

**UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ**

**CARINA TOLEDO SCOPARO**



**EFEITOS DA HISPIDULINA E DE CHALCONAS SINTÉTICAS SOBRE  
CÉLULAS DE HEPATOCARCINOMA HUMANO (HepG2)**

**CURITIBA  
2016**

CARINA TOLEDO SCOPARO

**EFEITOS DA HISPIDULINA E DE CHALCONAS SINTÉTICAS SOBRE  
CÉLULAS DE HEPATOCARCINOMA HUMANO (HepG2)**

Tese de Doutorado apresentada 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: Prof. Dr. Alfredo Ricardo  
Marques de Oliveira

CURITIBA  
2016

## TERMO DE APROVAÇÃO

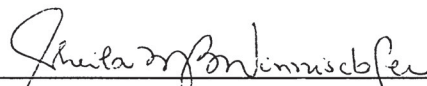
CARINA TOLEDO SCOPARO

Efeitos da hispidulina e de chalconas sintéticas sobre células de hepatocarcinoma humano (HepG2)

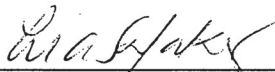
Tese aprovada como requisito parcial para obtenção do grau de Doutor no curso de Pós-Graduação em Ciências-Bioquímica, Setor de Ciências Biológicas, Universidade Federal do Paraná, pela seguinte banca examinadora:



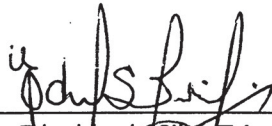
Prof.<sup>a</sup> Dr.<sup>a</sup> Maria Eliane M. Rocha – Orientadora  
Departamento de Bioquímica, UFPR



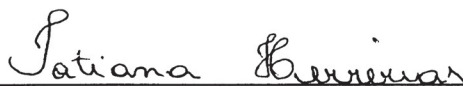
Prof.<sup>a</sup> Dr.<sup>a</sup> Sheila M. B. Winnischofer  
Departamento de Bioquímica, UFPR



Prof.<sup>a</sup> Dr.<sup>a</sup> Éia Sumie Nakao  
Departamento de Patologia Básica, UFPR



Prof. Dr. Edvaldo da Silva Trindade  
Departamento de Biologia Celular, UFPR



Prof.<sup>a</sup> Dr.<sup>a</sup> Tatiana Herrerias  
Núcleo de Ciências Biológicas e da Saúde, UP

Curitiba, 24 de fevereiro de 2016.

*Dedico esse trabalho de doutorado aos meus amados pais, José Roberto Scoparo e Tânia Scoparo, à minha amada irmã Camila Toledo Scoparo, à minha irmã de coração Normanda Souza Melo, ao meu companheiro de todas as horas Eduardo Barioni e a todos os amigos que contribuíram para que esse objetivo fosse alcançado!!*

*Sem o amor da família e sem o carinho dos amigos a vida torna-se uma infinidade de dias sem sentido, por isso agradeço a Deus por todos que fazem parte da minha vida e dedico este trabalho a essas pessoas.*

## AGRADECIMENTOS

Quero agradecer a todos que estiveram ao meu lado e me ajudaram de alguma forma em todas as etapas do meu mestrado e doutorado.

Aos meus pais José Roberto Scoparo e Tânia Scoparo que sempre estiveram ao meu lado, me apoiando, mesmo à distância, em todos os momentos de minha vida, que compartilharam comigo minhas vitórias e me deram força nos momentos em que mais precisei, devo toda minha vida e faço tudo que for preciso para estar com eles. A essência da minha vida, meu porto seguro, minha base, meus exemplos, cada conquista realizada eu devo a vocês.

À minha irmã Camila Scoparo por ser minha metade, por ser essa pessoa que eu não vivo sem, meu tudo, minha vida, desde sempre e pra sempre. A pessoa mais importante da minha vida, a melhor irmã que qualquer pessoa poderia ter, minha companheira pra tudo e minha inspiração para acordar todos os dias. Só tenho a agradecer por você ser assim, do jeitinho que é, a melhor companhia pra todas as horas.

À Prof<sup>ª</sup>. Maria Eliane, pela orientação, confiança, conversas, conselhos e liberdade que me foi concedida nesses anos; a ela que foi muito mais que uma orientadora, foi uma verdadeira mãe científica, só tenho a agradecer por tudo, todas as broncas, todos os conselhos, toda a psicologia utilizada em todos os anos e toda a ajuda que me permitiu concluir esse trabalho;

Ao meu namorado Eduardo Barioni, por todo o apoio, todas as conversas, o companheirismo, o amor e a compreensão em todos os meus 4 anos de doutoramento; eu só tenho a agradecer você por ser esse homem incrível, meu amor que também me inspira a cada dia que passa;

À Normanda (nenezinha) minha irmã de coração, que desde o início da minha vida aqui em Curitiba está presente não como uma amiga, mas como uma irmã, que só não veio da mesma mãe, mas que o sentimento é igualzinho. Amo você como amo a minha família e espero ter você por perto pra sempre.

A toda minha família por todo amor e apoio; minhas tias queridas Sônia e Rosana, que puderam assistir minha defesa e sabem o quanto isso foi importante pra mim e o quanto me deixou feliz, e também a tia Rúbia, agradeço a vocês por todo o amor, todo o carinho e cuidado que sempre tiveram comigo, amo vocês demais; aos meus tios queridos Mauro e Luís, que mesmo de longe estavam orando e torcendo por mim, amo muito vocês; e aos primos Marcela (que também

assistiu minha defesa e me deixou imensamente feliz), Gabriel, Laís e Luis Antônio por estarem sempre presentes em minha vida e por me amarem como eu os amo, vocês são meus amores.

Agradeço e dedico essa tese aos meus tios da família Toledo: Beto, Gelson, Fátima e Carlinhos, por todo amor que têm por mim, as tias que não são de sangue mas que amo igual, Eliete, Rose e Flávia, aos meus primos queridos Victor e Dani (que não puderam assistir minha defesa mas sei que estavam de coração torcendo e orando por mim), Aline, Gui, Rafa, Loraine, Fernanda, Vinicius e Thiago por sempre estarem presentes em minha vida e por me amarem como eu os amo;

A todos os meus amigos da vida, minhas amigas da química e as da bioquímica, à Patti Peres, à Karina Grisolia, minha outra irmã de coração e da vida;

Ao Prof<sup>o</sup>. Alfredo pela co-orientação, correções, dicas, enfim, tudo que me ajudou;

Ao Gláucio, e a todos os amigos do doutorado pelas imensas ajudas sempre que precisei;

Aos meus amigos da Bioquímica no geral, que de alguma forma fizeram parte de alguns momentos ou que me ajudaram de alguma forma neste período;

Aos colegas dos laboratórios pelos momentos passados juntos;

Aos coordenadores do Curso de Pós-Graduação, por toda dedicação prestada a nós;

A todos os professores, pós-graduandos e funcionários do Departamento de Bioquímica e Biologia Molecular – UFPR;

À CAPES, Fundação Araucária, Redoxoma e CNPq pelo apoio financeiro.

***“É impossível progredir sem mudanças,  
e aqueles que não mudam suas mentes  
não podem mudar nada”  
(George Bernard Shaw)***

## RESUMO

O carcinoma hepatocelular (CHC) é a mais comum neoplasia maligna primária do fígado em todo o mundo, sendo um dos mais agressivos. Os tratamentos apresentam muitas limitações e cada vez torna-se mais importante a busca de novos compostos que tragam menos efeitos colaterais e maior eficiência aos pacientes. Os flavonóides são um grupo de compostos polifenólicos com muitas atividades biológicas, incluindo propriedades antitumorais. Os efeitos antitumorais de vários flavonóides já estão descritos para alguns tipos de tumores, porém ainda há muito para ser descoberto. A flavona hispidulina já foi estudada em nosso laboratório, e verificou-se anteriormente que ela reduz a viabilidade de células de hepatocarcinoma humano (HepG2) provavelmente através da indução da geração de espécies reativas de oxigênio (ERO) e diminuição das defesas antioxidantes das células. Neste trabalho, foram avaliados outros efeitos citotóxicos da hispidulina. Observou-se que esta flavona reduz a atividade da catalase, induz a morte celular por apoptose com o envolvimento de ERO e apresenta seletividade sobre células tumorais (HepG2) quando comparada a células normais de fibroblasto L929. Neste trabalho foram avaliadas também cinco chalconas sintéticas verificando a importância da presença de grupo nitro e do grupo hidroxila na posição 2' para os efeitos citotóxicos em as células HepG2 e verificou-se também o possível envolvimento de ERO no processo de morte celular. Observou-se que todas as chalconas reduziram a viabilidade celular de maneira tempo e concentração-dependente e os valores de IC<sub>50</sub> obtidos utilizando células HepG2 indicaram que os compostos que apresentavam grupo nitro tiveram maior citotoxicidade, sendo a ordem crescente desses valores: 4-nitrochalcona > 2'-hidroxi-3-nitrochalcona > 3-nitrochalcona > 2'-hidroxichalcona > chalcona. Nas células L929, utilizando-se os mesmos compostos, observou-se uma redução da viabilidade celular com menor intensidade do que em células HepG2, sendo que as chalconas nitradas apresentaram maiores valores de IC<sub>50</sub> nos 3 tempos testados. Esse efeito observado em as células L929, juntamente com a avaliação da relação estrutura-atividade dos compostos, indicaram que as chalconas contendo grupo nitro foram as mais potentes, em relação a redução das defesas antioxidantes celulares, aumento das ERO e alterações no ciclo celular e, além disso apresentaram maior seletividade sobre células HepG2. Assim, os compostos que apresentaram-se como os mais promissores quanto aos efeitos antitumorais foram a 4-nitrochalcona e a 2'-hidroxi-3-nitrochalcona (HNC). Verificou-se ainda que a 4-nitrochalcona e a HNC promovem redução das defesas antioxidantes o que, pelo menos em parte, poderia contribuir para os mecanismos de indução da morte celular promovidos por estes compostos.

Palavras-chave: hispidulina, chalcona, HepG2, ERO, ciclo celular, enzimas antioxidantes



## ABSTRACT

Hepatocellular carcinoma (HCC) is the most common primary malignancy of the liver worldwide, being the most aggressive. The treatments have many limitations and increasingly becomes more important to search for new compounds to bring fewer side effects and greater efficiency to patients. Flavonoids are a group of polyphenolic compounds with many biological activities, including antitumor properties. The antitumor effects of several flavonoids are already described for some types of tumors, but much remains to be discovered. The flavone hispidulin has been studied in our laboratory, and it was found earlier that it reduces human hepatocarcinoma cell viability (HepG2) probably by inducing the generation of reactive oxygen species (ROS) and decreased antioxidant cell defenses. In this work, we evaluated other cytotoxic effects of hispidulin. It was observed that this flavone reduces catalase activity, inducing cell death by apoptosis with the involvement of ROS and provides selectivity for tumor cells (HepG2) when compared to normal fibroblast L929 cells. In this study were also evaluated five synthetic chalcones as the importance of the presence of nitro group and the hydroxyl group in position 2' to the cytotoxic effects on HepG2 cells and also found the possible involvement of ROS in the cell death process. It was observed that all chalcones reduced cell viability in a manner time and dose-dependent and IC50 values obtained using HepG2 cells indicated that compounds presented nitro group had higher cytotoxicity, with an ascending order of these values: 4-nitrochalcone > 2'-hydroxy-3-nitrochalcone > 3-nitrochalcone > 2'-hydroxychalcone > chalcone. In L929 cells using the same compounds, there was a reduction in cell viability at a lower intensity than HepG2 cells, wherein the nitrated chalcones showed higher IC50 values in the three times tested. This observed effect on the L929 cells together with the evaluation of structure-activity relationship of the compounds indicated that chalcones containing nitro group were the most potent with respect to reducing antioxidant defenses cell, increase of ROS and changes in cell cycle and also showed greater selectivity on HepG2 cells. Thus, compounds which show up as the most promising as antitumor effects were 4-nitrochalcone and 2'-hydroxy-3-nitrochalcone (HNC). It was also found that 4-nitrochalcone and HNC promote reduction of antioxidant defenses which, at least in part, might contribute to the induction of cell death mechanisms promoted by these compounds

Keywords: hispidulin, chalcone, HepG2, ERO, cell cycle, antioxidant enzymes

## LISTA DE FIGURAS

FIGURA 1 - ESTRUTURA BÁSICA DE UM FLAVONÓIDE COM ANEL C.....	21
FIGURA 2 - ESTRUTURA BÁSICA DA FLAVONA.....	23
FIGURA 3 - ESTRUTURA DA HISPIDULINA .....	24
FIGURA 4 - ESTRUTURA BÁSICA DAS CHALCONAS .....	26
FIGURA 5 - ESTRUTURAS DAS CHALCONAS.....	31
FIGURA 6 - FASES DO CICLO CELULAR .....	33
FIGURA 7 - ESQUEMA GERAL PARA A INDUÇÃO DA EXPRESSÃO DE GENES DE ENZIMAS ANTIOXIDANTES ATRAVÉS DA VIA DE SINALIZAÇÃO Keap1/Nrf2. ....	40
FIGURA 8 - VIA EXTRÍNSECA E INTRÍNSECA DA APOPTOSE .....	42
FIGURA 9 - FLUXOGRAMA EXPERIMENTAL .....	52
FIGURA 10 – EFEITOS DA HISPIDULINA SOBRE A ATIVIDADE DAS ENZIMAS ANTIOXIDANTES .....	62
FIGURA 11 – EFEITOS DA CO-INCUBAÇÃO COM HISPIDULINA E CATALASE EXÓGENA NA VIABILIDADE DAS CÉLULAS HepG2 .....	64
FIGURA 12 - ANÁLISE DOS NÍVEIS DE ERO INTRACELULAR NA PRESENÇA DE NAC .....	66
FIGURA 13 – EFEITOS DA HISPIDULINA SOBRE A VIABILIDADE DE CÉLULAS L929.....	67
FIGURA 14 – DUPLA MARCAÇÃO COM ANEXINA-V/7-AAD EM CÉLULAS HepG2 .....	71
FIGURA 15 - EFEITO DA CHALCONA SOBRE A VIABILIDADE DE CÉLULAS HEPG2 NOS TEMPOS DE 24, 48 E 72 HORAS .....	72
FIGURA 16 – EFEITOS DA CHALCONA SOBRE A VIABILIDADE DE CÉLULAS HepG2 PELO MÉTODO DO CRISTAL VIOLETA.....	73
FIGURA 17 - EFEITO DA 4-NITROCHALCONA SOBRE A VIABILIDADE DE CÉLULAS HepG2 NOS TEMPOS DE 24, 48 E 72 HORAS.....	75
FIGURA 18 – EFEITOS DA 4-NITROCHALCONA SOBRE A VIABILIDADE DE CÉLULAS HepG2 PELO MÉTODO DO CRISTAL VIOLETA.....	76
FIGURA 19 - EFEITO DA 3-NITROCHALCONA SOBRE A VIABILIDADE DE CÉLULAS HepG2 NOS TEMPOS DE 24, 48 E 72 HORAS.....	77
FIGURA 20 - EFEITO DA HC SOBRE A VIABILIDADE DE CÉLULAS HepG2 APÓS INCUBAÇÃO POR 24, 48 E 72 HORAS .....	79

FIGURA 21 - EFEITO DA HNC SOBRE A VIABILIDADE DE CÉLULAS HepG2 APÓS INCUBAÇÃO POR 24, 48 E 72 HORAS .....	81
FIGURA 22 - EFEITOS DAS CHALCONAS SOBRE OS NÍVEIS INTRACELULARES DE ERO EM CÉLULAS HepG2 NO TEMPO DE 24 HORAS .....	85
FIGURA 23 - EFEITOS DAS CHALCONAS SELECIONADAS SOBRE O CICLO CELULAR POR CITOMETRIA DE FLUXO.....	90
FIGURA 24 – EFEITOS DAS CHALCONAS SOBRE A ATIVIDADE DAS ENZIMAS ANTIOXIDANTES .....	92

## LISTA DE TABELAS

TABELA 1 - VALORES DE IC <sub>50</sub> DA HISPIDULINA EM CÉLULAS HEPG2 E L929 .....	68
TABELA 2 - VALORES DE IC <sub>50</sub> DAS CHALCONAS EM CÉLULAS HEPG2 .....	83
TABELA 3 - VALORES DE IC <sub>50</sub> DAS CHALCONAS EM CÉLULAS L929.....	84

## LISTA DE SÍMBOLOS E ABREVIATURAS

- 7-AAD - 7-amino-actinomicina D
- ADP - Adenosina difosfato
- AIF - fator indutor de apoptose
- Apaf-1 - protease ativadora de apoptose fator 1
- ARE – *antioxidant response element*
- ATP – Adenosina trifosfato
- Bax/Bak - proteínas pró-apoptóticas
- Bcl2/Bcl-xL - proteínas anti-apoptóticas
- Bid - proteína pró-apoptótica
- CAT – Catalase
- CHA- chalcona
- CHC – Carcinoma hepatocelular
- CuZnSOD – Cobre-Zinco Superóxido dismutase
- DCFDA - 2'-7'-Dichlorodihidrofluoresceína diacetato
- DISC - complexo sinalizador indutor de morte
- ERO – Espécies reativas de oxigênio
- FADD - domínio de morte associado à Fas
- Fas-L - ligante de Fas;
- Flip - proteína inibidora de FLICE.
- GSH – Glutathiona reduzida
- Gred – Glutathiona redutase
- Gpx1 – Glutathiona peroxidase 1
- GSSG - Glutathiona oxidada
- HC – 2'-hidroxichalcona

HNC- 2'-hidroxi-3-nitrochalcona

IAP – proteínas inibidoras de apoptose

IC<sub>50</sub> - Concentração responsável por obter 50% de redução máxima

KEAP1 - ECH Kelch associando proteína 1

MnSOD – Manganês Superóxido dismutase

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

3-NCHA – 3-nitrochalcona

4-NCHA – 4-nitrochalcona

NAC - N-acetilcisteína

Nrf2 - *NF-E2-related factor 2*

PBS – solução salina tamponada

PE - Phicoeritrina

Pi – Fosfato inorgânico

SFB – Soro fetal bovino

SOD – Superoxido dismutase

VHB – Vírus da hepatite B

VHC – Vírus da hepatite C

Smac - segundo ativador de caspase mitocondrial

TRAIL - ligante indutor de apoptose relacionado ao TNF

## SUMÁRIO

<b>1. INTRODUÇÃO</b>	<b>16</b>
<b>2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA</b>	<b>18</b>
<b>2.1 CARCINOMA HEPATOCELULAR</b>	<b>18</b>
<b>2.2 FLAVONÓIDES</b>	<b>20</b>
2.2.1 Flavonas	22
2.2.1.1 Hispidulina	23
2.2.2 Chalconas	25
2.2.2.1 Atividades Biológicas	26
2.2.2.2 Relação estrutura-atividade	27
<b>2.3 ALVOS CELULARES DOS COMPOSTOS ANTITUMORAIS</b>	<b>32</b>
2.3.1 Ciclo celular	32
2.3.2 Defesas Antioxidantes e Espécies Reativas	37
<b>2.4 MORTE CELULAR</b>	<b>41</b>
2.4.1 Tipos de morte celular	41
2.4.1.1 Apoptose	41
2.4.1.2 Necrose	45
2.4.1.3 Autofagia	46
2.4.1.4 Catástrofe mitótica	46
<b>3. JUSTIFICATIVA E OBJETIVOS</b>	<b>50</b>
<b>4. ESTRATÉGIA EXPERIMENTAL</b>	<b>52</b>
<b>5. MATERIAIS E MÉTODOS</b>	<b>53</b>
<b>5.1 REAGENTES</b>	<b>53</b>
<b>5.2 PREPARO DA HISPIDULINA E DAS CHALCONAS</b>	<b>53</b>
<b>5.3 CÉLULAS</b>	<b>53</b>
<b>5.4 ESTERILIZAÇÃO DE MATERIAIS</b>	<b>54</b>
<b>5.5 SOLUÇÕES E MEIOS DE CULTURA</b>	<b>54</b>
5.5.1 Solução Salina Tamponada (PBS)	54
5.5.2 Meio de Cultura	54
5.5.3 Solução de Tripsina-EDTA	54
<b>5.6 PROCEDIMENTOS DE CULTIVO</b>	<b>55</b>
<b>5.7 ENSAIOS EM CÉLULAS</b>	<b>55</b>
5.7.1 Viabilidade Celular	55
5.7.1.1 Método do MTT	55
5.7.1.2 Método do Cristal Violeta	56
5.7.2 Níveis intracelulares de ERO	57
5.7.3 Análise do ciclo celular	57
5.7.4 Atividade das Enzimas Antioxidantes	58
5.7.4.1 Atividade da Catalase	58
5.7.4.2 Atividade da Superóxido Dismutase (SOD)	58
5.7.4.3 Atividade da Glutathiona Redutase (Gred)	59
5.7.5 Ensaio de apoptose	59

	15
5.7.6 Determinação da concentração de proteínas _____	59
5.7.7 Análise estatística _____	60
<b>6. RESULTADOS E DISCUSSÃO _____</b>	<b>61</b>
<b>6.1 EFEITOS DA HISPIDULINA SOBRE CÉLULAS DE CARCINOMA HEPATOCELULAR HepG2 E CÉLULAS DE FIBROBLASTO MURINO (L929) _____</b>	<b>61</b>
6.1.1 Atividade das Enzimas Antioxidantes _____	62
6.1.2 Efeitos da adição de catalase exógena em células HepG2 expostas a hispidulina _____	63
6.1.3 Níveis intracelulares de ERO na presença de NAC _____	65
6.1.4 Determinação da Viabilidade de células de fibroblasto murino L929 tratadas com hispidulina _____	67
6.1.5 Detecção de apoptose _____	69
<b>6.2 EFEITOS DAS CHALCONAS SOBRE CÉLULAS DE CARCINOMA HEPATOCELULAR HepG2 _____</b>	<b>71</b>
6.2.1 Chalcona (CHA) _____	71
6.2.1.1 Efeitos da chalcona sobre a viabilidade de células HepG2 analisados pelo método do MTT _____	71
6.2.1.2 Efeitos da chalcona sobre a viabilidade de células HepG2 analisados pelo método do Cristal Violeta _____	73
6.2.2. 4-Nitrochalcona (4-NCHA) _____	74
6.2.2.1. Efeitos da 4-nitrochalcona sobre a viabilidade de células HepG2 analisada utilizando o método do MTT _____	74
6.2.2.2 Efeitos da 4-nitrochalcona sobre a viabilidade de células HepG2 analisados pelo Método do Cristal Violeta _____	75
6.2.3 3-Nitrochalcona (3-NCHA) _____	77
6.2.3.1 Efeitos da 3-nitrochalcona sobre a viabilidade de células HepG2 analisados pelo Método do MTT _____	77
6.2.4. 2'-Hidroxichalcona (HC) _____	78
6.2.4.1 Efeitos da 2'-hidroxichalcona sobre a viabilidade de células HepG2 analisados pelo método do MTT _____	78
6.2.5. 2'-Hidroxi-3-Nitrochalcona (HNC) _____	80
6.2.5.1. Efeitos da 2'-hidroxi-3-nitrochalcona sobre a viabilidade de células HepG2 analisados pelo Método do MTT _____	80
6.2.6 Comparação dos valores de IC <sub>50</sub> _____	81
<b>6.3. EFEITOS DA CHALCONA, 2'-HIDROXICHALCONA, 2'-HIDROXI-3-NITROCHALCONA, 3-NITROCHALCONA E 4-NITROCHALCONA EM CÉLULAS NORMAIS IMORTALIZADAS DE FIBROBLASTO (L929) _____</b>	<b>83</b>
<b>6.5. Efeitos das chalconas sobre os níveis de ERO _____</b>	<b>84</b>
<b>6.5. ANÁLISE DO CICLO CELULAR _____</b>	<b>86</b>
<b>6.6. ATIVIDADE DAS ENZIMAS ANTIOXIDANTES _____</b>	<b>92</b>
<b>7. DISCUSSÃO FINAL _____</b>	<b>96</b>
<b>8. CONCLUSÕES _____</b>	<b>102</b>
<b>9. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS _____</b>	<b>103</b>
<b>10. ARTIGOS CIENTÍFICOS _____</b>	<b>122</b>



## 1. INTRODUÇÃO

O carcinoma hepatocelular (CHC) é um tumor maligno hepático com alta incidência e taxa de mortalidade, que decorre, principalmente de sua patogênese metastática e da reduzida eficácia dos tratamentos empregados atualmente (MENDEZ-SANCHEZ *et al.*, 2014; SINGAL; ELSERAG, 2015). Apesar de diversos compostos serem descritos na literatura científica como eficazes em células tumorais, poucos são os relatos de quimioterápicos com baixa toxicidade em células não tumorais, assim, a alta toxicidade sistêmica leva os pacientes a abandonarem o tratamento antes de sua total eficácia (MAHATO *et al.*, 2011). O sorafenibe é um quimioterápico bastante utilizado recentemente e aprovado para o tratamento clínico do CHC, no entanto, o mau prognóstico observado após sua utilização, relacionado, por exemplo, à taxa de sobrevida após 5 anos, letalidade, mortalidade e recorrência da doença, tem estimulado a busca por novos compostos que possam apresentar melhores resultados (BUPATHI *et al.*, 2015; FITZMORRIS *et al.*, 2015; KALYAN *et al.*, 2015).

Os flavonóides são um grupo de compostos polifenólicos com muitas atividades biológicas, incluindo propriedades antitumorais, assim, neste trabalho investigou-se a ação citotóxica de duas classes desses compostos em células de carcinoma hepatocelular (HepG2). A flavona hispidulina já foi estudada em nosso laboratório e verificou-se que ela é capaz de reduzir a viabilidade de células HepG2 provavelmente através da indução da geração de espécies reativas de oxigênio (ERO) e diminuição das defesas antioxidantes destas células (SCOPARO, 2012), além de ser capaz de reduzir a atividade de enzimas da cadeia respiratória em mitocôndrias isoladas de fígado de rato (DABAGHI-BARBOSA *et al.*, 2005). Neste trabalho, o primeiro objetivo foi complementar os estudos sobre a importância das ERO na indução de morte celular promovida pela hispidulina, e a possível seletividade deste composto em células HepG2. Para comparar esses efeitos foram utilizadas como modelo celular não tumoral células de fibroblasto murino L929.

As chalconas representam a outra classe de flavonóides estudada nesse trabalho, visto que são descritos na literatura efeitos antitumorais desses compostos sobre algumas linhagens celulares, como, HCT116 (câncer de cólon humano) (KUO *et al.*, 2010), MCF-7 (câncer de mama humano) (HSU *et al.*, 2010), K562 (leucemia humana) (ROMAGNOLI *et al.*, 2010), B16-F10 (melanoma murino) (NAVARINI, 2009), entre outros. No entanto, até o momento foram pouco descritos

efeitos de chalconas contendo grupamentos nitro e/ou hidroxila na sua estrutura, em especial, sobre células HepG2, bem como a avaliação da seletividade desses compostos sobre células tumorais. Assim, o segundo objetivo do trabalho foi avaliar o mecanismo de ação desses compostos, sendo os resultados discutidos de forma comparativa com a finalidade de demonstrar a importância dos substituintes sobre os efeitos biológicos.

Deste modo, tendo em vista a ausência de drogas eficazes para o tratamento do hepatocarcinoma e os importantes efeitos biológicos já descritos para os flavonóides em outros estudos, o objetivo geral deste trabalho foi avaliar os efeitos citotóxicos da hispidulina, da chalcona e de chalconas modificadas (nitradas e/ou hidroxiladas) sobre células HepG2.

## 2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

### 2.1 CARCINOMA HEPATOCELULAR

O carcinoma hepatocelular (CHC) é o principal tipo histológico de câncer primário de fígado, e figura entre os tumores com maior incidência no mundo, sendo um dos mais agressivos e raramente curáveis quando não detectado precocemente (CHA *et al.*, 2010; STAGOS *et al.*, 2012; HATZARAS *et al.*, 2014; SINGNAL; EL-SERAG, 2015). São observadas mais de 600.000 mortes em decorrência desta doença anualmente (WOO; HEO, 2015), figurando como a terceira causa mais comum de morte relacionada ao câncer e o sexto tipo de câncer mais prevalente no mundo (CHENG *et al.*, 2014; LEE *et al.*, 2014; BUPATHI *et al.*, 2015; WOO; HEO, 2015).

Existem diversas possíveis causas atribuídas ao câncer primário de fígado como a distribuição e história natural da hepatite B e C, a exposição prolongada a algumas substâncias alimentares cancerígenas, alcoolismo, cirrose (NEUSCHWANDER-TETRI *et al.*, 2003; BOSCH *et al.*, 2004; PANG *et al.*, 2006; EL-SERAG *et al.*, 2011; STAGOS *et al.*, 2012) e, possivelmente, obesidade, diabetes e esteatose hepática não-alcoólica (SCHÜTTE *et al.*, 2009; WÖRNS *et al.*, 2009).

A distribuição destes fatores de riscos é bastante variável mundialmente e depende principalmente da região geográfica e da etnia (ELSERAG *et al.*, 2007). Percebe-se que sua incidência é maior em países pouco desenvolvidos e endêmicos para infecção do vírus da hepatite B, principalmente no continente Asiático e Africano. No entanto, países desenvolvidos mas com elevadas taxas de infecção pelo vírus da hepatite C, como países da Europa e América do Norte também apresentam elevada incidência de CHC (KEW, 2013). A cirrose, associada também ao alcoolismo e a hepatite crônica, é indicada como o principal fator de risco para o desenvolvimento do hepatocarcinoma, sendo responsável por quase metade dos casos (RAOUL, 2008; INCA, 2013).

De acordo com diversos estudos, o CHC não possui tratamento específico, sendo o prognóstico ruim e a taxa de sobrevida reduzida, por ser uma neoplasia com alto potencial para a invasão vascular e metástases para locais distantes (ROYAIE *et al.*, 2004; WÖRNS *et al.*, 2009; WÖRNS *et al.*, 2010). Quando não

tratado geralmente leva a morte, como resultado da progressão local do tumor. Assim, o estágio do tumor é essencial para prever o prognóstico de pacientes com câncer e para orientar a conduta terapêutica (CHOI *et al.*, 2014; MENDEZ-SANCHEZ *et al.*, 2014).

Entre as opções terapêuticas, a ressecção cirúrgica encontra-se como uma das mais eficazes, no entanto é restrita a pacientes diagnosticados em estágios iniciais de desenvolvimento do tumor, com eficiência em torno de 90% (EL-SERAG *et al.*, 2008). Quando o tumor é diagnosticado em fase que não há mais indicação para ressecção, a ablação por radiofrequência ou a quimioembolização transarterial são as opções disponíveis (POON *et al.*, 2004; STAGOS *et al.*, 2012). Mas, na maioria dos casos, o diagnóstico se dá em fases mais avançadas da doença, sendo o transplante hepático o tratamento mais indicado. Porém, apresenta limitações como o número de doadores e a compatibilidade, o tamanho do tumor, sua profundidade e a presença ou não de metástase. (BOSCH *et al.*, 2004; CHOI *et al.*, 2011).

Tratamentos sistêmicos eficazes são bastante limitados (WÖRNS *et al.*, 2009; FORNER *et al.*, 2012; HE *et al.*, 2012) e a taxa de sobrevivência de 5 anos não chega a 27% para pacientes com diagnóstico de CHC em estágio avançado (PUSZYK *et al.*, 2013). Isso ocorre, principalmente porque essa neoplasia é classificada com elevada quimiorresistência e, deste modo, a eficácia da quimioterapia sistêmica convencional é reduzida, sendo que os principais agentes utilizados são: a doxorubicina, etoposídeo, cisplatina, mitoxantrona, paclitaxel, irinotecan, gemcitabina, capecitabina, nolatrexed, 5-fluorouracil e também associações de alguns destes fármacos (WRZESINSKI *et al.*, 2011).

Embora a doxorubicina seja o agente mais utilizado na prática clínica, permite uma resposta parcial apenas em cerca de 10% dos doentes sem melhorar de forma significativa a sobrevivência global (JOHNSON *et al.*, 2000; YEO *et al.*, 2005; CHEUNG *et al.*, 2010; GIGLIA *et al.*, 2010; 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).

Recentemente, o sorafenibe também tem sido um quimioterápico muito utilizado no tratamento do CHC. Ele foi o primeiro composto a demonstrar aumento nas taxas de sobrevivência em pacientes com CHC em estágio avançado (ALVES *et al.*, 2011). O efeito antitumoral desta molécula é proveniente de sua ação inibitória em algumas quinases responsáveis pela sinalização da proliferação

celular e angiogênese, dentre as quais os receptores de membrana com atividade intrínseca de tirosina-quinase, como os receptores para o fator de crescimento endotelial vascular (VEGFR-1, 2 e 3).

Diversos efeitos colaterais provocados pelo sorafenibe têm sido descritos, devido, possivelmente, à sua baixa seletividade sobre células tumorais e elevada toxicidade sobre células normais, como por exemplo: cardiotoxicidade, neurotoxicidade, náuseas, vômito, diarreia, mucosite, dor epigástrica, hiperpigmentação cutânea, entre outras (SOUZA *et al.*, 2000; OZEKI; NATORI, 2010). Observa-se, também, que esse composto se apresenta com elevado valor no mercado e que, apesar de prolongar a sobrevida de 2 a 3 meses, apresenta pequenos efeitos sobre a qualidade de vida dos pacientes e a relação custo benefício pode não trazer muitas vantagens (ZHANG *et al.*, 2010).

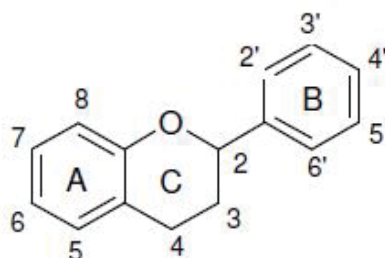
Assim, o mau prognóstico observado após sua utilização tem estimulado a busca por novos compostos que possam representar uma melhor alternativa (BUPATHI *et al.*, 2015; FITZMORRIS *et al.*, 2015; KALYAN *et al.*, 2015).

Agentes com a capacidade para induzir a apoptose seletiva de células tumorais tem ganhado atenção no campo da descoberta de novas drogas, sendo que os mecanismos de morte celular induzidos por flavonóides ainda não estão completamente compreendidos. Devido, então, à gravidade do CHC e a baixa evolução clínica obtida com as terapias sistêmicas atuais utilizadas, há uma grande necessidade de se encontrar novos compostos que possuam maior eficiência e seletividade para o tratamento dessa neoplasia. Neste sentido, diversos compostos fitoterápicos vêm sendo estudados, como, por exemplo, os polifenóis, que têm demonstrado efeitos promissores (HERREIAS, 2009; THOPPIL; BISHAYEE, 2011; KAY, 2010; VALDAMERI *et al.*, 2011).

## 2.2 FLAVONÓIDES

Os flavonóides são metabolitos secundários de plantas, derivados de 2-fenil-benzil- $\gamma$ -pirona, presentes em todo o reino vegetal, e 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 (HARBONE; WILLIAMS, 2000; HEIN *et al.*, 2002) (FIGURA 1). De acordo com as variações no anel heterocíclico C, os flavonóides são classificados em flavonas, flavonóis, dihidroflavonas, chalconas, flavanas, entre outros.

FIGURA 1 - ESTRUTURA BÁSICA DE UM FLAVONÓIDE COM ANEL C



FONTE: O autor (2015)

A estrutura básica dos flavonóides permite combinações estruturais de padrões de substituição nos anéis A e B. Em cada classe de flavonóides encontramos substituições como grupos hidroxila, metoxila, O-ou C-glicosil, nitro entre outros, e isso garante a esses compostos uma diversidade de aplicações biológicas (CORRADINI *et al.*, 2011; MAI *et al.*, 2014).

Nas plantas, os flavonóides são encontrados em concentrações maiores que 1 mM e são responsáveis pela cor e odor, além de possuírem atividades antibacterianas e antifúngicas, contribuindo para muitos aspectos da fisiologia das plantas e oferecendo proteção contra raios UV (ultravioletas) (HEIN *et al.*, 2002). Além disso, participam da fotossíntese como reguladores dos canais de íons e também como catalisadores do transporte de elétrons envolvidos na fosforilação oxidativa (HEIN *et al.*, 2002).

Esses compostos destacam-se devido às diversas atividades biológicas que possuem (MIERZIAK *et al.*, 2014; SINGH *et al.*, 2014; SANTOS *et al.*, 2015), tais como anti-inflamatória, antioxidante, antiviral e antitumoral (SINGH *et al.*, 2014; SANTOS *et al.*, 2015).

A maioria das funções biológicas dos flavonóides resulta de suas propriedades antioxidantes (MIERZIAK *et al.*, 2014), desempenhando um papel fundamental na proteção contra agentes oxidantes, como, por exemplo, os raios ultravioletas, a poluição ambiental, entre outros (REN *et al.*, 2003). Demonstrou-se que esses compostos podem atuar como sequestradores de espécies reativas de oxigênio (ERO) como ânion superóxido ( $O_2^{\bullet-}$ ), radicais hidroxila ( $OH^{\bullet}$ ) e peroxila ( $LOO^{\bullet}$ ), exercendo o papel de antioxidantes celulares (HARBORNE; WILLIAMS, 2000).

No entanto, diversos estudos realizados recentemente relacionam-se às atividades antitumorais dos flavonóides com propriedades pró-oxidantes, como a inibição do crescimento de células tumorais, sendo que a propriedade pró-oxidante é dependente tanto da concentração usada quanto da estrutura desses compostos (UEDA *et al.*, 2002; LIN *et al.*, 2008; SINGH *et al.*, 2014).

Diversos flavonóides possuem efeitos antiproliferativos em diferentes linhagens de células tumorais, e, ainda assim, o mecanismo pelo qual esses compostos exercem atividades antitumorais não é totalmente compreendido. Inúmeros autores têm investigado tais propriedades dos flavonóides, e várias tentativas foram feitas para elucidar as relações estrutura-atividade desses compostos (MARTÍNEZ-FLORES *et al.*, 2002; ECHEVERRIA *et al.*, 2009; SINGH *et al.*, 2014;).

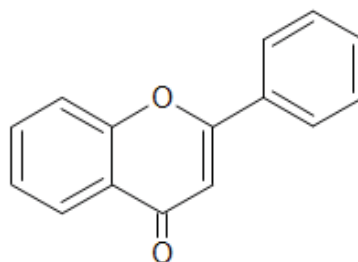
Tendo em vista estudos recentes de atividade antimoral de diversos flavonóides, as classes de interesse para este trabalho são as flavonas e as chalconas.

