRISTAL VIOLETA

FONTE: O Autor (2011)

NOTA: Os experimentos foram realizados conforme procedimento descrito em Materiais e Métodos no item 5.7.2 em volume final de 200µL em meio DMEM alta glucose completo, no controle somente foi adicionado o meio. A 3-nitrochalcona foi incubada nas doses indicadas por 48 horas a 37°C. O volume de DMSO utilizado foi de 0,1% (v/v). Os resultados estão expressos como percentagem em relação ao controle com DMSO (100%) e são média \pm desvio padrão de três experimentos independentes realizados em triplicata. **p<0,01; ***p<0,001.

Portanto, os resultados observados demonstram que a 3-nitrochalcona é capaz de promover redução da viabilidade de células HepG2 de maneira dependente da dose e do tempo de tratamento.

Echeverria *et al.* (2009) testaram, em células HepG2, 2'-hidroxichalconas sintéticas, contendo grupamentos metil nas posições 1, 2, 3 e 4, na dose de 50 µM por 24 horas e observaram que os flavonóides promoviam redução de aproximadamente 50% da viabilidade celular.

Em nosso laboratório estão sendo desenvolvidas pesquisas com a chalcona (1,3-difenil-2-en-1-ona) em células HepG2 e os resultados preliminares mostraram redução de aproximadamente 50% da viabilidade celular somente com doses 3 a 4 vezes maiores das que observadas com a 3-nitrochalcona (dados não mostrados). Valores semelhantes de redução de

viabilidade (aproximadamente 50%) utilizando a chalcona (10 µg/ml ou 48 µM e 6 µg/ml ou 29 µM) foram observados após 48 h de tratamento utilizando células MDA-MB-231 (câncer de mama) (HSU *et al.*, 2006) e células T24 (câncer de bexiga) (SHEN *et al.*, 2007), respectivamente.

Os resultados obtidos demonstram que a adição do grupamento nitro na estrutura básica das chalconas (1,3-difenil-2-en-1-ona) pode conferir efeitos citotóxicos mais intensos em células HepG2. Para a realização das análises posteriores as células foram tratadas com doses de 5 – 20 µM no tempo de 48 horas.

6.2 Análise do Ciclo Celular

Para avaliar se a 3-nitrochalcona causava alteração na progressão do ciclo celular foi realizada a análise de ciclo utilizando-se Iodeto de Propídeo (uma molécula intercalante de DNA). Os resultados apresentados na figura 14 representam os efeitos da 3-nitrochalcona sobre as porcentagens de células em cada fase do ciclo celular em relação aos controles. A partir do resultados obtidos, observou-se que o tratamento das células HepG2 com a 3-nitrochalcona nas doses de 10 e 15 µM resultou no aumento de 28 e 48% de células em SubG1, respectivamente, com concomitante diminuição da porcentagem de células em todas as demais fases do ciclo celular. Quando realizado o tratamento das células HepG2 com a 3-nitrochalcona na dose de 5 µM não foram verificadas alterações estatisticamente significativas do ciclo celular. Os resultados obtidos sugerem que o composto em estudo induz morte celular e que este efeito é dependente da dose utilizada.

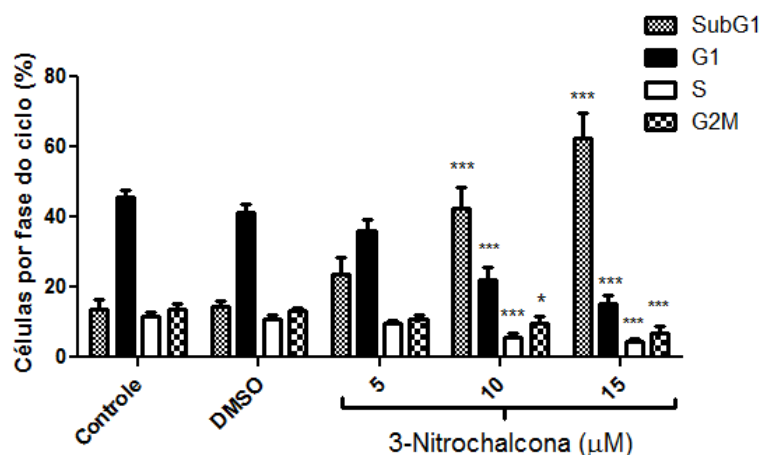


FIGURA 14: EFEITOS DA 3-NITROCHALCONA SOBRE AS FASES DO CICLO CELULAR EM CÉLULAS HepG2

FONTE: O Autor (2013)

NOTA: Os experimentos foram realizados conforme procedimento descrito em Materiais e Métodos no item 5.7.3 em meio DMEM alta glicose completo. A 3-nitrochalcona foi incubada nas doses indicadas (μM) por 48 horas a 37°C . Os resultados estão expressos como porcentagem em relação ao controle com DMSO (100%) e são média \pm desvio padrão de três experimentos independentes realizados em triplicata. * $p < 0,05$; *** $p < 0,001$.

Outros autores já verificaram alteração na progressão do ciclo celular utilizando chalconas. Moon *et al.* (2010) observaram o efeito da buteína (30 μM) na progressão do ciclo de células HepG2 e observaram aumento de 39% de células na fase G2/M em 24 horas de tratamento e aumento de 36% em SubG1 após 48 horas de tratamento.

Outras chalconas, dentre elas, a flavokavaína B (2'-hidroxi-4',6'-dimetoxichalcona) e a chalcona (1,3-difenil-2-en-1-ona) são capazes de induzir a parada do ciclo celular em G2/M em diferentes linhagens tumorais como em células HCT116 (carcinoma coloretal humano) (KUO *et al.*, 2010), e células MCF-7 e MDA-MB-231 (câncer de mama) (HSU *et al.*, 2006). Shen *et al.* (2007) mostraram que a chalcona (1,3-difenil-2-en-1-ona) obtida sinteticamente, na dose 6 $\mu\text{g/ml}$ (ou 28,8 μM) após 6 horas de tratamento em células T24 e HT-1376 (câncer de bexiga) aumentou em 22,1% e 19,2% a população de células na fase G2/M, respectivamente. Estes autores também observaram a expressão de reguladores chaves do ciclo celular e evidenciaram o aumento da expressão de p21, p57 e diminuição da expressão de ciclina A, ciclina B1 e da proteína Cdc2.

6.3 Análise da Morte Celular

Para avaliar se qual o mecanismo de morte celular causado pela 3-nitrochalcona em células HepG2, foi realizada a análise de citometria de fluxo utilizando dupla marcação com anexina-V FITC (que reconhece a fosfatidilserina) e iodeto de propídio (IP). Para esta análise a população de células que foi marcada somente com anexina foi considerada em apoptose, a que foi marcada com anexina e PI foi representada no gráfico como apoptose tardia e aquela marcada somente com o PI foi representada no gráfico como uma população de células que apresenta permeabilização de membrana.

Na figura 15 pode-se observar que após o tratamento das células HepG2 com a 3-nitrochalcona nas doses 15 e 20 μM houve redução de 24 e 37% da viabilidade celular, respectivamente. Observa-se também um aumento de 19 e 28% da porcentagem de células em apoptose após tratamento das células com a 3-nitrochalcona nas doses de 15 μM e 20 μM , respectivamente. Na dose de 20 μM , há um aumento de aproximadamente 16% da população de células em apoptose tardia.

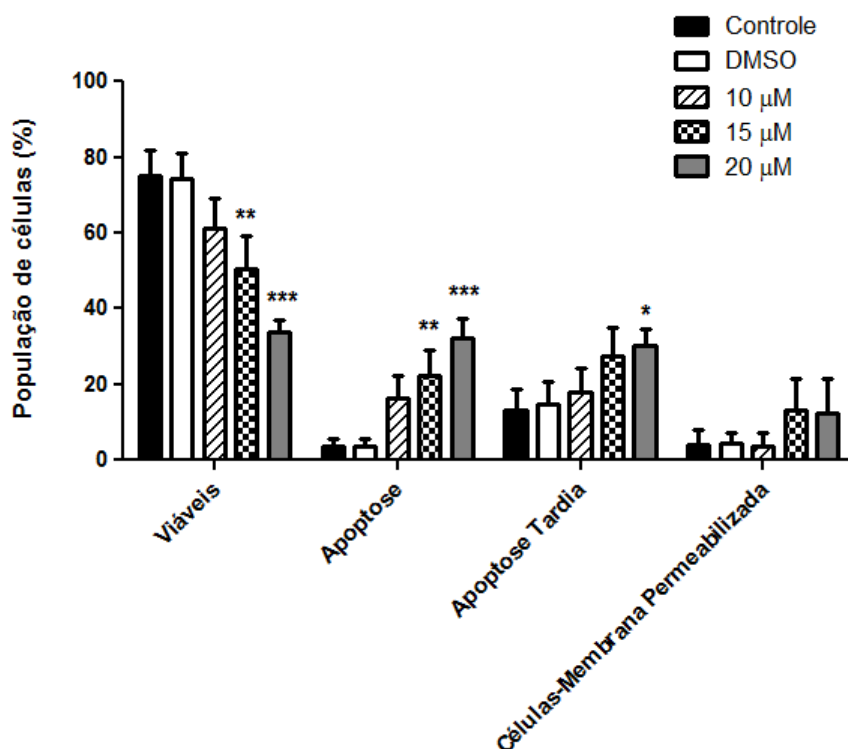


FIGURA 15: EFEITOS DA 3-NITROCHALCONA SOBRE A MORTE CELULAR.
FONTE: O Autor (2013)

Nota: Os experimentos foram realizados conforme procedimento descrito em Materiais e Métodos no item 5.7.4 em meio DMEM alta glicose completo. A 3-nitrochalcona foi incubada nas doses indicadas (μM) por 48 horas a 37°C . Os resultados estão expressos como porcentagem em relação ao controle com DMSO (100%) e são média \pm desvio padrão de três experimentos independentes realizados em triplicata * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$; *** $p < 0,001$.

Os resultados obtidos estão de acordo com aqueles encontrados na análise da viabilidade celular utilizando os métodos do MTT e Cristal Violeta que demonstram uma diminuição na viabilidade celular dependente da dose da 3-nitrochalcona sugerindo que o flavonóide pode induzir a morte celular por apoptose. Apesar dos resultados obtidos indicarem que a 3-nitrochalcona induz a morte celular por apoptose outras análises precisariam ser realizadas para se confirmar esta hipótese.

Algumas chalconas como chalcona, licochalcona-A, isobavachalcona, xantohumol, buteína e cardomomina (SZLISZKA *et al.*, 2010; OHTSUKI *et al.*, 2009; KIM *et al.*, 2008) podem induzir a apoptose através da via extrínseca e intrínseca (ORLIKOVA *et al.*, 2011). As chalconas: chalcona, licochalcona-A, isobavachalcona, xantohumol e buteína na dose de $50 \mu\text{M}$ promovem indução

da apoptose através da via extrínseca por aumentar os efeitos de TRAIL (TNF α related apoptosis-inducing ligand) em células LNCaP (câncer de próstata). (SZLISZKA *et al.*, 2010). Chalconas como a cardomomina e a buteína podem aumentar o efeito de TRAIL por induzirem aumento da expressão de receptores de morte (DR4 e/ou DR5) em células U937 (leucemia) (KIM *et al.*, 2008) e DLD1 (carcinoma coloretal) (OHTSUKI *et al.*, 2009).

Algumas chalconas podem induzir a apoptose através da via intrínseca por: diminuir a expressão de proteínas anti-apoptóticas (Bcl-xL e Bcl-2) e aumentar a expressão de proteínas pró-apoptóticas (Bax e Bak) em células DLD1 (carcinoma coloretal) (OHTSUKI *et al.*,) e HL-60 (leucemia) (KIM *et al.*, 2001); por reduzir o potencial de membrana mitocondrial em células T24 (células de bexiga) (Zi *et al.*, 2008), HeLa (carcinoma cervical) (HSU *et al.*, 2009), DU145 (cancer de próstata) (JUNG *et al.*, 2006) e MGC-803 (carcinoma gástrico) (MA *et al.*, 2001; LOU *et al.*, 2010); por aumentar a atividade da caspase-3 em células HL-60 (leucemia) (KIM *et al.*, 2001), IMR-32 e NB-39 (neuroblastoma) (NISHIMURA *et al.*, 2005), T24 (células de bexiga) (Zi *et al.*, 2008; TABATA *et al.*, 2005) e Jurkat (leucemia) (TABATA *et al.*, 2005).

Em células HepG2 após tratamento com 30 μ M de buteína (chalcona hidroxilada) por 48 horas foi observado o aumento 44% de células em apoptose, ativação da caspase-3, aumento da expressão de Bax (proteína pró-apoptótica) e diminuição da expressão de Bcl-2 (proteína anti-apoptótica) (MOOM *et al.*, 2010). Echeverria *et al.* (2009) observaram em células HepG2 que 2'-hidroxichalconas metoxiladas (nas posições 1, 2, 3 e 4) na dose de 200 μ M por 24 h induziram a apoptose através da ativação da caspase-9.

Shen *et al.* (2007) observaram a indução da apoptose através da via intrínseca em células de câncer de bexiga (T24 e HT-1376). Os autores observaram que o tratamento das células T24 e HT-1376 com a chalcona, na dose de 28,8 μ M por 48 horas, induziu 48,9% e 40,3%, respectivamente, de células em apoptose através do aumento da atividade das caspases-3 e 9, liberação de citocromo c para o citosol, aumento da expressão de Bax e Bak (proteínas pró-apoptóticas) e diminuição da expressão de Bcl-2 e Bcl-x (proteínas anti-apoptóticas).

Nossos resultados corroboram com dados observados na literatura que mostram que muitas chalconas induzem a morte de células tumorais por

mecanismos apoptóticos, entretanto, seriam necessários outros experimentos, como: avaliação da expressão de receptores de morte (DR4 e DR5), avaliação da atividade da caspase-3, liberação de citocromo c, expressão de enzimas pró e anti-apoptóticas, entre outros, para confirmar se o mecanismo da apoptose causado pela 3-nitrochalcona.

6.4 Avaliação dos níveis intracelulares de EROs

Uma das formas de induzir a morte celular por apoptose é através do aumento de espécies reativas de oxigênio (EROs) intracelular. Sabe-se que os flavonóides podem levar ao aumento de EROs em diversas linhagens tumorais (NAVARINI *et al.*, 2009; ROMAGNOLI *et al.*, 2009).

Para avaliar se a 3-nitrochalcona teria esse efeito foi utilizada uma sonda fluorescente, DCF-DA (2' -7' - diclorodihidrofluoresceína diacetato) como descrito no item 5.7.5. Os resultados demonstrados na figura 16 indicam que em células HepG2 após 48 horas de tratamento com a 3-nitrochalcona houve um aumento de 209% do nível de EROs somente na maior dose testada (20 μ M). Nas menores doses não foram observadas alterações nos níveis de ROS estatisticamente significativos em relação à condição controle.

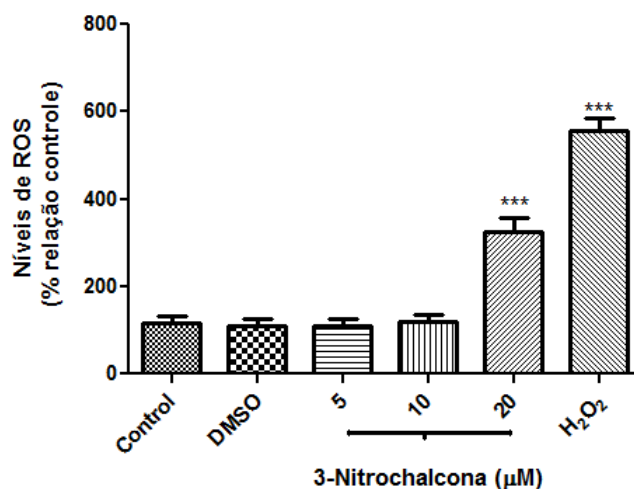


FIGURA 16: EFEITO DA 3-NITROCHALCONA SOBRE OS NÍVEIS INTRACELULARES DE EROs EM CÉLULAS HepG2 APÓS 48H DE TRATAMENTO

FONTE: O Autor (2013)

NOTA: Os experimentos foram realizados conforme procedimento descrito em Materiais e Métodos no item 5.7.5 em volume final de 200 µL em meio DMEM alta glucose completo, no controle somente foi adicionado o meio. O volume de DMSO utilizado foi de 0,1% (v/v). Como controle positivo) utilizou-se o H₂O₂ na concentração de 400 µM. Os resultados estão expressos como percentagem em relação ao controle com DMSO (100%) e são média ± desvio padrão de três experimentos realizados em triplicata. ***p<0,001.

Em nosso laboratório já foram observados os efeitos das flavonas, outra classe de flavonóides, sobre o aumento de EROs em células HepG2 e observou-se que o tratamento com a hispidulina nas doses de 50 e 100 µM no tempo de 48 horas induziu o aumento de 55 e 122% nos níveis de EROs, respectivamente (SCOPARO, 2012). O tratamento das células HepG2 com a apigenina na dose de 100 µM por apenas 20 minutos induziu aumento de aproximadamente 25% de EROs (VALDAMERI, 2012).

Winter *et al.* (2010) investigaram o efeito de três chalconas obtidas sinteticamente a partir da 2-naftillacetofenona com diferentes substituintes presentes no anel B (3-NO₂-fenil, 3-Cl-fenil, fenil) nas doses de IC₅₀ 23, 37 e 36 µM em células L1210 (leucemia linfoblástica) e observaram o aumento de 212, 156 e 240%, respectivamente, da produção de EROs. Quando as células foram co-incubadas com a 5000 U/m catalase por 24 horas, a produção de EROs foi

reduzida e observou-se um aumento da viabilidade celular de 21, 13 e 21%, respectivamente.

6.5 Viabilidade celular na presença de N-acetilcisteína (NAC)

Alguns autores descrevem os efeitos das chalconas na depleção da glutathiona reduzida (GSH) intracelular (KUO *et al.*, 2010; KACHADOURIAN; DAY, 2006; WINTER *et al.*, 2010; NAVARINI *et al.*, 2009; GUZY *et al.*, 2010). No intuito de avaliar se o aumento das espécies reativas de oxigênio observado (figura 16) estaria relacionado com uma possível depleção de GSH foi repetido o experimento de viabilidade celular realizando-se o pré-tratamento das células HepG2 com *N*-acetilcisteína (NAC) por 2 horas e, posteriormente, com a 3-nitrochalcona por 48 horas.