### 2.2.1 Flavonas

As flavonas apresentam como estrutura básica a 2-fenilcromen-4-ona (2-fenil-4H-1-benzopirano-4-ona) (FIGURA 2) com fórmula molecular  $C_{15}H_{10}O_2$  (SINGH *et al.*, 2014). As flavonas estão presentes em frutas e vegetais constantes em nossa dieta diária, trazendo diversos benefícios a saúde com reduzidos efeitos colaterais (SINGH *et al.*, 2014). No entanto, raramente esses compostos são encontrados em sua estrutura básica, sendo na maioria das vezes glicosilados ou com a presença de outros substituintes (KILANI-JAZIRI *et al.*, 2012; SINGH *et al.*, 2014).

Vários derivados naturais, semissintéticos e sintéticos de flavonas têm sido sintetizados e avaliados em diversas atividades biológicas, como anti-inflamatórias, antiestrogênicas, antimicrobianas, antialérgicas, antioxidantes, antitumoral e atividades citotóxicas (KILANI-JAZIRI *et al.*, 2012; SINGH *et al.*, 2014).

FIGURA 2 - ESTRUTURA BÁSICA DAS FLAVONAS



Flavona

FONTE: O autor (2015)

Na maioria das doenças metabólicas, há questionamentos quanto as suas origens e a relação que possuem com o estresse oxidativo, sendo que diversos estudos recentes têm demonstrado efeitos benéficos de flavonas no tratamento e/ou prevenção de doenças relacionadas ao estresse, tais como a aterosclerose, diabetes, câncer, Alzheimer, entre outras (SINGH *et al.*, 2014).

Devido à variedade de atividades biológicas das flavonas, a relação estrutura-atividade desses compostos tem gerado bastante interesse no desenvolvimento de novos compostos com diferentes substituintes. Tem sido demonstrado que flavonas com a presença de grupos hidroxila apresentam diversas atividades biológicas sobre células tumorais, como a flavona apigenina (4,5,7-trihidroxi-flavona) que induz a apoptose em células de carcinoma humano hepatocelular HepG2, (CHIANG *et al.*, 2006).

Herrerias (2009) analisaram, por exemplo, em nosso laboratório, o efeito citotóxico da flavona, hispidulina, eupafolina, apigenina e luteolina (50  $\mu$ M, 48h) em células de melanoma humano B16-F10 e observaram que as flavonas são capazes de reduzir a viabilidade dessas células, além de apresentarem diversos outros efeitos sobre parâmetros oxidativos celulares, como alterações na atividade das enzimas antioxidantes e enzimas relacionadas ao metabolismo mitocondrial.

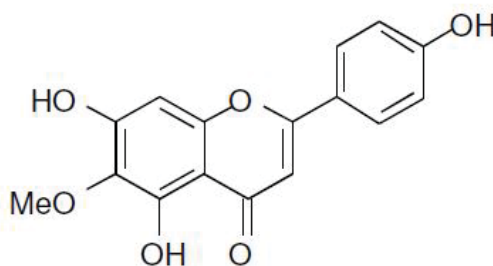
Deste modo, tendo em vista que a flavona hispidulina apresenta efeitos citotóxicos sobre algumas linhagens celulares, mas há poucos estudos sobre os efeitos deste composto em células de carcinoma hepatocelular, ela foi a escolhida para os ensaios em células HepG2, com o objetivo de verificar o seu mecanismo de ação.

#### 2.2.1.1 Hispidulina



A hispidulina (5,7,4'-trihidroxi-6-metoxiflavona) (FIGURA 3) é uma flavona encontrada em muitas plantas, como por exemplo *Eupatorium littorale* Cabrera (OLIVEIRA *et al.*, 2001), *Artemisia vulgaris* L. (LEE *et al.*, 1998) e *Arnica Montana* L. (NIKOLOVA *et al.*, 2013), entre outras utilizadas no Brasil, por suas diferentes atividades biológicas. Em um trabalho realizado em nosso laboratório, foi observado que esta flavona atua como desacopladora da fosforilação oxidativa em mitocôndrias isoladas de fígado de rato. Foi demonstrado que esta flavona apresentou efeitos sobre parâmetros relacionados com o transporte de elétrons na cadeia respiratória mitocondrial, por inibir atividades de enzimas da cadeia respiratória e o consumo de oxigênio, o que pode contribuir para o aumento de ERO intracelular. Além disso ela foi capaz de promover a liberação de ferro de ferritina, o qual poderia ser utilizado para catalisar reações que geram ERO, como ocorre na reação de Fenton, onde o ferro livre pode reagir com peróxido de hidrogênio formando radical hidroxila (extremamente reativo), podendo oxidar várias biomoléculas (DABAGUI-BARBOSA *et al.*, 2005).

FIGURA 3 - ESTRUTURA QUIMICA DA HISPIDULINA



FONTE: O autor (2015)

Recentemente, demonstrou-se em nosso laboratório que a incubação de células HepG2 com a hispidulina é capaz de diminuir a viabilidade celular de maneira dependente do tempo e concentração, e que esse efeito foi acompanhado de aumento nos níveis de ERO, diminuição nos níveis de GSH intracelular, assim como diminuição nos níveis de expressão no mRNA da catalase (SCOPARO, 2012).

Também se observou que a hispidulina (100  $\mu$ M) reduz em 40% a viabilidade da linhagem de células HeLa e esta citotoxicidade pode, pelo menos em parte, ser explicada pelas alterações nos parâmetros respiratórios (BARBOSA *et al.*, 2005; HERRERIAS, 2005). Herrerias (2009) verificou que a hispidulina (10  $\mu$ M)

reduz em 20% a proliferação de células de melanoma humano B16-F10 em 48 horas de incubação. Ao relacionar a atividade antiproliferativa e a estrutura química das flavonas, pode-se observar que o grupamento 6-metoxil presente na estrutura da hispidulina pode ter sido o responsável por reduzir o efeito antiproliferativo quando comparados seus efeitos aos das outras flavonas testadas não metoxiladas, como a apigenina, a luteolina e a flavona.

Gao *et al.* (2014), observaram que a hispidulina (50 - 200  $\mu$ M, 24h) induz a apoptose em células HepG2 e sugeriram que o efeito pró-apoptótico foi mediado através de disfunção mitocondrial e inibição da via de sinalização celular P13K/Akt. Em outro trabalho recente, estes autores observaram que a hispidulina (12,5 – 50  $\mu$ M, 48h) induz apoptose e bloqueia o crescimento e a progressão do ciclo celular em células de câncer da vesícula biliar (GBC) (GAO *et al.*, 2015).

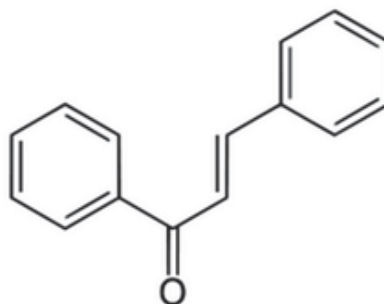
Em outros estudos, foi observado que a incubação de células de glioblastoma multiforme humano (GBM8401 e GBM8901) com hispidulina (40 e 60  $\mu$ M, 12-48 horas) causa parada de ciclo celular em G1 e induz apoptose através de um aumento na expressão das proteínas p53 e p21 (LIN *et al.*, 2010). Recentemente, a hispidulina foi descrita por induzir apoptose via receptor TRAIL, ativar caspases-8 e -3 em células de câncer de ovário humano (YANG *et al.*, 2010) e inibir o crescimento de células de tumor de pâncreas humano em um modelo xenográfico (HE *et al.*, 2011).

No entanto não foi estudada a ação dessa flavona sobre a atividade das enzimas antioxidantes e outros parâmetros oxidativos para confirmar se a morte celular está ocorrendo devido a um aumento dos níveis de ERO (em especial  $H_2O_2$ ) intracelular, bem como qual o mecanismo de morte de células HepG2 promovido pela hispidulina.

### 2.2.2 Chalconas

As chalconas têm, atualmente, atraído muita atenção devido às suas diversas atividades biológicas, como, por exemplo, antitumoral, antioxidante, anti-inflamatória, entre outras (CAMPOS *et al.*, 2003; BHAT *et al.*, 2005; NOWAKAWSKA, 2007). Essa classe de flavonóides representa um grupo de enonas aromáticas com estrutura básica de 1,3-difenil-2-en-1-ona (FIGURA 4), sendo que essa estrutura é base para a síntese de outros flavonóides (MAI *et al.*, 2014; MAHAPATRA *et al.*, 2015; KARTHIKEYAN *et al.*, 2015).

FIGURA 4 - ESTRUTURA BÁSICA DAS CHALCONAS



FONTE: O autor (2015)

### 2.2.2.1 Atividades Biológicas

As chalconas são constituídas por dois anéis aromáticos ligados por uma região  $\alpha$ ,  $\beta$ -insaturada com um grupo carbonila. Tem sido demonstrado que a remoção dessa região carbonila- $\alpha$ ,  $\beta$ -insaturada pode reduzir as suas atividades biológicas (SAHU *et al.*, 2012; MAI *et al.*, 2014; SINGH *et al.*, 2014; KARTHIKEYAN *et al.*, 2015; MAHAPATRA *et al.*, 2015).

Dentre as atividades biológicas desses compostos, encontram-se as atividades: hipocolesterolêmica, antioxidante, antitumoral, imunomoduladora, antiinflamatória, antibacteriana, antifúngica, antiviral (BHAT *et al.*, 2005; NOWAKAWSKA, 2007; KARTHIKEYAN *et al.*, 2015; SINGH *et al.*, 2014) entre outras.

Estudos que abordam atividade leishmanicida também foram descritos, onde se observou que a chalcona metoxilada no anel B (posições 4' e 6') e com grupamento nitro na posição 3 foi a que apresentou melhores resultados, com aumento da atividade seletiva contra os parasitas quando comparada com a chalcona natural DMC (2',6'-dihydroxy-4'-methoxychalcona), apresentando  $IC_{50}$  de 0,7 e 15,8  $\mu$ M contra promastigotos e amastigotos respectivamente, enquanto a chalcona DMC apresentou valores de  $IC_{50}$  de 25,3 e 4  $\mu$ M respectivamente (BOECK *et al.*, 2006).

Em relação à atividade antitumoral das chalconas, Szliszka *et al.* (2010) verificaram que a chalcona (1,3-difenil 2-propenona) (50  $\mu$ M) promove uma redução de 60% da viabilidade de células tumorais de próstata (LNCaP) após a incubação combinada com TRAIL (100 ng/mL) por 48 horas, sendo que quando a incubação foi realizada apenas com a chalcona ou com TRAIL o efeito citotóxico foi menor do que quando comparado ao tratamento combinado (TRAIL + chalcona).

Shen *et al.* (2007) também avaliaram os efeitos da estrutura básica da chalcona em células tumorais de bexiga (T24 e HT-1376) e observaram uma inibição da proliferação pela indução da apoptose, identificada através da liberação de citocromo C e ativação das caspases 3 e 9, após 12 horas de incubação e parada do ciclo celular na fase G2/M após incubação por 6 horas na concentração de 6  $\mu$ M.

Também foi observado que a incubação de células MCF-7 e MDA-MB-231 (câncer de mama) com a chalcona (1,3-difenil-2-en-1-ona) promove parada do ciclo celular em G2/M por aumentar a expressão de p21 e p27 e reduzir níveis de ciclinas (HSU *et al.*, 2006).

No entanto, modificações sintéticas realizadas na estrutura das chalconas podem afetar as atividades biológicas, inclusive antitumorais, destes compostos. Exemplos de substituições realizadas na estrutura das chalconas encontradas na literatura: oxatiolona, boro substituído, anel heterocíclico, bifenilo, imidazolonas, entre outras (ACHANTA *et al.*, 2006; KONIECZNY *et al.*, 2007; REDDY *et al.*, 2008; SHARMA *et al.*, 2010; KAMAL *et al.*, 2010; MAI *et al.*, 2014).

#### 2.2.2.2 Relação estrutura-atividade

As chalconas 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; SINGH *et al.*, 2014; KARTHIKEYAN *et al.*, 2015; MAHAPATRA *et al.*, 2015). As atividades citotóxicas observadas com as chalconas naturais incentivaram pesquisadores a desenvolverem chalconas sintéticas para o estudo de novos e promissores agentes antitumorais (SINGH *et al.*, 2014; KARTHIKEYAN *et al.*, 2015)

Efeitos antitumorais de chalconas sintéticas têm sido descritos em várias linhagens de células tumorais, tais como HepG2 (carcinoma hepatocelular), HCT116 (cancer de cólon), MCF-7 (cancer da 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; MAI *et al.*, 2014).

Algumas substituições podem conferir maior efeito antitumoral 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, metoxila, hidroxila,

entre outros (NOWAKOWSKA, 2007; BATOVSKA *et al.*, 2009; ECHEVERRIA *et al.*, 2009; SINGH *et al.*, 2014).

A seguir, serão abordadas algumas das chalconas obtidas a partir de substituintes na estrutura básica.

#### 2.2.2.2.1 Chalconas hidroxiladas

Adições de grupo hidroxila (grupo doador de elétrons) em chalconas desempenham um papel crucial na atividade antitumoral desses compostos, por aumentarem suas atividades citotóxicas e, também a seletividade sobre células tumorais (POUGET *et al.*, 2001; ECHEVERRIA *et al.*, 2009; MAI *et al.*, 2014; KARTHIKEYAN *et al.*, 2015).

A adição de grupo hidroxila na posição 2' (orto) do anel A pode fazer com que a região carbonila-insaturada fique mais reativa, devido a ligação de hidrogênio entre o grupo hidroxila e o oxigênio da carbonila, o que aumenta a atividade antiproliferativa em células tumorais (SZLISZKA *et al.*, 2010; ORLIKOVA *et al.*, 2011; LEWIN *et al.*, 2012; MAI *et al.*, 2014).

Além disso, foi visto por Navarini *et al.* (2008) que o grupo hidroxila na posição orto do anel A pode ser metabolizado a uma quinona intermediária, que pode reagir com nucleófilos celulares e levar a redução de defesas antioxidantes celulares, como a depleção de glutatona.

Echeverria *et al.* (2009) demonstram que 2'-hidroxichalconas (50-200  $\mu$ M), contendo ou não substituição metoxila no anel B apresentaram inibição da proliferação celular dependente da concentração e da posição do grupo metoxila e indução de apoptose em células de carcinoma hepatocelular humano (HepG2) após 24 horas de incubação.

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

Loa *et al.* (2009) estudou a atividade citotóxica de 68 polifenóis com estruturas diferentes e várias substituições em células HepG2 com o intuito de analisar as relações estrutura-atividade desses compostos. As chalconas mais

potentes do grupo foram as que continham hidroxilação na posição 2' do anel B (*orto*). Os autores concluíram que a chalcona mais potente foi 2,2'-dihidroxichalcona que promoveu aumento do número de células na fase G2/M do ciclo celular após 12 horas de incubação na concentração de 60  $\mu$ M e redução do número de células nesta fase após 24 horas de incubação com um aumento correspondente de células em sub-G1 (células com DNA fragmentado) indicando que o aumento de células apoptóticas depende do tempo de incubação.

Mai *et al.* (2014) observaram que chalconas com grupo hidroxila em qualquer das posições orto- ou para- no anel aromático B aumentam seus efeitos citotóxicos e a sensibilidade em células tumorais de câncer colo-retal (HT-29). No entanto, a presença de grupos OH em ambos os anéis A e B das chalconas não melhorou suas atividades antitumorais em comparação com as chalconas mono hidróxi substituídas em que o grupo OH está presente apenas no anel A ou no anel B.

Pouget *et al.* (2001) testaram uma série de flavonas, flavanonas, 2'-hidroxichalconas e flavan-4-óis, e observaram que as 2'-hidroxichalconas foram as mais potentes inibidoras do crescimento de células de câncer de mama (MCF-7), sendo a 2',4'-dihidroxichalcona a mais ativa, após incubação por 6 dias na concentração de 60  $\mu$ M..

Neves *et al.* (2012) avaliaram os efeitos de 2'-hidroxichalconas sobre células de adenocarcinoma de mama (MCF-7) e constataram que a 4-fluoro-2',4'-dihidroxichalcona e a 2',4'-dihidroxi-3,4,5-trimethoxichalcona, após incubação por 48 horas nas concentrações relativas ao IC<sub>50</sub> dos compostos, apresentaram um aumento na quantidade de células em sub-G1, indicativo de fragmentação de DNA e morte celular por apoptose, confirmada com o ensaio de dupla marcação com anexina e PI.

Assim, existem diversos estudos com 2'-hidroxichalconas descritos em algumas linhagens de células tumorais humanas, no entanto, os efeitos dos derivados nitrados de hidroxichalconas, em especial em células de hepatocarcinoma humano (HepG2) têm sido muito pouco descritos.

#### 2.2.2.2.1 Chalconas nitradas

Em relação à adição do grupo nitro (grupo retirador de elétrons) na estrutura das chalconas, poucos estudos foram realizados em células HepG2, no entanto, alguns trabalhos em outras linhagens celulares mostraram-se promissores

em relação a citotoxicidade (DALLA-VIA *et al.*, 2009; WINTER *et al.*, 2010; SHARMA *et al.*, 2013; MAI *et al.*, 2014).

Estudos de relação estrutura atividade com chalconas derivadas de  $\beta$ -ionona mostraram que os compostos que possuem grupos retiradores de elétrons no anel B, tais como nitro, flúor, cloro e bromo apresentaram efeitos citotóxicos maiores do que as chalconas que possuem grupos doadores de elétrons em diversas linhagens tumorais, como próstata (PC-3), mama (MCF-7), CNS (IMR-32), colo do útero (HeLa) e fígado (HepG2). A chalcona derivada de  $\beta$ -ionona com adição de nitro na posição *para* (4-nitro) apresentou menores valores de IC<sub>50</sub> que as outras chalconas não nitradas derivadas na maioria das linhagens celulares avaliadas (SHARMA *et al.*, 2013).

Ilango *et al.* (2010) observaram que a 4-nitrochalcona diminui a viabilidade de células tumorais de mama MCF-7 e T47D tendo como IC<sub>50</sub> 55 e 52  $\mu$ M respectivamente, após 24 horas de incubação com o composto.

Dalla Via *et al.* (2009) verificaram que a 4-nitrochalcona reduz a viabilidade de células de melanoma JR8 tendo sido obtido o valor de 6  $\mu$ M de IC<sub>50</sub> após 72 horas de incubação. Esses autores concluíram que a adição de grupo nitro afeta a reatividade da região  $\alpha$ - $\beta$ -insaturada tornando-a ainda mais reativa a adição de grupos nucleofílicos no ambiente biológico.

Mai *et al.* (2014) observaram que a chalcona contendo grupo nitro na posição *para* do anel B, um grupo OH na posição 2' e um grupo metóxi nas posições 4' e 6' foi um dos compostos mais potentes e seletivos em relação à atividade antitumoral contra célula tumorais TRAIL-resistentes (HepG2, HT-29, CNE-1, CEM-SS). Em células HepG2, esse composto apresentou um dos menores IC<sub>50</sub> (8,60  $\mu$ M) entre todos os compostos testados após 72 h de incubação e também valores reduzidos nas outras linhagens tumorais testadas. Além disso, apresentou maior efeito citotóxico (menores valores de IC<sub>50</sub>) quando comparado com a chalcona com grupo nitro na posição *orto* em todas as células testadas, e maior seletividade quando testada contra células de rim embrionário humano (HEK-293).

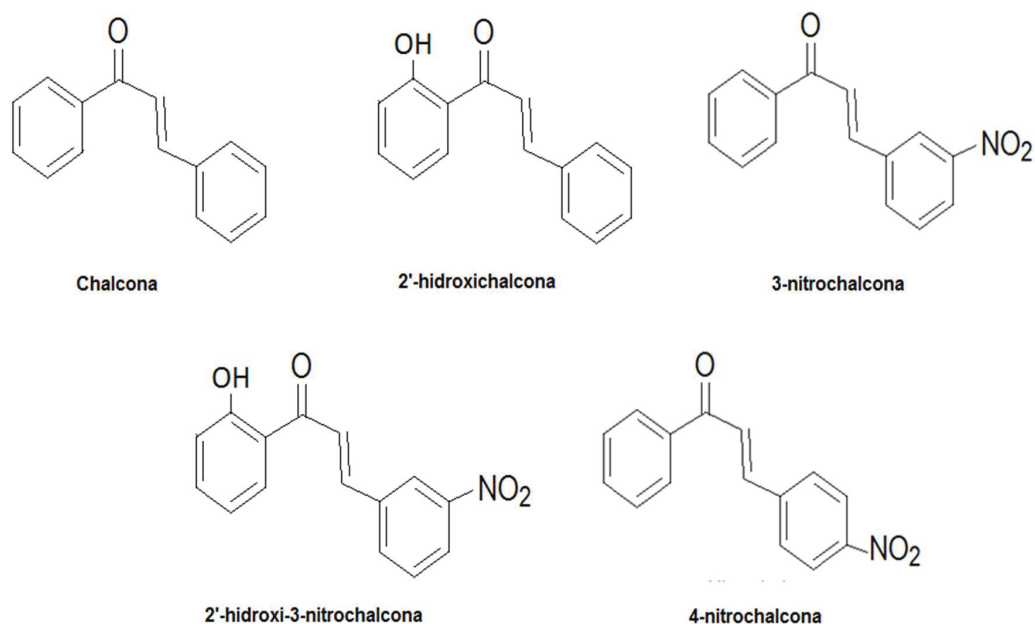
Em nosso laboratório, Tamiello (2013) verificou que a incubação de células HepG2 com a 3-nitrochalcona aumenta a produção de espécies reativas de oxigênio (ERO), diminui os níveis de expressão de mRNA e a atividade da catalase, aumenta a quantidade de células em sub-G1, indicativo de fragmentação de DNA, e diminui a viabilidade de células HepG2 em 56% na concentração de 20  $\mu$ M no tempo de 48 h de incubação, indicando uma influência das espécies reativas de oxigênio na morte celular induzida por esta chalcona.

Winter *et al.* (2010) observaram em células de leucemia (L1210) que uma chalcona derivada de 2-naftilcetofenona com o grupamento 3 nitrofenil no anel B, apresentou  $IC_{50}$  de 24  $\mu M$ , portanto menor que a chalcona que possuía somente o grupamento fenil na mesma posição ( $IC_{50}$  de 37  $\mu M$ ) após o mesmo tempo de incubação. Os autores verificaram fato semelhante após 48h de incubação, sendo o  $IC_{50}$  de 13  $\mu M$  para a chalcona nitrada e 20  $\mu M$  para a chalcona substituída apenas com o grupamento fenil.

Deste modo, pode-se concluir que a presença e posição do grupo nitro e/ou grupo hidroxila na estrutura de chalconas é importante para o aumento dos efeitos antitumorais destes compostos.

No entanto, observa-se que há poucos estudos dos efeitos de chalconas nitradas e/ou hidroxiladas em células HepG2 e os efeitos da 2'-hidroxi-3-nitrochalcona ainda não foram descritos sobre estas células. Assim, para a realização deste estudo foram utilizadas as seguintes chalconas: chalcona (CHA), 2'-hidroxichalcona (HC), 3-nitrochalcona (3-NCHA), 2'-hidroxi-3-nitrochalcona (HNC) e 4-nitrochalcona (4-NCHA) cujas estruturas estão demonstradas na FIGURA 5

FIGURA 5 - ESTRUTURAS DAS CHALCONAS



Fonte: O Autor (2015)

Outrossim, 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, este grupo de moléculas torna-se fonte promissora de novos medicamentos (OPLETALOVA *et al.*, 2003; YADAV *et al.*, 2011). O grupamento carbonila  $\alpha,\beta$  insaturado é essencial para as atividades biológicas das chalconas. A introdução de grupamentos retiradores de elétrons como o grupo nitro na estrutura das chalconas é capaz de aumentar sua eletrofilicidade, solubilidade e sua capacidade de reação com outras biomoléculas (BERESTOVISTSKAYA *et al.*, 2009; LEÓN-GONZALEZ *et al.*, 2015).

## 2.3 ALVOS CELULARES DOS COMPOSTOS ANTITUMORAIS

Os compostos antitumorais possuem uma diversidade de alvos celulares, muitas vezes atuando no processo de proliferação celular, afetando as fases do ciclo celular, as defesas antioxidantes e vias de sinalização e transporte de droga para o meio intracelular. Neste sentido, novos agentes antitumorais têm sido estudados por apresentarem atividades citotóxicas no tratamento de diversos tipos de câncer (MA *et al.*, 2007; SHEN *et al.*, 2007; HSU *et al.*, 2010; ORLIKOVA *et al.*, 2011; VALDAMERI *et al.*, 2011). A seguir estão descritos alguns dos principais alvos celulares de agentes antitumorais.

### 2.3.1 Ciclo celular

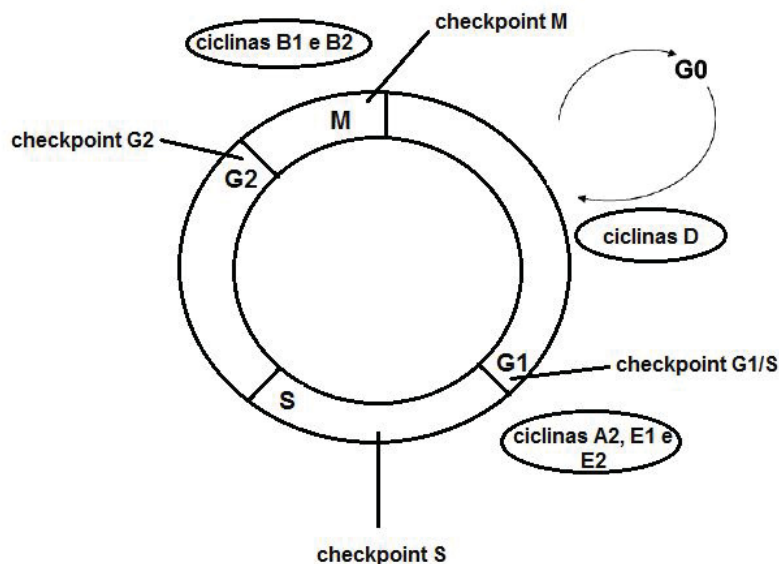
A divisão do ciclo celular da maioria das células eucarióticas consiste em quatro processos coordenados: crescimento celular, replicação de DNA, distribuição dos cromossomos para polos opostos da célula, e divisão celular. O crescimento das células geralmente é um processo contínuo, mas o DNA é sintetizado durante apenas uma fase do ciclo celular. A progressão entre estas fases do ciclo celular é controlada por um aparato regulatório conservado, o que coordena os diferentes eventos do ciclo celular, e liga-o com sinais extracelulares que controlam a proliferação celular (VERMEULEN *et al.*, 2003; MORGAN, 2007; BERTOLI *et al.*, 2013; HARASHIMA *et al.*, 2013).

O ciclo celular é dividido em duas partes principais, a interfase e a mitose. A mitose (divisão nuclear) corresponde à separação dos cromossomos e, geralmente, termina com a divisão celular (citocinese), sendo que esse processo dura cerca de uma hora. Assim, aproximadamente 95% do ciclo celular é gasto na interfase - o período entre mitoses. A interfase é o tempo durante o qual o crescimento celular e replicação do DNA ocorrem de uma forma ordenada,

preparando-se para a divisão celular (GARRETT, 2001; WILLIAMS; STOEBER, 2012).

A fase M (fase em que a célula sofre a divisão em duas células filhas) corresponde à mitose, que é geralmente seguida pela fase G1, fase onde a célula responde a sinais de crescimento, e corresponde ao intervalo (GAP) entre a mitose e a iniciação da replicação de DNA. Durante G1, a célula é metabolicamente ativa e cresce continuamente, mas não replica o seu DNA. Este período caracteriza-se pela transcrição e tradução de vários genes, com a consequente produção de proteínas necessárias tanto para o crescimento celular, quanto para o preparo para a síntese de DNA. G1 é seguida pela fase S (síntese de DNA), durante a qual ocorre a replicação do DNA. A conclusão da síntese de DNA é seguida pela fase G2, durante a qual o crescimento celular continua e as proteínas são sintetizadas em preparação para a mitose (FIGURA 6) (GARRETT, 2001; MASSAGUE, 2004; BERTOLI, *et al.*, 2013; HARASHIMA *et al.*, 2013). Células em G1 podem, antes de se comprometer com a replicação do DNA, entrar em um estado de repouso chamado G0, que representa a maior parte das células que estão em não-proliferação (VERMEULEN *et al.*, 2003; BERTOLI, *et al.*, 2013)

FIGURA 6 - FASES DO CICLO CELULAR



FONTE: O Autor (2015)

NOTA: Fases M: mitose, S: síntese de DNA, G1: intervalo (GAP) 1, G2: intervalo (GAP) 2, G0: estado de repouso ou senescente. Os checkpoints correspondem a pontos de controle do ciclo celular e estão representados logo após a fase do ciclo celular em que atuam.

### 2.3.1.1 Controle do Ciclo Celular

Deste modo, tornam-se necessários controles no ciclo celular que regulem a progressão pelas diferentes fases para que esses eventos ocorram numa sequência correta e coordenada com o crescimento celular. Os *checkpoints* protegem criteriosamente a transição entre as fases do ciclo garantindo que o estágio precedente tenha sido completado sem erros (KHODJAKOV; RIEDER, 2009).

A parada nos *checkpoints* permite que as células reparem os possíveis danos, impedindo a sua transmissão para as células filhas e contribuindo com a manutenção da estabilidade genômica, sendo responsáveis, assim, pela progressão ou parada do ciclo (BERTHET; KALDIS, 2007; MALUMBRES & BARBACID, 2009; LABIB; PICOLI, 2011; BERTOLI *et al.*, 2013; HARASHIMA *et al.*, 2013).

Essas regiões estão posicionadas antes da célula entrar na fase S (*G1-S checkpoint*) ou após a replicação do DNA (*G2-M checkpoint*) e parece haver pontos de controle de danos ao DNA durante as fases S e M. No *checkpoint* G1/S, a parada do ciclo celular induzida por dano ao DNA é dependente da proteína p53 (TAYLOR; STARK; 2001; VERMEULEN *et al.*, 2003).

Frequentemente, a progressão do ciclo celular é regulada pela ativação sequencial dos pares ciclinas (cyc) e quinases dependentes de ciclinas (Cdks). A atividade das Cdks é dependente da sua ligação a ciclinas específicas, sendo que esta ligação é a responsável por sua ativação (BERTHET; KALDIS, 2007; GOPINATHAN *et al.*, 2011). Essa maquinaria do ciclo celular envolve cinco CDKs e oito ciclinas sendo que diferentes complexos de ciclina-Cdk são altamente especializados na promoção de transições do ciclo celular (MASSAGUE 2004; BERTOLI *et al.*, 2013; HARASHIMA *et al.*, 2013; MOORE, 2013).

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 (MOORE, 2013). Na medida em que uma célula progride através do ciclo celular há sucessivas ondas de aumento e redução da atividade das Cdk-ciclinas, sendo que no controle do ciclo celular, esses diferentes complexos realizam funções especializadas (SANTAMARÍA *et al.*, 2007; HARASHIMA *et al.*, 2013).

As ciclinas do tipo D (D1, D2 e D3) são sintetizadas em resposta a sinais mitogênicos e direcionam a Cdk4 (e/ou Cdk6), durante a fase G1, a fosforilar e inativar proteínas - como a proteína supressora tumoral Rb - para permitir a expressão de ciclinas do tipo E (E1 e E2), que se ligam e ativam Cdk2. Assim, o conjunto Cdk2-ciclina E atua na progressão de G1/S para acionar a replicação do DNA (WEINBERG, 2008; MALUMBRES; BARBACID, 2009; WILLIAMS; STOEBER, 2012). A disponibilidade das ciclinas E durante o ciclo celular é rigorosamente controlada e limitada às fases iniciais da síntese de DNA (MALUMBRES; BARBACID, 2009).

O complexo CDK2-ciclina A colabora com o Cdk2-ciclina E para regular a replicação do DNA, tanto positiva como negativamente de modo que o DNA só é replicado uma única vez. Assim, Cdk2 é ativado pela ciclina A2 durante os estágios finais da replicação do DNA para dirigir a transição da fase S para G2. Já o complexo Cdk1-ciclina B é responsável pela condução da célula à mitose (MALUMBRES; BARBACID, 2005; MALUMBRES; BARBACID, 2009; MOORE, 2013).

A origem das células tumorais está associada a perda do controle e anomalias no ciclo celular, como a alteração em genes que controlam a progressão do ciclo, alteração da função das ciclinas/Cdks, anormalidade na função de fatores de crescimento e mutações dos genes supressores tumorais (GARRETT, 2001; PARK; LEE, 2003).

Essas mutações ocorrem principalmente em duas classes de genes: proto-oncogenes (versões de função normal de oncogenes, responsáveis pelo controle da divisão celular) e genes supressores de tumor.

Oncogenes são genes relacionados com o surgimento de tumores, benignos ou malignos, bem como genes que quando deixam de funcionar normalmente, transformando uma célula normal em célula tumoral. As versões de função normal de oncogenes, os proto-oncogenes, são genes responsáveis pelo controle da divisão celular (mitose), da diferenciação celular e da tradução proteica. Após sofrer uma mutação gênica somática, por exemplo, uma translocação, amplificação ou mutação pontual, um proto-oncogene torna-se eventualmente um oncogene (GOLBERT *et al.*, 2003)

A proteína p53 é um dos principais supressores tumorais, com uma importante função na resposta celular a diferentes sinais de stress, como danos ao DNA e hipóxia. Assim, quando um dano ao DNA é detectado, a proteína p53 promove uma parada no ciclo celular até que o reparo do dano esteja completo e,

se isso não for possível, a p53 desencadeia uma via de sinalização intracelular promotora de morte, geralmente a via apoptótica, para que esse dano ao DNA não seja conservado durante o processo de replicação celular (VOUSDEN, 2006; LIM, KALDIS, 2013). Assim, seu papel é, principalmente, eliminar células danificadas, ou pela promoção da morte celular por apoptose, ou pela retirada do potencial proliferativo destas células, através da indução de senescência. Uma única quebra em DNA dupla fita é capaz de induzir aumento mensurável de p53, que atua como fator transcricional (LEVINE, 1997).

Um dos mecanismos de parada do ciclo celular é através da indução da expressão de genes que codificam inibidores de Cdks, chamados de CKIs (inibidores de quinases ciclina dependentes), que se ligam aos pares ciclina/Cdk regulando negativamente o ciclo celular, como por exemplo a proteína p21 (DIGIUSEPPE *et al.*, 1995; LIM, KALDIS, 2013). A proteína p21 é uma inibidora da progressão do ciclo celular conhecida por interagir com uma variedade de fatores de transcrição envolvidos em vários processos biológicos, podendo interagir com outras proteínas celulares envolvidas no crescimento, síntese ou reparo do DNA e na regulação transcricional (BLAGOSKLONNY, 2002; LIM, KALDIS, 2013). A proteína p21 possui uma atividade mais ampla, sendo capaz de inibir todos os complexos ciclina/CDK, pois possuem estruturas que os permitem ligar-se tanto à subunidade ciclina quanto à CDK (FERREIRA e ROCHA, 2004).

Já a proteína pRb desempenha um papel fundamental no controle da transição entre as fases G1 e S do ciclo celular e uma das funções é evitar o crescimento excessivo de células por inibir a progressão do ciclo celular até que a célula esteja pronta para duplicar seu DNA (MCDONALD; EL DEIRY, 2000). O gene Rb foi o primeiro gene supressor de tumor a ser descoberto e seu produto, a proteína RB (pRb), exerce efeitos antiproliferativos ao controlar a transição da fase G1 para a fase S do ciclo celular. Tal proteína na forma ativa (hipofosforilada) encontra-se ligada ao fator de transcrição E2F (proteína de regulação gênica), proteína que estimula a transcrição de vários genes envolvidos na fase S do ciclo. Ligada à pRB, a ação de E2F permanece bloqueada e, assim, a célula para em G1. Os complexos ciclina-Cdks ocasionam a fosforilação da pRb. Uma vez hiperfosforilada, a pRb torna-se inativa e se desliga do fator E2F, permitindo a entrada em S e, dessa forma, dando continuidade ao ciclo celular (SINGH, 2010; HARASHIMA *et al.*, 2013)

Assim, diversas classes de compostos têm como alvo proteínas reguladoras do ciclo celular, e, dentre elas, os flavonóides têm se mostrado

promissores, sendo capazes de modular a expressão de p53 e p21 desencadeando diferentes mecanismos de morte celular (CHIANG *et al.*, 2006; SHEN *et al.*, 2007; HSU *et al.*, 2010).

### 2.3.2 Defesas Antioxidantes e Espécies Reativas

Radicais livres são átomos ou moléculas que possuem um ou mais elétrons desemparelhados e são capazes de desencadear diversos danos ao organismo (WOJNÁROVITS, 2011). No entanto, existem compostos tão reativos quanto os radicais livres, mas que não apresentam esses elétrons desemparelhados, surgindo, assim, uma classificação mais ampla: as espécies reativas de oxigênio (ERO) e de nitrogênio (ERN) (ZOROV *et al.*, 2014).

O principal e mais abundante das ERO é o ânion superóxido que tem uma capacidade oxidativa relativamente elevada. O  $H_2O_2$ , por sua vez, é a ERO mais estável, gerada pela dismutação do ânion superóxido, de forma espontânea ou por meio de catalisação pela superóxido dismutase (SOD) (ZOROV *et al.*, 2014). A geração intracelular de  $H_2O_2$  tem sido considerada uma importante mediadora de apoptose, e até mesmo a adição exógena de  $H_2O_2$  é um potente ativador de tal maquinaria (DINI, 2005).

As 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, os quais estão relacionados com o processo de envelhecimento, câncer, doenças inflamatórias crônicas e degenerativas (THANNICKAL; FANBURG, 2000; NAKAMURA *et al.*, 2003; ZAFARULLAHA, 2003). Assim, os seres vivos possuem defesas contra os efeitos dessas espécies: os agentes antioxidantes. Eles protegem as células contra os efeitos dos radicais livres e podem ser classificados em enzimáticos ou não enzimáticos (SIES, 1993; ZAFARULLAHA, 2003).