Os resultados demonstraram que quando realizado o tratamento das células HepG2 com 10 μ M da 3-nitrochalcona houve redução de 18% da viabilidade celular e não houve diferença estatisticamente significativa quando realizado o pré-tratamento com NAC 5 e 10 mM. O tratamento das células HepG2 com a 3-nitrochalcona na dose de 15 μ M promoveu redução de 51 % da viabilidade celular e não foi observada diferença estatisticamente significativa com o pré-tratamento com NAC 5 mM, entretanto, com o pré-tratamento com NAC 10 mM a redução da viabilidade celular foi de apenas 27%. Utilizando o tratamento das células HepG2 com a 3-nitrochalcona na dose de 20 μ M observou-se redução de 59% da viabilidade celular e quando realizado o pré-tratamento com NAC nas dose de 5 e 10 mM a redução da viabilidade caiu para 48 e 15%, respectivamente. Observa-se a partir desses resultados que o pré-tratamento das células HepG2 com NAC 10 mM promoveu aumento significativo da viabilidade celular após ação da 3-nitrochalcona na dose de 15 μ M e o pré-tratamento das células HeG2 com NAC 5 e 10 mM promoveu aumento estatisticamente significativo da viabilidade após ação da 3-nitrochalcona na dose de 20 μ M. Vale destacar que utilizando-se o pré-tratamento das células HepG2 com NAC 10 mM observou-se um aumento da viabilidade celular após a ação da 3-nitrochalcona na maior dose de 20 μ M (figura 17), entretanto esse valor não foi recuperado ao nível do controle.

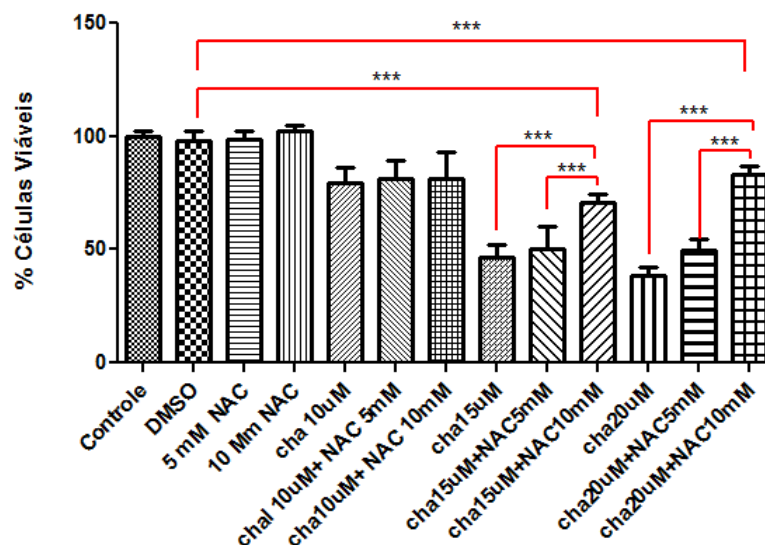


FIGURA 17: EFEITO DA 3-NITROCHALCONA E NAC SOBRE A VIABILIDADE DE CÉLULAS HepG2 APÓS 48 HORAS DE TRATAMENTO.

FONTE: O Autor (2013)

NOTA: Os experimentos foram realizados conforme procedimento descrito em Materiais e Métodos no item 5.7.6 em volume final de 200 µL em meio DMEM alta glucose completo, no controle somente foi adicionado o meio. A 3-nitrochalcona foi incubada nas doses indicadas (µM) por 48 horas a 37°C, com ou sem adição de NAC (5 e 10 mM) conforme indicado. O volume de DMSO utilizado foi de 0,1% (v/v). Os resultados estão expressos como percentagem em relação ao controle com DMSO (100%) e são média ± desvio padrão de três experimentos realizados em triplicata. Valores com diferenças estatisticamente significativas do controle ***p<0,001.

Os resultados sugerem que uma das possíveis causas da morte celular da linhagem HepG2 mediada pela 3-nitrochalcona pode ser devido ao aumento dos níveis de espécies reativas de oxigênio (observado na figura 16) com concomitante depleção dos níveis de glutathiona reduzida intracelular, pois, a adição de NAC, promoveu diminuição da percentagem de morte celular causada pela 3-nitrochalcona nas doses de 15 e 20 µM. Contudo, análises dos efeitos da 3-nitrochalcona sobre os níveis de GSH e GSSG precisariam ser realizados para confirmar esta hipótese.

Outros autores já verificaram depleção de glutathiona em presença de hidroxichalconas em células de leucemia (KACHADOURIAN; DAY, 2006;) e melanoma (NAVARINI *et al.*, 2009). NAVARINI *et al.* (2009) observou aproximadamente 75% de depleção de glutathiona (GSH) em células B16-F10

(melanoma) utilizando duas hidroxichalconas (grupamentos hidroxila nas posições 1 e 2 do anel A) na dose de 100 μM (24h).

As células tumorais quando submetidas ao estresse oxidativo podem sofrer adaptações como induzir o aumento da expressão de defesas antioxidantes, entretanto, possuem uma capacidade limitada para isto (WINTER *et al.*, 2010; KUMAR *et al.*, 2011; HOLLAND e FISHBEIN, 2010). Alguns autores sugerem que as chalconas podem promover efeitos citoprotetores em células tumorais dependendo da dose e do tempo de tratamento (LIU *et al.*, 2007; SIKANDER *et al.*, 2011).

Apesar de terem sido descritos na literatura aumentos de EROs após a ação de chalconas, também verificou-se que alguns destes compostos, por possuírem um domínio carbonil α,β -insaturado altamente eletrofílico, podem causar a ativação do fator de transcrição Nrf2 e induzir a expressão de enzimas antioxidantes (LIU *et al.*, 2007; FORESTI *et al.*, 2005). Além do estresse eletrofílico, o aumento na produção de espécies reativas de oxigênio também leva ao aumento da atividade de Nrf2 (TAGUCHI *et al.*, 2011). Desta forma, considerando os resultados obtidos de alteração de viabilidade celular com a presença de NAC uma perspectiva deste estudo seria verificar também a possibilidade de indução da expressão de enzimas do sistema antioxidante como a γ -glutamil cisteína ligase, envolvida na síntese da glutathiona.

Uma das possibilidades de mecanismo de ação da 3-nitrochalcona que poderia colaborar para o aumento dos níveis de EROs seria a diminuição da expressão e/ou atividade de enzimas antioxidantes. Por este motivo, o próximo passo foi avaliar o efeito da 3-nitrochalcona sobre os níveis de expressão de mRNA de enzimas antioxidantes e atividade da catalase.

6.6 Níveis de expressão de mRNA das enzimas antioxidantes e atividade da catalase

Os níveis de expressão das enzimas catalase (CAT), Mn-superoxido dismutase (MnSOD) e glutathiona peroxidase (GPx1), foram avaliados por RT-PCR em células HepG2 após o tratamento com a 3-nitrochalcona (10, 15 e 20 μM) por 48 horas. Os resultados obtidos estão representados na figura 18 e mostram os dados de expressão relativa de mRNA normalizados pelo

programa geNorm 3,4 software, utilizando três genes normalizadores HPRT, HMBS e GAPDH. Os resultados obtidos mostram que as células HepG2 tratadas com a 3-nitrochalcona nas doses de 15 e 20 μM apresentaram níveis menores (68 e 41%, respectivamente) da expressão de mRNA da catalase. A expressão das enzimas MnSOD e GPx não foi alterada de forma estatisticamente significativa apesar de ser possível perceber uma tendência ao aumento da expressão de mRNA de GPx na maior dose da 3-nitrochalcona utilizada (20 μM) (figura 18 A).

Foi avaliado também o efeito da 3-nitrochalcona sobre a atividade da catalase nas doses 10, 15 e 20 μM após 48 horas de tratamento e observou-se a redução estatisticamente significativa de 22 e 18% da atividade da enzima somente nas doses de 15 e 20 μM respectivamente, quando comparado ao controle (figura 18 B).

Cabe salientar, porém, que apesar de se ter verificado um aumento da expressão de mRNA da catalase com 20 μM da 3-nitrochalcona em relação a dose de 15 μM , este aumento não atingiu o nível do controle, e a atividade desta enzima foi reduzida de forma semelhante (aproximadamente 20%) nas duas doses (15 e 20 μM) (figuras 18 A e B) o que não foi suficiente para promover aumento da viabilidade das células HepG2.

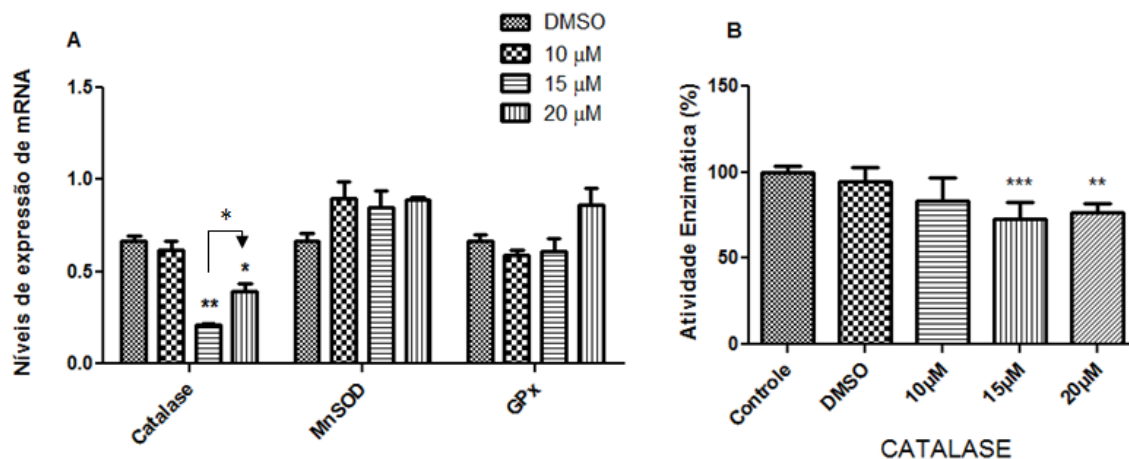


FIGURA 18: A) EFEITOS DA 3-NITROCHALCONA NOS DE EXPRESSÃO DE mRNA DA CATALASE, MnSOD E GPx. B) ATIVIDADE DA CATALASE

FONTE: O Autor (2013)