Dentre os antioxidantes enzimáticos temos as enzimas: superóxido dismutases (SOD) que atuam na reação para remoção do radical superóxido, a catalase (CAT), presente em todos os organismos aeróbicos, que neutraliza os efeitos tóxicos do  $H_2O_2$ , a glutathione peroxidase (GPx), que catalisa a redução do  $H_2O_2$  e hidroperóxidos utilizando a glutathione reduzida (GSH) e formando como produtos glutathione oxidada (GSSG) e água, entre outras. Esse último processo catalítico depende diretamente da redução da glutathione oxidada pela glutathione redutase (GR), para manter os níveis de glutathione reduzida (GSH) (FRIDOVICH,

1995; FERREIRA; MATSUBARA, 1997; NORDBERG, ARNÉR, 2001; VALKO *et al.*, 2006; ZOROV *et al.*, 2014).

Em mamíferos, foram encontradas três isoformas da SOD: a Cu, Zn-dependente (Cu, Zn SOD, SOD1) que está localizada no espaço intermembranar mitocondrial e no citosol; a isoforma Mn-dependente (Mn SOD, SOD2) que está localizada na matriz mitocondrial; e a Cu, Zn SOD localizada no espaço extracelular (ecSOD, SOD3) (ZOROV *et al.*, 2014).

As defesas antioxidantes não enzimáticas são compostas pela glutatona (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),  $\beta$ -caroteno, selênio e flavonóides (polifenóis) (FERREIRA; MATSUBARA, 1997; ZAFARULLAHA, 2003).

A N-acetilcisteína (NAC) é precursora da L-cisteína e da glutatona reduzida, e tem sido utilizada em vários estudos como ferramenta para investigar o papel de espécies reativas de oxigênio em numerosos processos biológicos e patológicos, revertendo seus efeitos em células tumorais (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  $\cdot\text{OH}$  e  $\text{H}_2\text{O}_2$ , diminuindo a disponibilidade desses agentes oxidantes (ZAFARULLAHA, 2003).

No entanto, o desequilíbrio entre os níveis de espécies reativas e as defesas antioxidantes pode causar alterações na sinalização e no controle redox, podendo levar ao acúmulo excessivo de espécies reativas (estresse oxidativo), que pode causar danos ao DNA, proteínas e lipídeos, induzindo a morte celular ou carcinogênese (VALKO *et al.*, 2006; ZOROV *et al.*, 2014).

#### 2.3.2.1 O sistema Nrf2/Keap1 e a expressão de enzimas antioxidantes

O corpo contém potentes defesas antioxidantes que são responsáveis por regular os níveis de oxidantes presentes e, assim, preservar a homeostase e proteger o organismo contra danos. Uma importante via na proteção contra ERO é a via Nrf2 (fator nuclear eritróide 2) (LYAKHOVICH *et al.*, 2006). Nrf2 é um fator de transcrição localizado no citoplasma que regula a expressão da maioria das enzimas que participam do sistema antioxidante. Nesta via a Keap1 (ECH Kelch associando proteína 1) é um inibidor do fator de transcrição Nrf2. KEAP1 funciona

como um sensor *in vivo* para ERO e eletrólitos, os quais fazem com que Nrf2 se dissocie do complexo com Keap1 (através de uma mudança conformacional) e transloque-se para o núcleo (FIGURA 7) (LO *et al.*, 2006; ANTELMANN *et al.*, 2011).

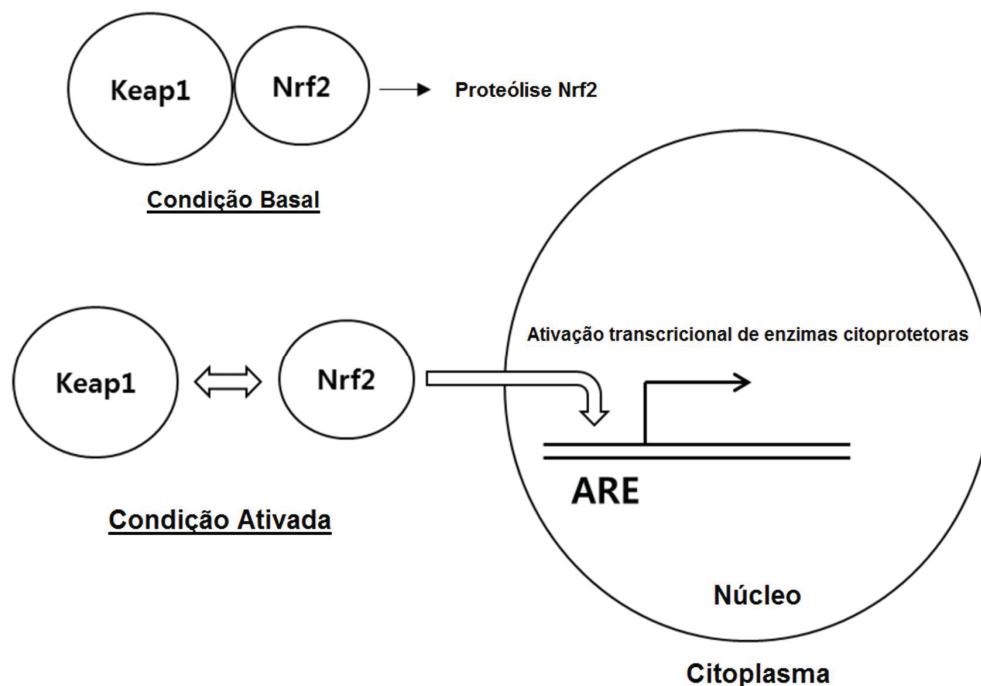
Keap1 é uma proteína rica em tiol e possui múltiplas cisteínas reativas cujos resíduos são geralmente aminoácidos básicos. Os tióis reativos são alvos excelentes de eletrófilos e ERO. Alterações em Keap1 comprometem a integridade estrutural do complexo KEAP1-Cul3 E3 ligase, resultando em um declínio na ubiquitinação, facilitando assim o acúmulo de Nrf2. Assim, Keap1 age como um sensor que transduz sinais eletrofílicos em ativação transcricional (TAGUCHI *et al.*, 2011).

A via Keap1/Nrf2 é responsável por regular mais de 100 genes citoprotetores e de defesas antioxidantes, entre eles os genes da SOD, catalase, e das enzimas do metabolismo da glutathione (glutathione peroxidase, glutathione redutase,  $\gamma$ -glutamyl cisteine ligase), da detoxificação de xenobióticos (NAD(P)H desidrogenase, quinona 1 (Nqo1)), genes da família da Glutathione S-transferase e do transporte de drogas (genes da família das proteína associada a resistência de multidrogas (Mrp)) (OKAWA *et al.*, 2006; KUMAR *et al.*, 2011; TAGUCHI *et al.*, 2011).

Na ausência de estresse, Nrf2 está localizada no citoplasma, ligado a Keap1, o que facilita a degradação de Nrf2 através da via da ubiquitina proteassoma. Desta forma, os mecanismos moleculares envolvidos na regulação da estabilidade de Nrf2 em resposta a eletrófilos e ERO tem sido uma questão crucial no estudo da resposta ao estresse (TAGUCHI *et al.*, 2011).



FIGURA 7 - ESQUEMA GERAL PARA A INDUÇÃO DA EXPRESSÃO DE GENES DE ENZIMAS ANTIOXIDANTES ATRAVÉS DA VIA DE SINALIZAÇÃO Keap1/Nrf2.



Fonte: O Autor (2015)

NOTA: Representação esquemática da via Nrf2/Keap1 nas condições basais e ativada, indicando como ocorre a ativação transcricional de enzimas antioxidantes no núcleo celular através da ligação a elementos de resposta antioxidantes (ARE).

Mutações frequentes em Keap1 e Nrf2 têm sido encontradas recentemente em tumores humanos, como os de próstata, pulmão, canal biliar, cabeça e pescoço. Tais mutações levam à perda de função de Keap1 e ativação de Nrf2 e os seus genes citoprotetores, que contribuem para quimiorresistência durante a terapia. Nrf2 protege as células normais contra carcinogênese, mas a sua ativação constitutiva em certos tumores aparentemente contribui para a sobrevivência e crescimento dessas células (TANG *et al.*, 2011; HAYES *et al.*, 2009).

Foi demonstrado que alguns flavonoides como as chalconas, são capazes de ativar essa via Keap1/Nrf2 em células tumorais devido ao seu domínio  $\alpha,\beta$  insaturado altamente eletrofílico e por aumentar os níveis de espécies reativas de oxigênio (KUMAR *et al.*, 2010).

Por sua vez, Lim *et al.* (2013) observaram que a 4-methoxichalcona inibe o mecanismo de defesa de Nrf2/ARE e aumenta o estresse oxidativo e a citotoxicidade induzida por cisplatina em células de câncer de pulmão A549. O estudo demonstrou que a chalcona avaliada pode melhorar a capacidade de resposta das células tumorais para medicamentos quimioterápicos e indica o

potencial de aplicação de compostos inibidores dessa via como sensibilizadores naturais em quimioterapia.

Nrf2 agora é visto, então, como um alvo farmacológico para superar a resistência terapêutica de vários tipos de tumores (TANG *et al.*, 2011; LIM *et al.*, 2013). Deste modo, a identificação de moléculas que potencialmente inibam especificamente Nrf2 é bastante desejável, e tais compostos podem ser utilizados em quimioterapia como adjuvantes para aumentar a eficácia de fármacos antitumorais.

Neste sentido, têm sido estudado o uso de terapias adjuvantes para inibir os sistemas antioxidantes, e já foi visto que para o tratamento de melanoma por exemplo, o uso de dissulfiran (DSF) e 2-metoxiestradiol (2-ME<sub>2</sub>), o primeiro afetando a capacidade redutora da glutatona e induzindo apoptose, e o segundo inibindo a atividade da SOD, foi capaz de promover parada de proliferação de células de melanoma B16-F10 (CEN *et al.*, 2002; DOBOS *et al.*, 2004).

## 2.4 MORTE CELULAR

A morte celular acontece não apenas quando as células são expostas a quimioterápicos e agentes citotóxicos, mas ela também faz parte dos mecanismos de controle e manutenção do organismo, através da eliminação de células danificadas e/ou com tempo de vida expirado (HERNANDEZ-MARTINEZ; COVARRUBIAS, 2011).

### 2.4.1 Tipos de morte celular

A morte celular pode ser caracterizada por critérios morfológicos e apresentar diversas nomenclaturas como apoptose, necrose, autofagia e catástrofe mitótica (KROEMER *et al.*, 2009; GALLUZZI *et al.*, 2012). Na sequência, apresentaremos algumas características dos tipos de morte celulares melhores descritos na literatura.

#### 2.4.1.1 Apoptose

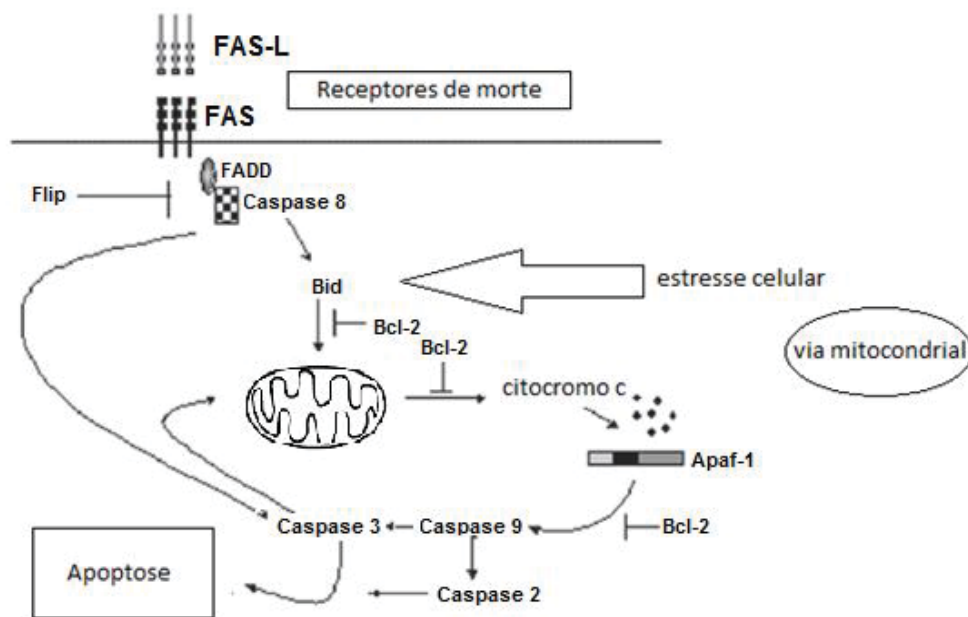
A expressão "apoptose" foi criada por Kerr *et al.* (1972) para descrever um aspecto morfológico específico de morte celular, visto que a apoptose é acompanhada por arredondamento da célula, retração de pseudópodes, redução do volume celular, condensação da cromatina, fragmentação nuclear, pouca ou

nenhuma modificação estrutural das organelas citoplasmáticas, formação de “blebs” na membrana plasmática (mas manutenção de sua integridade até os estágios finais do processo) e englobamento por fagócitos residentes (*in vivo*) (NISHIDA *et al.*, 2008).

As alterações bioquímicas promovidas pela apoptose incluem clivagem do DNA em fragmentos internucleossômicos, externalização de fosfatidilserina e a presença de substratos intracelulares clivados por proteólise (COHEN *et al.*, 1994; MARTIN *et al.*, 1995; OUYANG *et al.*, 2012). Assim, o termo “apoptose” deve ser aplicado exclusivamente para a célula que esteja manifestando-se entre esses vários aspectos morfológicos (BAEHRECKE *et al.*, 2002; KROEMER *et al.*, 2009).

A apoptose pode ocorrer por via extrínseca ou por via intrínseca (HENGARTNER, 2000; FULDA; DEBATIN, 2006) (FIGURA 8), e essas vias serão melhor abordadas a seguir.

FIGURA 8 - VIA EXTRÍNSECA E INTRÍNSECA DA APOPTOSE



FONTE: O Autor (2015)

NOTA: FADD, domínio de morte associado à Fas; Fas-L, ligante de Fas; Bid, proteína pró-apoptótica; Bcl2/Bcl-xL, proteínas anti-apoptóticas; Bax/Bak, proteínas pró-apoptóticas; Apaf-1, protease ativadora de apoptose fator 1; Flip, proteína inibidora de FLICE.

#### 2.4.1.1.1 Apoptose via extrínseca

A apoptose por via extrínseca é desencadeada por sinais extracelulares, os quais sensibilizam receptores específicos na membrana plasmática

responsáveis por propagar os sinais. Os principais receptores conhecidos incluem Fas (também chamado CD95 ou APO-1), receptor de TNF 1 (TNFR1) e ligante indutor de apoptose (TRAIL) receptor 1 (TRAIL-R1; também denominado DR4) e TRAIL receptor 2 (TRAIL -R2; também denominado DR5). Por sua vez, os principais ligantes envolvidos na iniciação destes sinais através de receptores de morte são: Fas-L (ligante de Fas), TNF- $\alpha$  (fator de necrose tumoral  $\alpha$ ) e TRAIL (ligante indutor de apoptose relacionado ao TNF) (WAJANT, 2002; CIRCU; AW, 2010; GALLUZZI *et al.*, 2012; HURWITZ *et al.*, 2012). A estimulação desses receptores de morte resulta na ativação do iniciador caspase-8, que pode propagar o sinal de apoptose por clivagem de caspases efetoras como a caspase-3 (FIGURA 8) (WALCZAK; KRAMER, 2000; FULDA; DEBATIN, 2006)

Fas (também denominado Apo-1 ou CD95) é um receptor de morte membro da superfamília de receptor de fator de necrose tumoral (TNFR), que tem um papel central na regulação da morte celular programada e tem sido implicada na patogênese de várias doenças do sistema imunológico, bem como doenças malignas. Assim, Fas é expresso em linfócitos ativados, numa variedade de tecidos de origem linfóide ou não linfóide, assim como em células tumorais. Ele é produzido pelas células T ativadas, desempenhando um papel crucial na regulação do sistema imune desencadeando a morte de linfócitos ou outras células alvo (KRAMMER, 2000; WAJANT, 2002).

O sistema Fas/FasL é um dos sistemas melhores estudados de receptores de morte que levam a apoptose. Pouco tempo após a ligação de Fas/FasL, Fas-associado a DD (domínio de morte) (FADD) e procaspase-8 são recrutados, e o complexo sinalizador indutor de morte (DISC) é endocitado. A liberação de DISC endossomal a partir do receptor se acumula como DISC citosólico e a partir disso FADD e pro-caspase-8 são recrutados, resultando na ativação do iniciador caspase-8, que por fim conduz a apoptose (CHAN *et al.*, 2000; KRAMMER, 2000; WAJANT, 2002; HURWITZ *et al.*, 2012).

TNFR1 é um receptor de morte que medeia as principais funções biológicas de TNF- $\alpha$ . A ligação TNF $\alpha$  -TNFR1 provoca trimerização do receptor, liberação de silenciador inibitório do domínio de morte, e recrutamento do domínio de morte associada ao TNFR1 (TRADD) que resulta na formação de dois complexos (complexos I e II), que ativam distintamente a redução da sobrevivência ou as vias de sinalização apoptóticas. TRADD serve como uma plataforma para recrutar pelo menos três mediadores adicionais: proteína de interação com o receptor 1 (RIP1),

proteína do domínio de morte associado a Fas (FADD), receptor TNF associado ao fator 2 (TRAF2) (MICHEAU; TSCHOPP, 2003; BALKWIL, 2009)

O complexo I consiste em TNFR1, o adaptador TRADD, a quinase RIP1, e a TRAF2, e sinaliza rapidamente a ativação de NF-kappa B. Num segundo passo, TRADD e RIP1 associado com FADD e caspase-8, formam um complexo citoplasmático (complexo II). Quando NF-kappa B é ativado pelo complexo I, o complexo II abriga a caspase-8 inibidora de FLIP(L) e a célula sobrevive. Assim, o sinal de transdução mediado por TNRF1 inclui um ponto de controle, resultando em morte celular (por meio do complexo II) nos casos em que o sinal inicial (através de complexo I) falha em ser ativado (MICHEAU; TSCHOPP, 2003; BALKWIL, 2009; CIRCU; AW, 2010)

TRAIL (fator de necrose tumoral relacionado a apoptose induzida por ligante) é um ligante indutor de apoptose também conhecido por Apo-2L e foi identificado pela primeira vez em 1995, com base na sua homologia de sequência com os outros membros da superfamília do TNF e é expresso em um grande número de tecidos (LEBLANC; ASHKENAZI, 2003). Os dois receptores de TRAIL (TRAIL-R1 e TRAIL-R2), contém um motivo conservado citoplasmático, o que lhes permite dar início a maquinaria apoptótica da célula após a ligação do ligante, enquanto que TRAIL-R3 a R5 são receptores antagonistas que se ligam a TRAIL, mas não transmitem um sinal de morte (LEBLANC; ASHKENAZI, 2003; WANG; EI-DEIRY, 2003; FULDA; DEBATIN, 2006).

C-flip foi identificada como uma protease de morte, com base na observações de que ela impede TRAIL, fator de necrose tumoral-alfa (TNF- $\alpha$ ) e Fas-L, de ligarem-se a FADD e/ou a caspase-8 ou -10 de modo dependente do ligante, que por sua vez previne a formação do complexo sinalizador indutor de morte (DISC) e posterior ativação da cascata de caspase (KRUEGER *et al.*, 2001; SAFA *et al.*, 2008; HURWITZ *et al.*, 2012)

#### 2.4.1.1.2 Apoptose via intrínseca

Por sua vez, a apoptose por via intrínseca se caracteriza pelo envolvimento direto com a mitocôndria, o que levou muitos autores a denominarem essa via como mitocondrial (INDRAN *et al.*, 2011). Ela pode ser dependente ou não da ativação das caspases, visto que outros eventos podem ativar essa via como os danos no DNA, o estresse oxidativo, entre outros. Diferentes estímulos são recebidos pelas células através de proteínas pró (Bax e Bak) e anti- apoptóticas (Bcl-2, Bcl-X<sub>L</sub>),

desencadeando uma cascata de sinalização celular (FIGURA 8). Esses sinais de morte (com ou sem envolvimento das caspases) são recebidos pela mitocôndria com indução ou prevenção da liberação de fatores apoptogênicos da mitocôndria para o citosol. Assim, a morte celular mediada pela mitocôndria é controlada por essas duas famílias de proteínas que são expressas por diferentes estímulos (FIGURA 8) (HENGARTNER *et al.*, 2000; WHELAN *et al.*, 2010; GALLUZZI *et al.*, 2012).

A via mitocondrial é iniciada por sinais de estresse através da liberação de fatores apoptogênicos, como citocromo C, fator indutor de apoptose (AIF), Smac (segundo ativador de caspase mitocondrial)/DIABLO, do espaço intermembranar mitocondrial (CANDE *et al.*, 2002; SAELENS *et al.*, 2004). A liberação de citocromo C no interior do citosol desencadeia a ativação de caspase-3 através da formação de um complexo contendo citocromo C/Apaf-1/caspase 9, chamado de apoptossomo (CAI, *et al.*, 2000), ao passo que Smac/DIABLO promove a ativação de caspase através da neutralização dos efeitos dos inibidores de proteínas apoptóticas (IAPs), e AIF provoca a condensação de DNA (CANDE *et al.*, 2002; SAELENS *et al.*, 2004; GALLUZZI *et al.*, 2012).

As vias intrínsecas e extrínsecas podem se interconectar em diferentes níveis, como por exemplo através da via de receptores de morte, a ativação de caspase-8 pode resultar na clivagem de Bid, uma proteína da família Bcl-2 com um único domínio BH3, que por sua vez se transloca para a mitocôndria para a liberação de citocromo C (CORY; ADAMS, 2002; SHI, 2002). A ativação das caspases é regulada negativamente, ao nível de receptor de morte, por FLIP, que bloqueia a ativação da caspase-8, na mitocôndria por proteínas da família Bcl-2 e inibidoras de apoptose (IAPs) (COWLING; DOWNWARD, 2002).

#### 2.4.1.2 Necrose

A necrose é caracterizada morfologicamente por um ganho no volume da célula (*oncosis*), inchaço das organelas, ruptura da membrana plasmática e subsequente perda de conteúdo intracelular, levando a processos inflamatórios do tecido ao redor da célula. Durante muito tempo, a necrose foi considerada uma forma descontrolada acidental de morte celular, mas há evidências de que ela pode ser estritamente regulada por um conjunto de vias de transdução de sinais e mecanismos catabólicos (GOLSTEIN *et al.*, 2007; GALLUZZI *et al.*, 2012), como por exemplo por receptores de domínio de morte (TNFR1, Fas/CD95 e TRAIL-R) e os receptores de tipo *Toll* (por exemplo TLR3 e TLR4) foram estudados por

provocar a necrose, em particular na presença de inibidores de caspase (DEGTEREV *et al.*, 2005; LAFONT *et al.*, 2010; GALLUZZI *et al.*, 2012; KAISER *et al.*, 2013).

Com a descoberta de mediadores-chave da morte celular por necrose, como RIP quinases e PARP, o conceito de necrose programada tem sido bastante explorado recentemente. Receptor que interage com proteínas quinases (RIP), poli (ADP ribose) polimerase-1 (PARP 1) e NADPH oxidases foram identificadas como componentes em potencial de sinalização de necrose programada (GOLSTEIN *et al.*, 2007; GALLUZZI *et al.*, 2008). Quando as células sofrem esse tipo de morte celular, a integridade da membrana celular é interrompida e os materiais intracelulares são liberados para o meio extracelular, conduzindo a respostas inflamatórias das células imunitárias. Consequente, a inflamação local induzida pela necrose programada pode promover o crescimento tumoral. No entanto, a morte celular por necrose têm sido explorada por eliminar células tumorais (AGOSTINIS *et al.*, 2004; ZONG *et al.*, 2004).

#### 2.4.1.3 Autofagia

A autofagia é um processo de auto degradação importante para equilibrar fontes de energia em momentos de desenvolvimento celular e em resposta a momentos de estresse ou escassez de nutrientes, resultando na degradação de organelas danificadas, tais como mitocôndrias, retículo endoplasmático e peroxissomos, fornecendo a energia necessária para o funcionamento mínimo da célula (WHITE, 2012) bem como a eliminação de patógenos intracelulares.

Assim, a autofagia é geralmente considerada como um mecanismo de sobrevivência, e a ativação autofágica pode desempenhar um papel protetor nas fases iniciais da progressão tumoral (KUNDU; THOMPSON, 2008). Por outro lado, no entanto, a autofagia pode atuar como um supressor tumoral, ativando genes pró-autofágicos e bloqueando genes anti-autofágicos na oncogênese (DEBNATH *et al.*, 2005; GLICK *et al.*, 2010; GALLUZZI *et al.*, 2012)

#### 2.4.1.4 Catástrofe mitótica

Catástrofe mitótica é um tipo de morte celular que ocorre durante ou logo após uma mitose desregulada ou que falhou, em que a distribuição inadequada de cromossomos compromete as funções celulares, e que acaba por sinalizar a célula

à senescência ou à morte celular, prevenindo a oncogênese. Ela pode ser acompanhada por alterações morfológicas incluindo micronucleação (que muitas vezes resulta de cromossomas e/ou fragmentos de cromossomo que não foram distribuídos uniformemente) e multinucleação (a presença de dois ou mais núcleos com tamanhos semelhantes ou heterogêneos, que derivam de uma separação deficiente durante a citocinese (VITALE *et al.*, 2011; GALLUZZI *et al.*, 2012).

A catástrofe mitótica apresenta-se então como uma estratégia celular para eliminar as células mitóticas desreguladas, conduzindo uma cascata de sinalização complexa e pouco compreendida, mas, do ponto de vista funcional, que pode ser definido como um mecanismo oncosupressor que precede a apoptose, necrose ou senescência, sendo diferente destes. Por conseguinte, a ruptura de uma catástrofe mitótica propicia a tumorigênese e a progressão do câncer, e a sua indução constitui um alvo terapêutico (CASTEDO *et al.*, 2004; VITALE *et al.*, 2011; GALLUZZI *et al.*, 2012).

## 2.5 TERAPIA ADJUVANTE E INDUÇÃO DE MORTE CELULAR

Tem-se observado recentemente que a resistência a medicamentos é um grande obstáculo na quimioterapia antineoplásica e a terapia combinada de quimioterápicos com fitoquímicos tem surgido como um possível mecanismo de superação da quimiorresistência, usando drogas com diferentes mecanismos de ação podendo aumentar a eficácia antitumoral dos compostos (ADEGHI-ALIABADI *et al.*, 2011; NESSA *et al.*, 2011; ZHANG *et al.*, 2014).

Diversos compostos polifenólicos foram estudados por atuarem como adjuvantes em diversos mecanismo de morte celular, como por exemplo polifenóis encontrados em algas marinhas *Spatoglossum asperum* (SA-EA), *Padina tetrastromatica* (PT-EA), e *Harmophysa triquerta* (HT-EA), que exercem atividade antiproliferativa em células de câncer pancreático (Panc-3.27 e MiaPaCa-2) resistentes á quimioterapia quando utilizados como adjuvantes em seu tratamento, visto que a combinação dos polifenóis com o quimioterápico gemcitabina impede a autofagia, conhecida como contribuinte para a progressão dessa neoplasia (ARAVINDAN *et al.*, 2015).

Nessa *et al.*, (2011) avaliaram dois fitoquímicos, quercetina e timoquinona, como adjuvantes na combinação com fármacos de platina (cisplatina e oxaliplatina) no tratamento de células de ovário humano (A2780 e sua forma resistente a platina A2780 (CISR)). As células foram tratadas com combinações binárias de cisplatina



(0,67 e 4,14  $\mu\text{M}$ ) e oxaliplatina (0,41 e 1,47  $\mu\text{M}$ ) com quercetina (22,69 e 25,95  $\mu\text{M}$ ) e timoquinona (5,7 e 4,82  $\mu\text{M}$ ) usando três sequências de administração de acordo com o tempo de incubação, e observou-se que a adição dos fitoquímicos 2 h antes das drogas de platina podem sensibilizar as células tumorais para a ação da platina, oferecendo assim um meio de superar a resistência aos medicamentos.

Zhang *et al.*, (2014) avaliaram o efeito da quercetina (50  $\mu\text{M}$ ) em combinação com a cisplatina (10  $\mu\text{M}$ ) em células de hepatocarcinoma humano (HepG2) e constataram que a combinação foi significativamente eficaz na indução da supressão do crescimento e na apoptose em células HepG2, quando comparado com o tratamento em separado com os compostos. A quercetina combinada com a cisplatina modulou a expressão de diversos genes envolvidos na progressão do ciclo celular e apoptose.

Por sua vez, Shi *et al.* (2015) avaliaram o efeito de um derivado de chalcona denominado Chal-24 (3-hydroxy-4,3',4',5'-tetrametoxichalcona) (1  $\mu\text{M}$ ) sobre células de câncer de pulmão (A549) e observaram que quando combinado o tratamento da chalcona com cisplatina (10  $\mu\text{M}$ ) por 24 horas houve uma indução sinérgica da apoptose nessas células. Os autores observaram que enquanto a cisplatina induzia a via JNK/Bcl-2/beclin 1 para a ativação da autofagia, a sua combinação com a Chal-24 desencadeou a degradação proteossômica do inibidor celular de proteínas apoptóticas (c-IAPs) e a formação do complexo Ripoptossomo que contém RIP1, FADD e caspase 8. Além disso, a combinação de ambos os compostos induziu a degradação de cFLIPL que suprime a ativação da apoptose mediada pelo complexo Ripoptossomo. Assim, a combinação da Chal-24 e cisplatina poderia ser utilizada para melhorar a eficácia da quimioterapia.

Também foi estudada por Song *et al.* (2013) uma nova chalcona sintética, a DK-78 (2'-hidroxi-2,3,4-trimetoxi-benzochalcona), que foi administrada com o quimioterápico doxorrubicina contra duas linhagens celulares de câncer da mama (MCF 7-VN e MDA-MB-231), e avaliada quanto a presença de efeito citotóxico sinérgico. O tratamento com a chalcona (10 e 20  $\mu\text{M}$ , 24 h) e após com o quimioterápico (5 e 10  $\mu\text{M}$ , 24 h) reduziu a viabilidade celular, a expressão de proteínas marcadoras mesenquimais e a migração celular de maneira mais acentuada do que o tratamento isolado com ambos os compostos, confirmando o efeito sinérgico avaliado.

Szliszka *et al.* (2010) demonstram que a chalcona e outros três análogos naturais (licochalcona-A, isobavachalcona, xantohumol e buteína) na concentração de 50  $\mu\text{M}$  por 48 horas em células LNCaP (tumor de próstata) aumentaram a

apoptose e citotoxicidade induzida por TRAIL em células da próstata (LNCaP). Assim, o uso combinado das chalconas e de TRAIL foi responsável pelo aumento da indução de morte celular promovido pelos compostos quando avaliados em separado.

Desta forma, o uso de compostos naturais combinados com quimioterápicos e/ou indutores de apoptose para o tratamento de células tumorais têm sido alvo de diversos estudos recentes e muito ainda precisa ser descoberto para uma futura aplicação de fitoquímicos como adjuvantes na quimioterapia.

### 3. JUSTIFICATIVA E OBJETIVOS

Tendo em vista a alta incidência do carcinoma hepatocelular (CHC), e a baixa eficácia dos tratamentos convencionais utilizados, têm-se a necessidade de descoberta de novas drogas que sejam mais promissoras e seletivas para o seu tratamento. Várias flavonas e chalconas possuem efeitos antitumorais, mas seus efeitos em HepG2 foram pouco estudados. Sabendo-se que as nitrochalconas substituídas têm demonstrado efeitos biológicos mais acentuados quando comparadas com chalconas semelhantes não nitradas e que, além disso, são pouco conhecidos os efeitos de nitrochalconas substituídas ou não, sobre linhagens tumorais, em especial, sobre células HepG2, torna-se importante estudar o efeito destes compostos sobre estas células, visando a possibilidade de aplicação deste flavonóide no tratamento do CHC. Além disso, torna-se importante avaliar a seletividade dos compostos, realizando análise de viabilidade celular em células de fibroblasto adiposo murino L929.

Assim, o objetivo geral deste trabalho foi estudar os efeitos da hispidulina e de chalconas substituídas com grupamentos 2' hidroxil e/ou nitro em células de hepatocarcinoma humano (HepG2) para o entendimento de seus mecanismos de ação, e em células de fibroblasto (L929) com a finalidade de avaliar a citotoxicidade destes compostos sobre uma linhagem não-tumoral.

Para tanto, tivemos como objetivos específicos:

#### 1) Hispidulina

##### a) Avaliar efeitos sobre:

- Atividade das enzimas antioxidantes
- Níveis intracelulares de ERO na presença de NAC
- Viabilidade na presença de co-tratamento com catalase exógena
- Mecanismo de indução de morte celular
- Viabilidade em células de fibroblasto L929

#### 2) Chalconas

##### a) Avaliar efeitos sobre:

- Viabilidade celular (chalconas sintetizadas), incluindo a 4-nitrochalcona, sobre células HepG2
- Viabilidade em células de fibroblasto L929

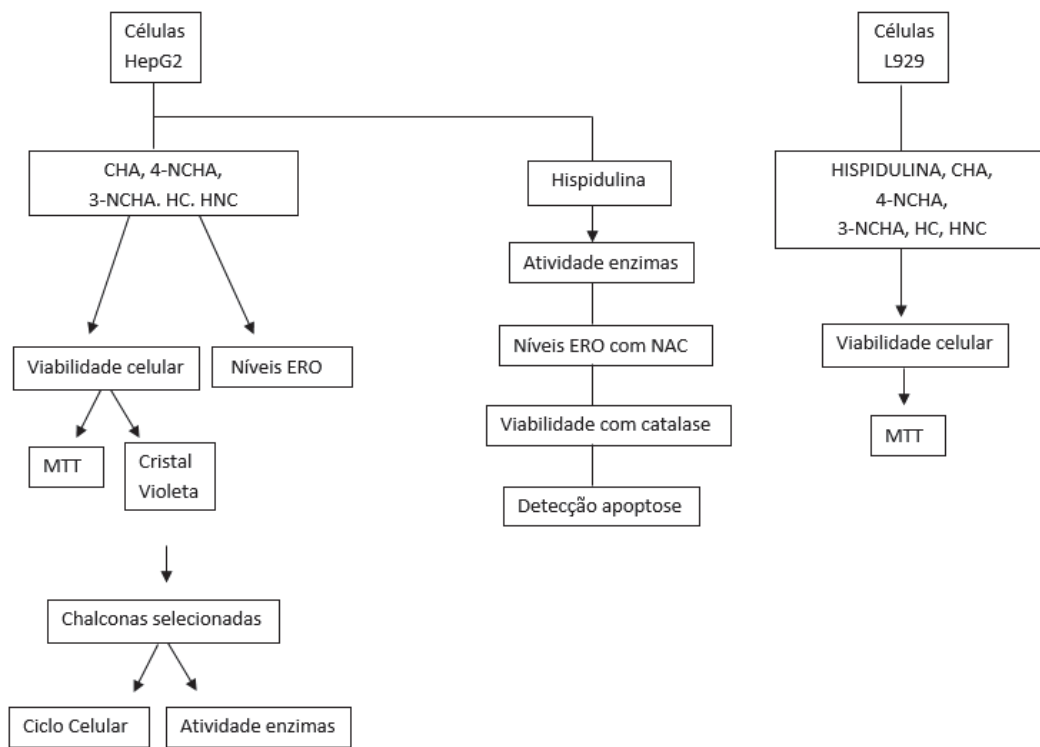
- Comparar os resultados obtidos e escolher os flavonóides com os melhores efeitos para estudar seus mecanismos de ação.

b) Chalconas escolhidas, avaliar os efeitos em células de hepatocarcinoma humano, sobre:

- Ciclo Celular
- Níveis intracelulares de ERO
- Atividade das enzimas antioxidantes

#### 4. ESTRATÉGIA EXPERIMENTAL

FIGURA 9 - FLUXOGRAMA EXPERIMENTAL



FONTE: O Autor (2016)

## 5. MATERIAIS E MÉTODOS

### 5.1 REAGENTES

NAC, NADH, EDTA, DCFDA, iodeto de propídio, dimetilsulfóxido (DMSO), Soro fetal bovino, DMEM alta glucose, gentamicina, RNaseA, 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. A hispidulina foi comprada da empresa Tocris Bioscience dos Estados Unidos (Bristol, U.K.) com uma pureza >98%.

A chalcona, 3-nitrochalcona, 2'-hidroxi-3-nitrochalcona e 2'-hidroxichalcona foram sintetizadas e gentilmente cedidas pelo professor Dr. Alfredo Marques de Oliveira do Departamento de Químico da UFPR. A 4-nitrochalcona foi comprada da empresa Alfa Aesar.

Os demais reagentes utilizados foram 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 HISPIDULINA E DAS CHALCONAS

Para a solução estoque a hispidulina e as chalconas foram solubilizada em DMSO. Foram realizados em todos os experimentos controles com e sem o uso do solvente DMSO com um volume máximo de 0,1% (v/v).

### 5.3 CÉLULAS

A células de hepatocarcinoma humano (HepG2) e de fibroblasto adiposo murino (L929) (Culture Collection American Type, ATCC) foram mantidas em DMEM alta glicose, suplementado com soro bovino a 10% (FBS) e 50 µg/ml de gentamicina, a 37 °C, com 5% de CO<sub>2</sub> sob umidade controlada. As células foram cultivadas no laboratório de 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 todos foram esterilizados em microondas, durante 40 minutos.

## 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. Esta solução concentrada foi constituída por: NaCl 680mM, KCl 13,4 mM, Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> 40,5mM (pH 7,5). A solução 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 glicose, 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 estuda 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% (v/v) de soro bovino fetal estéril inativado. O pH do meio foi 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 mM, KCl 5,4 mM, glucose 5 mM, Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> 0,42 mM, KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 0,44 mM, NaHCO<sub>3</sub> 2,3 mM, EDTA 0,53 mM, 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.