Nota: (A) Quantificação dos níveis de mRNA da enzimas antioxidantes: Catalase, MnSOD, GPx foi realizada segundo o item 5.7.7 de materiais e métodos após exposição de células HepG2 com apigenina (10-20 μM) por 48 horas. Os dados representam a média ± DP de três experimentos realizados em triplicata. ** p<0,005 e ***p<0,001. (B) Efeito da exposição de células HepG2 à 3-nitrochalcona (10-20 μM) por 48 horas na atividade da catalase. Os dados representam a média ± DP de três experimentos realizados em triplicata. A atividade da catalase foi realizada segundo o item 5.7.8 de materiais e métodos. Para catalase, controle 100% corresponde a 10 mM de H₂O₂ consumido por segundo por μg de proteína. **p<0,01 e *** p<0,001

Os resultados observados sugerem que a 3-nitrochalcona (15 e 20 μM) causa redução da expressão de mRNA e da atividade da catalase que poderiam contribuir para o aumento de H₂O₂ e, possivelmente, para redução da viabilidade de células verificadas nestas doses. Utilizando-se a dose de 20 μM da 3-nitrochalcona os resultados estariam de acordo com os que demonstram o aumento de EROs (figura 16) nesta mesma dose do flavonóide. Resultados semelhantes já foram observados em estudos com outros flavonóides em nosso laboratório onde a apigenina (uma flavona hidroxilada) na dose de 100 μM por 24 horas promoveu redução da expressão e atividade da catalase (VALDAMERI *et al.*, 2012).

Winter *et al.* (2010) testaram, em catalase isolada de fígado bovino, naftilchalconas com grupamento 3-NO₂-fenil e fenil nas doses de IC₅₀ de 23 e 36 μM, respectivamente, por 24 horas e observaram a diminuição de aproximadamente 15 e 10%, respectivamente, da atividade da enzima.

7. DISCUSSÃO FINAL

O carcinoma hepatocelular (CHC) é uma das neoplasias mais comuns no mundo. As infecções pelos vírus das hepatites B e C estão entre as principais causas desta doença e, a região sul, no Brasil está entre as regiões com maior número de casos notificados destas infecções (ACS, 2012; SVS, 2012). Os medicamentos utilizados para esse tipo de neoplasia apresentam baixa eficiência terapêutica e, por isso, novos compostos estão sendo investigados quanto aos seus efeitos antitumorais, dentre eles as chalconas (HE *et al.*, 2001; CERQUEIRA *et al.*, 2007; KUO *et al.* (2010).

Os resultados observados com a 3-nitrochalcona em células HepG2 mostraram redução da viabilidade celular (figura 12 e 13) de maneira dependente do tempo e das doses utilizadas. Chalconas com grupamentos diferentes na sua estrutura básica já foram testadas em diversas linhagens tumorais como: células de câncer de mama (MCF-7 e MDA-MB-231) (HSU *et al.*, 2006), câncer de bexiga (T24 e HT-1376) (SHEN *et al.*, 2007), melanoma (B16-F10) (NAVARINI *et al.*, 2009), entre outras. A 3-nitrochalcona estudada neste trabalho a partir da dose de 15 μM promove redução de 50% da viabilidade celular após 48 horas de tratamento, o que demonstra a importância deste composto.

Foram avaliados os efeitos da 3-nitrochalcona no ciclo celular e verificou-se o aumento da porcentagem de células em SubG1 (que representa células com DNA fragmentado). Esse efeito foi maior com o aumento das doses utilizadas (10 e 15 μM) (figura 14). O aumento do número de células com DNA fragmentado na dose de 10 e 15 μM estão de acordo com a redução da viabilidade celular (figura 12 e 13) e com a marcação com anexina (figura 15) observadas nestas doses, sugerindo apoptose. O aumento das EROs, especialmente o H_2O_2 , pode ter sido gerado pela redução da expressão e atividade da catalase (figura 18 A e B) observadas nas doses de 15 e 20 μM da 3-nitrochalcona. Este aumento das EROs (principalmente do H_2O_2) podem colaborar para a indução da morte celular por apoptose (KUO *et al.*, 2010; GUZY *et al.*, 2010). Além da redução da atividade da catalase, outras possíveis causas do aumento de EROs poderiam ser sugeridas como um exemplo, o possível efeito da 3-nitrochalcona sobre o metabolismo mitocondrial. Foram

verificados os efeitos da 4'-hidroxichalcona e seus análogos em mitocôndrias isoladas de fígado de rato e verificou-se que estes compostos possuem um efeito desacoplador parcial e efeito inibitório sobre a fosforilação oxidativa (GUZY *et al.*, 2010). Além disso, estes autores verificaram que estes compostos aumentam a geração de radicais livres e tem uma possível interação covalente com tióis celulares resultando em depleção de glutathione reduzida (GSH) e modulação de atividades enzimáticas. Recentemente, em nosso laboratório, verificou-se uma diminuição da atividade da NADH oxidase em mitocôndrias isoladas de fígado de rato (dado não mostrado) promovida pela 3-nitrochalcona (20 μM), o que poderia contribuir para o aumento de radical superóxido e conseqüentemente do H_2O_2 . Contudo, outras análises utilizando células tumorais (HepG2) precisam ser realizadas para confirmar esta hipótese e o mecanismo de ação pelo qual a 3-nitrochalcona pode estar gerando seus efeitos citotóxicos deverão ser melhor investigados posteriormente.

Diferentes chalconas podem induzir a apoptose, principalmente, a partir da via intrínseca através da redução do potencial de membrana mitocondrial (ZI *et al.*, 2008; HSU *et al.*, 2009; JUNG *et al.*, 2006), aumento da atividade da caspase-3 (KIM *et al.*, 2008; NISHIMURA *et al.*, 2005), diminuição da expressão de proteínas anti-apoptóticas (Bcl-xL e Bcl-2) e aumento da expressão de proteínas pró-apoptóticas (Bax e Bak) (OHTSUKI *et al.*, 2009; KIM *et al.*, 2001).

A chalcona na dose de 28,8 μM (48 h) induziu a apoptose (48,9% e 40,3%) de células T24 e HT-1376 (câncer de bexiga), através do aumento da atividade das caspases-3 e 9, liberação de citocromo *c* para o citosol, aumento da expressão de Bax e Bak (proteínas pró-apoptóticas) e diminuição da expressão de Bcl-2 e Bcl-x (proteínas anti-apoptóticas) (SHEN *et al.*, 2007).

As chalconas possuem um grupamento α,β insaturado com atividade eletrofílica que pode reagir com grupos tióis essenciais em organismos vivos podendo oxidá-los aos seus respectivos dissulfetos (KACHADOURIAN *et al.*, 2012, KUMAR *et al.*, 2011, ALCATRAZ *et al.*, 2004). A glutathione reduzida (GSH) é uma fonte de grupos tióis (DIMMOCK *et al.*, 1999, GUZY *et al.*, 2010). Alguns trabalhos mostram que diferentes chalconas podem causar depleção da glutathione reduzida intracelular em células leucêmicas (KACHADOURIAN e

DAY, 2006; WINTER *et al.*, 2010), em células de melanoma (NAVARINI *et al.*, 2009), em mitocôndria isolada de fígado de rato (GUZY *et al.*, 2010).

O fato de se ter observado um aumento da viabilidade de células HepG2 após a pré-incubação com NAC e a posterior adição da 3-nitrochalcona (15 e 20 μM) (figura 17) sugere também que a 3-nitrochalcona pode estar colaborando para reduzir os níveis de GSH, o que também comprometeria a atividade da glutatona peroxidase aumentando ainda mais o acúmulo de H_2O_2 . Como colocado anteriormente, esta hipótese precisaria ser comprovada através da análise dos níveis de GSH e GSSG após o tratamento com a 3-nitrochalcona. Alguns autores verificaram que algumas chalconas podem induzir a expressão de enzimas como a γ -glutamil cisteína ligase (WINTER *et al.*, 2010; KACHADOURIAN *et al.*, 2012; KUMAR *et al.*, 2011) que está envolvida na síntese de glutatona, o que poderia contribuir para um efeito citoprotetor. Também seria importante ser realizada a análise da expressão desta enzima com o tratamento com a 3-nitrochalcona com a finalidade de verificar se o flavonóide poderia alterar sua expressão. Apesar de serem relatados na literatura o aumento da expressão de algumas enzimas antioxidantes com chalconas (KUMAR *et al.*, 2011; LIU *et al.*, 2007; KACHADOURIAN *et al.*, 2012), nossos resultados não demonstram o aumento da expressão das enzimas de forma estatisticamente significativa, entretanto, observa-se uma tendência ao aumento de GPx (glutatona peroxidase).

Os resultados sugerem também que o aumento das espécies reativas de oxigênio, em especial, o H_2O_2 , resultante da diminuição da expressão e da atividade da catalase, pode estar envolvido com o efeito citotóxico promovido pela 3-nitrochalcona em células HepG2. A partir destes resultados demonstrou-se que a 3-nitrochalcona é um composto com atividades promissoras para estudos em linhagens tumorais.

8. CONCLUSÕES

Com os resultados obtidos podemos concluir que a 3-nitrochalcona:

- É capaz de reduzir a viabilidade das células HepG2 de forma dependente do tempo e da dose de tratamento, e que o pré-tratamento com o antioxidante NAC aumenta a viabilidade celular, principalmente na maior dose de NAC (10 mM) com a maior dose da 3-nitrochalcona (20 μ M).
- Induz aumento da porcentagem de células HepG2 com fragmentação do DNA.
- Induz morte celular por apoptose.
- Promove o aumento dos níveis de EROs intracelular na maior dose (20 μ M).
- Não afeta a expressão de mRNA da MnSOD e GPx de forma estatisticamente significativa.
- Diminui os níveis de expressão de mRNA e atividade da catalase.