## 5.6 PROCEDIMENTOS DE CULTIVO

As células foram cultivadas em garrafas estéreis com meio DMEM - alta glicose, acrescido de soro fetal bovino 10% (v/v) e gentamicina. As culturas foram mantidas em estufa (Sanyo), em atmosfera contendo 5% de CO<sub>2</sub>, com umidade controlada de 95% e temperatura constante de 37°. Os repiques foram realizados utilizando-se de solução de tripsina-EDTA para soltar as células em intervalos de 48h na proporção de 1:3. Para armazenamento das linhagens, as células (10<sup>6</sup> células/mL) foram suspensas em meio de cultura e DMSO 10% (v/v), e congeladas a -70°C. Para uso as células foram descongeladas a 37°C e adicionadas em garrafas pequenas (50mL) contendo meio adequado como já descrito. Após adesão das células à superfície da garrafa (~2h), o meio foi trocado, eliminando-se o meio de congelamento contendo o DMSO e eventuais células mortas. A monocamada de células foi rotineiramente observada em microscópio invertido (Olympus, modelo CK2).

## 5.7 ENSAIOS EM CÉLULAS

### 5.7.1 Viabilidade Celular

Os compostos testados nos experimentos foram: chalcona (CHA), 3-nitrochalcona (3-NCHA), 2'-hidroxi-3-nitrochalcona (HNC), 2'-hidroxichalcona (HC) e 4-nitrochalcona (4-NCHA).

#### 5.7.1.1 Método do MTT

A viabilidade celular foi avaliada pelo método do MTT (REILLY *et al.*, 1998). A redução do MTT decorrente da atividade respiratória de células viáveis produz um sal de formazan insolúvel que é posteriormente solubilizado para quantificação em 550 nm. A leitura das absorbâncias foi realizada em leitor de microplacas (TECAN-Infinite M200). Para a viabilidade das células L929, a mesma metodologia foi utilizada.



As células foram colhidas assepticamente, contadas e plaqueadas em placas de 96 poços com aproximadamente  $1 \times 10^4$  células por poço. Após a aderência (24 h), foram retirados 200  $\mu$ L do sobrenadante e adicionada a hispidulina (50 e 100  $\mu$ L) e as chalconas (CHA, 3-NCHA, 4-NCHA, HNC, HC) nas diferentes concentrações indicadas, nos tempos de 24, 48 e 72 horas. Após o término das incubações, o sobrenadante foi retirado e adicionaram-se 180  $\mu$ L de HBSS + 20  $\mu$ L da solução de MTT (5 mg/mL), seguindo-se de incubação por 37°C/ 3 h / 5% CO<sub>2</sub>. Após 3h retirou-se o MTT que não reagiu, adicionou-se 200  $\mu$ L de DMSO, para solubilizar o formazan formado. 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%). Para os ensaios de proteção da catalase as células foram simultaneamente tratadas com a hispidulina (50 e 100  $\mu$ M) e catalase exógena (100, 250, 500 ou 1000 U/mL), durante os tempos determinados, utilizando-se também o método do MTT.

#### 5.7.1.2 Método do Cristal Violeta

Devido a possíveis interferências das chalconas sobre desidrogenases mitocondriais (DABAGUI-BARBOSA *et al.*, 2005) em mitocôndrias isoladas de fígado de rato que poderiam afetar os resultados pelo método do MTT, tornou-se importante a realização da análise dos efeitos dos compostos utilizando-se do método do Cristal violeta (KUENG *et al.*, 1989) para confirmar e comparar os resultados obtidos pelas duas técnicas. O ensaio do cristal violeta é útil para obter informação quantitativa sobre a densidade relativa de células aderidas em placas de cultura.

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<sub>2</sub> a 37°C para adesão e crescimento. Após a aderência (24 h), foram retirados 200  $\mu$ L do sobrenadante e adicionadas as chalconas (CHA e 4-NCHA) nas suas diferentes concentrações nos tempos de 24, 48 e 72 horas de incubação.

O volume final foi completado para 200 $\mu$ L com meio DMEM alta glucose completo. Após o término das incubações, o sobrenadante foi retirado, as células foram lavadas com PBS, logo após fixadas com 50  $\mu$ L de metanol por 10 min, e depois coradas com 50  $\mu$ L cristal violeta 0,2% em etanol 2% por 2 min. O cristal

violeta foi retirado e as células lavadas exaustivamente (5x) com PBS, estas foram, após, 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 0,05 mol/L em etanol 50% como branco para as determinações de absorbância em leitor de microplaca microplacas (TECAN-Infinite M200) em 540 nm. Os resultados foram expressos em percentagem de células viáveis em relação ao controle com DMSO (100%). O Cálculo da viabilidade proporcional foi determinado em relação à absorbância média dos controles tratados com o veículo (DMSO).

### 5.7.2 Níveis intracelulares de ERO

Mudanças relativas na ERO intracelular em células HepG2 foram monitoradas através de uma sonda fluorescente, DCFH-DA (LABEL *et al.*, 1992). A sonda 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 ERO. A intensidade de fluorescência do DCF é proporcional à quantidade de ERO formada intracelularmente (Shen *et al.*, 1996). Para o ensaio, as células foram plaqueadas ( $1 \times 10^4$  células/poço) em placas de 96 poços, deixadas por 24 horas em estufa de CO<sub>2</sub> a 37°C para aderirem. Após as incubações por 24 h com as chalconas (CHA, 3-NCHA, 4-NCHA, HNC, HC) nas diferentes concentrações indicadas, o meio foi retirado e foi adicionado 5µL da solução de DCFH-DA (2 mM) e 200 µL de PBS. Como controle positivo foi utilizado o peróxido de hidrogênio (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>) na concentração de 200 µM dissolvido em PBS, com volume total de 200 µL por poço. Então foi deixado incubando em estufa de CO<sub>2</sub> a 37°C por 30 minutos. A fluorescência foi monitorada em 480 nm de excitação, e 520 nm de emissão em leitor de microplacas TECAN Infinite. Os resultados foram expressos como percentagem em relação ao controle.

Para os ensaios com adição de N-acetilcisteína (NAC), o mesmo procedimento foi utilizado, porém adicionando-se pré-incubação com NAC (2 h) nas concentrações de 5 e 10 mM, além de controles somente com adição de NAC nas mesmas concentrações.

### 5.7.3 Análise do ciclo celular

A metodologia foi baseada no ensaio de Vindelov *et. al.* (1983). As células HepG2 foram plaqueadas ( $5,0 \times 10^5$  células) em placas de 60 mm. As células foram tratadas com as chalconas selecionadas CHA, 4-NCHA e HNC, nas concentrações responsáveis por reduzir a viabilidade celular em 20% (50, 10 e 15  $\mu\text{L}$  respectivamente) e também na concentração de 20  $\mu\text{L}$  para comparação dos resultados obtidos entre elas, ambas no tempo de 24 horas de incubação.

Após, 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). Os resultados foram expressos como porcentagem em relação ao controle com DMSO (100%).

#### 5.7.4 Atividade das Enzimas Antioxidantes

Para esse ensaio, as células foram tratadas com as chalconas selecionadas, CHA, 4-NCHA e HNC, nas concentrações responsáveis por reduzir a viabilidade celular em 20% (50, 10 e 15  $\mu\text{L}$  respectivamente) e também na concentração de 20  $\mu\text{L}$  para comparação dos resultados obtidos entre elas, ambas no tempo de 24 horas de incubação.

##### 5.7.4.1 Atividade da Catalase

A atividade da catalase foi acompanhada pelo decréscimo da absorbância do peróxido de hidrogênio ( $\text{H}_2\text{O}_2$ ) a 240 nm (AEBI, 1984). O sistema de reação foi constituído de tampão fosfato 50 mM (pH 7,0),  $\text{H}_2\text{O}_2$  10 mM e o extrato celular de HepG2 130  $\mu\text{g}$  de proteína. $\text{mL}^{-1}$ . O ensaio foi iniciado pela adição de  $\text{H}_2\text{O}_2$  e acompanhado durante 2 minutos. Os resultados expressos como porcentagem em relação ao controle foram calculados considerando o coeficiente de extinção molar do  $\text{H}_2\text{O}_2$  (43,6  $\text{mol}^{-1} \cdot \text{L} \cdot \text{cm}^{-1}$ ).

##### 5.7.4.2 Atividade da Superóxido Dismutase (SOD)

A atividade da superóxido dismutase foi avaliada espectrofotometricamente através da auto-oxidação da epinefrina monitorada em 480 nm (MCCORD e FRIDOVIC.I, 1969). O sistema de reação foi constituído de tampão carbonato 0,05 M (pH 10,2), adrenalina 1 mM e extrato celular de células HepG2 (150  $\mu\text{g}$  de

proteína) em um volume de 1 mL a 30°C. Uma unidade de SOD foi definida como a quantidade de proteína capaz de inibir 50% da atividade. Os resultados foram expressos em relação ao controle, sendo o controle definido como 100% de atividade ou 1 unidade de SOD.

#### 5.7.4.3 Atividade da Glutathione Redutase (Gred)

A atividade da Gred foi avaliada espectrofotometricamente (SIES *et al.*, 1979). Neste ensaio a Gred catalisa a redução da glutathione na presença de NADPH. O sistema de reação foi constituído de tampão fosfato 100 mM (pH 7,0), EDTA 1 mM, GSSG 0,66 mM, NADPH 0,075 mM e extrato celular de HepG2 50 µg de proteína por mL. A reação foi iniciada pela adição de GSSG e a absorbância acompanhada durante 5 minutos a 340 nm. Os resultados foram expressos em porcentagem em relação ao controle, considerando o coeficiente de extinção molar do NADPH (6220 mol.L<sup>-1</sup>. cm<sup>-1</sup>).

#### 5.7.5 Ensaio de apoptose

A apoptose foi determinada em células HepG2, usando PE Anexina-V Apoptosis Detection Kit I da BD Biosciences, de acordo com o manual de instruções. As células foram plaqueadas a uma densidade de 2x10<sup>5</sup> células/poço em placas de 12 poços e tratadas com hispidulina (50 e 100 µM) durante 24h. A incubação combinada com quercetina (50 µM) e cisplatina (10 µM) foi usado como controle positivo para a apoptose (ZHAO *et al.*, 2014). As células em suspensão e as aderidas foram coletadas e, após centrifugação, o pellet foi ressuspenso em 100 µL de tampão de ligação, e coradas com 5 µL de PE-anexina V e 5 µL de 7-AAD durante 15 min a 25° C no escuro. As amostras foram diluídas em 400 µL de tampão de ligação e analisadas por citometria de fluxo (FACSCalibur - BD Biosciences Pharmingen, San Diego, CA, USA) e os resultados foram calculados utilizando o software BD Accuri C6.

#### 5.7.6 Determinação da concentração de proteínas

A quantificação de proteína foi realizada de acordo com o método de Bradford (1976), utilizando soluções de BSA como padrão.

### 5.7.7 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 \* $p < 0,05$ ; \*\* $p < 0,01$ ; \*\*\* $p < 0,001$ .

## 6. RESULTADOS E DISCUSSÃO

### 6.1 EFEITOS DA HISPIDULINA SOBRE CÉLULAS DE CARCINOMA HEPATOCELULAR HepG2 E CÉLULAS DE FIBROBLASTO MURINO (L929)

Em relação aos resultados observados com a hispidulina anteriormente em nosso laboratório verificou-se que hispidulina é capaz de reduzir a viabilidade das células HepG2 de maneira dependente da concentração e do tempo, observando-se uma redução de 24%, 45% e 53% nas concentrações de 50, 100 e 200  $\mu\text{M}$  respectivamente após 24 h de incubação; 36%, 51% e 68% respectivamente após 48 h e 60%, 82% e 91% respectivamente após 72 h de tratamento. No ensaio para avaliar alterações no ciclo celular, observou-se que após tratamentos com hispidulina (50 e 100  $\mu\text{M}$ , 24 h) houve um aumento da fase subG1 de 69% e 93% respectivamente, assim como uma diminuição de 13% e 20% nas mesmas doses na fase G1 (SCOPARO, 2012)

Na análise dos níveis de espécies reativas de oxigênio (ERO) foi constatado que após tratamento com hispidulina (50 e 100  $\mu\text{M}$ ) por 24 horas houve um aumento de 49% e 61% respectivamente, após 48 horas o aumento foi de 55% e 122%, e após 72 horas o aumento foi de 92% e 177% respectivamente. Para confirmar o envolvimento do aumento de ERO na indução de morte celular, realizou-se tratamento simultâneo com um antioxidante (N-acetilcisteína - NAC) e verificou-se que após tratamento com a hispidulina (50  $\mu\text{M}$ , 24 h) houve uma redução de 28% na viabilidade celular, quando adicionou-se NAC nas concentrações de 5 e 10 mM, estas reduções foram de 22% e 14% respectivamente. Após o tratamento com hispidulina (100  $\mu\text{M}$ ) a redução de viabilidade foi de 36%, porém com a adição de NAC 5 e 10 mM essas reduções foram de 23% e 17% respectivamente quando o dobro da concentração de NAC (10 mM) foi utilizado, indicando que a adição de NAC protege contra a morte celular.

Nos experimentos para avaliar os níveis de glutathiona total (GSH) e a relação GSH/GSSG, observou-se uma diminuição significativa dos níveis de GSH de 43% e 52% após o tratamento com a hispidulina (50 e 100  $\mu\text{M}$ , 24 h). Foi visto também uma diminuição de 36% e 46% respectivamente na relação GSH/GSSG. E, quanto a expressão das enzimas antioxidantes foi possível observar que os níveis de mRNA da enzima catalase diminuíram significativamente em 38 e 40%

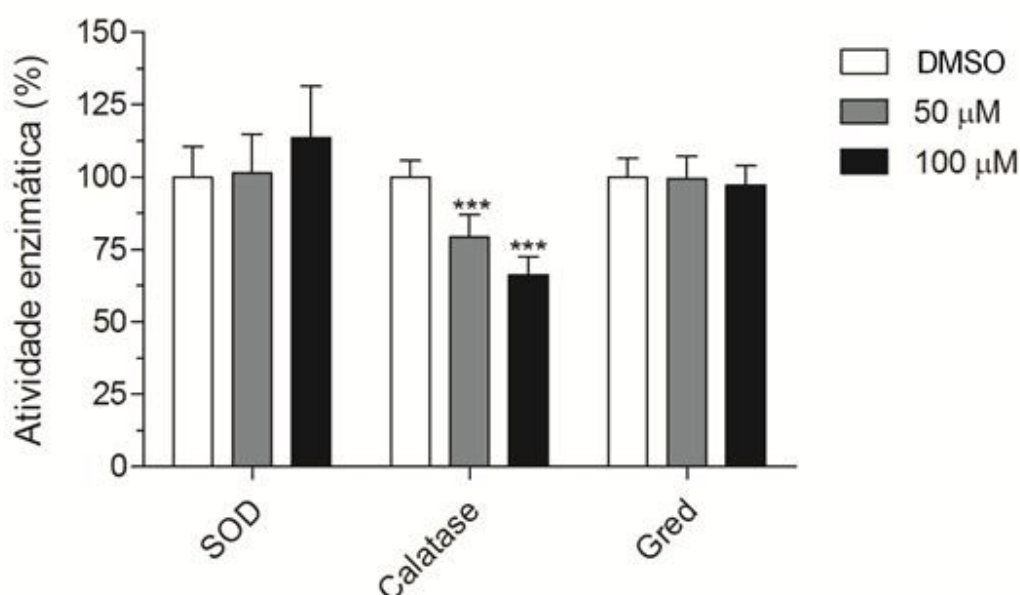
nas doses de 50 e 100 $\mu$ M respectivamente sem afetar a expressão das demais enzimas antioxidantes (CuZnSOD, MnSOD, GPx1 e Gred). Indicando que a hispidulina altera parâmetros relacionados às defesas antioxidantes celulares (SCOPARO, *et al.*, 2015; SCOPARO, 2012).

Assim, no presente trabalho, um dos objetivos foi complementar os estudos sobre a importância das ERO na indução de morte celular promovida pela hispidulina, e a possível seletividade deste composto quando comparada as células tumorais (HepG2). Para tanto foram realizadas as análises descritas a seguir.

### 6.1.1 Atividade das Enzimas Antioxidantes

Como citado anteriormente observamos em nosso laboratório que a incubação de células HepG2 com a hispidulina reduz os níveis de expressão de mRNA da catalase (SCOPARO, *et al.*, 2015). Para confirmar os resultados obtidos em nível transcricional, foram avaliadas as atividades das enzimas antioxidantes. Foi observado que a incubação de células HepG2 com hispidulina (50 e 100  $\mu$ M) por 24 horas promoveu uma redução significativa somente na atividade da catalase (20 e 34% respectivamente), quando comparada com o controle (FIGURA 10).

FIGURA 10 – EFEITOS DA HISPIDULINA SOBRE A ATIVIDADE DAS ENZIMAS ANTIOXIDANTES



FONTE: O Autor (2015)

NOTA: As análises das atividades das enzimas antioxidantes foram realizadas como descrito em Materiais e Métodos no item 5.7.4. Os experimentos foram realizados em triplicata, em volume final de 200 $\mu$ L em meio DMEM alta glicose completo, no controle foi adicionado meio com DMSO (0,1% v/v). A hispidulina foi incubada nas concentrações indicadas ( $\mu$ M) por 24 horas a 37°C. \*\*\*p<0,001

Herrerias (2009) observou que a incubação de células de melanoma murino (B16-F10) com hispidulina (50  $\mu$ M por 24 h) estimulou a atividade de SOD total em aproximadamente 40% e inibiu em 25% a atividade da catalase. Os autores relacionaram esse aumento da atividade de SOD conjuntamente com a inibição da catalase a um possível aumento nos níveis de peróxido de hidrogênio nas células B16-F10, levando ao aumento de processos oxidativos e geração de danos celulares.

Outras flavonas também foram estudadas em relação à atividade e expressão das enzimas antioxidantes. Herrerias (2009) observou que a incubação de células de melanoma murino B16F10 com a flavona luteolina inibe a atividade da SOD em aproximadamente 40% e a incubação com eupafolina, apigenina e luteolina inibiram respectivamente 45, 40 e 35% a atividade da catalase (50  $\mu$ M) após 24 horas de incubação.

Também em nosso laboratório Valdameri *et al.* (2011), observaram que a incubação de células de hepatocarcinoma humano (HepG2) com apigenina promove diminuição da expressão da enzima catalase em aproximadamente 40% (100  $\mu$ M), sugerindo que o aumento dos níveis de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> poderiam estar envolvidos na morte celular de células HepG2 induzida por apigenina.

Os resultados obtidos indicam, então, que a hispidulina é capaz de modular negativamente tanto os níveis de expressão do mRNA da catalase (SCOPARO, 2012) quanto reduzir sua atividade enzimática em células HepG2, e este fato pode contribuir para o aumento de ERO especialmente de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, e colaborar para a indução de morte celular.

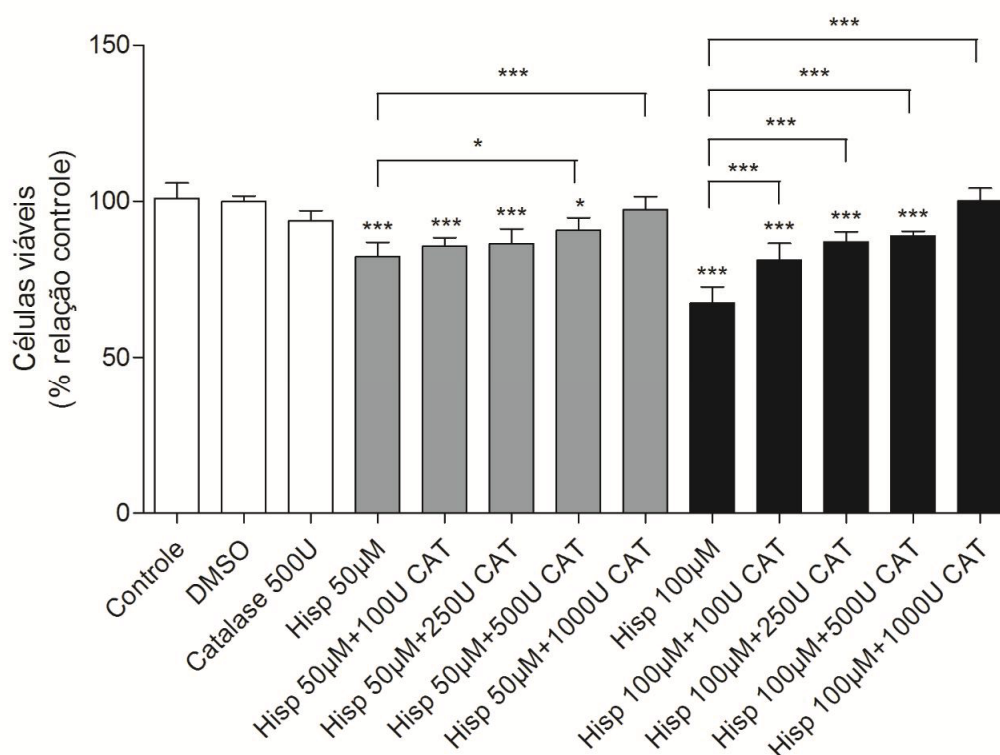
#### 6.1.2 Efeitos da adição de catalase exógena em células HepG2 expostas a hispidulina

Para avaliar se o aumento de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> em função da redução da atividade da catalase estaria diretamente relacionado aos efeitos de indução de morte celular induzida pela hispidulina, as células HepG2 foram submetidas simultaneamente a incubação com hispidulina (50 e 100  $\mu$ M) e diferentes concentrações de catalase (100, 250, 500 e 1000 U/mL) por 24 horas (FIGURA 11). As análises foram feitas através do método do MTT (REILLY *et al.*, 1998). A adição de 500 ou 1000 unidades por mL de catalase juntamente com 50  $\mu$ M de hispidulina resultou em uma redução significativa do efeito do flavonoide sobre a indução de morte das células HepG2,



em aproximadamente 10% e 17%, respectivamente. Com a concentração de 100  $\mu\text{M}$  de hispidulina e 100 U/mL de catalase já foi possível observar uma redução significativa do efeito do flavonóide sobre a morte celular de 15%, sendo que com 250, 500 e 1000 U/mL de catalase essas reduções foram de 20%, 23% e 35% respectivamente.

FIGURA 11 – EFEITOS DA CO-INCUBAÇÃO COM HISPIDULINA E CATALASE EXÓGENA NA VIABILIDADE DAS CÉLULAS HepG2



FONTE: O autor (2015)

NOTA: A análise da viabilidade das células HepG2 utilizando o co-tratamento com hispidulina e catalase exógena foi realizada segundo o item 5.7.1.1 do Materiais e Métodos após a exposição com a hispidulina (50 ou 100  $\mu\text{M}$ ) e as concentrações de catalase como indicadas. Os experimentos foram realizados em triplicata, em volume final de 200 $\mu\text{L}$  em meio DMEM alta glucose completo, no controle somente foi adicionado o meio. A hispidulina foi incubada nas concentrações indicadas ( $\mu\text{M}$ ) por 24 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 3 experimentos independentes. \* $p < 0,05$ ; \*\*\* $p < 0,001$

Valdameri *et al.* (2011), em nosso laboratório utilizando a flavona apigenina (100  $\mu\text{M}$ ), constatou que a adição de catalase (500 U / mL e 1000 U / mL) promoveu uma redução significativa do efeito sobre a indução de morte das células HepG2, em aproximadamente 20% e 30% respectivamente, o que sugere que o aumento nos níveis de  $\text{H}_2\text{O}_2$  pode estar envolvido na morte celular induzida por apigenina.

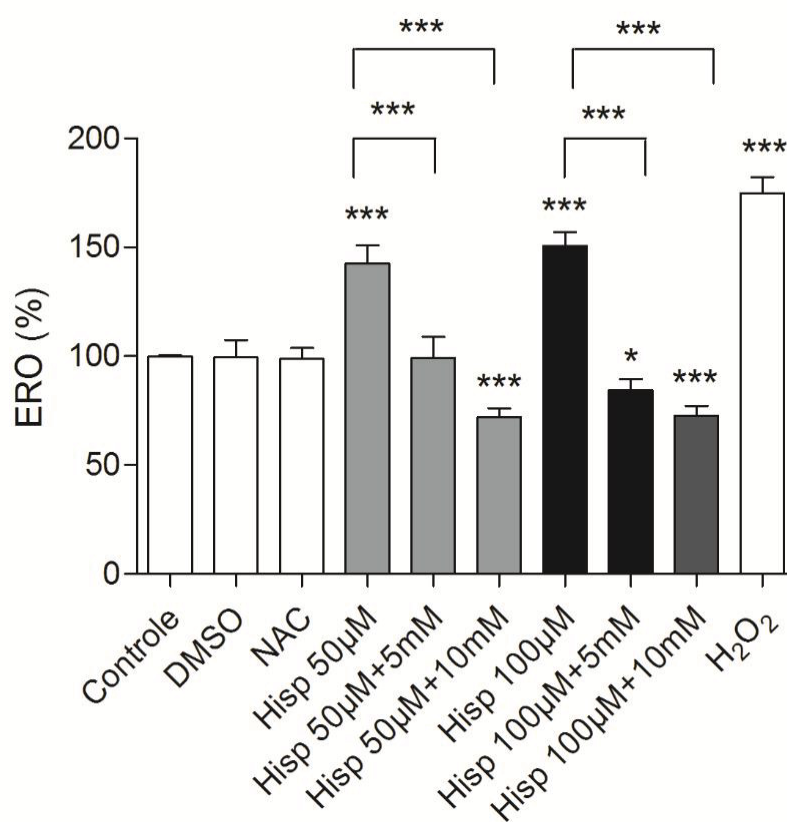
Pan *et al.* (2005) também observaram resultados semelhantes com a flavona acacetina (5,7-dihidroxi-4'-metoxiflavona) (60  $\mu\text{M}$ , 24 horas), onde constataram que com a adição de catalase (200 e 400 U/mL) houve uma proteção das células de carcinoma gástrico humano AGS (CCRC 60102) da indução de morte induzida pela acacetina.

Nossos resultados sugerem, então, que o aumento intracelular de  $\text{H}_2\text{O}_2$  causado pela incubação com hispidulina pode ser, pelo menos em parte, o responsável pela indução de morte celular.

### 6.1.3 Níveis intracelulares de ERO na presença de NAC

Para comprovar o envolvimento do aumento de espécies reativas de oxigênio no mecanismo de indução de morte celular induzido pela hispidulina foi realizada também a análise dos níveis intracelulares de ERO na presença de NAC (N-acetilcisteína). Realizamos a incubação com a hispidulina nas concentrações de 50 e 100  $\mu\text{M}$  e pré- incubação com NAC por 2 horas. Mudanças relativas nos níveis de ERO intracelular foram monitoradas através da sonda fluorescente, DCFH-DA (LABEL *et al.*, 1992). Na FIGURA 12 pode-se observar que com a incubação na concentração de 50  $\mu\text{M}$  de hispidulina, ocorre um aumento de 42% na produção destas espécies reativas. Já com a adição de NAC (2 horas) na concentração de 5 mM e hispidulina 50  $\mu\text{M}$  não foi observado um aumento na formação de ERO e com 10 mM de NAC e 50  $\mu\text{M}$  de hispidulina, houve uma redução destes níveis de 29%. Após incubação das células com hispidulina na concentração de 100  $\mu\text{M}$ , observou-se um aumento de ERO de aproximadamente 50%, e com a pré-incubação com NAC na concentração de 5 mM e 10 mM houve uma redução dos níveis de ERO para 16% e 28%.

FIGURA 12 - ANÁLISE DOS NÍVEIS DE ERO INTRACELULAR NA PRESENÇA DE NAC



FONTE: O Autor (2015)

NOTA: A análise da viabilidade das células HepG2 após incubação com hispidulina e pré- incubação com NAC foi realizada segundo o item 5.7.1.1 do Materiais e Métodos. Os experimentos foram realizados em triplicata, em volume final de 200µL em meio DMEM alta glucose completo, no controle somente foi adicionado o meio. No controle somente com NAC a concentração utilizada foi de 5mM. A hispidulina foi incubada nas concentrações indicadas (50 ou 100µM) por 24 horas a 37°C. O volume de DMSO utilizado foi de 0,1% (v/v) e as adições de NAC foram de 5mM ou 10mM como indicadas. Os resultados estão expressos como percentagem em relação ao controle com DMSO (100%) e são média ± desvio padrão de 3 experimentos independentes. \*p<0,05; \*\*\*p<0,001

Sugere-se, assim, que a hispidulina pode promover o aumento dos níveis de ERO, uma vez que a adição de NAC causou uma redução destas espécies dependente da concentração, provavelmente devido aos níveis restaurados de GSH.

Shukla e Gupta (2008), avaliaram os efeitos da apigenina (20 e 40 µM) na indução de morte celular da linhagem de células de câncer de próstata humano (22Rv1) e observaram que esta pode ser iniciada por espécies reativas de oxigênio. As células foram tratadas ou não com NAC por 3 h e observou-se que a incubação das células com a flavona antes da exposição ao NAC causou um aumento na geração de ERO em 50 e 100% respectivamente, já com a adição de NAC, houve uma diminuição na quantidade de ERO de aproximadamente 50% em relação as

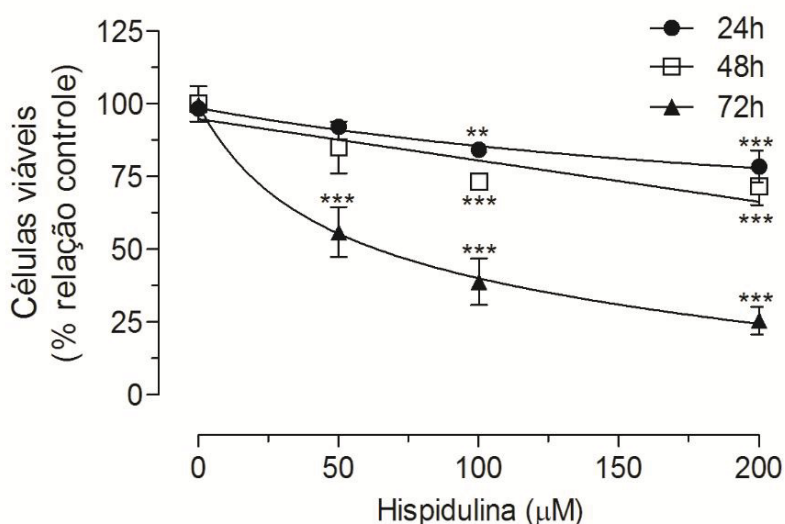
células tratadas somente com apigenina (20 $\mu$ M), sugerindo que ERO pode regular o processo apoptótico após a incubação das células com apigenina.

Nossos resultados sugerem, então, que a hispidulina pode promover o aumento dos níveis de ERO e que com a adição de NAC ocorre uma redução destas espécies de maneira dependente da concentração. Os resultados obtidos estão de acordo com os observados anteriormente (SCOPARO, 2012) quando se observou um aumento da viabilidade das células HepG2 após a adição de NAC também de maneira dependente da concentração.

#### 6.1.4 Determinação da Viabilidade de células de fibroblasto murino L929 tratadas com hispidulina

Com a finalidade de verificar a toxicidade da hispidulina em células não-tumorais foram realizadas as análises de viabilidade pelo método do MTT utilizando células de fibroblastos normais imortalizadas (L929) e os efeitos comparados com os obtidos com células HepG2. A FIGURA 13 mostra os efeitos da hispidulina sobre a viabilidade de células L929 tratadas com diferentes concentrações de hispidulina durante 24, 48 e 72h.

FIGURA 13 – EFEITOS DA HISPIDULINA SOBRE A VIABILIDADE DE CÉLULAS L929



FONTE: O autor (2015)

NOTA: A análise da viabilidade das células L929 foi realizada segundo o item 5.7.1.1 do Materiais e Métodos. Os experimentos foram realizados em volume final de 200 $\mu$ L de meio DMEM alta glucose completo, no controle somente foi adicionado o meio. A hispidulina foi incubada nas concentrações indicadas ( $\mu$ M) por 24, 48 e 72 h 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 3 experimentos independentes realizados em triplicata. \*\* $p < 0,01$ ; \*\*\* $p < 0,001$

Não foi observado redução da viabilidade celular de maneira estatisticamente significativa quando se utilizou a concentração de 50  $\mu\text{M}$  de hispidulina após 24 e 48h de incubação. Contudo, quando se utilizou a concentração de 100  $\mu\text{M}$  verificou-se uma redução de 16, 27 e 62% nos tempos de 24, 48 e 72 h respectivamente. Observou-se também redução da viabilidade celular de 21%, 29%, 75% com a concentração de 200  $\mu\text{M}$ , após 24, 48 e 72h de incubação respectivamente.

Para observar os efeitos seletivos da hispidulina em células HepG2, comparou-se na TABELA 1 os resultados de  $\text{IC}_{50}$  obtidos após incubação das células HepG2 e L929 por 24 e 48 horas com a hispidulina:

TABELA 1 - VALORES DE  $\text{IC}_{50}$  DA HISPIDULINA EM CÉLULAS HEPG2 E L929

	<b>HepG2</b>	<b>L929</b>
	<b><math>\text{IC}_{50}</math> (<math>\mu\text{M}</math>)</b>	<b><math>\text{IC}_{50}</math> (<math>\mu\text{M}</math>)</b>
24h	158 $\pm$ 33	> 300
48h	95,7 $\pm$ 9,6	> 300
72h	35,6 $\pm$ 3,6	63,45 $\pm$ 12,5

FONTE: O autor (2015)

NOTA: Os valores de  $\text{IC}_{50}$  foram calculados pelo programa GraphPad Prism 6 e representam as concentrações que resultam em 50% de redução da viabilidade celular após os tempos de incubação

Os resultados mostram que a hispidulina pode ser tóxica para células L929, porém com menor intensidade em comparação com os efeitos observados para a linhagem HepG2 nas mesmas concentrações e tempos de incubação. Os resultados sugerem uma aparente seletividade observada com a incubação com hispidulina, quando se comparam os efeitos obtidos em células tumorais (HepG2) versus células não-tumorais (L929).

Demonstrou-se recentemente que tanto a estrutura base da flavona quanto a presença de grupos hidroxila na apigenina (5,7,4'-triidroxiflavona) foram capazes de induzir morte celular preferencial de células de hepatocarcinoma humano (HepG2) em comparação com células de hepatócito de ratos (Valdameri *et al.*, 2011; Valdameri *et al.*, 2014).

Herrerias (2009) também verificou que a flavona eupafolina (50  $\mu$ M, 24 h) reduziu em 70% a viabilidade de células de melanoma murino e não apresentou efeitos citotóxicos significativos em células de melanócitos murinos (Melan-A), indicando uma possível seletividade da eupafolina em células tumorais.

Seletividade semelhante foi observado por Cárdenas *et al.* (2006), que usou flavonóides naturais e sintéticos (flavonas, hidroxiflavonas e nitroflavonas) no tratamento de várias linhagens de células tumorais contra células normais de glândula mamária de camundongos (NMuMG) e células de fibroblasto embrionárias de rato (NIH-3T3).

Em outro estudo, a flavona crisina (5,7 diidroxiflavona) demonstrou atividade antiproliferativa contra a linhagem celular HepG2 e, apresentou fraca atividade de inibição do crescimento contra a linhagem de células normais de fibroblasto murino NIH-3T3 (EL-HADY *et al.*, 2013).

Apesar de agentes com capacidade para induzir a apoptose seletiva de células tumorais terem ganhado bastante atenção no campo da descoberta de novas drogas antitumorais, os mecanismos moleculares relacionados com esta seletividade induzida por flavonóides ainda não são completamente compreendidos (BADISA *et al.*, 2009; SAMARGHANDIAN *et al.*, 2010; CHAMPELOVIER *et al.*, 2013; NG *et al.*, 2013).

#### 6.1.5 Avaliação do mecanismo de indução de morte celular

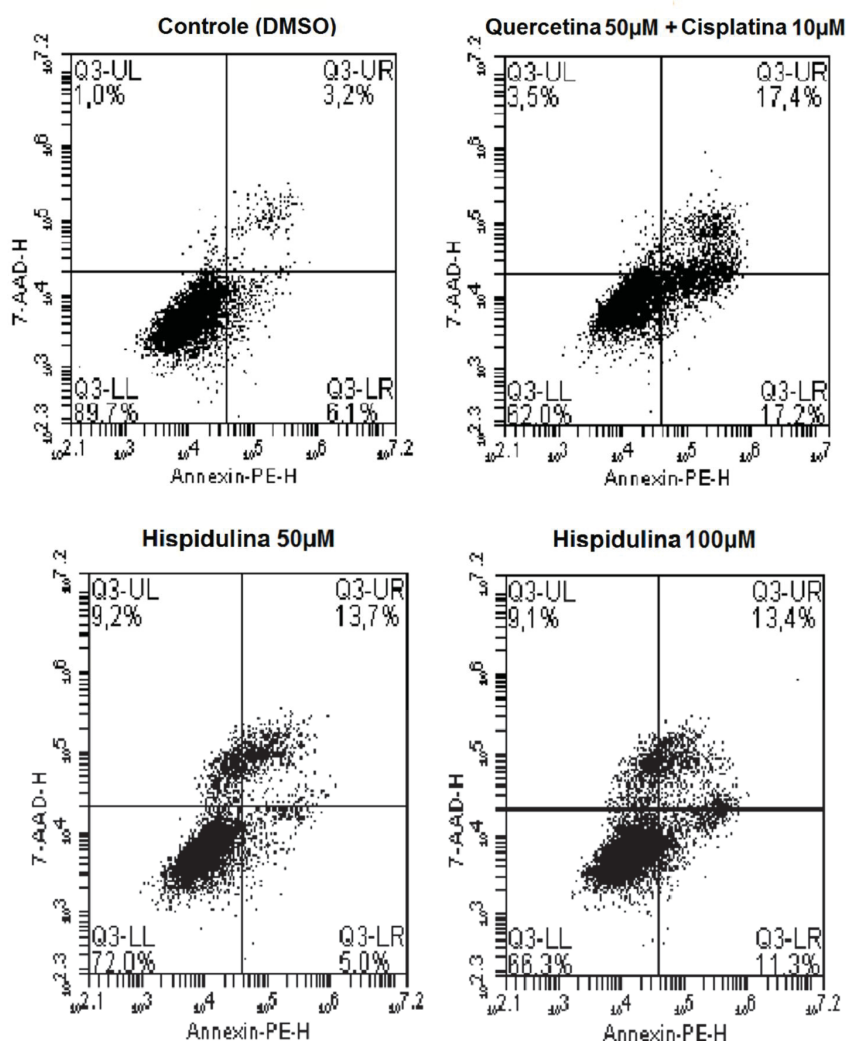
Na tentativa de elucidar o mecanismo de morte celular promovido pela hispidulina em células HepG2 foi realizado o ensaio de dupla marcação com anexina-V (que reconhece a fosfatidilserina) e 7-amino-actinomicina D (7-AAD - que marca DNA). A população anexina-V<sup>-</sup>/7-AAD<sup>-</sup> foi considerada como controle, enquanto que as populações de células anexina-V<sup>+</sup>/7-AAD<sup>-</sup> e anexina-V<sup>-</sup>/7-AAD<sup>+</sup> positivas foram consideradas em apoptose. Como mostrado na FIGURA 14, a incubação com hispidulina aumentou a percentagem de células Anexina V<sup>+</sup> em comparação com células do controle (quadrante inferior direito - 11,3% versus 6,1%). Além disso, as porcentagens de células Anexina V<sup>+</sup>/7-AAD<sup>+</sup> também aumentaram após a incubação com hispidulina (quadrante direito superior - 13,4% versus 3,2%) e as células 7-AAD<sup>+</sup> também aumentaram após tratamento com 50 e 100  $\mu$ M de hispidulina (quadrantes superiores esquerdo – 9,2 e 9,1% versus 1%) Em conjunto, estes resultados sugerem que a hispidulina promove a morte celular por ambos os mecanismo de necrose e apoptose em células HepG2.