Esses resultados sugerem que o mecanismo pelo qual a 3-nitrochalcona promove morte celular está relacionado com o aumento de EROs que podem ser geradas, pelo menos em parte, pela diminuição das defesas antioxidantes (diminuição do nível de expressão e atividade da enzima catalase).

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ABDEL-HAMID, N.M., *et al.* A survey on herbal management of hepatocellular carcinoma. **World J Hepatol.**, v 3 p. 175-183, 2011.

ALBERTON, A., *et al.* Influence of chalcone analogues on serum glucose levels in hyperglycemic rats. **Chemico-Biological Interactions**, v 171, p. 355–362, 2008.

ALCARAZ, M.J., *et al.* Role of nuclear factor- κ B and heme oxygenase-1 in the mechanism of action of anti-inflammatory chalcone derivate in RAW 264.7 cells. **Br. J. Pharmacol.**, v. 142, p. 1191–1199, 2004.

AMARANTE-MENDES, G. P. Apoptose: programa molecular de morte celular. **Einstein**, p. 15-18, 2003.

ACS. AMERICAN CANCER SOCIETY. Liver cancer detailed guide, 2013. Disponível em: <<http://www.cancer.org/>>. Acesso em: 21 jan. 2013.

ACS. AMERICAN CANCER SOCIETY. Cancer Facts & Figures 2013. Atlanta, Ga: American Cancer Society; 2013. <<http://www.cancer.org/>>. Acesso em: 21 jan. 2013.

ARII, S., *et al.* Results of surgical and nonsurgical treatment for small-sized hepatocellular carcinomas: a retrospective and nationwide survey in Japan. The Liver Cancer Study Group of Japan. **Hepatology**; v 32, p 1224 – 1229, 2000.

BALLATORI, N., *et al.* Molecular Glutathione dysregulation and the etiology and progression of human diseases. **Biological Chemistry**, v 390, p. 191–214, 2009.

BAK, M.; JUN, M.; JEONG, W. Procyanidins from Wild Grape (*Vitis amurensis*) Seeds Regulate ARE-Mediated Enzyme Expression via Nrf2 Coupled with p38 and PI3K/Akt Pathway in HepG2 Cells. *Int. J. Mol. Sci.*, v. 13, p. 801-818, 2012.

BARBIOR, B.M. Superoxide: a two-edged sword. **Brazilian Journal of Medical and Biological Research**, v 30, p 141-155, 1997.

BARCELOS, G.R.M., Avaliação das propriedades antígeno-tóxicas e antioxidantes do faloovoíde quercetina e dos carotenóides bixina e norbixina contra os danos no material genético e distúrbio do estado redox causados pelo cloreto de mercúrio e metilmercúrio *in vitro* e *in vivo*. Tese (Doutorado em Toxicologia – Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto), 2010.

BARNETT, Y.A.; KING, C.M. An investigation of antioxidant status, DNA repair capacity and mutation as a function of age in humans. **Mutation Research**, Amsterdam, v. 338, n. 1/6, p. 115-128, 1995.

BATOVSKA, D., *et al.* Examination of growth inhibitory properties of synthetic chalcones for which antibacterial activity was predicted. **European Journal of Medicinal Chemistry**, v 44, p. 2211-2218, 2009.

BIRT, D. F.; HENDRICH, S.; WANG, W. Dietary agents in cancer prevention: Flavonoids and isoflavonoids. **Pharmacology and Therapeutics**, v. 90, p. 157–177, 2001.

BOATRRIGHT, K.M.; SALVESEN, G.S. Mechanisms of caspase activation. **Current Opinion in Cell Biology**, v. 15, p. 725-731, 2003.

BOECK, P., *et al.* Synthesis of chalcone analogues with increased antileishmanial activity. **Bioorganic & Medicinal Chemistry**, v. 14, p. 1538–1545, (2006).

BOSCH, F. X., RIBES J, DÍAZ M, CLÉRIES R. Primary liver cancer: worldwide incidence and trends. **Gastroenterology**, v. 127: p. 5-16, 2004

BOUMENDJEL, A., *et al.* Antimitotic and Antiproliferative Activities of Chalcones: Forward Structure–Activity Relationship. **J. Med. Chem**, v. 51, p. 2307–2310, 2008.

BRUIX, J.; LLOVET, JM. Prognostic prediction and treatment strategy in hepatocellular carcinoma. **Hepatology**; v 35, p 519-524, 2002.

CABRERA, M., *et al.* Synthetic chalcones, flavanones, and flavones as antitumoral agents: Biological evaluation and structure–activity relationships. **Bioorganic & Medicinal Chemistry**, v. 15, p. 3356–3367, 2007.

CASSADY, J. Natural products as a source of potential cancer chemotherapeutic and chemopreventive agents. **Journal of Natural Products**. v. 53, no. 1, p. 23-41, 1990.

CERQUEIRA, F. M.; GENNARI, M. H.; AUGUSTO, O. Antioxidantes dietéticos: controvérsias e perspectivas. Departamento de Bioquímica, Instituto de Química, USP. **Quim. Nova**, v. 30, No. 2, p 441-449, 2007.

CHENG, S., *et al.* Cigarette smoke particle-phase extract induces HO-1 expression in human tracheal smooth muscle cells: role of the c-Src/NADPH oxidase/MAPK/Nrf2 signaling pathway. **Free Radical Biol. Med.**, v. 48, p. 1410–1422, 2010.

CHOI, J. M., *et al.* Antioxidant properties of neohesperidin dihydrochalcone: inhibition of hypochlorous acid-induced DNA strand breakage, protein degradation, and cell death. **Biol Pharm Bull.**, v 30, p 324-30, 2007.

CIRCU, M. L.; AW, T. Y. Reactive oxygen species, cellular redox systems, and apoptosis. **Free Radical Biology and Medicine**, v. 48, p. 749-762, 2010.

COOK, N.C.; SAMMAN, S. Flavonoids-chemistry, metabolism, cardioprotective effects, and dietary sources. **Journal of Nutritional Biochemistry**, New York, v. 7, p. 66–76, 1996.

CONTE, V. Carcinoma Hepatocelular. Parte 1. Considerações gerais e diagnóstico. **Arq Gastroenterol**, v. 37, 2000.

CORRADINI, E., *et al.* Flavonoids: chemical properties and analytical methodologies of identification and quantitation in foods and plants. **Natural Product Research**, v. 25, p. 469-495, 2011.

COSTA, Investigação dos Mecanismos de Transdução de Sinais Envolvidos na Apoptose Induzida pelas Chalconas Sintéticas Derivadas da 2, 4,5-Trimetoxiacetofenona e do 2',4',5'-Trimetoxibenzaldeído em Leucemias Agudas Dissertação (Mestrado em Farmácia) - Departamento de Ciências da Saúde – UFSC, 2012.

- CRAGG, G.M.; NEWMAN, D.J. Antineoplastic agents from natural sources: achievements and future directions. *Expert Opinion on Investigational Drugs*, v. 9, p. 2783, 2000.
- DAMAZIO, R., *et al.* Nitrochalcones: Potential in vivo insulin secretagogues. **Biochimie** **91.**, p. 1493–1498, 2009.
- DEBNATH, J., BAEHRECKE, E. H., AND KROEMER, G. Does autophagy contribute to cell death? **Autophagy**, v 1, p. 66–74, 2005.
- DIMMOCK, J.R., *et al.* N.M. Bioactivities of chalcones. *Curr. Med. Chem.*, v. 6, p. 1125–1149, 1999.
- DREOSTI, I. E. Antioxidant polyphenols in tea, cocoa, and wine. **Nutrition**, v 16 p 692, 2000.
- DUTHIE, G. G.; DUTHIE, S. J.; KYLE, J. A. M. Plant polyphenols in cancer and heart disease: implications as nutritional antioxidants. **Nutrition Research Reviews**, v. 13, p. 79-106, 2000.
- DREOSTI, I. E. Nutrition, Cancer, and Aging. **Division of Human Nutrition**.
- ECHEVERRIA, C., *et al.* Structural Antitumoral Activity Relationships of Synthetic Chalcones. **Int. J. Mol. Sci.**, v 10, p. 221-231, 2009.
- El-Naggar, S.F., *et al.* Flavonoids from the leaves of *Kalmia latifolia*. **J Nat Prod.**, v. 43, p. 739-51, 1980.
- FERREIRA, A.L.A.; MATSUBARA, L.S. Radicais livres: conceitos, doenças relacionadas, sistema de defesa e eestresse oxidativo. **Rev. Assoc. Méd. Bras**, v. 43, n.1, p.1-16, 1997.
- Foresti, R., *et al.* Differential activation of heme oxygenase-1 by chalcones and rosolic acid in endothelial cells. **Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics**, v. 312, p. 686–693, 2005.
- FRIDOVICH, I. Superoxide radical and superoxide dismutases. **Annual Review of Biochemistry**, Palo Alto, v. 64, p. 97-112, 1995.
- GALLUZZI, L., *et al.* Molecular definitions of cell death subroutines: recommendations of the Nomenclature Committee on Cell Death 2012. **Cell Death and Differentiation**, v. 19, p. 107-120, 2012.
- GARRETT, M. A. Cell cycle control and cancer. **Current Science**, v. 81, p. 515-522, 2001.
- GISH, R. G. Phase III randomized controlled trial comparing the survival of patients with unresectable hepatocellular carcinoma treated with nolatrexed or doxorubicin (vol 25, pg 3069, 2007). **Journal of Clinical Oncology**, v. 25, p. 4512-4512, 2007.
- GO, M.L., WU, X. AND LIU, X. Chalcones: an update on cytotoxic and chemopreventive properties. **Curr. Med. Chem.**, v. 12, p. 483–499, 2005.
- GREGUS, Z.; KLAASEN, C.D. Mechanisms of toxicity in: *The Basic Science of Poisons*. **Toxicology**, 2001.

GUZI, J.; VASKOVA-KUBALKOVA, J.; ROZMER, Z.; FODOR, K.; MAREKOVA, M.; POSKROBOVA, M.; PERJESI, P. Activation of oxidative stress response by hydroxyl substituted chalcones and cyclic chalcone analogues in mitochondria. **Federation of European Biochemical Societies**, v. 584, p. 567-570, 2010.

GUZZO, M.R. Estudo da omplexação da fisetina com ciclodextrinas. Dissertação (Mestrado em Ciências (Química)) - Departamento de Química – USP, 2007.

GUZZY, J.; VASKOVA-KUBALKOVA, J.; ROZMER, Z.; FODOR, K.; MAREKOVA, M.; POSKROBOVA, M.; PERJESI, P. Activation of oxidative stress response by hydroxyl substituted chalcones and cyclic chalcone analogues in mitochondria. **Federation of European Biochemical Societies**, v. 584, p. 567-570, 2010.

HALLIWELL, B. Reactive Species and Antioxidants. Redox Biology Is a Fundamental Theme of Aerobic Life. *Plant Physiology*, v. 141, p. 312–322, 2006.

HARBORNE, J.B.; WILLIAMS, C.A. Advances in flavonoid research since 1992. **Phytochemistry**, Oxford, v. 55, p. 481–504, 2000.

HE, C., *et al.* Downregulating hypoxia-inducible factor-2 α improves the efficacy of doxorubicin in the treatment of hepatocellular carcinoma. **Cancer Science.**, 2012.

HENGARTNER, M.O. The biochemistry of apoptosis. **Nature**, v. 407, p. 770-6, 2000.

HERENCIA, F.; LÓPEZ-GARCÍA, M.; UBEDA, A.; FERRÁNDIZ, M. Nitric Oxide-Scavenging Properties of Some Chalcone Derivatives. **NITRIC OXIDE: Biology and Chemistry**, v. 6, No. 2, p. 242–246, 2002.

HERTOG, M.G.L., *et al.* Intake of potentially anticarcinogenic flavonoids and their determinants in adults in the Netherlands. **Nutrition and Cancer**, v 20, p. 21-29, 2009.

HITOMI, J., *et al.* Identification of a Molecular Signaling Network that Regulates a Cellular Necrotic Cell Death Pathway. **Cell**, v. 135, p. 1311–1323, 2008.

HIRAGI, C. O., *et al.* Superoxide dismutase, catalase, glutathione peroxidase and glutathione S-transferases M1 and T1 gene polymorphisms in three Brazilian population groups. **Genetics and Molecular Biology**, v. 34, p. 11-18 2011.

HODEK, P.; TREFIL, P.; STIBOROVÁ, M. Flavonoids-potent and versatile biologically active compounds interacting with cytochromes P450. **Chemico-Biological Interactions**, v. 139, n. 1, p. 1-21, 2002.

HOLLAND, R.; FISHBEIN, C.J. Chemistry of the Cysteine Sensors in Kelch-Like ECH-Associated Protein. **Antioxidants & Redox Signaling**, v. 13, 2010.

HSU, C.L.; YOU, S.Y.; YEN, G.C. Anticancer Effects of *Alpinia pricei* Hayata Roots. **J. Agric. Food Chem.**, v 58, p. 2201–2208, 2010.

IARC, International Agency for Research on Cancer, 2011. Disponível em: <http://globocan.iarc.fr/>. Acesso em: 27/10/1987.

INCA (Instituto Nacional do Câncer) – Ministério da Saúde. Estimativa da Incidência e Mortalidade por Câncer. Disponível em: www.inca.gov.br. Acesso em: 01/01/2013.

- JIN, C.; JULIANG, Y.; HONWUEHE, L. Synthesis and antitumor activity of novel chalcone derivatives. **Biomedicine & Pharmacotherapy**, 2010.
- JONES, D.P. Redefining Oxidative Stress. **Antioxidants & Redox Signaling**. 2006,v. 8(9-10), p. 1865-1879, 2006.
- JÚNIOR, R.L., *et al.* Sistema Antioxidante Envolvendo O Ciclo Metabólico Da Glutaciona Associado A Métodos Eletroanalíticos Na Avaliação Do Estresse Oxidativo. **Quim. Nova**, v 24, p. 112-119, 2001.
- JUNG, J.I., *et al.* Isoliquiritigenin induces apoptosis by depolarizing mitochondrial membranes in prostate cancer cells. **Journal of Nutritional Biochemistry**, v 17, p. 689-696, 2006.
- KANDASWAMI, C., *et al.* The antitumor activities of flavonoids. **Journal In Vivo**, New York, v. 19, n. 5, p. 895-909, 2005.
- KAMEI, R., *et al.* 2V-benzyloxychalcone derivatives stimulate glucose uptake in 3T3-L1 adipocytes. **Life Sciences**, v 73 p. 2091–2099, 2003.
- KAY, C.D. The future of flavonoid research. **British Journal of Nutrition**, v 104, p. 91–95, 2010.
- KACHADOURIAN R.; DAY B.J. Flavonoid-induced glutathione depletion: potential implications for cancer treatment. *Free Radic Biol Med.*, v. 41, p. 65-76, 2006.
- KACHADOURIAN, R., *et al.* A Synthetic Chalcone as a Potent Inducer of Glutathione Biosynthesis. **J. Med. Chem.**, v. 55, p. 1382–1388, 2012.
- KENSLER, T. W., WAKABAYASHI, N.; BISWAL, S. Cell survival responses to environmental stresses via the Keap1-Nrf2-ARE pathway **Annu. Rev. Pharmacol. Toxicol.**, v 47, p. 89–116, 2007.
- KENSLER, T.W.; Yamamoto, M. Hepatocyte-specific deletion of the keap1 gene activates Nrf2 and confers potent resistance against acute drug toxicity. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, v. 339, p. 79–88, 2006.
- KIM, N.Y., *et al.* Butein, a Plant Polyphenol, Induces Apoptosis Concomitant with Increased Caspase-3 Activity, Decreased Bcl-2 Expression and Increased Bax Expression in HL-60 Cells. **Pharmacology & Toxicology**. V 88, p. 261–266, 2001.
- KIM, N. Butein sensitizes human leukemia cells to apoptosis induced by tumor necrosis factor-related apoptosis inducing ligand (TRAIL). **Arch. Pharm. Res.**, v. 31, 1179–1186, 2008.
- KOHNO, Y., *et al.* Metabolism of the α,β -unsaturated ketones, chalcone and trans-4-phenyl-3-buten-2-one, by rat liver microsomes and estrgenic activity of the metabolites. **Drug Metabolism and Disposition**, v. 33, N.8. 1115–1123, 2005.
- KOLBE, L., *et al.* Anti-inflammatory efficacy of Licochalcone A: correlation of clinical potency and in vitro effects. **Archives of Dermatological Research**., v 298, p. 23-30, 2006.
- KOSHY, A.S; VIJAYALAKSHMI, A.L. Flavonoids from *Garcinia cambogia* lower lipid levels in hypercholesterolemic rats. *Food Chemistry*, v 72, p 289-294, 2001.

KOZLOWSKI, D., *et al.* Density functional theory study of the conformational, electronic, and antioxidant properties of natural chalcones. **Journal of Physical Chemistry A**, v. 111, p. 1138-1145, 2007.

KROEMER, G.; GALLUZZI, L.; BRENNER, C. Mitochondrial membrane permeabilization in cell death. **Physiological Reviews**, v. 87, p. 99-163, 2007.

KROMANN, H., *et al.* Synthesis of prenylated benzaldehydes and their use in the synthesis of analogues of licochalcone A. **European Journal of Medicinal Chemistry**, v. 39 p. 993–1000, 2004.

KUMAR, D., *et al.* Synthesis and biological evaluation of indolyl chalcones as antitumor agents. **Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters**. v. 20 p. 3916–3919, 2010.

KUO, YU-FENG., *et al.* Flavokawain B, a novel chalcone from *Alpinia pricei* Hayata with potent apoptotic activity: Involvement of ROS and GADD153 upstream of mitochondria-dependent apoptosis in HCT116 cells. **Free Radical Biology & Medicine**, v. 49 p. 214-226, 2010.

LABIB, K.; PICCOLI, G. S-phase checkpoint pathway. **Phil. Trans. R. Soc. B**, v 366, p. 3554-3561, 2011.

LAI C. L., *et al.* Doxorubicin versus no antitumor therapy in inoperable hepatocellular carcinoma. A prospective randomized trial. **Cancer**, v 62, p 479-83, 1988

LANGERAK, P.; RUSSELL, P. Regulatory networks integrating cell cycle control with DNA damage checkpoints and double-strand break repair. **Phil. Trans. R. Soc. B.**, v 366, p. 3562–3571, 2011.

LEE, K. W.; LEE, H. J.; SURH, Y. J.; LEE, C.Y. Vitamin C and cancer chemoprevention: reappraisal. **Am. J. Clin. Nutr.**, v 78, p 1074, 2003

LEVINE, B.; KROEMER, G. Autophagy in the Pathogenesis of Disease. **Cell**, v. 132, p. 27-42, 2008.

LIU, Y.C. Chalcone inhibits the activation of NF- κ B and STAT3 in endothelial cells via endogenous electrophile. **Life Sciences**, v. 80, p. 1420–1430, 2007.