Anteriormente, em nosso laboratório, foi visto por Valdameri *et al.* (2011) que a exposição das células HepG2 à flavona (100  $\mu$ M) por 24 e 48 horas promove um aumento na população anexina-V<sup>+</sup>/IP<sup>-</sup> de 12 e 16%, respectivamente.

Outros autores já observaram que a incubação com hispidulina, em duas linhagens celulares de glioblastoma multiforme humano (GBM8401 e GBM8901) durante 48 horas, reduz a viabilidade celular de uma forma dependente da concentração, e bloqueia a progressão do ciclo celular na fase G1, e induz apoptose (LIN *et al.*, 2010). Yang *et al.* (2010) observaram que a hispidulina potencializa a apoptose induzida por TRAIL em células de câncer de ovário humanos.

Esses resultados sugerem que a morte celular está sendo causada por apoptose e corrobora com dados descritos na literatura, nos quais é sugerido que em outras linhagens celulares que as flavonas são capazes de induzir apoptose (ULLMANNOVA; POPESCU, 2007; LIN *et al.*, 2015; LU *et al.*, 2015).

FIGURA 14 – DUPLA MARCAÇÃO COM ANEXINA-V/7-AAD EM CÉLULAS HepG2



FONTE: O autor (2015)

NOTA: A análise da dupla marcação com anexina-V/7-AAD em células HepG2 foi realizada segundo o item 5.7.5 de Materiais e Métodos. A quercetina e a cisplatina foram adicionadas nas concentrações indicadas como controles positivos para apoptose. As células foram analisadas por citometria de fluxo após incubação com hispidulina (50 e 100 µM) durante 24 h a temperatura ambiente. Os dados representam dois experimentos independentes realizados em duplicata.

## 6.2 EFEITOS DAS CHALCONAS SOBRE CÉLULAS DE CARCINOMA HEPATOCELULAR HepG2

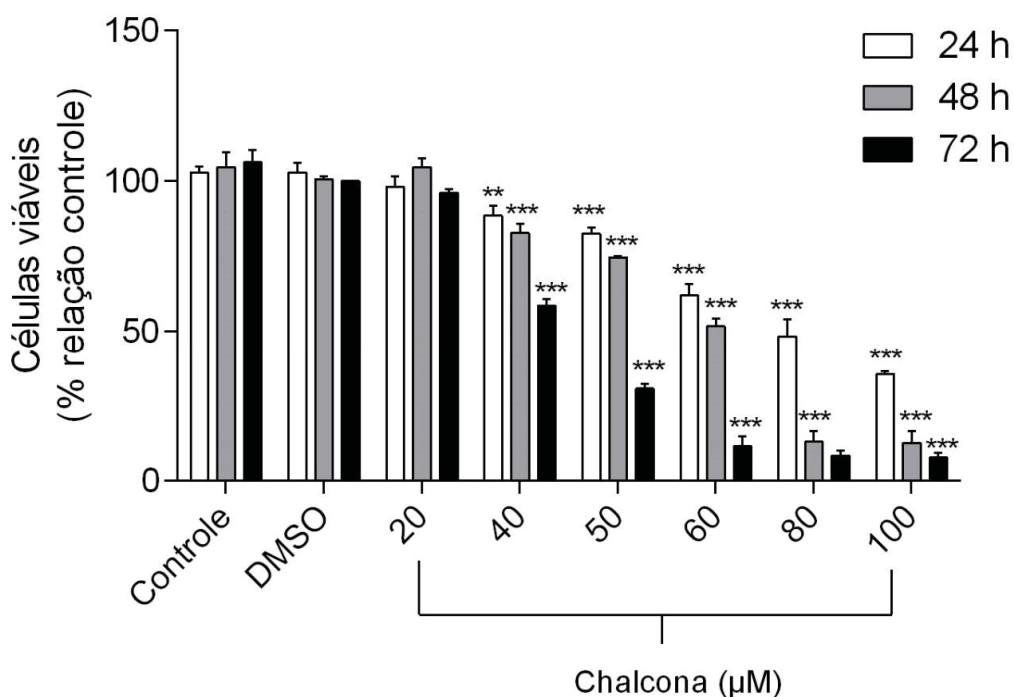
### 6. 2.1 Chalcona (CHA)

#### 6. 2.1.1 Efeitos da chalcona sobre a viabilidade de células HepG2 analisados pelo método do MTT



Foram avaliados os efeitos da CHA sobre a viabilidade de células HepG2 nos tempos de 24, 48 e 72 horas utilizando-se a metodologia do MTT e os resultados estão apresentados na FIGURA 15. Observou-se que o composto é capaz de reduzir a viabilidade dessas células de maneira dependente da concentração e do tempo de incubação. Foram observados efeitos estatisticamente significativos somente a partir da concentração de 40  $\mu\text{M}$  com uma redução de 12% na viabilidade celular após 24h de incubação. Nas concentrações de 50, 60, 80 e 100  $\mu\text{M}$  as reduções foram de 18%, 38%, 52% e 65% respectivamente após 24h de incubação. Após 48 horas de incubação nas concentrações de 40, 50, 60, 80 e 100  $\mu\text{M}$ , a chalcona reduziu a viabilidade celular em 18%, 26%, 49%, 86% e 88% respectivamente. Após 72 horas de incubação com a CHA, observou-se uma redução de 42%, 77%, 89%, 92% e 94% nas concentrações de 40, 50, 60, 80 e 100  $\mu\text{M}$ , respectivamente.

FIGURA 15 - EFEITO DA CHALCONA SOBRE A VIABILIDADE DE CÉLULAS HEPG2 NOS TEMPOS DE 24, 48 E 72 HORAS



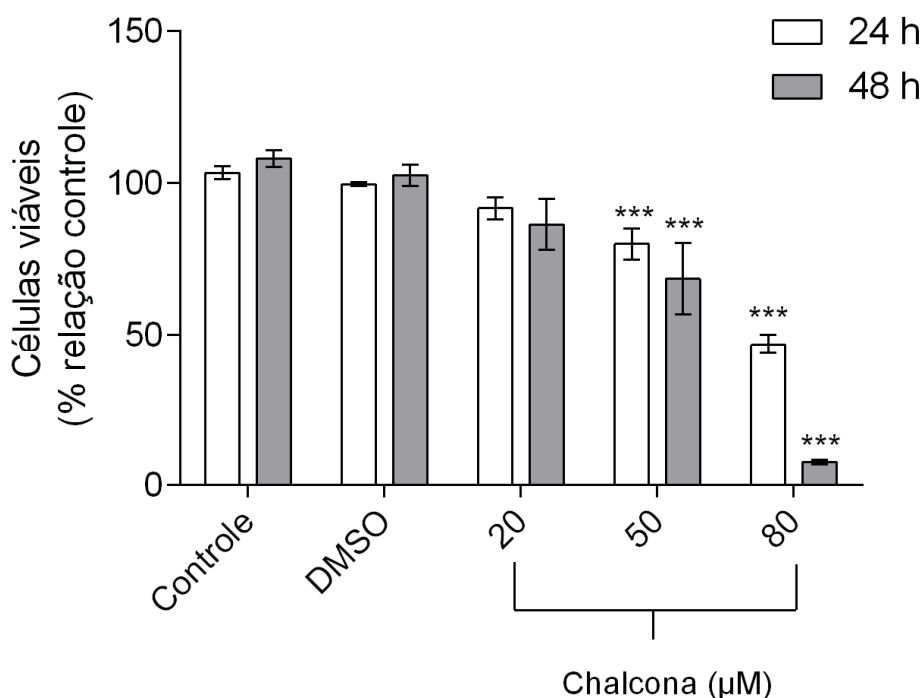
FONTE: O autor (2015)

NOTA: A análise da viabilidade das células HepG2 foi realizada segundo o item 5.7.1.1 do Materiais e Métodos. Os experimentos foram realizados em volume final de 200 $\mu\text{L}$  de meio DMEM alta glucose completo, no controle somente foi adicionado o meio. A chalcona foi incubada nas concentrações indicadas ( $\mu\text{M}$ ) por 24, 48 e 72 h a 37°C. O volume de DMSO utilizado foi de 0,1% (v/v). Os resultados estão expressos como porcentagem em relação ao controle com DMSO (100%) e são média  $\pm$  desvio padrão de 3 experimentos independentes realizados em triplicata. \*\*p<0,01; \*\*\*p<0,001

### 6.2.1.2 Efeitos da chalcona sobre a viabilidade de células HepG2 analisados pelo método do Cristal Violeta

Para confirmar os resultados obtidos pela metodologia do MTT, foi realizada a análise de viabilidade celular pelo método do cristal violeta, utilizando a CHA durante os tempos de 24 e 48h na linhagem de hepatocarcinoma humano HepG2 (FIGURA 16). Os resultados obtidos foram muito semelhantes nas duas metodologias utilizadas. As reduções de viabilidade foram de 21 e 54% no tempo de 24h e de, 32 e 93% após 48 h de incubação nas concentrações de 50 e 80  $\mu\text{M}$  respectivamente.

FIGURA 16 – EFEITOS DA CHALCONA SOBRE A VIABILIDADE DE CÉLULAS HepG2 PELO MÉTODO DO CRISTAL VIOLETA



FONTE: O autor (2015)

NOTA: A análise da viabilidade das células HepG2 foi realizada segundo o item 5.7.1.2 do Materiais e Métodos. Os experimentos foram realizados em volume final de 200 $\mu\text{L}$  de meio DMEM alta glucose completo, no controle somente foi adicionado o meio. A chalcona foi incubada nas concentrações indicadas ( $\mu\text{M}$ ) por 24 e 48 h a 37°C. O volume de DMSO utilizado foi de 0,1% (v/v). Os resultados estão expressos como porcentagem em relação ao controle com DMSO (100%) e são média  $\pm$  desvio padrão de 3 experimentos independentes realizados em triplicata. \*\*\* $p < 0,001$

As chalconas e seus derivados têm demonstrado atividade antitumoral em várias linhagens celulares (SZLISZKA *et al.*, 2010; MAI *et al.*, 2014; PRABHAKAR

*et al.*, 2014). Szliska *et al.* (2010) observaram que a chalcona e outros três análogos naturais (licochalcona-A, isobavachalcona, xantohumol e buteína) na concentração de 50  $\mu\text{M}$  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).

Shen *et al.* (2007) observaram que a chalcona (28,8  $\mu\text{M}$ , 48h) é capaz de parar a progressão do ciclo celular e induzir a apoptose por via intrínseca (mitocondrial) em células humanas de câncer de bexiga T24 e HT-1376, visto que a incubação dessas células com a chalcona induziu 48,9% e 40,3%, respectivamente, de células a 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). Além disso, demonstraram que a chalcona é capaz de inibir NF- $\kappa\text{B}$ , que está associado com a via de apoptose e também afeta a sensibilidade das células tumorais a agentes anticancerígenos.

HSU *et al.* (2011) verificaram que a chalcona (48  $\mu\text{M}$ , 48 h) inibe a proliferação de células de câncer da mama humano (MCF-7 e MDA-MB-231), bloqueando a progressão do ciclo celular, através da alteração da expressão de proteínas reguladoras de G2/M (aumento da expressão de p21 e p27 e redução da expressão de ciclina A, ciclina B1 e Cdc2) e induzindo a apoptose.

Cabe ressaltar que Valdameri *et al.* (2014) verificaram reduções da viabilidade de células HepG2 com a flavona nas concentrações de 50 e 100  $\mu\text{M}$  após 24 h de incubação, porém com a chalcona apresentou reduções de viabilidade aproximadamente 3 vezes maiores na concentração de 100 $\mu\text{M}$ , o que pode indicar que a ausência do anel C e/ou a presença da carbonila  $\alpha,\beta$  insaturada pode aumentar significativamente a citotoxicidade da chalcona frente a estas células.

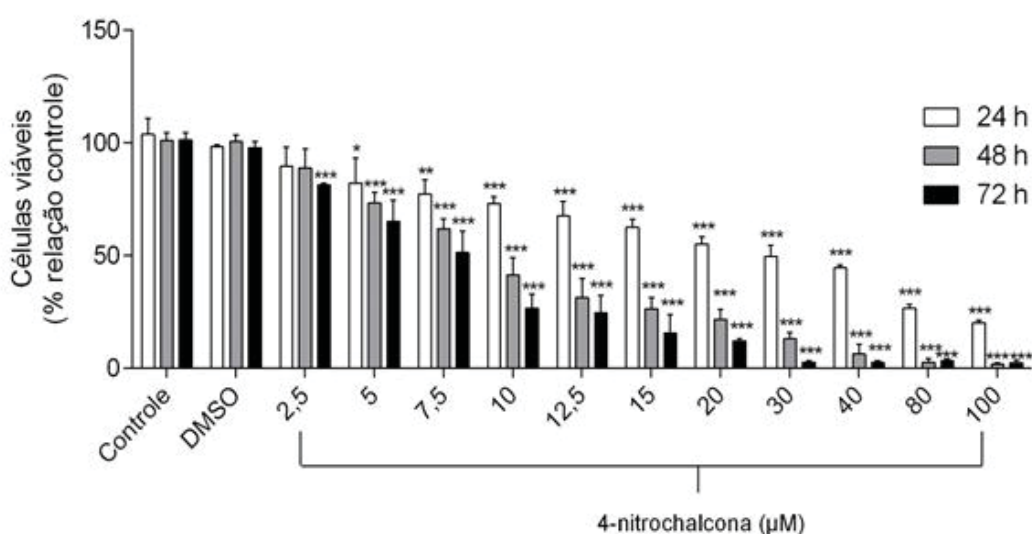
#### 6.2.2. 4-Nitrochalcona (4-NCHA)

##### 6.2.2.1. Efeitos da 4-nitrochalcona sobre a viabilidade de células HepG2 analisada utilizando o método do MTT

Quando a metodologia do MTT foi utilizada (FIGURA 17), houve redução da viabilidade celular de 18,23, 27, 33, 38, 45, 50, 56, 74 e 80% para as concentrações de 5,0; 7,5; 10; 12,5; 15; 20; 30; 40; 80 e 100  $\mu\text{M}$  respectivamente após 24h de incubação. No tempo de 48 horas essas reduções foram de maiores

para as concentrações para as mesmas concentrações.. Porém, após 72 horas de incubação com a 4-NCHA, observou-se que houve reduções de viabilidade significativas a partir da concentração de 2,5  $\mu\text{M}$  (19%). Nas concentrações seguintes, as reduções foram ainda maiores chegando a 99% na dose de 100  $\mu\text{M}$ . Desta forma pode-se concluir que 4-NCHA é capaz de reduzir a viabilidade celular de maneira dependente da concentração e do tempo de incubação.

FIGURA 17 - EFEITO DA 4-NITROCHALCONA SOBRE A VIABILIDADE DE CÉLULAS HepG2 NOS TEMPOS DE 24, 48 E 72 HORAS



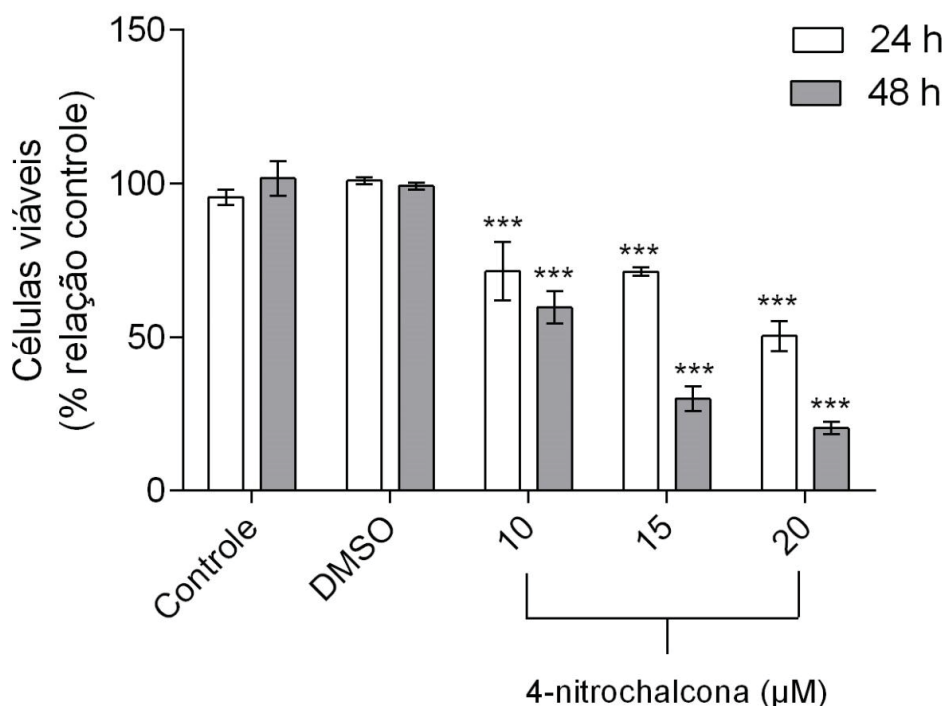
FONTE: O autor (2015)

NOTA A análise da viabilidade das células HepG2 foi realizada segundo o item 5.7.1.1 do Materiais e Métodos. Os experimentos foram realizados em volume final de 200 $\mu\text{L}$  de meio DMEM alta glucose completo, no controle somente foi adicionado o meio. A 4-nitrochalcona foi incubada nas concentrações indicadas ( $\mu\text{M}$ ) por 24, 48 e 72 h 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 3 experimentos independentes realizados em triplicata. \* $p < 0,05$ ; \*\* $p < 0,01$ ; \*\*\* $p < 0,001$

#### 6.2.2.2 Efeitos da 4-nitrochalcona sobre a viabilidade de células HepG2 analisados pelo Método do Cristal Violeta

Pela metodologia do cristal violeta, os resultados obtidos foram muito semelhantes aos obtidos pelo método do MTT. Observaram-se reduções da viabilidade celular de 29, 35 e 50% após 24 h e de 41, 70 e 80% após 48h de incubação nas concentrações de 10, 15 e 20  $\mu\text{M}$  respectivamente (FIGURA 18). Os resultados confirmam que a 4-NCHA promove efeitos em função do tempo de incubação e da concentração utilizados.

FIGURA 18 – EFEITOS DA 4-NITROCHALCONA SOBRE A VIABILIDADE DE CÉLULAS HepG2 PELO MÉTODO DO CRISTAL VIOLETA



FONTE: O autor (2015)

NOTA: A análise da viabilidade das células HepG2 foi realizada segundo o item 5.7.1.2 do Materiais e Métodos. Os experimentos foram realizados em volume final de 200µL de meio DMEM alta glucose completo, no controle somente foi adicionado o meio. A 4-nitrochalcona foi incubada nas concentrações indicadas (µM) por 24 e 48 h 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 ± desvio padrão de 3 experimentos independentes realizados em triplicata. \*\*\*p<0,001

Em células HepG2 ainda não foram testados os efeitos da 4-nitrochalcona sem a presença de outros substituintes, no entanto outros autores já testaram esse composto em outras linhagens tumorais. Dalla Via *et al.* (2009) testaram uma série de compostos e observaram que em células de melanoma e leucemia humanos (JR8 e HL-60) a 4-nitrochalcona apresentou IC<sub>50</sub> de 6,0 e 7,8 µM após 72h de incubação.

Dimmock *et al.* (2002) verificaram que após a incubação por 24 horas com 4-nitrochalcona em células leucêmicas L1210 o IC<sub>50</sub> foi de 59 µM, enquanto que, para CEM T-linfócitos o IC<sub>50</sub> foi de 13,8 µM. Ilango *et al.* (2010) observaram que a 4-nitrochalcona com incubação por 24 horas diminui a viabilidade de células tumorais de mama MCF-7 e T47D tendo como IC<sub>50</sub> 55 e 52 µM, respectivamente.

Nossos resultados também estão de acordo com o observado por Mai *et al.* (2014) que, após 72 horas de incubação, verificou que a 2'-hidroxi-4',6'-dimetoxi-

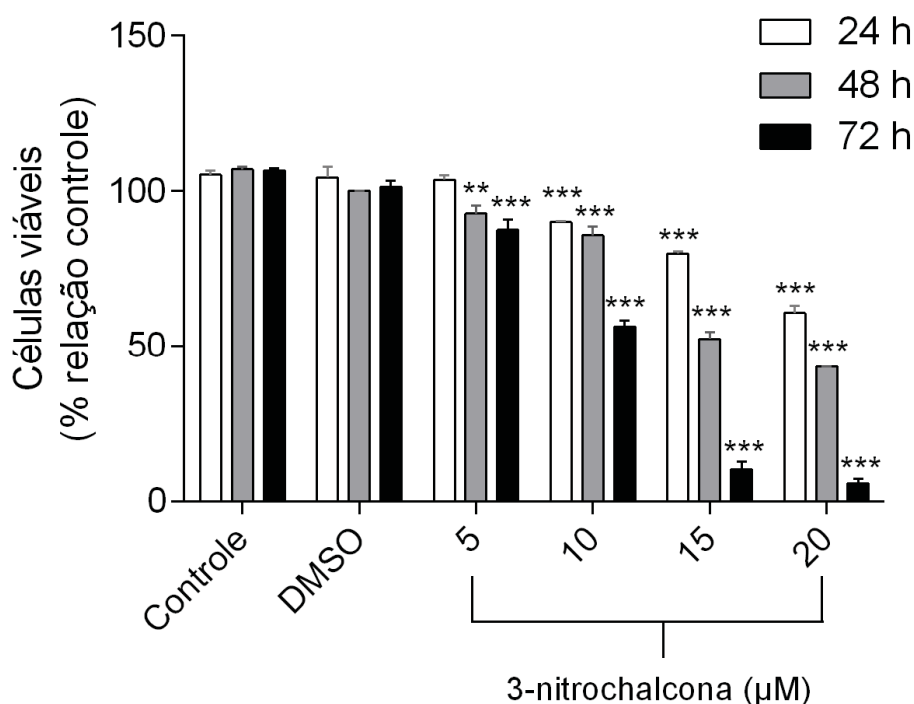
4-nitrochalcona ( $IC_{50}$  de 8,6  $\mu$ M) foi um dos mais potentes em relação à atividade antitumoral em células HepG2.

### 6.2.3 3-Nitrochalcona (3-NCHA)

#### 6.2.3.1 Efeitos da 3-nitrochalcona sobre a viabilidade de células HepG2 analisados pelo Método do MTT

As concentrações de 3-NCHA utilizadas foram menores que as utilizadas com a chalcona e os resultados obtidos foram semelhantes aos observados por Tamiello (2012). No tempo de 24 horas, observaram-se mudanças significativas a partir da concentração de 10  $\mu$ M com uma redução de 10% na viabilidade celular. Nas concentrações de 15 e 20  $\mu$ M as reduções foram de 21% e 40% respectivamente (FIGURA 19). No tempo de 48 horas nas concentrações de 5, 10, 15 e 20  $\mu$ M, a 3-NCHA reduziu em 8%, 15%, 48%, 57% respectivamente a viabilidade das células. Já no tempo de 72 horas de incubação, observou-se uma diminuição de 13%, 44%, 90%, 95% respectivamente, nas concentrações de 5, 10, 15 e 20  $\mu$ M.

FIGURA 19 - EFEITO DA 3-NITROCHALCONA SOBRE A VIABILIDADE DE CÉLULAS HepG2 NOS TEMPOS DE 24, 48 E 72 HORAS



NOTA: A análise da viabilidade das células HepG2 foi realizada segundo o item 5.7.1.1 do Materiais e Métodos. Os experimentos foram realizados em volume final de 200µL de meio DMEM alta glucose completo, no controle somente foi adicionado o meio. A 3-nitrochalcona foi incubada nas concentrações indicadas (µM) por 24, 48 e 72 h 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 ± desvio padrão de 3 experimentos independentes realizados em triplicata. \*\*p<0,01; \*\*\*p<0,001

Recentemente, Tamiello (2012) verificou que a 3-nitrochalcona aumenta a produção de espécies reativas de oxigênio (ERO), diminui os níveis de expressão de mRNA e a atividade da catalase, reduz o número de células em G1, S e G2/M do ciclo celular e diminui a viabilidade de células HepG2 em 56% na concentração de 20 µM no tempo de 48 horas.

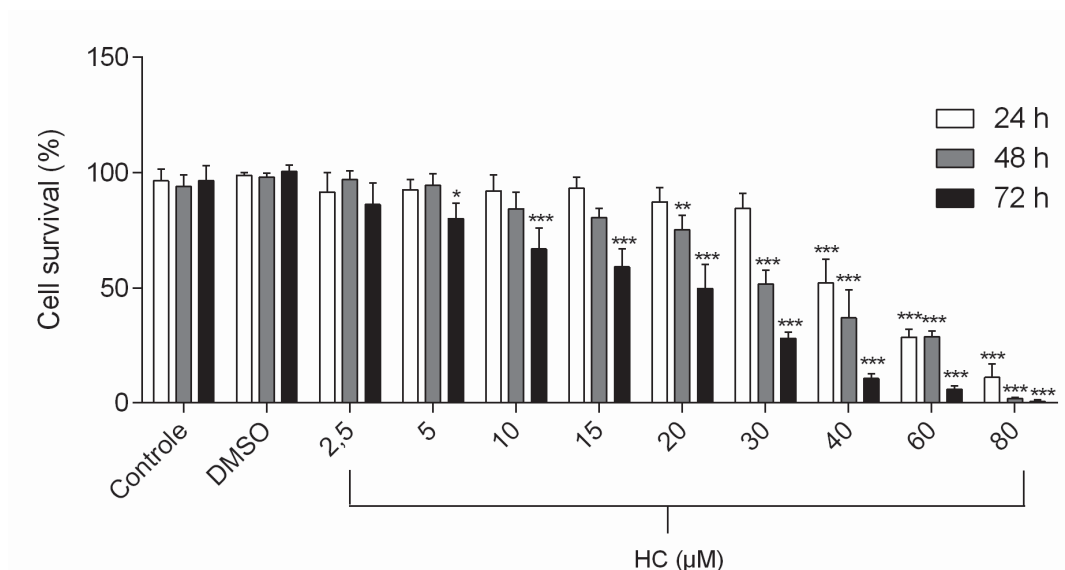
Os resultados obtidos demonstram que a adição do grupo nitro na estrutura básica das chalconas pode conferir maiores efeitos citotóxicos em células HepG2 e confirmam a importância do tempo de incubação e da concentração para os efeitos desta nitrochalconas. Esses resultados estão semelhantes aos observados com a 4-nitrochalcona, porém nos tempos de 48 e 72h verifica-se que a presença do grupamento nitro na posição 4 aumentaria o efeito citotóxico observado.

#### 6.2.4. 2'-Hidrochalcona (HC)

##### 6.2.4.1 Efeitos da 2'-hidrochalcona sobre a viabilidade de células HepG2 analisados pelo método do MTT

Com o objetivo de verificar os efeitos da adição do grupamento hidroxila na posição 2' na estrutura básica da chalcona foi realizada a análise da viabilidade celular pelo método do MTT. As concentrações utilizadas do composto foram 2,5; 5; 10; 15; 20; 30; 40; 60 e 80 µM nos tempos de 24, 48 e 72 horas. Em 24 horas observaram-se mudanças significativas a partir da concentração de 40 µM com uma redução de 49% na viabilidade celular. Nas concentrações seguintes (60 e 80µM) as reduções foram de 72 e 89% respectivamente. No tempo de 48 horas, observaram-se reduções significativas na viabilidade das células a partir da concentração de 30µM (49%) e, nas outras concentrações testadas o composto reduziu em 64, 72 e 99%. Já no tempo de 72 horas de incubação, observou-se uma redução significativa a partir da concentração de 5µM (20%) e 33, 40, 51, 73, 90, 95 e 100% nas concentrações de 10, 15, 20, 30, 40, 60 e 80 µM respectivamente, como pode-se observar na FIGURA 20.

FIGURA 20 - EFEITO DA HC SOBRE A VIABILIDADE DE CÉLULAS HepG2 APÓS INCUBAÇÃO POR 24, 48 E 72 HORAS



FONTE: O autor (2015)

NOTA: A análise da viabilidade das células HepG2 foi realizada segundo o item 5.7.1.1 do Materiais e Métodos. Os experimentos foram realizados em volume final de 200µL em meio DMEM alta glicose completo, no controle somente foi adicionado o meio. A HC foi incubada nas concentrações indicadas (µM) por 24, 48 e 72 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 ± desvio padrão de 3 experimentos independentes. \*p<0,05; \*\*p<0,01; \*\*\*p<0,001

Nossos resultados estão de acordo com os já descritos na literatura em relação à presença de grupo hidroxila na estrutura da chalcona, com um papel crucial deste grupamento na atividade antitumoral destes compostos (ECHEVERRIA *et al.*, 2009; POUGET *et al.*, 2001). Mai *et al.* (2014) estudaram uma série de 46 chalconas e avaliaram a atividade antiproliferativa contra células tumorais humanas TRAIL-resistentes (MCF-7, MDA-MB-231, HeLa, Caov-3, A549, HepG2, K-562, HT-29, HepG2, CNE-1, CEM-SS). Eles observaram que chalconas com grupo hidroxila na estrutura nas posições *orto* ou *para* do anel B apresentaram efeito antitumoral potente e seletivo em células de câncer colo-retal (HT-29) após 72 horas de incubação. Estes autores verificaram que os efeitos citotóxicos de chalconas em células HepG2 são influenciados pela posição e número de grupos hidroxila. No entanto, os autores não avaliaram os efeitos destes compostos em 24 h ou 48 h de incubação.

Szliszka *et al.* (2010) demonstram que a chalcona, dihidroxichalconas e tetrahidroxichalconas aumentaram a apoptose e citotoxicidade induzida por TRAIL em células da próstata (LNCaP). Echeverria *et al.* (2009) demonstram que 2'-hidroxichalconas (50-200 µM) sintéticas contendo diferentes substituições metoxila



no anel B promovem inibição da proliferação celular dependente da concentração e indução de apoptose em células de carcinoma hepatocelular (HepG2) após 24 horas de incubação.

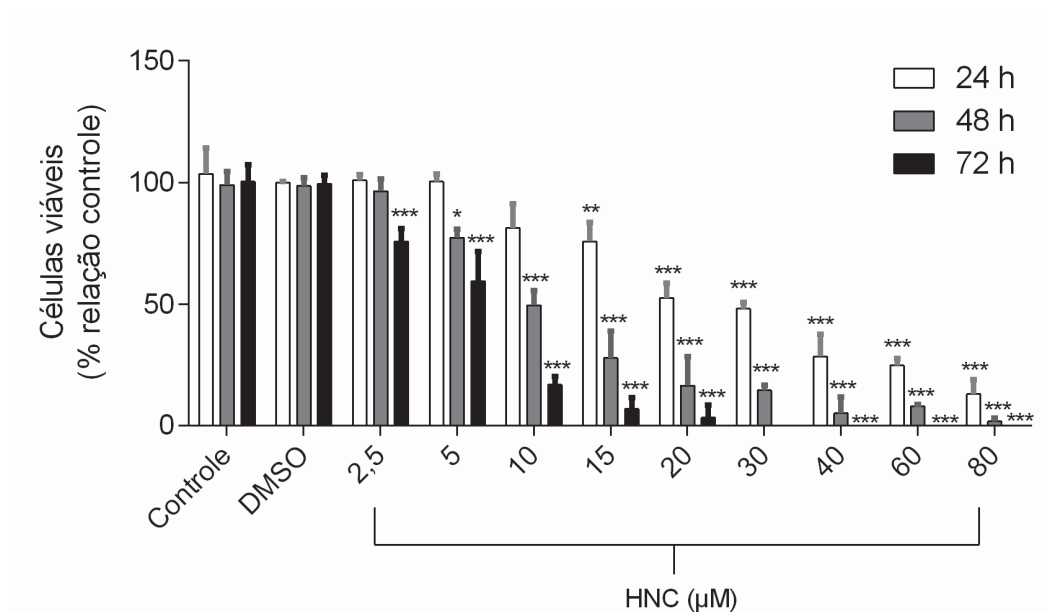
#### 6.2.5. 2'-Hidroxi-3-Nitrochalcona (HNC)

##### 6.2.5.1. Efeitos da 2'-hidroxi-3-nitrochalcona sobre a viabilidade de células HepG2 analisados pelo Método do MTT

Com o objetivo de comparar o efeito da adição dos grupamentos hidroxila (posição 2') e nitro (posição 3) na estrutura da chalcona foi realizada a análise da viabilidade celular pelo método do MTT utilizando a HNC. As concentrações utilizadas da HNC foram de 2,5; 5; 10;15; 20; 30; 40; 60 e 80  $\mu\text{M}$  nos tempos de 24, 48 e 72 horas. Em 24 horas observaram-se mudanças significativas a partir da concentração de 10  $\mu\text{M}$  com uma redução de 19% na viabilidade celular. Nas concentrações seguintes as reduções foram de 25, 48, 52, 72, 76 e 88% respectivamente. No tempo de 48 horas, observou-se reduções significativas a partir da concentração de 5  $\mu\text{M}$  (33%) e, nas outras concentrações testadas o composto reduziu a viabilidade das células em 51, 73, 84, 86, 95, 93 e 99% respectivamente. Já no tempo de 72 horas de incubação com a HNC, observou-se uma redução da viabilidade significativa a partir da concentração de 2,5  $\mu\text{M}$  (25%) e reduções de 41, 84, 94, 97% nas concentrações de 5, 10, 15 e 20  $\mu\text{M}$  respectivamente e 100% nas concentrações de 30, 40, 60 e 80  $\mu\text{M}$ , como pode-se observar na FIGURA 21.

Quando compara-se os resultados observados com a 2'-hidroxichalcona pode-se verificar que a adição do grupamento nitro intensifica os efeitos citotóxicos.

FIGURA 21 - EFEITO DA HNC SOBRE A VIABILIDADE DE CÉLULAS HepG2 APÓS INCUBAÇÃO POR 24, 48 E 72 HORAS



FONTE: O autor (2015)

NOTA: A análise da viabilidade das células HepG2 foi realizada segundo o item 5.7.1.1 do Materiais e Métodos. Os experimentos foram realizados em volume final de 200µL de meio DMEM alta glucose completo, no controle somente foi adicionado o meio. A 2'-hidroxi-3-nitrochalcona foi incubada nas concentrações indicadas (µM) por 24, 48 e 72 h a 37°C. O volume de DMSO utilizado foi de 0,1% (v/v). Os resultados estão expressos como porcentagem em relação ao controle com DMSO (100%) e são média ± desvio padrão de 3 experimentos independentes realizados em triplicata. \*p<0,05; \*\*\*p<0,001

Em relação à importância da presença do grupo nitro na estrutura da chalcona para os seus efeitos antiproliferativos, foi possível observar que as chalconas nitradas, em comparação com as outras chalconas testadas, foram as mais promissoras sendo os mais potentes a 4-nitrochalcona e a 2'-hidroxi-3-nitrochalcona.

Estes resultados podem ser explicados por Dalla Via *et al.* (2009), que testaram uma série de compostos em três linhagens celulares tumorais humanas: HL-60 (leucemia), HeLa (adenocarcinoma de colo de útero) e JR8 (células de melanoma humano) e observaram que a adição de grupo nitro na estrutura da chalcona, que é um grupo receptor elétrons, afeta a reatividade da região α-β insaturada tornando-a ainda mais sensível à adição de grupos nucleofílicos no ambiente biológico.

#### 6.2.6 Comparação dos valores de IC<sub>50</sub>

Em relação aos valores de  $IC_{50}$  das chalconas em células HepG2 observou-se que a 4-NCHA nos tempos de 24, 48 e 72 h apresentou valores iguais a 27,28  $\mu M$ , 8,71  $\mu M$  e 6,62  $\mu M$  respectivamente (**Erro! Fonte de referência não encontrada.2**). Este composto quando comparado com a chalcona, promoveu reduções de 4 a 6 vezes nos valores de  $IC_{50}$ , o que indica que a adição do grupo nitro na posição 4 promove um aumento na citotoxicidade do composto.

Com a 3-NCHA, os valores de  $IC_{50}$  nos tempos de 24, 48 e 72 horas foram de 23,25; 17,19 e 10,25  $\mu M$  respectivamente. Os valores foram cerca de 4 vezes menores dos que os observados com a chalcona, o que pode então indicar que adição do grupamento nitro na posição 3 da chalcona também aumenta a citotoxicidade do flavonóide, porém com menor intensidade do que o observado com a 4-nitrochalcona nos tempos de 48 e 72h.

Para a HNC, os valores de  $IC_{50}$  nos tempos de 24, 48 e 72 horas foram 25,67; 9,54 e 5,60  $\mu M$  respectivamente. Pode-se verificar que esses valores foram de 4 a 6 vezes menores que os  $IC_{50}$  obtidos após incubação somente com a chalcona. Isso se deve a uma possível influência dos grupos hidróxi e nitro na redução da viabilidade celular promovida pelas chalconas. Além disso, quando comparados aos valores de  $IC_{50}$  da 3-NCHA observou-se que adição do grupamento hidroxila na posição 2' da estrutura da 3-NCHA houve um aumento na citotoxicidade do composto nos três tempos de incubação testados.