LLOVET, J. M.; BURROUGHS, A.; BRUIX, J. Hepatocellular carcinoma. **Lancet.**, v 362, p 1907-1917, 2003.

LLOVET, J. M., *et al.* Sorafenib in Advanced Hepatocellular Carcinoma. **New England Journal of Medicine**, v 359, pg 378, 2008.

LONG, J.S.; RYAN, K.M. New frontiers in promoting tumour cell death: targeting apoptosis, necroptosis and autophagy. **Oncogene**, v. 31, p. 5045–5060, 2012.

LOU, C., *et al.* 2',4'-Dihydroxychalcone-induced apoptosis of human gastric cancer MGC-803 cells via down-regulation of survivin mRNA. **Toxicology in Vitro**, v. 24, p. 1333–1337, 2010.

LUSTOSA, F.; OLIVEIRA, S.; ROMEIRO, L. Efeito Alelopático de Extrato Aquoso de *Piper aduncum* L. e *Piper tectoniifolium* Kunth na Germinação e Crescimento de *Lactuca sativa* L. **Revista Brasileira de Biociências.**, v. 5, p. 849-851, 2007.

MAIA, José Guilherme S.; ANDRADE, Eloísa Helena A.. Database of the Amazon aromatic plants and their essential oils. **Quím. Nova**, São Paulo, v. 32, n. 3, 2009 .

MANACH, C., SCALBERT, A.; MORAND, C.; RÉMÉSY, C.; JIMENEZ, L. Polyphenols: food sources and bioavailability. **Am. J. Clin.Nutr.**, v 79, p 727, 2004.

MASGRAS, I.; CARRERA, S.; VERDIER, P.J.; *et al.* Reactive oxygen species and mitochondrial sensitivity to oxidative stress determine induction of cancer cell death by p21. **J Biol Chem.**, 2012.

MATHIESEN, L.; MALTERUD, K. E.; SUND, R. B. Hydrogen bond formation as basis for radical scavenging activity: A structureactivity study of C-methylated dihydrochalcones from *Myrica gale* and structurally related acetophenones. **Free Radical Biol. Med.**, v 22, p 307-311, 1997.

MCDONALD, E. R. III, EL DEIRY, W. S. Cell cycle control as a basis for cancer drug development. **International Journal of Oncology**, v. 16, p. 871, 2000.

MCCMAHON, M; HAYES, J. D.; NRF2 and KEAP1 mutations: permanent activation of an adaptive response in cancer. **Trends Biochem Sci.**, v 34, p. 176–188, 2009.

MEDINA, J.; MORENO-OTERO, R. Pathophysiological basis for antioxidant therapy in chronic liver disease. **Drugs**, v. 65, p. 2445–2461, 2005.

MESNER JR., P.W., BUDIARDJO, I.I.; KAUFMANN, S.H. Chemotherapyinduced apoptosis in: Apoptosis. Pharmacological Implications and Therapeutic Opportunities, 1997.

MIDDLETON, E.; KANDASWAMI, C.; THEOHARIDES, T. C. The effects of plant flavonoids on mammalian cells: Implications for inflammation, heart disease and Cancer. **Pharmacological Reviews**, Washington, v.52, p. 673–751, 2000.

MONOSTORY, K., *et al.* Study on CYP1A1 inhibitory action of 40-methoxybenzylidene-benzosuberone and some related cyclic chalcone derivatives. **Toxicology**, v. 184, p. 203–210, 2003.

MOON, D.O., *et al.* Butein induces G2/M phase arrest and apoptosis in human hepatoma cancer cells through ROS generation. **Cancer Letters**, v 288 p. 204–213, 2010.

MOTANI K., *et al.* Proteomic analysis of apoptosis induced by xanthoangelol, a major constituent of *Angelica keiskei*, in neuroblastoma. **Biol Pharm Bull**, v. 31p. 618–626, 2008

MOTOHASHI, H. & YAMAMOTO, M. Nrf2-Keap1 defines a physiologically important stress response mechanism. **Trends Mol. Med.**, v. 10, p. 549–557, 2004.

MOTANI, K., *et al.* Proteomic analysis of apoptosis induced by xanthoangelol, a major constituent of *Angelica keiskei*, in neuroblastoma. **Biol Pharm Bull**, v. 31, p. 618–626, 2008.

MORGAN, D. O. Cyclin-dependent kinases: Engines, clocks, and microprocessors. **Annual Review of Cell and Developmental Biology**, v. 13, p. 261-291, 1997.

NAKAMURA, Y.; WATANABE, S.; MIYAKE, N.; KOHNO, H.; OSAWA, T. Dihydrochalcones: Evaluation as Novel Radical Scavenging Antioxidants. **J. Agric. Food Chem.**, v 51, p 3309 – 3312, 2003.

NAKASHIMA, T.; OKUDA, K.; KOJIRO, M.; JIMI, A., YAMAGUCHI, R.; SAKAMOTO, K.; IKARI, T. Pathology of hepatocellular carcinoma in Japan. 232 Consecutive cases autopsied in ten years. **Cancer.**, v 51, p 863-877, 1983.

NAVARINI, A.L.F., *et al.* Hydroxychalcones induce apoptosis in B16-F10 melanoma cells via GSH and ATP depletion. **European Journal of Medicinal Chemistry**, v. 44, p. 1630–1637, 2009.

NAVARRO, J.; OBRADOR, E.; CARRETERO, J.; PETSCHEN, I.; AVIÑÓ, J.; PEREZ, P.; ESTRELA, J. M. Changes in glutathione status and the antioxidant system in blood and in cancer cells associate with tumour growth *in vivo*. **Free Rad. Biol. Med.**, v 26, p. 410, 1999.

NEPALI *et al.*, Effect of ring A and ring B substitution on the cytotoxic potential of pyrazole tethered chalcones. **Med Chem Res.**, 2011.

NISHIMURA R., *et al.* Isobavachalcone, a chalcone constituent of *Angelica keiskei*, induces apoptosis in neuroblastoma. **Biol Pharm Bull.**, v. 30:1878–1883, 2007

NITURE, S. K.; JAIN, A. K.; JAISWAL, A. K. Antioxidant-induced modification of INrf2 cysteine 151 and PKC-delta-mediated phosphorylation of Nrf2 serine 40 are both required for stabilization and nuclear translocation of Nrf2 and increased drug resistance. **J. Cell Sci.**,v 122, p. 4452–4464, 2009.

NOVIELLO, E.; ALUIGI, M.G.; CIMOLI, G.; ROVINI, E.; MAZZONI, A.; PARODI, S.; SESSA, F.; RUSSO, P. Sister-chromatid exchanges, chromosomal aberrations and cytotoxicity produced by topoisomerase II-targeted drugs in sensitive (A2780) and resistant (A2780-DX3) human ovarian cancer cells: correlations with the formation of DNA double-strand breaks. **Mut Res.**, v. 311, p. 21-29, 1994.

NOWAKOWSKA, Z. A review of anti-infective and anti-inflammatory chalcones. **European Journal of Medicinal Chemistry**, v 42, p. 125- 137, 2007.

NURSE, P. A Long Twentieth Century of the Cell Cycle and Beyond. **Cell**, v. 100, p. 71–78, 2000,

OHTSUKI T., *et al.* Death receptor 5 promoter-enhancing compounds isolated from *Catimbum speciosum* and their enhancement effect on TRAIL-induced apoptosis. **Bioorg Med Chem.**, v. 17, p. 6748–6754, 2009.

OKAWA, H., *et al.* Hepatocyte-specific deletion of the *keap1* gene activates Nrf2 and confers potent resistance against acute drug toxicity. **Biochem. Biophys. Res. Commun.**, v 339, p. 79–88, 2006.

OPLETALOVÁ, V., *et al.* Chalcones (1,3-diarylpropen-1-ones) and their analogs as potential therapeutic agents in cardiovascular system diseases. **Ceska Slov Farm.**, v 52(1), p. 12-9, 2003.

ORLIKOVA, B., *et al.* Dietary chalcones with chemopreventive and chemotherapeutic potential. **Genes Nutr.**, v 6, p. 125–147, 2011.

OZEKI T; NATORI T. The specific inhibition of HepG2 cells proliferation by apoptosis induced by gabexate mesilate. *International Journal of Clinical and Experimental Pathology*, Madson, v. 15;3(7), p. 710-7, 2010.

PARK, I., *et al.* Isoliquiritigenin induces G2 and M phase arrest by inducing DNA damage and by inhibiting the metaphase/anaphase transition. *Cancer Lett*, v. 277, p. 174–181, 2009.

PELICANO, H.; CARNEY, D.; HUANGA, P. ROS stress in cancer cells and therapeutic implications. *Drug Resistance Updates*, v. 7, p. 97–110, 2004.

PERERA, R.M.; BARDEESY, N. Cancer: When antioxidants are bad. *Cancer: When antioxidants are bad. Nature*, v 475, p. 43-44, 2011.

PERJESI, P., Kubalkova, J., Chovanova, Z., Marekova, M., Rozmer, Z., Fodor, K., Chavkova, Z., *et al.* Comparison of effects of some cyclic chalcone analogues on selected mitochondrial functions. *Pharmazie*, v. 63, p 899–903, 2008.

QUINTIN, J. Synthesis and biological evaluation of a series of tangeretin-derived chalcones. *Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters*, v. 19, p. 167–169 (2009).

RAOUL, J. L. Natural history of hepatocellular carcinoma and current treatment options. *Semin Nucl Med.*, v 38, S13-S18, 2008.