Em relação a HC, os valores de  $IC_{50}$  nos tempos de 24, 48 e 72 horas foram 43,06; 30,57 e 16,2  $\mu M$  respectivamente. Assim, pode-se verificar que esses valores foram aproximadamente 2 vezes menores que os  $IC_{50}$  obtidos após incubação somente com a chalcona. Isso se deve a presença do grupo hidróxi na posição 2' que aumentaria a redução da viabilidade celular promovida pela chalcona porém com menor intensidade do que observado com o grupamento nitro.

Alguns autores destacam a importância da região  $\alpha$ - $\beta$  insaturada na estrutura das chalconas, a qual pode ser considerada como agente de alquilação, devido à capacidade dessa região em sofrer reações de adição com nucleófilos biologicamente importantes, tais como aminas e tióis. Para esses autores, a adição de grupamento nitro na estrutura da chalcona, que é um grupo receptor de elétrons, irá diminuir a densidade eletrônica do anel aromático, o que afeta a reatividade da região  $\alpha$ - $\beta$  -insaturada, tornando-a ainda mais reativa para as reações de adição (Dalla Via *et al.*, 2009; Winter *et al.*, 2010). Estes resultados reforçam a importância do grupamento nitro para os efeitos citotóxicos observados.

TABELA 2 - VALORES DE IC<sub>50</sub> DAS CHALCONAS EM CÉLULAS HEPG2

Compostos	CHA ( $\mu$ M)	3-NCHA ( $\mu$ M)	HNC ( $\mu$ M)	HC ( $\mu$ M)	4-NCHA ( $\mu$ M)
24 h	78 $\pm$ 3,6	23,25 $\pm$ 2,7	25,67 $\pm$ 2,2	43,06 $\pm$ 3,0	27,28 $\pm$ 2,8
48 h	59 $\pm$ 2,3	17,19 $\pm$ 1,4	9,54 $\pm$ 0,8	30,57 $\pm$ 2,6	8,71 $\pm$ 0,5
72 h	37,28 $\pm$ 4,0	10,25 $\pm$ 0,7	5,6 $\pm$ 0,5	16,21 $\pm$ 2,0	6,62 $\pm$ 0,5

FONTE: O autor (2015)

NOTA: Os valores de IC<sub>50</sub> foram calculados pelo programa GraphPad Prism 6 e representam as concentrações que resultam em 50% de redução da viabilidade celular após os tempos de incubação.

### 6.3. EFEITOS DA CHALCONA, 2'-HIDROXICHALCONA, 2'-HIDROXI-3-NITROCHALCONA, 3-NITROCHALCONA E 4-NITROCHALCONA EM CÉLULAS NORMAIS IMORTALIZADAS DE FIBROBLASTO (L929)

Para avaliar uma possível citotoxicidade das chalconas sobre células não tumorais, foram feitas análises de viabilidade em células normais imortalizadas de fibroblasto (L929), pelo método do MTT em 24 horas de incubação. A TABELA 3 ilustra os resultados obtidos. Pode-se observar que para todos os compostos os valores de IC<sub>50</sub> foram maiores que aqueles observados com a linhagem de carcinoma hepatocelular (HepG2). O que indica que os compostos testados apresentam maior efeito citotóxico em linhagem de célula tumoral.

Diversos flavonóides já foram estudados por apresentarem maior indução de morte em células tumorais quando comparadas a linhagens de células normais (EL-HADY et al., 2013; CÀRDENAS et al., 2006; NECKEL 2011). A flavona crisina (5,7-diidroxiflavona) apresentou atividade antit proliferativa quando avaliado seus efeitos sobre células HepG2 e apresentou menor atividade de inibição do crescimento celular contra a linhagem de células normais de fibroblasto murino (NIH-3T3), indicando uma possível seletividade da flavona para células tumorais (EL-HADY et al., 2013).

Neckel (2011) avaliou os efeitos antineoplásicos *in vitro* e *in vivo* do composto Chalcona N9 ((E)-1-(2,5-dimetoxifenil)-3-(quinoxalina-6-il) prop-2-an-1-ona), obtido sinteticamente. Este composto demonstrou ser citotóxico nas linhagens celulares de carcinoma de pulmão humano (A549), melanoma de camundongos (B16-F10), glioma de rato (C6), carcinoma de próstata humano (DU 145), carcinoma de mama humano (MCF-7) e glioblastoma humano (U-87 MG) e

com citotoxicidade menor sobre a linhagem imortalizada de fibroblastos (L929). Os resultados autores sugeriram que a Chalcona N9 apresenta uma possível seletividade sobre as linhagens de células tumorais.

Champelovier *et al.* (2013) também observaram seletividade de dois derivados de chalconas A (JAI-51) e B (MBL-II-58) (20  $\mu\text{M}$ ) contra células de glioblastoma humano (LN229) e células normais de fibroblasto de pele (NHSF) por 24 e 48 horas e observaram que a chalcona A reduziu a viabilidade de células tumorais mas não reduziu a viabilidade de células normais nos dois tempos de tratamento testados, indicando que os compostos exercem mecanismos diferentes de indução de morte celular.

Assim, pode-se concluir que todas as chalconas avaliadas no presente trabalho apresentaram seletividade em células L929 e os compostos que apresentaram maior toxicidade em células HepG2 e menor em células L929 foram a 4-nitrochalcona (4-NCHA) e a 2'-hidroxi-3-nitrochalcona (HNC), apresentando-se como compostos em potencial para futuros estudos contra o carcinoma hepatocelular.

TABELA 3 - VALORES DE IC<sub>50</sub> DAS CHALCONAS EM CÉLULAS L929

<b>Compostos</b>	<b>CHA (<math>\mu\text{M}</math>)</b>	<b>3-NCHA (<math>\mu\text{M}</math>)</b>	<b>HNC (<math>\mu\text{M}</math>)</b>	<b>HC (<math>\mu\text{M}</math>)</b>	<b>4-NCHA (<math>\mu\text{M}</math>)</b>
<b>24 h</b>	>100	>20	>60	70,24 $\pm$ 2,0	>80
<b>48 h</b>	98,9 $\pm$ 10,2	>20	>60	57,38 $\pm$ 2,5	>80
<b>72 h</b>	61,19 $\pm$ 3,7	>20	30,1 $\pm$ 2,6	52,92 $\pm$ 1,9	67,13 $\pm$ 7,5

FONTE: O autor (2015)

NOTA: Os valores de IC<sub>50</sub> foram calculados pelo programa GraphPad Prism 6 e representam as concentrações que resultam em 50% de redução da viabilidade celular após os tempos de incubação

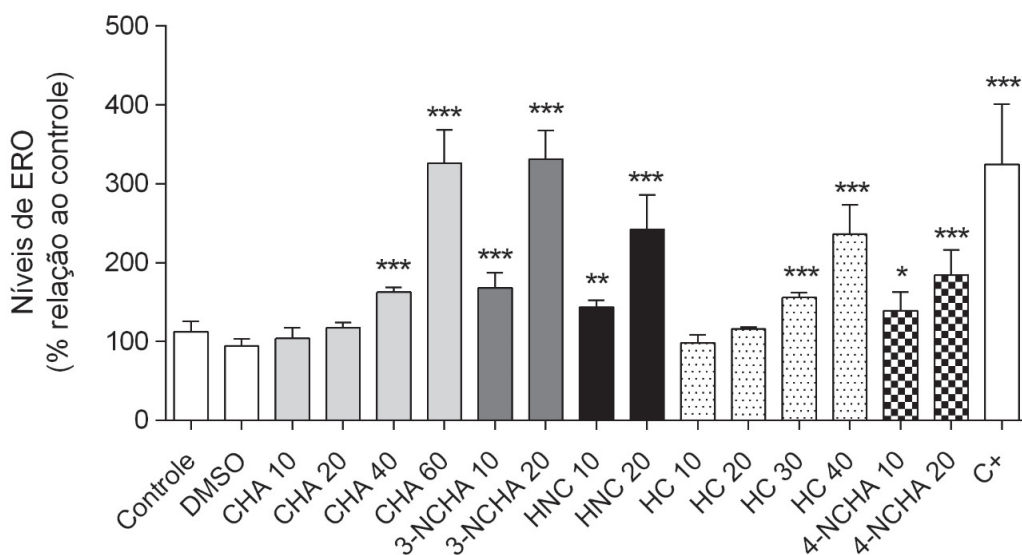
### 6.5. Efeitos das chalconas sobre os níveis de ERO

Utilizando a sonda de DCFH-DA, os experimentos para avaliar os níveis de ROS intracelular mostrou que após 24 horas de incubação das células HepG2 com as chalconas, os níveis de ROS foram aumentados em todas as concentrações e os compostos testados (FIGURA 222). Nas menores concentrações testadas (concentrações que reduziram em aproximadamente 20% a viabilidade) observou-se que todas as chalconas tiveram um menor aumento dos níveis de ERO do que o aumento obtido com a concentração que representa cerca de 50% de redução na

viabilidade. Estes aumentos nas últimas concentrações foram: 232%, 237%, 148%, 142% e 90% para a CHA (60  $\mu$ M), 3-NCHA (20  $\mu$ M), HNC (20  $\mu$ M), HC (40  $\mu$ M) e 4-NCHA (20  $\mu$ M) respectivamente, quando comparados ao controle.

Na mesma concentração (20  $\mu$ M) a 3-NCHA mostrou o maior aumento nos níveis de ERO, seguido pelo HNC. Quando as chalconas HNC e 4-NCHA foram comparadas (20  $\mu$ M) não se observou diferença significativa no aumento dos níveis de ERO. Quando comparadas as mesmas concentrações testadas (10 e 20  $\mu$ M) de todas as chalconas, observou-se que as chalconas que não continham o grupo nitro em sua estrutura não apresentaram aumento dos níveis de ERO, o que pode sugerir que o grupo nitro tem uma importância crítica dos níveis de ERO em células HepG2. Além disso, ao comparar esses resultados com os obtidos na viabilidade celular, observa-se que as chalconas que não apresentam grupo nitro na estrutura também não reduziram significativamente a viabilidade nas concentrações de 10 e 20  $\mu$ M, o que pode sugerir uma relação entre o aumento dos níveis de ERO intracelular e a redução da viabilidade das células.

FIGURA 22 - EFEITOS DAS CHALCONAS SOBRE OS NÍVEIS INTRACELULARES DE ERO EM CÉLULAS HepG2 NO TEMPO DE 24 HORAS



FONTE: O autor (2015)

NOTA: A análise dos efeitos das chalconas sobre os níveis de ERO em células HepG2 foi realizada segundo o item 5.7.2 do Materiais e Métodos. As concentrações utilizadas das chalconas estão representadas em  $\mu$ M. O volume de DMSO utilizado foi de 0,1% (v/v). Como controle positivo (C+) utilizou-se o  $H_2O_2$  na concentração de 400  $\mu$ M. Os resultados estão expressos como percentagem em relação ao controle com DMSO (100%) e são média  $\pm$  desvio padrão de 3 experimentos realizados em triplicata. \* $p < 0,05$ , \*\* $p < 0,01$ , \*\*\* $p < 0,001$ .

Diversos estudos utilizando compostos polifenólicos têm mostrado que o aumento dos níveis de ERO pode causar danos oxidativos na membrana mitocondrial e este dano pode ter um papel significativo na indução de morte celular por apoptose (KUO *et al.*, 2010; MOON *et al.*, 2010).

Os compostos polifenólicos têm sido descritos por promoverem a morte celular induzida por ERO em várias linhas de células tumorais, incluindo células de câncer de cólon (HCT116) (KUO *et al.*, 2010), células de melanoma (NAVARINI *et al.*, 2009), e células de carcinoma hepatocelular (HepG2) (MOON *et al.*, 2010). Nossos resultados sugerem que as chalconas promovem o aumento de ERO em células HepG2.

Em nosso laboratório, Tamiello (2012) observou que a 3-nitrochalcona, em células HepG2 após 48 horas de incubação, promoveu um aumento de 209% do nível de ERO somente na maior concentração testada (20  $\mu$ M). Escobar (2014) observou que a chalcona reduz o consumo de oxigênio em mitocôndrias isoladas de fígado de rato, o que pode afetar o transporte de elétron da cadeia respiratória mitocondrial e levar ao aumento de ERO.

Winter *et al.* (2010) investigaram o efeito de três chalconas obtidas sinteticamente a partir da 2-naftilacetofenona com diferentes substituintes presentes no anel B (3-NO<sub>2</sub>-fenil, 3-Cl-fenil, fenil) nas concentrações de IC<sub>50</sub> 23, 37 e 36  $\mu$ M em células L1210 (leucemia linfoblástica) e observaram o aumento de 212, 156 e 240%, respectivamente, da produção de ERO. Quando as células foram co-incubadas com a 5000 U/m catalase por 24 horas, a produção de ERO foi reduzida e observou-se um aumento da viabilidade celular de 21, 13 e 21%, respectivamente.

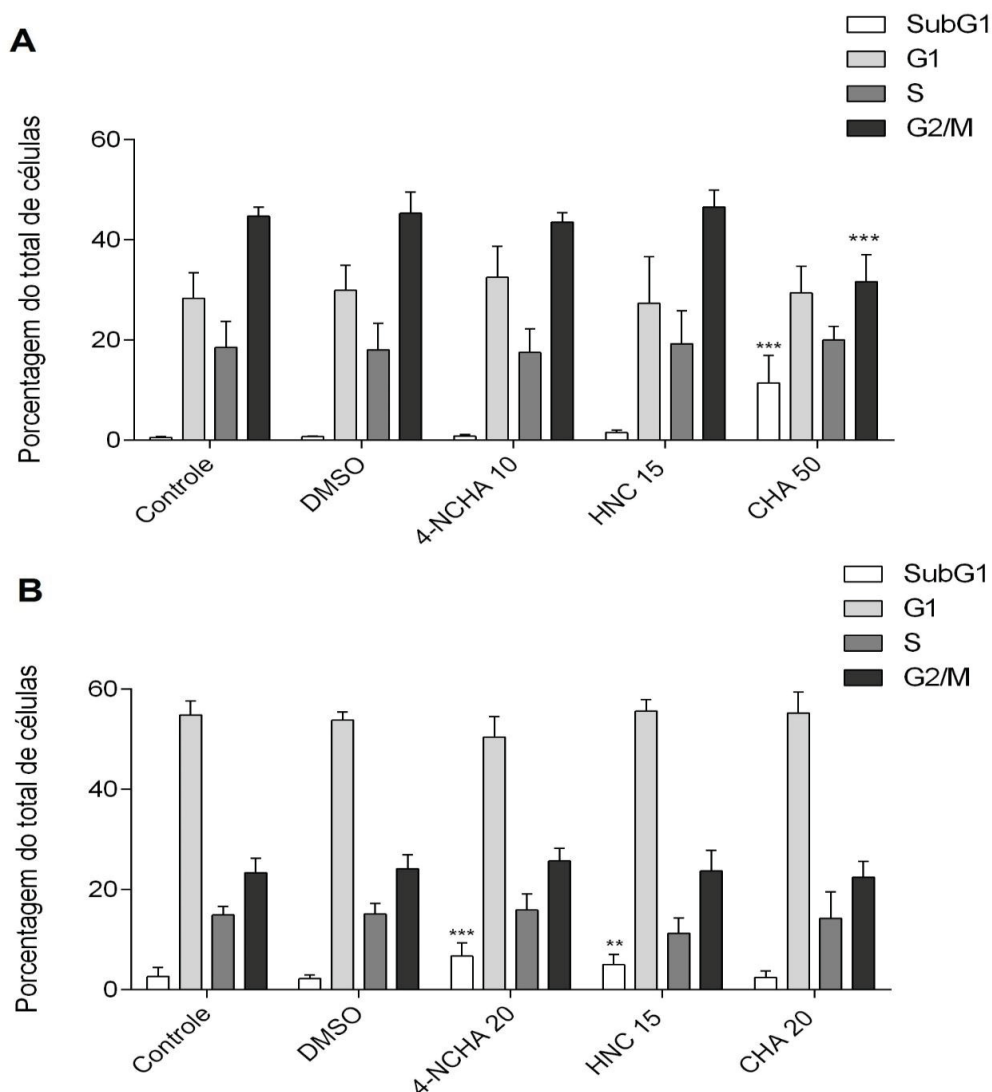
Moon *et al.* (2010) observaram que a incubação de células HepG2 com buteína (3,4,2',4'-tetrahidroxichalcona) (20-40  $\mu$ M), promove um aumento da geração de ERO e após pré-incubação (10 mM, 1 h) com NAC e buteína (30  $\mu$ M, 48 h) há uma diminuição dos efeitos citotóxicos, o que indica que aumento de ERO pode ser o responsável pelos efeitos citotóxicos.

## 6.5. ANÁLISE DO CICLO CELULAR

Para avaliar se os efeitos citotóxicos promovidos pelas chalconas são mediados por alterações no ciclo celular, foi realizada análise de ciclo celular após a incubação com as chalconas que

apresentaram maior citotoxicidade em células HepG2 e menor em células L929: HNC e 4-NCHA. A CHA foi avaliada para comparação dos resultados com a estrutura básica da chalcona. O ensaio foi realizado através da marcação com iodeto de propídio. As concentrações utilizadas das chalconas foram aquelas que reduziram a viabilidade celular em aproximadamente 20%. A quantidade de DNA fragmentado aumentou de 0,65% (condição controle) para aproximadamente 11,4% após a incubação com a chalcona (50  $\mu$ M) durante 24 h (FIGURA 23 - EFEITOS DAS CHALCONAS SELECIONADAS SOBRE O CICLO CELULAR POR CITOMETRIA DE FLUXO).



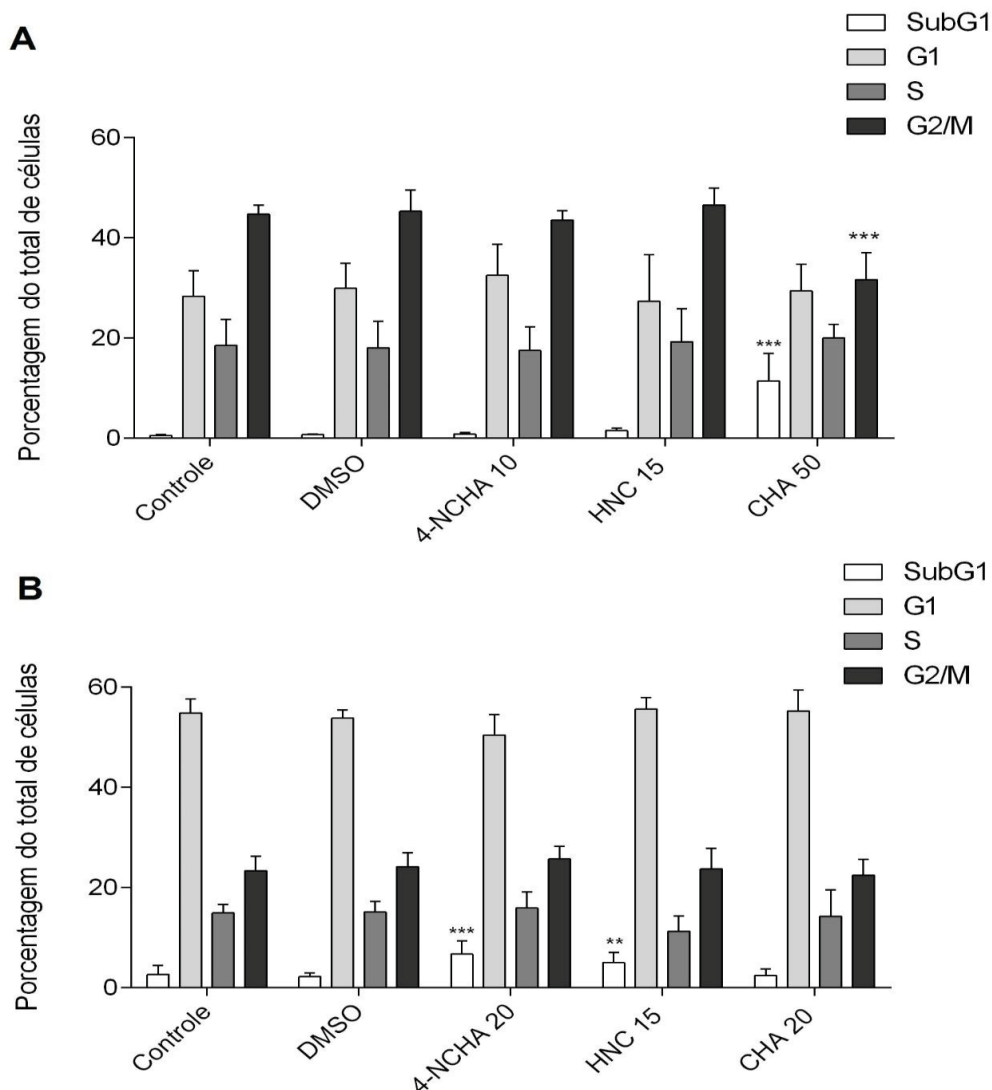


FONTE: O autor (2015)

NOTA: A análise dos efeitos das chalconas sobre o ciclo celular em células HepG2 foi realizada segundo o item 5.7.3 do Materiais e Métodos. As concentrações utilizadas das chalconas estão representadas em  $\mu\text{M}$ . As incubações foram realizadas com A) CHA (50  $\mu\text{M}$ ), HNC (15  $\mu\text{M}$ ) e 4-NCHA (10  $\mu\text{M}$ ) e B) CHA, HNC e 4-NCHA na concentração de 20  $\mu\text{M}$ , durante 24 horas. Os valores representam a média  $\pm$  DP da porcentagem de células viáveis em comparação com o controle (DMSO) tomado como 100%. Os dados representam três experimentos independentes, sendo cada um deles realizados em triplicata. Diferenças significativas: \*\* $p < 0,01$ ; \*\*\*  $p < 0,001$ .

3A). Além disso, a porcentagem de células HepG2 diminuiu na fase G2/M de 45,2% (condição controle) para 31,64% após a incubação com a chalcona nas mesmas condições. Os compostos HNC (15  $\mu\text{M}$ ) e 4-NCHA (10  $\mu\text{M}$ ) não mostraram alterações significativas na análise do ciclo celular nessas concentrações.

Na FIGURA 23 - EFEITOS DAS CHALCONAS SELECIONADAS SOBRE O CICLO CELULAR POR CITOMETRIA DE FLUXO.

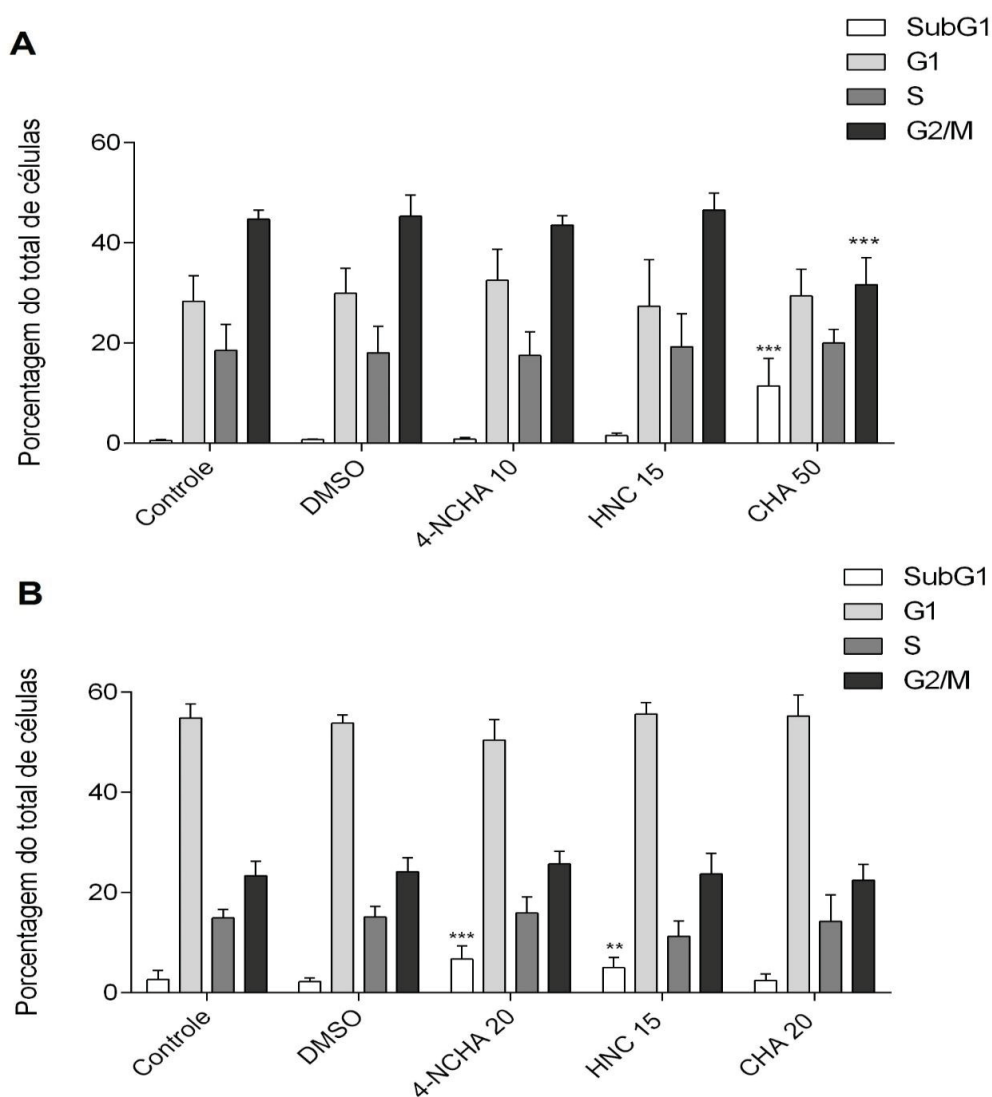


FONTE: O autor (2015)

NOTA: A análise dos efeitos das chalconas sobre o ciclo celular em células HepG2 foi realizada segundo o item 5.7.3 do Materiais e Métodos. As concentrações utilizadas das chalconas estão representadas em  $\mu\text{M}$ . As incubações foram realizadas com A) CHA (50  $\mu\text{M}$ ), HNC (15  $\mu\text{M}$ ) e 4-NCHA (10  $\mu\text{M}$ ) e B) CHA, HNC e 4-NCHA na concentração de 20  $\mu\text{M}$ , durante 24 horas. Os valores representam a média  $\pm$  DP da porcentagem de células viáveis em comparação com o controle (DMSO) tomado como 100%. Os dados representam três experimentos independentes, sendo cada um deles realizados em triplicata. Diferenças significativas: \*\* $p < 0,01$ ; \*\*\*  $p < 0,001$ .

3B, foram testadas a CHA, HNC e 4-NCHA na concentração de 20  $\mu\text{M}$ , para fins de comparação dos efeitos dessas chalconas num mesmo tempo de incubação. Pode-se observar um aumento na quantidade de DNA fragmentado de 1,9% (condição controle) para 5,2% e 8,2% após a incubação com os compostos HNC e 4-NCHA, respectivamente. A CHA não apresentou diferenças significativas na concentração de 20  $\mu\text{M}$  em comparação com o controle.

FIGURA 23 - EFEITOS DAS CHALCONAS SELECIONADAS SOBRE O CICLO CELULAR POR CITOMETRIA DE FLUXO.



FONTE: O autor (2015)

NOTA: A análise dos efeitos das chalconas sobre o ciclo celular em células HepG2 foi realizada segundo o item 5.7.3 do Materiais e Métodos. As concentrações utilizadas das chalconas estão representadas em  $\mu\text{M}$ . As incubações foram realizadas com A) CHA (50  $\mu\text{M}$ ), HNC (15  $\mu\text{M}$ ) e 4-NCHA (10  $\mu\text{M}$ ) e B) CHA, HNC e 4-NCHA na concentração de 20  $\mu\text{M}$ , durante 24 horas. Os valores representam a média  $\pm$  DP da porcentagem de células viáveis em comparação com o controle (DMSO) tomado como 100%. Os dados representam três experimentos independentes, sendo cada um deles realizados em triplicata. Diferenças significativas: \*\* $p < 0,01$ ; \*\*\*  $p < 0,001$ .

Tamiello (2012) em nosso laboratório, observou que a incubação das células HepG2 com a 3-nitrochalcona nas concentrações de 10 e 15  $\mu\text{M}$  resultou no aumento de 28 e 48% de células em SubG1, respectivamente, após 48h de incubação com concomitante diminuição da porcentagem de células em todas as

demais fases do ciclo celular, sugerindo que o composto induz morte celular e que este efeito é dependente da concentração utilizada.

Outros autores já verificaram alteração na progressão do ciclo celular utilizando chalconas. Moon *et al.* (2010) observaram o efeito da buteína (3,4,2',4'-tetrahidroxichalcona) (30  $\mu$ M) na progressão do ciclo de células HepG2 e observaram aumento de 39% de células na fase G2/M em 24 horas de incubação e aumento de 36% em SubG1 após 48 horas de incubação.

HSU *et al.* (2006) observaram que a incubação de células MCF-7 e MDA-MB-231 (câncer de mama) com a chalcona promove parada do ciclo celular em G2/M por aumentar a expressão de p21 e p27 e reduz níveis de ciclinas. Shen *et al.* (2007) mostraram que a chalcona obtida sinteticamente, na concentração de 28,8  $\mu$ M após 6 horas de incubação 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.

Rao *et al.* (2010) verificaram que a 2'-hidroxi-2,3,4',6'-tetrametoxichalcona (HTMC) reduz a viabilidade de células de adenocarcinoma de pulmão (A549) em 59% na concentração de 50  $\mu$ M e induz a parada do ciclo celular na fase G1 na concentração de 12,5  $\mu$ M, ambas no tempo de 24 horas.

Loa *et al.* (2009) estudaram a atividade antitumoral de 68 polifenóis de plantas com estruturas diferentes em células HepG2 e verificaram que as chalconas com maiores atividades antitumorais foram as hidroxiladas na posição 2' do anel B, sendo a 2,2'-dihydroxychalcona (60  $\mu$ M) a mais potente, por induzir parada de ciclo em G2/M (após 12 horas de incubação). No entanto, após 24 e 48 horas de incubação, a quantidade de células em G2/M diminuiu progressivamente com um aumento correspondente de células em sub-G1 (células apoptóticas), o que sugere que a parada de ciclo em G2/M levou a apoptose posteriormente. Assim, nossos resultados obtidos com a chalcona sugerem resultado semelhante, visto ter aumentado a quantidade de células em sub-G1 e reduzido na fase G2/M após 24 horas de incubação.

Neves *et al.* (2012) avaliaram os efeitos da 2'-hidroxichalconas sobre células de adenocarcinoma de mama (MCF-7) e constataram que a 4-fluoro-2',4'-dihidroxichalcona e a 2',4'-dihidroxi-3,4,5-trimethoxichalcona, após incubação por 48 horas nas concentrações relativas ao IC<sub>50</sub> dos compostos, apresentaram um aumento na quantidade de células em sub-G1, indicativo de fragmentação de DNA e morte celular por apoptose, confirmada com o ensaio de dupla marcação com anexina e PI.

Deste modo, é possível concluir que o aumento do número de células em sub-G1, observado em nossos experimentos é dependente da concentração e pudemos confirmam a importância do grupo nitro e hidroxila para a morte celular induzida por chalconas.

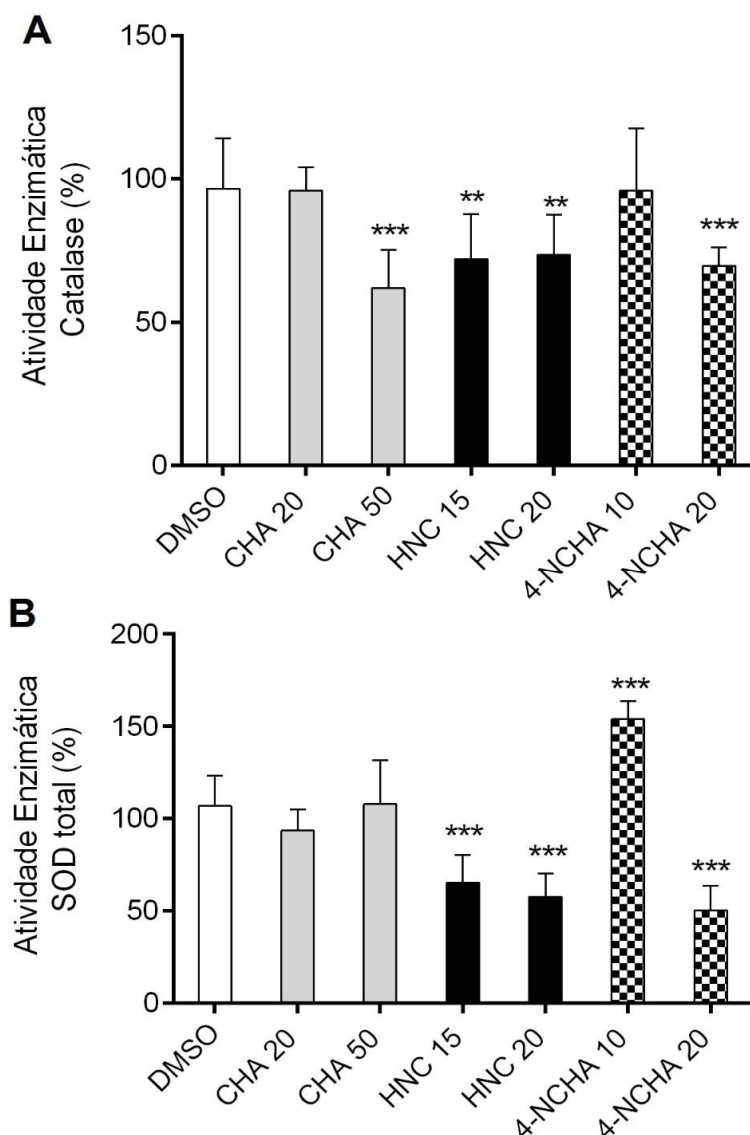
## 6.6. ATIVIDADE DAS ENZIMAS ANTIOXIDANTES

Para verificar se as defesas antioxidantes poderiam ser afetadas pelas chalconas em células HepG2 foram analisados os efeitos das chalconas selecionadas (CHA, HNC e 4-NCHA) na atividade de catalase e superóxido dismutase (SOD total). As concentrações utilizadas na FIGURA 24A e B foram aquelas responsáveis por reduzir a viabilidade celular em aproximadamente 20% e a de 20  $\mu$ M das chalconas testadas.

Os resultados mostraram que a CHA (50  $\mu$ M) reduziu a atividade da catalase em 34%. O HNC (15  $\mu$ M) inibiu a atividade da catalase em 24% no entanto, com a 4-NCHA (10  $\mu$ M) não foi observado nenhum efeito na atividade da catalase (FIGURA 24A). Na figura 24B os resultados mostraram que a CHA (50  $\mu$ M) não alterou a atividade da SOD total. O HNC (15  $\mu$ M) inibiu a atividade da SOD em 41%, no entanto, com a 4-NCHA (10  $\mu$ M) foi observado um aumento da atividade da SOD de 47%.

Quando as chalconas foram testadas na concentração de 20  $\mu$ M, afim de comparar os efeitos das chalconas numa mesma concentração, observou-se que a CHA não alterou a atividade das enzimas SOD e catalase, no entanto a HNC e a 4-NCHA reduziram a atividade da catalase em 27% e 31% respectivamente e da SOD em 43% e 50% respectivamente (FIGURA 24 A e B). Assim, é possível verificar que as atividades de enzimas antioxidantes, catalase e SOD, podem ser afetadas de forma diferente pelas chalconas testadas.

FIGURA 24 – EFEITOS DAS CHALCONAS SOBRE A ATIVIDADE DAS ENZIMAS ANTIOXIDANTES



FONTE: O autor (2015)

NOTA: A análise dos efeitos das chalconas sobre a atividade das enzimas antioxidantes em células HepG2 foi realizada segundo o item 5.7.4 do Materiais e Métodos. As concentrações utilizadas das chalconas estão representadas em  $\mu\text{M}$ . **A**) atividade enzimática da catalase após incubação das células com a CHA (20 e 50  $\mu\text{M}$ ), HNC (15 e 20  $\mu\text{M}$ ) e 4-NCHA (10 e 20  $\mu\text{M}$ ) e **B**) atividade enzimática da SOD total após incubação das células com a CHA (20 e 50  $\mu\text{M}$ ), HNC (15 e 20  $\mu\text{M}$ ) e 4-NCHA (10 e 20  $\mu\text{M}$ ), durante 24 horas a 37°C. Os experimentos foram realizados em triplicata, em volume final de 200 $\mu\text{L}$  em meio DMEM alta glicose completo, no controle somente foi adicionado o meio. 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 4 experimentos realizados em triplicata. \*\* $p < 0,01$ , \*\*\* $p < 0,001$ .

Observou-se uma redução na atividade da catalase quando as células HepG2 foram tratadas com a chalcona (50  $\mu\text{M}$ ). No entanto, este composto não afetou a atividade da SOD total. Na concentração de 20  $\mu\text{M}$  a CHA não alterou a atividade das enzimas antioxidantes, o que está de acordo com o observado no

experimento de geração de ERO, uma vez que houve aumento dessas espécies apenas nas concentrações mais elevadas (40 e 60  $\mu\text{M}$ ). Também está de acordo com os resultados de viabilidade, onde se observou reduções significativas de viabilidade apenas nas concentrações mais elevadas (a partir de 40  $\mu\text{M}$ ).

Quando as células foram tratadas com a HNC (15  $\mu\text{M}$ ), observou-se uma inibição de atividade da catalase e da SOD. Estes resultados também estão de acordo com os obtidos no ensaio de geração de ERO (aumento de 148% na concentração de 20  $\mu\text{M}$ ) e viabilidade, no qual houve uma redução significativa do número de células viáveis a partir da concentração de 10  $\mu\text{M}$  (FIGURA 23A e B). Esses resultados indicam que a HNC reduziu as defesas antioxidantes celulares, o que pode ter levado a um aumento das espécies reativas de oxigênio (especialmente  $\text{H}_2\text{O}_2$ ) e, por conseguinte, levado à morte celular.

Em relação aos resultados obtidos com a 4-NCHA (10  $\mu\text{M}$ ) observou-se um aumento da atividade da SOD e nenhuma alteração na atividade da catalase. No entanto, após incubação com esta chalcona na concentração de 20  $\mu\text{M}$ , observou-se uma redução da atividade da SOD e da catalase. Estes resultados sugerem que os efeitos observados deste composto dependem da concentração utilizada, visto que provavelmente existe uma primeira resposta antioxidante das células contra a ação da 4-NCHA quando esta é utilizada na menor concentração (10  $\mu\text{M}$ ). No entanto quando testada a concentração próxima ao valor de  $\text{IC}_{50}$  (20  $\mu\text{M}$ ) há uma redução das defesas antioxidantes celulares, que pode estar levando a danos oxidativos (com o aumento das ERO) e à morte celular.

Em relação à estrutura da chalcona pode-se observar que a presença de substituintes interfere na ação dos compostos sobre as defesas antioxidantes, em especial as chalconas nitradas e, conseqüentemente, nos níveis de ERO.

Assim, analisados em conjunto, os resultados obtidos sugerem uma possível relação entre a redução das defesas antioxidantes celulares, o aumento dos níveis de ERO e a redução da viabilidade celular.

Du *et al.* (2007) observaram que a catequina é capaz de induzir a atividade das enzimas antioxidantes catalase, SOD e glutathione peroxidase celulares de um modo dependente da concentração e relacionaram esse resultado a uma proteção contra apoptose induzida pelo estresse oxidativos ocasionado pelo incubação com a catequina.

Por sua vez, Leung *et al.* (2006) observaram que a flavona luteolina, na concentração de 50  $\mu\text{M}$ , aumenta a atividade das enzimas antioxidantes dependente do tempo de incubação, visto que após 16 horas de incubação houve

ativação das enzimas antioxidantes catalase e SOD e após 24 horas houve uma redução da atividade dessas enzimas.

Em nosso laboratório, Tamiello (2012) observou que as células HepG2 tratadas com a 3-nitrochalcona nas concentrações de 15 e 20  $\mu\text{M}$  apresentaram níveis menores (68 e 41%, respectivamente) da expressão de mRNA da catalase e redução de 22 e 18% na atividade dessa enzima após 48 horas de incubação. Os resultados observados sugeriram, então, que a chalcona poderia contribuir para o aumento de  $\text{H}_2\text{O}_2$  e, possivelmente, para redução da viabilidade de células verificadas nestas concentrações.

Winter *et al.* (2010) testaram uma série de chalconas derivativas de 2-naftilacetofenona em células de leucemia humana (L1210) e observaram uma redução da atividade da catalase com todos os compostos testados. Assim, testaram o efeito das naftilchalconas com grupamento 3- $\text{NO}_2$ -fenil e fenil nas concentrações de  $\text{IC}_{50}$  de 23 e 36  $\mu\text{M}$ , respectivamente, por 24 horas, em catalase isolada de fígado bovino, e observaram a diminuição de aproximadamente 15 e 10%, da atividade da enzima. Os autores concluíram, então, que a incapacidade das células de leucemia em aumentar a atividade da catalase, neste caso, pode ser devido a citotoxicidade das chalconas, visto estar relacionada principalmente com a geração de  $\text{H}_2\text{O}_2$ . Um outro fator importante resultante da ação de ERO nas células tumorais, é a oxidação de proteínas, tais como citocromo C e catalase, assim, a inibição da catalase pode reduzir a capacidade das células em eliminar o  $\text{H}_2\text{O}_2$ , aumentando o dano celular induzido pelas ERO.



## 7. DISCUSSÃO FINAL

O carcinoma hepatocelular (CHC) é uma das neoplasias mais comuns no mundo, com elevada incidência e mortalidade (MENDEZ-SANCHEZ *et al.*, 2014; SINGAL; ELSERAG, 2015), no entanto, 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 os flavonóides (HE *et al.*, 2001; CERQUEIRA *et al.*, 2007; KUO *et al.* 2010).

Neste estudo, observou-se que a hispidulina provoca uma redução na porcentagem de células HepG2, dependente tanto do tempo quanto da concentração utilizada, além de induzir efeitos antiproliferativos preferenciais sobre as células HepG2, em comparação com as células normais imortalizadas L929 (FIGURA 13). Agentes com capacidade para induzir a apoptose seletiva de células tumorais ganharam atenção no campo de descoberta de novas drogas. No entanto, os mecanismos moleculares relacionados à morte seletiva de células tumorais induzida por flavonóides ainda não estão completamente compreendidos (BADISA *et al.*, 2009; SAMARGHANDIAN *et al.*, 2010; CHAMPELOVIER *et al.*, 2013; NG *et al.*, 2013).

Já foi observado anteriormente que a hispidulina promove um aumento na porcentagem de células em subG1 de forma dependente da concentração, o que indica um aumento do número de células contendo DNA fragmentado (SCOPARO, 2012). O ensaio de dupla marcação com Anexina-V-PE e 7-AAD, demonstrou aumento significativo nas populações de células positivas para anexina e positivas para anexina e 7-AAD o que pode ser um indicativo de que a morte celular poderia estar ocorrendo por apoptose de maneira dependente da concentração utilizada (FIGURA 14). Nossos resultados estão de acordo com os observados por Gao *et al.* (2014) que verificou que a hispidulina induz a morte de células HepG2 por apoptose possivelmente mediada por disfunção mitocondrial e inibição da via de sinalização de P13k/Akt.

Esses resultados corroboram também com outros dados descritos na literatura, nos quais é sugerido que em outras linhagens celulares como câncer de ovário (SKOV3), câncer gástrico (AGS), câncer de mama (MCF-7), entre outros, a hispidulina e outras flavonas como apigenina e luteolina são capazes de induzir apoptose por via mitocondrial, através da indução de PARP e liberação de citocromo C (Yang *et al.*, 2010; Gao *et al.* 2014; LIN *et al.*, 2015; LU *et al.*, 2015). Lin *et al.* (2010) observaram que a incubação com a hispidulina, em duas linhagens

celulares de glioblastoma multiforme humano (GBM8401 e GBM8901) durante 48 horas, reduziu a viabilidade celular de maneira dependente da concentração, bloqueando a progressão do ciclo celular na fase G1, e induzindo apoptose (LIN *et al.*, 2010).

Também foi relatado anteriormente um aumento dos níveis de ERO dependente do tempo e concentração após a incubação com 50 e 100  $\mu\text{M}$  de hispidulina (SCOPARO, 2012). Neste trabalho, no entanto, foi observado (FIGURA 12) que quando as células HepG2 foram pré-incubadas com NAC (5 e 10 mM) e posteriormente com a hispidulina (50 e 100  $\mu\text{M}$ ), os níveis de ERO foram reduzidos, sugerindo que hispidulina pode promover o aumento dos níveis dessas espécies, uma vez que a adição de NAC causou uma redução de ERO dependente da concentração, provavelmente devido aos níveis de GSH restaurados. Esses resultados obtidos estão de acordo com os observados anteriormente (SCOPARO, 2012) quando se observou um aumento da viabilidade das células HepG2 após a adição de NAC também de maneira dependente da concentração, sugerindo que os níveis de ERO podem ter um papel crucial na morte celular induzida pela hispidulina.

Observou-se também que hispidulina reduz a atividade da catalase (FIGURA 10), o que sugere que  $\text{H}_2\text{O}_2$  tem um papel essencial na morte celular, uma vez que a incubação simultânea das células com hispidulina e catalase protegeu da morte celular induzida por esta flavona. Foram observados resultados semelhantes no nosso laboratório com apigenina (100  $\mu\text{M}$ ) em células HepG2, em que a adição de catalase (500 ou 1000 U/ml) reduziu a indução de morte celular em condições semelhantes, o que sugeriu que o aumento dos níveis de  $\text{H}_2\text{O}_2$  pode estar envolvido no mecanismo de morte celular induzida pela apigenina (VALDAMERI *et al.*, 2011).

Em relação ao segundo objetivo do trabalho, observou-se que as chalconas foram capazes de reduzir a viabilidade das células HepG2 de maneira dependente da concentração e do tempo de incubação. No entanto, as chalconas que apresentavam grupo nitro e/ou grupo hidroxila na estrutura foram as que tiveram menores valores de  $\text{IC}_{50}$ , apresentando maior citotoxicidade em células tumorais (**Erro! Fonte de referência não encontrada.**2). Quanto ao grupo hidroxila, a presença deste grupo na estrutura de chalconas tem demonstrado um papel crucial na atividade antitumoral desses compostos (POUGET *et al.*, 2001; ECHEVERRIA *et al.*, 2009; MAI *et al.*, 2014).

Echeverria *et al.* (2009) demonstram que 2'-hidroxichalconas (50-200  $\mu\text{M}$ ), contendo ou não substituição metoxila no anel B, promovem inibição da proliferação

celular dependente da concentração e da presença do grupamento metoxila e indução de apoptose em células HepG2 após 24 horas de incubação.

Quanto à presença do grupo nitro, também se tem observado na literatura a importância da adição desse grupo na atividade citotóxica de chalconas. Mai *et al* (2014) testaram uma série de chalconas sintéticas e observaram que a chalcona contendo um grupo NO<sub>2</sub> na posição *para* no anel B, grupo OH na posição 2' além de metoxila nas posições 4' e 6', foi um dos compostos com atividade antitumoral mais potente e seletiva contra células tumorais humanas TRAIL-resistentes (HT-29, HepG2, CNE-1, CEM-SS) após 72 horas de incubação. No entanto, não foram descritos os efeitos destes compostos depois de 24 horas e 48h de incubação, nem os efeitos de compostos unicamente com grupo nitro, ou apenas com um grupo nitro e grupo 2'-hidroxila em células HepG2. Em nosso estudo, observou-se que os compostos mais potentes foram a 4-NCHA e a HNC. Este é, então, o primeiro trabalho que demonstra estes efeitos citotóxicos em células HepG2.

Também foi avaliado neste trabalho a citotoxicidade das chalconas em células normais imortalizadas de fibroblasto murino (L929) a fim de comparar os efeitos destes compostos em relação a células tumorais e células normais imortalizadas (**Erro! Fonte de referência não encontrada.**3). Pôde-se observar que os compostos testados têm um maior efeito citotóxico sobre a linhagem de células HepG2. No entanto, entre os compostos testados, a 4-NCHA e a HNC foram as mais promissoras para futuros estudos de novos compostos antitumorais para o tratamento do CHC.

No experimento de análise do ciclo celular (FIGURA 23), observou-se que a CHA (50 µM) aumentou o número de células na fase G2/M do ciclo celular e em subG1, sugerindo que a morte celular pode estar ocorrendo devido à fragmentação no DNA. No entanto, para a concentração de 20 µM, a chalcona não apresentou alterações nas fases do ciclo celular. Por sua vez, os compostos HNC e 4-NCHA mostraram um aumento na quantidade de células em sub-G1 (DNA fragmentado) após a incubação por 24 horas nas concentrações próximas aos valores de IC<sub>50</sub> (20 µM), sugerindo que a morte celular pode estar ocorrendo por apoptose. Assim, os resultados confirmam que chalconas com o grupo nitro apresentam uma maior citotoxicidade sobre células HepG2 quando comparadas com a chalcona, uma vez que requerem uma concentração menor para induzir a morte celular.

Outros autores observaram mudanças na progressão do ciclo celular utilizando chalconas. Moon *et al.* (2010) relataram o efeito da buteína (30 µM) na progressão do ciclo celular em células HepG2, observado um aumento do número

de células na fase G2/M após 24 horas de incubação e aumento de em subG1 após 48 horas de incubação, induzindo, assim, a apoptose e bloqueando a progressão do ciclo celular na fase G2/M.

Em alguns estudos utilizando chalconas, o aumento de ERO é visto como o principal responsável pela indução de morte celular em várias linhagens celulares tumorais: câncer do cólon (HCT116) incubadas com Flavokavaína B (KUO *et al.*, 2010), células de carcinoma hepatocelular (HepG2) incubadas com buteína (MOON *et al.*, 2010), células de melanoma (B16-F10) incubadas com hidroxichalconas entre outras (NAVARINI *et al.*, 2007). Assim, foi avaliado neste trabalho se as chalconas poderiam alterar os níveis intracelulares de ERO e observou-se que nas concentrações de 10 e 20  $\mu\text{M}$  apenas as chalconas nitradas foram capazes de aumentar os níveis dessas espécies, indicando a importância desse grupo para o efeito observado (FIGURA 22).

Sob estresse oxidativo, as células entram geralmente em um processo adaptativo antioxidante, classificado como enzimático ou não enzimático (SIES, 1993), sendo que os antioxidantes enzimáticos são a primeira linha de defesa contra os radicais livres ou espécies reativas de oxigênio. No presente estudo, avaliou-se os efeitos dos compostos 4-NCHA e HNC (os mais promissores), e a chalcona, quanto a alterações na atividade das enzimas antioxidantes SOD total e catalase (FIGURA 24). Foi possível verificar que as atividades de enzimas antioxidantes podem ser afetadas de forma diferente pelas chalconas testadas e as que contém grupo nitro na estrutura apresentam-se como promissoras na redução da atividade das enzimas e, conseqüentemente, das defesas antioxidantes e aumentos dos níveis de ERO intracelulares.

Recentemente tem sido demonstrado que a transcrição de enzimas antioxidantes é regulada por elementos de resposta antioxidante (ARE) através da via Nrf2/Keap1 (ANTELMANN *et al.*, 2011). A variação dos efeitos de flavonóides (quercetina, kaempferol, taxifilina e apigenina) sobre a expressão de enzimas antioxidantes (MnSOD, CuZnSOD glutationa peroxidase, glutationa redutase e catalase), foram verificadas por Crespo *et al.* (2008) utilizando células CHL (Chang Liver cells) incubadas com mistura de citocinas para induzir o estresse oxidativo. Os autores verificaram que diferentes concentrações do mesmo flavonóide podem afetar de forma distinta os níveis de mRNA destas enzimas e, ainda, que estes efeitos podem ser diferentes em função das suas estruturas.

As diferentes respostas dos flavonóides têm sido demonstradas também em outras linhagens celulares. Em células HepG2, a quercetina aumenta a

atividade de ARE pela *upregulation* da expressão de Nrf2, prevenindo sua ubiquitinação e degradação proteossomal, e além disso, acelera a degradação de Keap1 de maneira independente de proteossoma (TANIGAWA *et al.*, 2007; LEONARDUZZI *et al.*, 2010). Wu *et al.* (2010) observaram que derivados das chalconas (*E*)-3-(4-hidroxi-3-metoxifenil)-1-(4-metoxifenil) prop-2-en-1-ona e (*E*)-3-(4-hidroxifenil)-1-(4-metoxifenil) prop-2-en-1-ona na concentração de 10 µM e após 24 horas de incubação são capazes de ativar a via Nrf2-ARE em células PC12 de feocromocitoma de rato expostas a H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>.

No entanto, Lim *et al.* (2013) observaram que a 4-metoxichalcona, na concentração de 5 µg/ml e após 6 horas de incubação, aumenta o estresse oxidativo e a citotoxicidade induzida por cisplatina inibindo o mecanismo de defesa de Nrf2/ARE em células de câncer de pulmão A549. O estudo demonstrou que um inibidor de Nrf2 pode melhorar a capacidade de resposta das células tumorais para medicamentos quimioterápicos e indica o potencial de aplicação desse composto como um sensibilizador natural em quimioterapia. Neste mesmo sentido, em células de adenocarcinoma A549 altas concentrações (200 µM) da epigalocatequina 3-galato aboliu a atividade da Nrf2/ARE e a consequente expressão e síntese da HO-1 (heme oxigenase 1) (KWEON *et al.*, 2006; LEONARDUZZI *et al.*, 2010).

Tem sido relatado na literatura que as células tumorais podem ter uma capacidade limitada para se adaptar frente a algumas defesas antioxidantes em resposta ao estresse oxidativo (PELICANO *et al.*, 2004; WINTER *et al.*, 2010). Assim, Nrf2 é visto como um alvo farmacológico para superar a resistência terapêutica de vários tipos de tumores (ITOH *et al.*, 2010; TANG *et al.*, 2011). Deste modo, a identificação de moléculas que potencialmente inibam especificamente Nrf2 é bastante desejável, e tais compostos podem ser utilizados para aumentar a eficácia de fármacos antitumorais.

Neste sentido, a menor capacidade das células de aumentar a atividade da catalase em resposta ao estresse oxidativo pode ser uma das razões para a citotoxicidade observada após tratamento com as chalconas. Assim, a inibição da catalase pode reduzir a capacidade das células em eliminar o excesso de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> intracelular, podendo levar a danos celulares e, conseqüentemente, à morte celular (MALLIS *et al.*, 2001; WINTER *et al.*, 2010).

Desta forma, com os resultados obtidos neste trabalho demonstrou-se que as nitrochalconas foram mais eficazes na promoção de efeitos pró-oxidantes e indução de morte das células HepG2 do que a estrutura básica da chalcona. Isso

pode estar ocorrendo, possivelmente, por reagirem com biomoléculas importantes para o equilíbrio redox intracelular, como as enzimas antioxidantes, as ERO, Nrf-2, entre outras, podendo atuar, então, como compostos em potencial para futuros estudos em aplicação como adjuvantes na terapia contra o hepatocarcinoma.

## 8. CONCLUSÕES

Os resultados obtidos com a hispidulina sugerem que a esta flavona promove a morte das células HepG2 provavelmente por apoptose e que a redução da atividade da catalase e o aumento de ERO podem estar envolvidos neste mecanismo. O efeito de redução de viabilidade promovida pela hispidulina sobre as células HepG2 (células tumorais de fígado humano) é significativamente superior ao verificado com células não tumorais de fibroblasto murino (L929) sugerindo uma possível seletividade.

Em relação aos efeitos das chalconas sobre células HepG2 pode-se concluir que todos os compostos testados podem induzir a morte de células HepG2 de maneira dependente do tempo e da concentração utilizados, sendo que a ordem de citotoxicidade, verificada utilizando os valores de  $IC_{50}$  foi: 4-NCHA > HNC > 3-NCHA > HC > CHA. Também foi possível observar alterações no ciclo celular, com aumento do número de células em sub-G1 após incubação com a CHA (50  $\mu$ M), 4-NCHA e HNC (20  $\mu$ M) sugerindo uma possível morte celular por apoptose.

No ensaio de alteração nos níveis de ERO, as chalconas nitradas promoveram elevação desses níveis em concentrações menores (10 e 20  $\mu$ M) que as não nitradas (CHA e a HC). Possivelmente a alteração da atividade das enzimas antioxidantes e o conseqüente aumento dos níveis de ERO estariam envolvidos na indução de morte celular promovida pelas chalconas.

Observou-se também que nos ensaios de viabilidade celular, as chalconas demonstraram maior efeito citotóxico sobre as células HepG2 do que o efeito verificado com células L929, sugerindo uma possível seletividade, sendo os compostos mais promissores a 4-NCHA e a HNC. Assim, estes se apresentam como compostos com potencial para novos estudos, tendo em vista a utilização como adjuvantes no tratamento do HCC.

## 9. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ACHANTA, G.; MODZELEWSKA, A.; FENG, L.; KHAN, S.R.; HUANG, P. A boronic-chalcone derivative exhibits potent anticancer activity through inhibition of the proteasome, **Molecular Pharmacology**, v. 70, p. 426-433, 2006.

AEBI, H. Catalase in vitro. **Methods in Enzymology**, San Diego, v. 105, p. 121–126, 1984.

ALVES, R. C. *et al.* Advanced hepatocellular carcinoma. Review of targeted molecular drugs. **Ann Hepatol**, v. 10, n. 1, p. 21-7, 2011.

AGOSTINIS, P.; BUYTAERT, E.; BREYSSENS, H.; HENDRICKX, N. Regulatory pathways in photodynamic therapy induced apoptosis. **Photochem. Photobiol. Sci.** v. 3, p. 721–729, 2004

ANTELMANN, H.; HELMANN, J. D. Thiol-based redox switches and gene regulation. **Antioxid. Redox Signal.**, v. 14, p. 1049–1063, 2011.

ARAVINDAN, S. *et al.* Novel adjuvants from seaweed impede autophagy signaling in therapy-resistant residual pancreatic cancer. **Journal of Biomedical**, p. 22-28, 2015.

BADISA, R. B.; DARLING-REED, S. F.; JOSEPH, P.; COOPERWOOD, J. S.; LATINWO, L. M.; GOODMAN, C. B. Selective cytotoxic activities of two novel synthetic drugs on human breast carcinoma MCF-7 cells. **Anticancer Res.** v. 29, p. 2993-6, 2009.

BAEHRECKE E.H. How death shapes life during development. **Nat Rev Mol Cell Biol.** v. 3, p. 779–787, 2002.

BALKWIL, F. Timeline: Tumour necrosis factor and cancer. **Nature Reviews Cancer**, v. 9, p. 361-371, 2009.

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, p. 115-128, 1995.

BERESTOVITSKAYA, V. M., BAICHURIN, R. I., ABOSKALOVA, N. I., *et al.*  $\alpha$ -Nitro chalcones: Structure and reaction with pyrrole. **Russian Journal of General Chemistry**. v. 79, p. 2191-2196

BERTHET, C.; KALDIS, P. Cell-specific responses to loss of cyclin-dependent kinases. **Oncogene**, v. 26, p. 4469-4477, 2007.

BHAT, B. A., *et al.* Synthesis and biological evaluation of chalcones and their derived pyrazoles as potential cytotoxic agents. **Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters**, v. 15, n. 12, p. 3177-3180, 2005.

BLAGOSKLONNY, M. V. Are p27 and p21 cytoplasmic oncoproteins? **Cell cycle (Georgetown, Tex.)**, v. 1, p. 391-393, 2002.

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.; DIAZ, M.; CLERIES, R. Primary liver cancer: Worldwide incidence and trends. **Gastroenterology**, v. 127, p. S5-S16, 2004.

BRADFORD, M. M. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding **Analytical Biochemistry**, Bethesda, v. 72, p. 248-254, 1976.

BUPATHI, M.; KASEBB, A.; MERIC-BERNSTAMA, F.; NAING, A. Hepatocellular carcinoma: Where there is unmet need. **Mol Oncol**, v. 9, p. 1501–1509, 2015.

CAIN, K.; BRATTON, S. B.; LANGLAIS, C.; WALKER, G.; BROWN, D. G.; SUN, X. M. Apaf-1 Oligomerizes into Biologically Active ~700-kDa and Inactive ~1.4-MDa Apoptosome Complexes. **J Biol Chem**, v. 275, p. 6067–6070, 2000.

CANDE, C.; CECCONI, F.; DESSEN, P.; KROEMER, G. Apoptosis-inducing factor (AIF): key to the conserved caspase-independent pathways of cell death? **J Cell Sci**, v. 15, p. 4727–4734, 2002.

CARDENAS, M.; MARDER, M.; BLANK, V. C.; ROGUIN, L. P. Antitumor activity of some natural flavonoids and synthetic derivatives on various human and murine cancer cell lines, **Bioorg. Med. Chem.** 14, p. 2966-2971, 2006.

CASTEDO, M.; PERFETTINI, J. L.; ROUMIER, T.; ANDREAU, K.; MEDEMA, R.; KROEMER G. Cell death by mitotic catastrophe: a molecular definition. **Oncogene**. v. 23, p. 2825–2837, 2004.

CEN, D.; GONZALEZ, R. I.; BUCKMEIER, J. A.; KAHN, R. S.; TOHIDIAN, N. B.; MEYSKENS, F. L., JR. Disulfiram induces apoptosis in human melanoma cells: a redox-related process. **Mol Cancer Ther**, v. 1, p. 197-204, 2002.

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.

CHA, C. H.; SAIF, M. W.; YAMANE, B. H.; WEBER, S. M. Hepatocellular Carcinoma: Current Management. **Curr Probl Surg** v. 47, p. 10-67, 2010.

CHAMPELOVIER, P.; CHAUCHET, X.; HAZANE-PUCH, F.; VERGNAUD, S.; GARREL, C.; LAPORTE, F.; BOUTONNAT, J.; BOUMENDJEL, A.. Cellular and molecular mechanisms activating the cell death processes by chalcones: Critical structural effects. **Toxicol In Vitro**. 27(8) (2013) 2305-15.

CHEN, M.H.; YEN, W.B.; WU, Y.S.; PU, C.N. Chalcone derivatives inhibit human platelet aggregation and inhibit growth in human bladder cancer cells. **Biol. Pharm. Bull**, v. 37, p. 1191–1198, 2014.

CHENG, X.; SUN, P.; HU, Q. G.; SONG, Z. F.; XIONG, J.; ZHENG, Q. C. Transarterial (chemo)embolization for curative resection of hepatocellular carcinoma: a systematic review and meta-analyses. **J Cancer Res Clin Oncol.**, v. 140, p. 1159-70, 2014

CHEUNG, T. T.; NG, K. K.; CHOK, K. S; CHAN, S. C.; POON, R. T.; LO, C. M.; FAN, S. T.; Combined resection and radiofrequency ablation for multifocal

hepatocellular carcinoma: prognosis and outcomes. **World J Gastroenterol**, v. 16, p. 3056-62, 2010.

CHIANG, L. C.; NG, L. T.; LIN, I.C.; KUO, P.L.; LIN, C. C. Anti-proliferative effect of apigenin and its apoptotic induction in human Hep G2 cells. **Cancer Lett.** 237, p. 207-214, 2006.

CHOI, J. Y.; LEE, J.M.; SIRLIN. C. B. CT and MR imaging diagnosis and staging of hepatocellular carcinoma: part II. Extracellular agents, hepatobiliary agents, and ancillary imaging features. **Radiology**, v. 273, p. 30-50, 2014.

CHOI, S. B.; KIM, H.; KIM, S. H. PARK, Y. N.; KIM, K. S. Solitary Extrahepatic Intraabdominal Metastasis from Hepatocellular Carcinoma after Liver Transplantation. **Yonsei University College of Medicine**, v. 52, n. 1, p. 199-203, 2011.

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

COHEN, G. M.; SUN, X. M.; FEARNHEAD, H.; MACFARLANE, M.; BROWN, D. G.; SNOWDEN, R. T.; et al. Formation of large molecular weight fragments of DNA is a key committed step of apoptosis in thymocytes. **J. Immunol.**, v.153, p. 507-516, 1994.

COOPER, G. M.; **The Cell: A Molecular Approach**. 2nd edition. Sunderland (MA): Sinauer Associates; 2000.

CORY, S.; ADAMS, J. M. The Bcl2 family: regulators of the cellular life-or-death switch. **Nat. Rev. Cancer**, v. 2, p. 647-656, 2002.

COWLING, V.; DOWNWARD, J. Caspase-6 is the direct activator of caspase-8 in the cytochrome c-induced apoptosis pathway: absolute requirement for removal of caspase-6 prodomain. **Cell Death Differ**, v. 9, p. 1046–1056, 2002.

CORRADINI, E.; FOGLIA, P.; GIANSAANTI, P.; GUBBIOTTI, R.; SAMPERI, R.; LAGANA, A. Flavonoids: chemical properties and analytical methodologies of identification and quantitation in foods and plants. **Natural Product Research**, v. 25, p. 469-495, 2011.

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.

CRESPO, I.; GARCÍA-MEDIAVILLA, M.V.; ALMAR, M.; GONZÁLEZ, P.; TUÑÓN, M. J.; SÁNCHEZ-CAMPOS, S.; GONZÁLEZ-GALLEGO, J. Differential effects of dietary flavonoids on reactive oxygen and nitrogen species generation and changes in antioxidant enzyme expression induced by proinflammatory cytokines in Chang Liver cells. **Food Chem Toxicol.**, v. 46(5), p. 1555-69, 2008.

DALLA-VIA, L.; GIA, O.; CHIARELOTTO, G.; FERLIN, M. G. DNA-targeting pyrroloquinoline-linked butenone and chalcones: Synthesis and biological evaluation. **European Journal of Medicinal Chemistry**, v. 44, p. 2854–2861, 2009.

DAVENPORT, A.; FREZZA, M.; SHEN, M.; GE, Y.; HUO, C.; CHAN, T. H.; DOU, Q. P. Celastrol and an EGCG prodrug exhibit potent chemosensitizing activity in human leukemia cells. **Int J Mol Med** v. 25, p. 465-470, 2010.

DEBNATH, J.; BAEHRECKE, E. H.; KROEMER, G. Does autophagy contribute to cell death? **Autophagy**, v 1, p. 66–74, 2005.

DEGTEREV, A.; HUANG, Z.; BOYCE, M.; LI, Y.; JAGTAP, P.; MIZUSHIMA, N et al. Chemical inhibitor of nonapoptotic cell death with therapeutic potential for ischemic brain injury. **Nat Chem Biol**, v. 1, p. 112–119, 2005.

DESAI, B. M.; VILLANUEVA, J.; NGUYEN, T. T.; LIONI, M.; XIAO, M.; KONG, J.; KREPLER, C.; VULTUR, A.; FLAHERTY, K. T.; NATHANSON, K. L.; SMALLEY, K. S.; HERLYN, M. The anti-melanoma activity of dinaciclib, a cyclin-dependent kinase inhibitor, is dependent on p53 signaling. **PLoS One**, v. 8, p. e59588, 2013.

DIGIUSEPPE, J. A.; REDSTON, M. S.; YEO, C. J.; KERN, S. E.; HRUBAN, R. H. p53-independent expression of the cyclin-dependent kinase inhibitor p21 in pancreatic carcinoma. **Am J Pathol.** v. 147, p. 884–888, 1995.

DIMMOCK, J.R., et al. N.M. Bioactivities of chalcones. **Curr. Med. Chem.**, v. 6, p. 1125–1149, 1999.

DIMMOMOCK, J. R.; ZELLO, G. A.; OLOO, E. O. QUAIL, J. W.; et al. Correlations between Cytotoxicity and Topography of Some 2-Arylidenebenzocycloalkanones Determined by X-ray Crystallography. **J. Med. Chem.** v. 45, p. 3103-3111, 2002.

DINI, L. Apoptosis induction in DU-145 human prostate carcinoma cells. **Tissue Cell**, v. 37, p. 379–384; 2005

DOBOS, J.; TIMAR, J.; BOCSI, J.; BURIAN, Z.; NAGY, K.; BARNA, G.; (...) LADANYI, A. In vitro and in vivo antitumor effect of 2-methoxyestradiol on human melanoma. **Int J Cancer**, v. 112, p. 771-776, 2004.

DU, Y.; GUO, H.; LOU, H. Grape seed polyphenols protect cardiac cells from apoptosis via induction of endogenous antioxidant enzymes. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 55, p.1695 -1701, 2007.

ECHEVERRIA, C.; SANTIBAÑEZ, J. F.; DONOSO-TAUDA, O.; ESCOBAR, C. A. RAMIREZ-TAGLE, R. Structural Antitumoral Activity Relationships of Synthetic Chalcones. **Int. J. Mol. Sci.**, v. 10, p. 221-231, 2009.

EL-HADY, F. K. A.; SHAKER, K. H.; IMHOFF, J. F.; ZINECKER, H.; SALAH, N. M.; IBRAHIM, A. M. Bioactive Metabolites from Propolis Inhibit Superoxide Anion Radical, Acetylcholinesterase and Phosphodiesterase (PDE4). **Int. J. Pharm. Sci. Rev. Res.**, v. 21, p. 338-344, 2013.

EL-NAGGAR, S.F., et al. Flavonoids from the leaves of *Kalmia latifolia*. **J Nat Prod.**, v. 43, p. 739-51, 1980.

EL-SERAG, H. B.; MARRERO, J. A.; RUDOLPH, L.; REDDY, K. R. Diagnosis and treatment of hepatocellular carcinoma. **Gastroenterology**, v. 134, p. 1752-1763, 2008.

EL-SERAG, H. B. Current Concepts Hepatocellular Carcinoma. **New England Journal of Medicine**, v. 365, p. 1118-1127, 2011.

EL-SERAG, H. B. Hepatocellular carcinoma and hepatitis C in the United States. **Hepatology**, v. 36, p. S74-S83, 2002.

EL-SERAG, H. B.; LAU, M.; ESCHBACH, K.; DAVILA, J.; GOODWIN, J. Epidemiology of hepatocellular carcinoma in Hispanics in the United States. *Archives of Internal Medicine*, v. 167, p. 1983-1989, 2007

FERREIRA, A.L.A.; MATSUBARA, L.S. Radicais livres: conceitos, doenças relacionadas, sistema de defesa e estresse oxidativo. **Revista da Associação Médica Brasileira**, v. 43, n.1, p.1-16, 1997.

FERREIRA, C. G.; ROCHA, J. C. **Oncologia Molecular**. Atheneu: São Paulo, 2004.

FITZMORRIS, P.; SHOREIBAH, M.; ANAND, B. S.; SINGAL, A. K. Management of hepatocellular carcinoma. **J Cancer Res Clin Oncol**, v. 141, p. 861-76, 2015.

FORBES, A.; WILLIAMS, R. Chemotherapy and radiotherapy of malignant hepatic tumours. **Baillieres Clin Gastroenterol**, v. 1, p. 151-69, 1987.

FORNER, A.; LLOVET, J. M.; BRUIX, J. Hepatocellular carcinoma. **Lancet**, v. 379, p. 1245–55. 2012.

FRIDOVICH, I. Superoxide radical and superoxide dismutases. **Annual Review of Biochemistry**, Palo Alto, v. 64, p. 97-112, 1995.

FULDA, S.; DEBATIN, K. M. Extrinsic versus intrinsic apoptosis pathways in anticancer chemotherapy. **Oncogene**, v. 25, p. 4798–4811, 2006.

GALLUZZI, L.; KROEMER, G. Necroptosis: a specialized pathway of programmed necrosis. **Cell**, v. 135, p. 1161–1163, 2008.

GALLUZZI, L.; VITALE, I.; ABRAMS, J. M.; ALNEMRI, E. S.; BAEHRECKE, E. H.; BLAGOSKLONNY, M. V.; DAWSON, T. M.; DAWSON, V. L.; EL-DEIRY, W. S.; FULDA, S.; GOTTLIEB, E.; GREEN, D. R.; HENGARTNER, M. O.; KEPP, O.; KNIGHT, R. A.; KUMAR, S.; LIPTON, S. A.; LU, X.; MADEO, F.; MALORNI, W.; MEHLEN, P.; NUNEZ, G.; PETER, M. E.; PIACENTINI, M.; RUBINSZTEIN, D. C.; SHI, Y.; SIMON, H. U.; VANDENABEELE, P.; WHITE, E.; YUAN, J.; ZHIVOTOVSKY, B.; MELINO, G.; KROEMER, G. Molecular definitions of cell death subroutines: recommendations of the Nomenclature Committee on Cell Death 2012. **Cell Death and Differentiation**, v. 19, p. 107-120, 2012.

GAO H., WANG H, PENG J. Hispidulin Induces Apoptosis Through Mitochondrial Dysfunction and Inhibition of P13k/Akt Signalling Pathway in HepG2 Cancer Cells. **Cell Biochem Biophys**, v. 69, p. 27-34, 2014.

GAO H., XIE J., PENG J., HAN Y., JIANG Q., HAN M., WANG C.. Hispidulin inhibits proliferation and enhances chemosensitivity of gallbladder cancer cells by targeting HIF-1 $\alpha$ . **Exp Cell Res.**, v. 332, p. 236-46, 2015

GARRETT, M. A. Cell cycle control and cancer. **Current Science**, v. 81, p. 515-522, 2001.

GIGLIA, J. L.; ANTONIA, S. J.; BERK, L. B.; BRUNO, S.; DESSUREAULT, S.; FINKELSTEIN, S. E. Systemic therapy for advanced hepatocellular carcinoma: past, present, and future. **Cancer Control**, v. 17, p. 120-9, 2010.

GLICK, D.; BARTH, S.; MACLEOD, K.F. Autophagy: cellular and molecular mechanisms. **J Pathol**. V. 221, p. 3–12, 2010.

GOLBERT, L., *et al.* Aumento da expressão do proto-oncogene ras no bócio multinodular: possível envolvimento na patogênese. **Arq Bras Endocrinol Metab** v. 47 n.6, 2003.

GOLSTEIN, P.; KROEMER, G. Cell death by necrosis: towards a molecular definition. **Trends Biochem Sci**, v. 32, p. 37–4, 2007.

GOPINATHAN, L.; RATNACARAM, C. K.; KALDIS P. Established and novel Cdk/cyclin complexes regulating the cell cycle and development. **Results Probl. Cell Differ**. v. 53, p. 365–389, 2011.

GUPTA, S.; AFAQ, F.; MUKHTAR, H. Selective growth-inhibitory, cell-cycle deregulatory and apoptotic response of apigenin in normal versus human prostate carcinoma cells. **Biochem Biophys Res Commun**, 287(4):914-920, 2001.

HARASHIMA, H.; DISSMEYER, N.; SCHNITTGER, A. Cell cycle control across the eukaryotic kingdom. **Trends Cell Biol.**, v. 23(7), p. 345-56, 2013.

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

HATZARAS, I.; Bischof, D. A.; Fahy, B.; Cosgrove, D.; Pawlik, T. M. Treatment options and surveillance strategies after hepatocellular carcinoma. **Ann Surg Oncol**, v. 21, n. 3, p. 758-66, 2014.

HAVSTEEN, B. H. The biochemistry and medical significance of the flavonoids. **Pharmacol. Ther.**, v. 96, p. 67–202, 2002.

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

HE, C.; SUN, X. P.; QIAO, H.; JIANG, X.; WANG, D.; JIN, X.; DONG, X.; WANG, J.; JIANG, H.; SUN, X. Downregulating hypoxia-inducible factor-2 $\alpha$  improves the efficacy of doxorubicin in the treatment of hepatocellular carcinoma. **Cancer Sci**, v. 103, p. 528-34, 2012.

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

HERNANDEZ-MARTINEZ, R.; COVARRUBIAS, L. Interdigital cell death function and regulation: New insights on an old programmed cell death model. **Development Growth & Differentiation**, v. 53, p. 245-258, 2011.

HERRERIAS, T. **Efeitos de flavonóides sobre o metabolismo mitocondrial e suas implicações na viabilidade e apoptose de células de melanoma**. Curitiba, 2009. Tese (Doutorado em Bioquímica) – Setor de Ciências Biológicas, Universidade Federal do Paraná.

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.

HSU, Y. L.; KUO, P. L.; TZENG, W. S.; LIN, C. C. Chalcone inhibits the proliferation of human breast cancer cell by blocking cell cycle progression and inducing apoptosis. **Food Chem Toxicol.** v. 44, p. 704-13, 2006.

HU, Y.; WANG, S.; WU, X.; ZHANG, J.; CHEN, R.; CHEN, M.; WANG, Y. Chinese herbal medicine-derived compounds for cancer therapy: A focus on hepatocellular carcinoma. **J Ethnopharmacol**, v. 149, p. 601-612, 2013.