REDDY, M.V.B., *et al.* Inhibitory effects of Mannich bases of heterocyclic chalcones on NO production by activated RAW 264.7 macrophages and superoxide anion generation and elastase release by activated human neutrophils. *Bioorganic & Medicinal Chemistry*, v. 19, p. 2751–2756, 2011.

REN, W.Y., QIAO, Z.H., WANG, H.W., ZHU, L.; ZHANG, L. Flavonoids: promising anticancer agents. *Medicinal Research Reviews*, v. 23, n. 4, p.519–534, 2003.

REZK B. M., *et al.* The antioxidant activity of phloretin: the disclosure of a new antioxidant pharmacophore in flavonoids. *Biochemical and Biophysical Research Communications.*, v 295, p 9-13, 2002.

ROMAGNOLI, R., *et al.* Hybrid α -bromoacryloylamido chalcones. Design, synthesis and biological evaluation. *Bioorg Med Chem Lett.*, v. 19, p. 2022–2028, 2009.

SANGLE, G., *et al.* Impairment of mitochondrial respiratory chain activity in aortic endothelial cells induced by glycated low-density lipoprotein. *Free Radical Biology & Medicine*, New York, v. 48, p. 781-790, 2010.

SCHAFFER, F.Q.; BUETTNER, G.R. Redox environment of the cell as viewed through the redox state of the glutathione disulfide/glutathione couple. *Free Radical in Biology Medicine*, v. 30, p. 1191–1212, 2001

SCHNELLDORFER, T.; GANSAUGE, S.; GANSAUGE, F.; SCHLOSSER, S.; BEGER, H. G.; NUSSLER, A. K. Glutathione depletion causes cell growth inhibition and enhanced apoptosis in pancreatic cancer cells. *Cancer*, v. 89, p. 1440–1447, 2000.

SCOPARO, C. T. Efeitos da hispidulina sobre o metabolismo oxidativo e a viabilidade de células de hepatoma humano (HepG2) Dissertação (Mestrado em Ciências - Bioquímica) - Setor de Ciências Biológicas, Universidade Federal do Paraná, 2012.

SEVERI, F., *et al.* Synthesis and activity of a new series of chalcones as aldose reductase inhibitors. **Eur. J. Med. Chem.**, v. 33, p. 859–866, 1998.

SHEN, K.H., *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**, v 101, p. 254–261, 2007.

SHERR, C.J.; M.; Roberts, J.M. CDK inhibitors: positive and negative regulators of G1-phase. **Genes Dev.**, v. 13, p. 1501-1512, 1999.

SHERMAN, M.B., *et al.* Multidisciplinary Canadian consensus recommendations for the management and treatment of hepatocellular carcinoma. **Current Oncology**, v 18, 2011.

SIKANDER, M., *et al.* Cytoprotective Activity of a Trans-chalcone Against Hydrogen Peroxide Induced Toxicity in Hepatocellular Carcinoma (HepG2) Cells. **Asian Pacific Journal of Cancer Prevention**, v. 12, 2011

SIMIRGIOTIS, M.J., *et al.* Cytotoxic chalcones and antioxidants from the fruits of *Syzygium samarangense* (Wax Jambu). **Food Chemistry**, v. 107, p. 813–819, 2008.

SOUZA, Cármino A. *et al.* Terapêutica citoprotetora em pacientes tratados com quimio e/ou radioterapia anti neoplásica. **Rev. Bras. Hematol. Hemoter.**, São José do Rio Preto, v. 22, n. 2, 2000 .

STRATHMANN, J., *et al.* Xanthohumol-induced transient superoxide anion radical formation triggers cancer cells into apoptosis *via* a mitochondria-mediated mechanism. **Research Communication**, v 24, p. 2938–2950, 2010.

SUAREZ, J.; HERRERA, M. D.; MARHUENDA, E. *In vitro* scavenger and antioxidant properties of hesperidin and neohesperidin dihydrochalcone. *Phytomedicine*, v 5, p 469 – 473, 1998.

SUN, A. Y.; SIMONYI, A.; SUN, G. Y. The “french paradox” and beyond: neuroprotective effects of polyphenols. *Free Radical Biol. Med.*, v 32, p. 314, 2002.

SVS. (Secretaria de Vigilância em Saúde) – Ministério da Saúde. Hepatite viral tipo C: casos captados pelo sistema de Vigilância Epidemiológica e notificados no SINAN – Brasil, de 1999 a 2007. Disponível em: http://189.28.128.179:8080/svs_informa/edicao-especial-abrasco-2009. Acesso em: 23 jan 2013.

SZLISZKA, E., *et al.* Chalcones Enhance TRAIL-Induced Apoptosis in Prostate Cancer Cells. **Int. J. Mol. Sci.**, v 11, p. 1-13, 2010.

TABATA, K., *et al.* Xanthoangelol, a Major Chalcone Constituent of *Angelica keiskei*, Induces Apoptosis in Neuroblastoma and Leukemia Cells. **Biol. Pharm. Bull.**, v. 28, p. 1404–1407, 2005.

TAGUCHI, K.; MOTOHASHI, H.; YAMAMOTO, M. Molecular mechanisms of the Keap1–Nrf2 pathway in stress response and cancer evolution. **Genes to Cells**, v.16, p. 123–140, 2011.

TAN, C.H., *et al.* Wash-out of Hepatocellular Carcinoma: Quantitative Region of Interest Analysis on CT. **Ann Acad Med Singapore**, v 40, p. 269-75, 2011.

- THANNICKAL, V. J.; FANBURG, B. L. Reactive oxygen species in cell signaling. **American Journal of Physiology-Lung Cellular and Molecular Physiology**, v. 279, p. L1005-L1028, 2000.
- THOPPIL, E.J.; BISHAYEE, A. Terpenoids as potential chemopreventive and therapeutic agents in liver cancer. **World J Hepatol.** v 3, p. 228-249, 2011.
- TRISTÃO, T. Triagem para a atividade antimicrobiana e potencial tóxico de uma série de chalconas sintéticas e seus derivados análogos. Centro de Ciências da Saúde – UNIVALI, 2008.
- UEDA S., *et al.* Redox Control of Cell Death. *Antioxid.* **Redox Signal.**, v. 4, p. 405-414, 2002.
- VALDAMERI, G., *et al.* Substituted Chromones as Highly Potent Nontoxic Inhibitors, Specific for the Breast Cancer Resistance Protein. **J. Med. Chem.**, v. 55, p. 966–970, 2012.
- VALKO, M.; RHODES, C.J.; MONCOL, J.; IZAKOVIC, M.; MAZUR, M. Free radicals, metals and antioxidants in oxidative stress-induced cancer. **Chem Biol Interact.**, v. 160(1), p. 1-40, 2006.
- VERMEULEN, K.; BOCKSTAELE, D. R. V.; BERNEMAN, Z. N. The cell cycle: a review of regulation, deregulation and therapeutic targets in cancer. **Cell Proliferation**, v. 36, p.131–149, 2003
- VINCENZO, R., *et al.* In vitro evaluation of newly chalcone analogues in human cancer cells. **Cancer Chemother Pharmacological**, v 46, p. 305-312, 2000.
- VOUSDEN, K. H. Outcomes of p53 activation - spoilt for choice. **Journal of Cell Science**, v. 119, p. 5015-5020, 2006.
- WHELAN, R. S.; KAPLINSKIY, V.; KITSIS, K.N. Cell Death in the Pathogenesis of Heart Disease: Mechanisms and Significance. **Annu. Rev. Physiol.**, v. 72, p. 19–44, 2010.
- WINTER, E., *et al.* Naphthylchalcones induce apoptosis and caspase activation in a leukemia cell line: The relationship between mitochondrial damage, oxidative stress and cell death. **Bioorganic & Medicinal Chemistry**, v 18, p. 8026–8034, 2010.
- WOJNÁROVITS, L. Characteristics of Radical Reactions, Spin Rules, and a Suggestion for the Consistent Use of a Dot on Radical Species. **Journal of Chemical Education**, v 88, p. 1658-1662, 2011.
- YADAV, Vivek.; PRASAD, Sahdeo.; SUNG, Bokyung.; AGGARWAL, Bharat. The role of chalcones in suppression of NF-κB-mediated inflammation and cancer. **International Immunopharmacology**, v. 11, p. 295-309, 2011.
- YATES, M.S., *et al.* Potent protection against aflatoxin-induced tumorigenesis through induction of Nrf2-regulated pathways by the triterpenoid 1-[2-cyano-3-, 12-dioxooleana-1,9(11)-dien-28-oyl]imidazole. **Cancer Res.**, v 66, p. 2488–2494, 2006.
- YATES M.S; KENSLER T.W. Keap1 eye on the target: chemoprevention of liver cancer. **Acta Pharmacol Sin.**, v. 28 p.1331-42, 2007

YIT, C.C. Cytotoxic effect of butein on human colon adenocarcinoma cell proliferation. *Cancer Letters*, v. 82, p. 65-72, 1994.

YUNES, R. A.; SILVA, F. Nitrochalcones: Potential in vivo insulin secretagogues. *Biochimie*, v. 91, p. 1493–1498, 2009.

ZAFARULLAHA, M., *et al.* Molecular mechanisms of N-acetylcysteine actions. *Cellular and Molecular Life Sciences*, v. 60, p. 6–20, 2003

ZHANG, K., *et al.* Inhibition of Glutathione Reductase by Plant Polyphenols. *Biochemical Pharmacology*, v 54, p. 1047-1053, 1997.

ZI X., SIMONEAU A.R. Flavokawain a, a novel chalcone from kava extract, induces apoptosis in bladder cancer cells by involvement of bax protein-dependent and mitochondriadependent apoptotic pathway and suppresses tumor growth in mice. *Cancer Res.*, v. 65, p. 3479–3486, 2005.