HURWITZ, J. L.; STASIK, I.; KERR, E. M.; et al. Vorinostat/SAHA-induced apoptosis in malignant mesothelioma is FLIP/caspase 8-dependent and HR23B-independent. **Eur J Cancer.**, v. 48(7), p.1096-107, 2012.

IKEDA, K.; KUMADA, H.; SAITOH, S.; ARASE, Y.; CHAYAMA, K. Effect of repeated transcatheter arterial embolization on the survival time in patients with hepatocellular carcinoma. An analysis by the Cox proportional hazard model. **Cancer**, v. 68, p. 2150-2154, 1991..

ILANGO, K.; VALENTINA, P.; SALUJA, G. S. Synthesis and In-vitro anti-cancer activity of some substituted Chalcone derivatives. Research Journal of Pharmaceutical, **Biological and Chemical Sciences.** v.1, p. 354-359, 2010.

INCA (Instituto Nacional do Câncer) – Ministério da Saúde. Estimativa da Incidência e Mortalidade por Câncer. Disponível em: [www.inca.gov.br](http://www.inca.gov.br). Acesso em: 01/12/2015.

INDRAN, I. R.; TUFO, G.; PERVAIZ, S.; BRENNER, C. Recent advances in apoptosis, mitochondria and drug resistance in cancer cells. **Biochimica Et Biophysica Acta Bioenergetics**, v. 1807, p. 735-745, 2011.

IQBAL, H.; PRABHAKAR, V.; SANGITH, A.; CHANDRIKA, B.; BALASUBRAMANIAN, R. Synthesis, anti-inflammatory and antioxidant activity of ring-A-monosubstituted chalcone derivatives. **Med Chem Res**, v. 23, p. 4383–4394, 2014.

JOHNSON, P. J. Systemic chemotherapy of liver tumors. **Semin Surg Oncol**, v.19, p. 116-24, 2000

KACHADOURIAN, R.; DAY, B. J. Flavonoid-induced glutathione depletion: potential implications for cancer treatment. **Free Radical Biology & Medicine**, v. 41, p. 65-76, 2006.

KAISER, W. J.; SRIDHARAN, H.; HUANG, C.; MANDAL, P.; UPTON, J. W.; GOUGH, P. J.; SEHON, C. A.; MARQUIS, R. W.; BERTIN, J.; MOCARSKI, E. S. Toll-like receptor 3-mediated necrosis via TRIF, RIP3, and MLKL. **J Biol Chem**, v. 288, p. 31268-79, 2013.

KALYAN, A.; NIMEIRI, H.; KULIK, L. Systemic therapy of hepatocellular carcinoma: current and promising. **Clin Liver Dis**, v. 19, p. 421-32, 2015.

KAMAL, A.; RAMAKRISHNA, G.; RAJU, P.; VISWANATH, A.; RAMAIAH, M.J.; BALAKISHAN, G.; PAL-BHADRA, M. synthesis and anti-cancer activity of chalcone

linked imidazolones, **Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters**, v. 20, p. 4865-4869, 2010.

KARTHIKEYANA, C.; MOORTHYA, N. S. H. N.; RAMASAMY, S.; VANAMC, U.; MANIVANNAND, E.; KARUNAGARANC, D.; TRIVEDIA, P. Advances in Chalcones with Anticancer Activities. **Recent Patents on Anti-Cancer Drug Discovery**, 2015.

KAY, C.D. The future of flavonoid research. **British Journal of Nutrition**, v. 104, p. 91–95, 2010

KEW, M. C. Hepatitis C virus-induced hepatocellular carcinoma in sub-Saharan Africa. **African Journal of Cancer**, v. 5, p. 169-174, 2013.

KILANI-JAZIRI, S.; FRACHET, V.; BHOURI, W.; GHEDIRA, K.; CHEKIR-GHEDIRA, L.; RNOT, X. Flavones inhibit the proliferation of human tumor cancer cell lines by inducing apoptosis. **Drug and Chemical Toxicology**, v. 35, p. 1–10, 2012.

KHODJAKOV, A.; RIEDER, C. L. The nature of cell-cycle checkpoints: facts and fallacies. **J Biol**, v. 8, p. 88, 2009.

KONIECZNY, M. T.; KONIECZNY, W.; SABISZ, M.; SKLADANOWSKI, A.; WAKIEC, R.; AUGUSTYNOWICZ-KOPEC, E.; ZWOLSKA, Z. Acid-catalyzed synthesis of oxathiolone fused chalcones. Comparison of their activity toward various microorganisms and human cancer cells line. **European Journal of Medicinal Chemistry**, v. 42, p. 729-733, 2007.

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.; VANDENABEELE P.; *et al.* Classification of cell death: recommendations of the Nomenclature Committee on Cell Death 2009. **Cell Death Differ**, v. 16, p. 3-11, 2009.

KRUEGER, A.; BAUMANN, S.; KRAMMER, P. H.; KIRCHHOF, S. FLICE-Inhibitory Proteins: Regulators of Death Receptor-Mediated Apoptosis. **Mol. Cell. Biol.**, p. 8247–8254, 2001.

KUENG, W.; SILBER, E.; EPPENBERGER, U. Quantification of cells cultured on 96-well plates. **Analytical Biochemistry**, Bethesda, v. 182, p. 16-19, 1989.

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

KUNDU, M.; THOMPSON C. B. Autophagy: basic principles and relevance to disease. **Annu. Rev. Pathol.** v. 3, p. 427–455, 2008.

KUO, S. M. Antiproliferative potency of structurally distinct dietary flavonoids on human colon cancer cells. **Cancer Letter**, Oxford, v. 110, p. 41–48, 1996.

KUO, Y. F.; SU, Y. Z.; TSENG, Y.H.; WANG, S.Y.; WANG, H.M; CHUEH, P.J. 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.

KWAK, M.K.; WAKABAYASHI, N.; ITOH, K.; MOTOHASHI, H.; YAMAMOTO, M.; KENSLER, T.W. Modulation of gene expression by cancer chemopreventive dithiolethiones through the Keap1–Nrf2 pathway. Identification of novel gene clusters for cell survival, **J. Biol. Chem**, v. 278, p. 8135–8145, 2003.

KWEON, M. H.; ADHAMI, V. M.; LEE, J. S.; MUKHTAR, H. Constitutive overexpression of Nrf2-dependent heme oxygenase-1 in A549 cells contributes to resistance to apoptosis induced by epigallocatechin 3-gallate. **J Biol Chem.**, v. 281(44), p. 33761-72, 2006.

LABEL, C. P.; ISCHIOPOULOS, H.; BONDY, S. C. Evaluation of the probe 2",7" - dichlorofluorescein as an indicator of reactive oxygen species formation and oxidative stress. **Chemical Research in Toxicology**, Washington, v. 5, p. 227231, 1992.

LABIB, K.; PICCOLI, G. Surviving chromosome replication: the many roles of the S-phase checkpoint pathway. *Phil. Trans. R. Soc. B*, v. 366, p. 3554-3561, 2011.

LAFONT, E.; MILHAS, D.; TEISSIE, J.; THERVILLE, N.; ANDRIEU-ABADIE, N.; LEVADE, T. et al. Caspase-10-dependent cell death in Fas/CD95 signalling is not abrogated by caspase inhibitor zVAD-fmk. **PLoS One**, v. 5, p. e13638, 2010.

LEBLANC, H. N.; ASHKENAZI, A. Apo2L/TRAIL and its death and decoy receptors. **Cell Death and Differentiation**, v. 10, 66–75, 2003.

LEE, J. M.; PARK, J. W.; CHOI, B. I. 2014 KLCSG-NCC Korea Practice Guidelines for the management of hepatocellular carcinoma: HCC diagnostic algorithm. **Dig Dis**, v. 32, n. 6, p. 764-77, 2014.

LEE, S. J.; CHUNG, H.Y.; MAIER, C. G. A.; WOOD, A. R.; DIXON, R. A.; MABRY, T. J. Estrogenic flavonoids from *Artemisia vulgaris* L. **J Agr Food Chem**, v. 46, p. 3325-3329, 1998.

LEÓN-GONZÁLEZ, A. J. ACERO, N., MUÑOZ-MINGARRO, D., NAVARRO, I., MARTÍN-CORDERO, C. Chalcones as Promising Lead Compounds on Cancer Therapy. **Current Medicinal Chemistry**, 2015, 22, 3407-3425 3407

LEONARDUZZI, G.; SOTTERO, B.; POLI, G. Targeting tissue oxidative damage by means of cell signaling modulators: the antioxidant concept revisited. **Pharmacol Ther.**, v. 128(2), p. 336-74, 2010.

LEUNG, H.W.C.; KUO, C.L.; YANG, W.H.; LIN, C.H.; LEE, H.Z. Antioxidant enzymes activity involvement in luteolin-induced human lung squamous carcinoma CH27 cell apoptosis. **European Journal of Pharmacology**, v.534, p. 12-18, 2006.

LEWIN, G.; AUBERT, G.; THORET, S.; DUBOIS, J.; CRESTEIL, T. Influence of the skeleton on the cytotoxicity of flavonoids. **Bioorganic & Medicinal Chemistry**, v. 20, p. 1231–1239, 2012.

LIM, S.; KALDIS, P. Cdks, cyclins and CKIs: roles beyond cell cycle regulation. **Development**, v. 140, p. 3079-3093, 2013.



LIM, J.; LEE, S. H.; CHO, S. LEE, I. S.; KNG, B.Y.; CHOI, H. J. 4-Methoxychalcone Enhances Cisplatin-Induced Oxidative Stress and Cytotoxicity by Inhibiting the Nrf2/ARE-Mediated Defense Mechanism in A549 Lung Cancer Cells. **Mol Cells**, v. 36, p. 340–346, 2013.

LIN, C. H.; CHANG, C. Y.; LEE, K. R.; LIN, H. J.; CHEN, T. H.; WAN, L. Flavones inhibit breast cancer proliferation through the Akt/FOXO3a signaling pathway. **BMC Cancer**. v. 15, p. 958-970, 2015.

LIN, C.W.; HOU, W. C. et al. Quercetin inhibition of tumor invasion via suppressing PKC $\alpha$ /ERK/AP-1-dependent matrix metalloproteinase-9 activation in breast carcinoma cells, **Carcinogenesis**, v. 29, p. 1807-1815, 2008.

LIN, Y. C.; HUNG, C. M.; TSAI, J.C.; LEE, J.C.; CHEN, Y. L.; WEI, C. W.; KAO, J. Y.; WAY, T. D. Hispidulin Potently Inhibits Human Glioblastoma Multiforme Cells through Activation of AMP-Activated Protein Kinase (AMPK). **J Agric Food Chem**, v. 58, p. 9511-9517, 2010.

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

LO, S.C.; LI, X.; HENZL, M.T.; BEAMER, L.J.; HANNINK, M. Structure of the Keap1:Nrf2 interface provides mechanistic insight into Nrf2 signaling. **The EMBO Journal**, v. 25, p. 3605-3617, 2006.

LOA, J.; CHOW, P.; ZHANG, K.. Studies of structure–activity relationship on plant polyphenol-induced suppression of human liver cancer cells. **Cancer Chemother Pharmacol**, v. 63, p. 1007–1016, 2009.

LU, J.; LI, G.; HE, K.; JIANG, W.; XU, C.; LI, Z.; WANG, H.; WANG, W.; WANG, H.; TENG, X.; TENG, L. Luteolin exerts a marked antitumor effect in cMet-overexpressing patient-derived tumor xenograft models of gastric cancer. **J Transl Med**. v. 1, p. 13-42, 2015.

LYAKHOVICH, V.V.; VAVILIN, V.A.; ZENKOV, N.K.; MENSCHCHIKOVA, E.B. Active defense under oxidative stress. The antioxidant responsive element. **Biochemistry. Biokhimiia**, v. 71, p. 962-974, 2006.

MA, J.; LI, Q.; ZHAO, J.; GUO, Y.; SU, Q.; JI, Z. Effects of apigenin on cell proliferation of human pancreatic carcinoma cell line BxPC-3 in vitro. **Journal of Nanjing Medical University**, v. 21, p. 94-98, 2007.

MAHAPATRA, D. K.; BHARTI, S. K.; ASATI, V. Anti-cancer chalcones: Structural and molecular target perspectives. **Eur J Med Chem.**, v. 15, p. 98:69-114, 2015.

MAHATO, R.; TAI, W.; CHENG, K. Prodrugs for improving efficiency. **Adv Drug Deliv Rev**, v. 63, n. 8, p. 659-70, 2011.

MAI, C. W.; YAEGHOobi, M.; ABD-RAHMAN, N.; KANG, Y. B.; PICHKA, M. R. Chalcones with electron-withdrawing and electron donating substituents: Anticancer activity against TRAIL resistant cancer cells, structureactivity relationship analysis and regulation of apoptotic proteins. **European Journal of Medicinal Chemistry**, v. 77, p. 378-387, 2014.

MALUMBRES, M.; BARBACID, M. Cell cycle, CDKs and cancer: a changing paradigm. **Nature Reviews Cancer**, v. 9, p. 153-166, 2009.

MALUMBRES, M.; BARBACID, M. Mammalian cyclin-dependent kinases. **Trends Biochem. Sci.** v. 30, p. 630–641, 2005.

MARIN, J. J. G.; ROMERO, M. R.; BRIZ, O. Molecular Bases of Liver Cancer Refractoriness to Pharmacological Treatment. **Curr Med Chem** v. 17, p. 709-740, 2010.

MARKLUND SL. Extracellular superoxide dismutase and other superoxide dismutase isoenzymes in tissues from nine mammalian species. **Biochem J.**, v. 222, p. 649–655, 1984.

MARTIN, S.J.; GREEN, D. R. Protease activation during apoptosis: death by a thousand cuts? **Cell**, v. 82, p. 349-352, 1995.

MASSAGUE, J. G1 cell-cycle control and cancer. **Nature**, v. 432, p. 298–306, 2004.

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.

MENDEZ-SANCHEZ, N.; RIDRUEJO, E.; ALVES DE MATTOS, A.; CHÁVEZ-TAPIA, N. C.; ZAPATA, R.; PARANÁ, R. Latin American Association for the Study of the Liver (LAASL) clinical practice guidelines: management of hepatocellular carcinoma. **Ann Hepatol**, v. 13, p. S4-40, 2014.

MICHEAU, O.; TSCHOPP, J. Induction of TNF receptor I-mediated apoptosis via two sequential signaling complexes. **Cell**. V. 114, p. 181-90, 2003.

MIERZIAK, J.; WOJTASIK, W.; KOSTYN, K.; CZUJ, T.; SZOPA, J.; KULMA, A. Crossbreeding of transgenic flax plants overproducing flavonoids and glucosyltransferase results in progeny with improved antifungal and antioxidative properties. *Mol Breed.*, v. 34(4), p. 1917-1932, 2014

MOON, D. O.; KIMA, M. O.; CHOIC, Y. H.; HYUNB, J. W.; CHANGB, W. Y.; KIMA, G. Y. Butein induces G2/M phase arrest and apoptosis in human hepatoma cancer cells through ROS generation. **Cancer Letters**, v. 288 p. 204–213, 2010.

MOORE, J. D. In the wrong place at the wrong time: does cyclin mislocalization drive oncogenic transformation? **Nature Reviews Cancer**, 13, 201-208, 2013.

Morgan, D. O. **The cell cycle: principles of control**. London: New Science Press, 297p, 2007.

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.

NAVARINI, A.; CHIARADIA, L.; MASCARELLO, A.; FRITZEN, M.; NUNES, R.; YUNES, R.; CRECZYNSKI-PASA, T. Hydroxychalcones induce apoptosis in B16-F10 melanoma cells via GSH and ATP depletion. **European Journal of Medicinal Chemistry**, v. 44, p.1630-1637, 2009.

NECKEL, G. L. **Atividade antineoplásica in vitro e in vivo da chalcona N9 e seu possível mecanismo de ação**. Florianópolis, 2011. Tese (Doutorado em Farmacologia) – Programa de Pós-Graduação em Farmacologia, Centro de Ciências Biológicas, Universidade Federal de Santa Catarina.

NESSA, M. U., et al. Synergism from combinations of cisplatin and oxaliplatin with quercetin and thymoquinone in human ovarian tumour models. **Anticancer Res.**, v. 31(11), p. 3789-97, 2011.

NEUSCHWANDER-TETRI, B. A.; CALDWELL, S. H. Nonalcoholic steatohepatitis: Summary of an AASLD single topic conference. **Hepatology**, v. 37, p. 1202-19, 2003.

NEVES, M.; CRAVO, S.; LIMA, R.; VASCONCELOS, H.; NASCIMENTO, S.; SILVA, A.M.; PINTO, M.; CIDADE, H.; CORRÊA, A.G. Solidphase synthesis of 20-hydroxychalcones. Effects on cell growth inhibition, cell cycle and apoptosis of human tumor cell lines. **Bioorganic & Medicinal Chemistry**, v.20, p. 25–33, 2012.

NG, K. B.; BUSTAMAM, A.; SUKARI, M. A, et al. Induction of selective cytotoxicity and apoptosis in human T4-lymphoblastoid cell line (CEMss) by boesenbergin a isolated from boesenbergia rotunda rhizomes involves mitochondrial pathway, activation of caspase 3 and G2/M phase cell cycle arrest. **BMC Complement Altern Med.**, v. 22; p.13:41, 2013.

NIKOLOVA, M.; PETROVA, M.; ZAYOVA, E.; VITKOVA, A.; EVSTATIEVA, L. Comparative study of in vitro, ex vitro and in vivo grown plants of Arnica montana – polyphenols and free radical scavenging activity. **Acta Bot. Croat**, v. 72, p. 13–22, 2013.

NISHIDA, K.; YAMAGUCHI, O.; OTSU, K. Crosstalk between autophagy and apoptosis in heart disease. **Circ. Res.** v.103, p. 343–351, 2008.

NORDBERG, J.; ARNÉR, E.S.J. Reactive oxygen species, antioxidants and the mammalian thioredoxin system. **Free Radical Biology and Medicine**, New York, v. 31, p. 1287-1312, 2001.

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

OLIVEIRA, B. H.; NAKASHIMA, T.; FILHO, J. D. S.; FREHSE, F. L. HPLC analysis of flavonoids in Eupatorium litorale. **J Braz Chem Soc**, v. 12, p. 243-246, 2001.

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.; TASDEMIR, D.; GOLLAIS, F.; DICATO, M.; DIEDERICH, M. Dietary chalcones with chemopreventive and chemotherapeutic potential. **Genes Nutr.**, v 6, p. 125–147, 2011.

OUYANG, L.; SHI, Z.; ZHAO, S.; WANG, F. T.; ZHOU, T. T.; LIU, B.; BAO, J. K. Programmed cell death pathways in cancer: a review of apoptosis, autophagy and programmed necrosis. **Cell Prolif.** v. 45, p. 487-98, 2012.

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, p. 710-7, 2010.

PAN, M.H., LAI, C.S., HSU, P.C.; WANG, Y.J. Acacetin induces apoptosis in human gastric carcinoma cells accompanied by activation of caspase cascades and production of reactive oxygen species. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, Washington, v. 53, p. 620–630, 2005.

PANG, R.; TSE, E.; POON, R. T. P. Molecular pathways in hepatocellular carcinoma. **Cancer Lett**, v. 240, p. 157-169, 2006.

PARK, M. T.; LEE, S. J. Cell Cycle and Cancer. **Journal of Biochemistry and Molecular Biology**, v. 36, p. 60-65, 2003.

PARKIN, D. M.; BRAY, F.; FERLAY, J.; PISANI, P. Estimating the world cancer burden: Globocan 2000. **Int J Cancer**, v. 94, p. 153-156, 2001.

PELED-KAMAR, M.; LOTEM, J.; OKON, E.; SACHS, L.; GRONER, Y. Thymic abnormalities and enhanced apoptosis of thymocytes and bone marrow cells in transgenic mice overexpressing Cu/Znsuperoxide dismutase: implications for Down syndrome. **EMBO Journal** v. 14, p. 4985-4993, 1995.

PELED-KAMAR, M.; LOTEM, J.; OKON, E.; SACHS, L.; GRONER, Y. Thymic abnormalities and enhanced apoptosis of thymocytes and bone marrow cells in transgenic mice overexpressing Cu/Znsuperoxide dismutase: implications for Down syndrome. **EMBO Journal**, v. 14, p. 4985-4993, 1995.

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

POON, R. T.; FAN, S. T. Hepatectomy for hepatocellular carcinoma: patient selection and postoperative outcome. **Liver Transpl**, v. 10, p. S39-45, 2004.

POUGET, C.; LAUTHIER, F.; SIMON, A.; FAGNERE, C.; BASLY, J. P.; DELAGE, C.; CHULIA, A. J. Flavonoids: Structural requirements for antiproliferative activity on breast cancer cells. **Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters**, v. 11, p. 3095-3097, 2001.

PRABHAKAR, V.; BALASUBRAMANIAN, R.; SATHE, P.; MURALI KRISHNA, C.; JUVEKAR, A. In Vitro Anticancer Activity of Monosubstituted Chalcone Derivatives. **International Journal of Tumor Therapy**, v. 3, p. 1-9, 2014.

PUSZYK, W. M.; THU, L. E. T.; CHAPPLE, S. J.; LIU, C. Linking metabolism and epigenetic regulation in development of hepatocellular carcinoma. **Lab Invest**, v. 93, p. 983-990, 2013

RAO, Y. K., TZENG, Y. Differential effects of synthesized 2"-oxygenated chalcone derivatives: modulation of human cell cycle phase distribution. **Bioorganic & Medicinal Chemistry**, v. 12, p. 2679-2686, 2004.

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

REDDY, M. V.; SU, C. R.; CHIOU, W. F.; LIU, Y. N.; CHEN, R. Y.; BASTOW, K. F.; LEE, K. H.; WU, T. S. Design, synthesis, and biological evaluation of Mannich bases of heterocyclic chalcone analogs as cytotoxic agents, **Bioorganic & Medicinal Chemistry**, v. 16, p. 7358-7370, 2008.

REILLY, M. L. Comparison of the *In Vitro* Cytotoxicity of Hydroxylamine Metabolites of Sulfamethoxazole and Dapsone. **Biochemical Pharmacology**, v. 55, p. 803-10, 1998.

REILLY, M. L. Comparison of the In Vitro Cytotoxicity of Hydroxylamine Metabolites of Sulfamethoxazole and Dapsone. **Biochemical Pharmacology**, v. 55, p. 803-810, 1998.

REN, J.; KOSTYN, K.; KULMA, A. Flavonoids as Important Molecules of Plant Interactions with the Environment. **Molecules**, v. 19, p. 16240–16265, 2014.

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

ROMAGNOLI, R., BARALDI, P. G.; CARRION, M. D.; CRUZ-LOPEZ, O.; CARA, C. L.; BALZARINI, J.; HAME, E.; CANELLA, A.; FABBRI, E.; GAMBARI, R.; BASSO, G.; VIOLA, G. Hybrid  $\alpha$ -bromoacryloylamido chalcones. Design, synthesis and biological evaluation. **Bioorg Med Chem Lett.**, v. 19, p. 2022–2028, 2009

ROYAIE, S.; SCHWARTZ, J. D.; SUNG, M. W.; EMRE, S. H.; MILLER, C. M.; GONDOLESI, G. E.; KRIEGER N. R.; SCHWARTZ, M.E. Recurrence of hepatocellular carcinoma after liver transplant: patterns and prognosis. **Liver Transplant**, v. 10, p.534-540, 2004.

SAELENS, X.; FESTJENS, N.; WALLE, L. V.; VAN GURP, M.; VAN LOO, G.; Vandenamele, P. Toxic proteins released from mitochondria in cell death, **Oncogene**, v. 23, p. 2861–2874, 2004.

SAFA, A. R.; DAY, T. W.; WU, C.H. Cellular FLICE-like inhibitory protein (C-FLIP): a novel target for cancer therapy. **Curr Cancer Drug Targets**, v. 8, 37-46, 2008.

SAMARGHANDIAN, S.; AFSHARI, J. T.; DAVOODI, S. Modulation of programmed cell death by honey bee in human prostate adenocarcinoma. **Journal of Medicinal Plants Research**, v. 4, p. 2551-2556, 2010

SANTAMARÍA, D.; BARRIÈRE, C.; CERQUEIRA, A.; HUNT, S.; TARDY, C.; NEWTON, K.; CÁCERES, J. F.; DUBUS, P.; MALUMBRES, M.; BARBACID, M. Cdk1 is sufficient to drive the mammalian cell cycle. **Nature**, v. 448, p. 811-5.

SANTOS, B. L.; OLIVEIRA, M. N.; COELHO, P. C.; PITANGA, B. P.; DA SILVA, A. B.; ADELITA, T.; SILVA, V. D.; COSTA, M. F.; EL-BACHÁ, R. S.; TARDY, M.; CHNEIWEISS, H.; JUNIE, M. P.; MOURA-NETO, V.; COSTA, S. L. Flavonoids

suppress human glioblastoma cell growth by inhibiting cell metabolism, migration, and by regulating extracellular matrix proteins and metalloproteinases expression. **Chem Biol Interact.** v. 242, p. 123-138, 2015.

SCHÜTTE, K.; BORNSCHEIN, J.; MALFERTHEINER, P. Hepatocellular carcinoma-epidemiological trends and risk factors. **Dig Dis**, v. 27, p 80-92, 2009.

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

SHARMA, A.; CHAKRAVARTI, B.; GUPTA, M. P.; SIDDIQUI, J. A.; KONWAR, R.; TRIPATHI, R. P. Synthesis and anti breast cancer activity of biphenyl based chalcones, **Bioorganic & Medicinal Chemistry**, v. 18, p. 4711-4720, 2010.

SHARMA, V.; KUMAR, V.; KUMAR, P. Heterocyclic chalcone analogues as potential anticancer agents. **Anticancer Agents Med Chem.** v. 13, p. 422-32, 2013.

SHEN, K.H.; CHANG, J. K.; HSU, Y. L.; KUO, P. L. Chalcone Arrests Cell Cycle Progression and Induces Apoptosis through Induction of Mitochondrial Pathway and Inhibition of Nuclear Factor Kappa B Signalling in Human Bladder Cancer Cells. **Basic & Clinical Pharmacology & Toxicology**, v 101, p. 254–261, 2007.

SHUKLA, S.; GUPTA, S. Apigenin-induced prostate cancer cell death is initiated by reactive oxygen species and p53 activation. **Free Radical Biology and Medicine**, v. 44, p. 1833-1845, 2008.

SIES, H. Biochemistry of oxidative stress. **Angewandte Chemie International Edition**, Ed. Engl., v. 25, p. 1058-1071, 1986.

SIES, H. Strategies of antioxidant defence. Review. **European Journal of Biochemistry**, Berlin, v. 215, n. 2, p. 213-219, 1993

SINGAL, A. G.; EL-SERAG, H. B. Hepatocellular Carcinoma from Epidemiology to Prevention: Translating Knowledge into Practice. **Clin Gastroenterol Hepatol**, 2015.

SINGH, M., KAUR, M., SILAKARI, O. Flavones: an important scaffold for medicinal chemistry. **European Journal of Medicinal Chemistry** v. 84, p. 206-239, 2014.

SINGH, P.; ANAND, A.; KUMAR, V. Recent developments in biological activities of chalcones: A mini review. **European Journal of Medicinal Chemistry**, v. 85, p. 758-777, 2014.

SINGH S, JOHNSON J, CHELLAPPAN S. Small molecule regulators of Rb-E2F pathway as modulators of transcription. **Biochim Biophys Acta.**, v. 1799, p. 788-94, 2010.

SONG, Y. W. *et al.* Synergistic effect of the novel benzochalcone derivative DK-78 and doxorubicin on MCF7-VN breast cancer stem cells. **Journal of the Korean Society for Applied Biological Chemistry**, v. 56, p. 631-635, 2013.

SOUZA, C.A.; VIGORITO, A. C.; ARANHA F. J. P.; OLIVEIRA, G. B.; EID, K. A. B.; RUIZ, M. A. Terapêutica citoprotetora em pacientes tratados com quimio e/ou

radioterapia anti neoplásica. **Rev. Bras. Hematol. Hemoter.** São José do Rio Preto, v. 22, p. 123-128, 2000

STAGOS, D.; AMOUTZIAS, G. D.; MATAKOS, A.; SPYROU, A.; TSATSAKIS, A. M.; KOURETAS, D. Chemoprevention of liver cancer by plant polyphenols. **Food Chem Toxicol**, v. 50, p. 2155-2170, 2012.

SYAM, S.; ABDELWAHAB, S. I.; AL-MAMARY, M.A.; MOHAN, S. Synthesis of chalcones with anticancer activities, **Molecules**, v. 17, p. 6179-6195, 2012.

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

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.

TAMIELLO, C. **Efeitos da 3-nitrochalcona sobre células de hepatoma humano (HepG2)**. Curitiba, 2013. 82p. Dissertação (Mestrado em Bioquímica) – Setor de Ciências Biológicas, Universidade Federal do Paraná.

TANG, X; WANG, H.; FAN, L.; WU, X.; XIN, A.; REN, H.; WANG, X. J. Luteolin Inhibits NRF2 Leading to Negative Regulation of the NRF2/ARE Pathway and Sensitization of Human Lung Carcinoma A549 Cells to Therapeutic Drugs. **Free Radical Biology and Medicine**, v. 50, p. 1599–1609, 2011.

TANIGAWA, S.; FUJII, M.; HOU, D. X. Action of Nrf2 and Keap1 in ARE-mediated NQO1 expression by quercetin. **Free Radic Biol Med.**, v. 42(11), p. 1690-703, 2007.

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.

UEDA, S.; NAKAMURA, H.; MASUTANI, H.; SASADA, T.; TAKABAYASHI, A.; YAMAOKA, Y.; YODOI, J. Baicalin induces apoptosis via mitochondrial pathway as prooxidant. **Molecular Immunology**, v. 38, p. 781-791, 2002.

ULLMANNOVA, V.; POPESCU, N. C. Inhibition of cell proliferation, induction of apoptosis, reactivation of DLC1, and modulation of other gene expression by dietary flavone in breast cancer cell lines. **Cancer Detection and Prevention**, v. 31, p. 110-118, 2007.

VALDAMERI, G.; KENSKI, J. C. N.; MOURE, V. R.; TROMBETTA-LIMA, M. MARTINEZ, G. R.; SOGAYAR, M. C.; WINNISCHOFER, S. M. B.; ROCHA, M. E. M. Flavone Induces Cell Death in Human Hepatoma HepG2 Cells. **Nat Prod Commun**, v. 9, p. 1457-1460, 2014.

VALDAMERI, G.; TROMBETTA-LIMA, M.; WOLFEL, P. R.; PIRES, A. R. A.; MARTINEZ, G. R.; NOLETO, G. R.; CADENA, S. M. S. C.; SOGAYAR, M. C.; WINNISCHOFER, S. M. B.; ROCHA, M. E. M. involvement of catalase in the

apoptotic mechanism induced by apigenin in HepG2 human hepatoma cells. **Chemico-Biological Interactions**, v.193, p. 180–189, 2011.

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

VINDELOV, L.L., CHRISTENSEN, I.J. AND NISSEN, N.I. A detergent-trypsin method for the preparation of nuclei for flow cytometric DNA analysis. **Cytometry**, v. 3, p. 323-327, 1993

VITALE, I.; GALLUZZI, L.; CASTEDO, M.; KROEMER G. Mitotic catastrophe: a mechanism for avoiding genomic instability. **Nat Rev Mol Cell Biol.** v. 12, p. 385-92, 2011.

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

WALCZAK, H.; KRAMMER, P. H. The CD95 (APO-1/Fas) and the TRAIL (APO-2L) apoptosis systems. **Exp Cell Res.**, v.256, p. 58-66, 2000.

WENZEL, H.; KUNTZ, S.; BRENDDEL, M. D.; DANIEL, H. Dietary flavone is a potent apoptosis inducer in human colon carcinoma cells. **Cancer Research**, v. 60, p. 3823- 3831, 2000.

WENZEL, U.; NICKEL, A.; DANIEL, H. Increased mitochondrial palmitoylcarnitine/carnitine counter transport by flavone causes oxidative stress and apoptosis in colon cancer cells. **Cellular and Molecular Life Sciences**, v. 62, p. 3100- 3105, 2005.

WANG, S.; EL-DEIRY, W. S. TRAIL and apoptosis induction by TNF-family death receptors. *Oncogene*, v. 22, p. 8628–8633, 2003.

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.

WHITE, E. Deconvoluting the context-dependent role for autophagy in cancer. **Nat. Rev. Cancer.** v. 12, p. 401–410, 2012.

WILLIAMS, G. H.; STOEBER, K. The cell cycle and cancer. **J Pathol**, v. 226, p. 352–364, 2012.

WINTER, E.; CHIARADIA, L. D.; CORDOVA, A. S.; NUNES, R. J.; YUNES, R. A.; CRECZYNSKI-PASA, T. B. Naphthylchalcones induce apoptosis and caspase activation in a leukemia cell line: The relationship between mitochondrial damage, oxidative stress, and cell death. **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.



WÖRNS, M. A.; GALLE, P. R. Future perspectives in hepatocellular carcinoma. **Dig Liver Dis**, v. 42, p. S302-9, 2010.

WÖRNS, M. A.; WEINMANN, A.; SCHUCHMANN, M.; GALLE, P. R. Systemic Therapies in Hepatocellular Carcinoma. **Dig Dis**, v. 27, p. 175-188, 2009.

WRZESINSKI, S. H.; TADDEI, T. H.; STRAZZABOSCO, M. Systemic Therapy in Hepatocellular Carcinoma. **Clinics in Liver Disease**, v. 15, p. 423+, 2011

WOO, H. Y.; HEO, J. New perspectives on the management of hepatocellular carcinoma with portal vein thrombosis. **Clin Mol Hepatol**, v. 21, n. 2, p. 115-21, 2015.

WU, B.; ZHANG, Q.; SHEN, W.; ZHU, J. Anti-proliferative and chemosensitizing effects of luteolin on human gastric cancer AGS cell line. **Mol Cel Biochem** v. 313, p. 125-132, 2008.

WU, J. Z.; CHENG, C C.; SHEN, L. L.; WANG, Z. K.; WU, S. B.; LI, W. L.; CHEN, S. H.; ZHOU, R.P.; QIU, P.H. Synthetic Chalcones with Potent Antioxidant Ability on H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>-Induced Apoptosis in PC12 Cells. **Int J Mol Sci**. v. 15, p. 18525–18539, 2014.

YADAV, V.; PRASAD, S.; SUNG, B.; AGGARWAL, B. The role of chalcones in suppression of NF- $\kappa$ B-mediated inflammation and câncer. **International Immunopharmacology**, v. 11, p. 295-309, 2011.

YAMAOKA, Y.; YODOI, J. Baicalin induces apoptosis via mitochondrial pathway as prooxidant. **Molecular Immunology**, v. 38, p. 781-791, 2002.

YANG, J. M.; HUNG, C. M.; FU, C. N.; LEE, J. C.; HUANG, C. H.; YANG, M. H.; LIN, C. L.; KAO, J. Y.; WAY, T. D. Hispidulin Sensitizes Human Ovarian Cancer Cells to TRAIL-Induced Apoptosis by AMPK Activation Leading to Mcl-1 Block in Translation. **J Agric Food Chem**, 58, p. 10020-10026, 2010.

YEO, W.; MOK, T. S.; ZEE, B.; LEUNG, T. W.; LAI, P. B.; LAU, W. Y.; KOH, J.; MO, F. K.; YU, S. C.; CHAN, A. T.; HUI, P.; MA, B.; LAM, K. C.; HO, W. M.; WONG, H. T.; TANG, A.; JOHNSON, P. J. A randomized phase III study of doxorubicin versus cisplatin/interferon alpha-2b/doxorubicin/fluorouracil (PIAF) combination chemotherapy for unresectable hepatocellular carcinoma. **J Natl Cancer Inst**, v. 97, 1532-8, 2005.

ZAFARULLAHA, M.; LI, W.Q.; SYLVESTER, J.; AHMAD, M. Molecular mechanisms of N-acetylcysteine actions. **Cellular and Molecular Life Sciences**, v. 60, p. 6–20, 2003.

ZHANG, X. D.; FRANCO, A.; MYERS, K.; GRAY, C.; NGUYEN, T.; HERSEY, P. Relation of TNF-related apoptosis-inducing ligand (TRAIL) receptor and FLICE-inhibitory protein expression to TRAIL-induced apoptosis of melanoma. **Cancer Res.**, 59, 2747–2753, 1999.

ZHANG, S.; YANG, X.; MORRIS, M. E. Flavonoids Are Inhibitors of Breast Cancer Resistance Protein (ABCG2)-Mediated Transport. **Mol Pharmacol** 65:1208–1216, 2004.

ZHANG, F. L., *et al.* Effects of quercetin and quercetin in combination with cisplatin on adhesion, migration and invasion of HeLa cells. **Zhonghua Fu Chan Ke Za Zhi.**, v. 43(8), p. 619-21, 2008.

ZHANG, F. L., *et al.* Sorafenib improves the survival at patients with advanced hepatocellular carcinoma: a meta-analysis of randomized trials. **Anti-cancer Drugs**, v. 21 (3), p. 326-331, 2010.

ZHAO, J. L.; ZHAO, J.; JIAO, H. J. Synergistic growth-suppressive effects of quercetin and cisplatin on HepG2 human hepatocellular carcinoma cells. **Appl Biochem Biotechnol.** v. 172, p. 784-91, 2014.

ZONG, W. X.; DITSWORTH, D.; BAUER, D. E; WANG, Z. Q.; Thompson, C.B. Alkylating DNA damage stimulates a regulated form of necrotic cell death. **Genes Dev.** v. 18, p. 1272–1282, 2004.

ZOROV, D.B., JUHASZOVA, M., SOLLOTT, S.J. Mitochondrial reactive oxygen species (ROS) and ROS-induced ROS release. **Physiol Rev.**, v. 94, p. 909-50, 2014.

## **10. ARTIGOS CIENTÍFICOS**

10.1 ARTIGO 1- Publicado na Revista Molecular and Cellular Biochemistry, 2015  
Nov; 409 (1-2):123-33 (DOI 10.1007/s11010-015-2518-8) (EM ANEXO)

10.2 ARTIGO 2- Será submetido à Bioorganic and Medicinal Chemistry neste ano de 2016.