

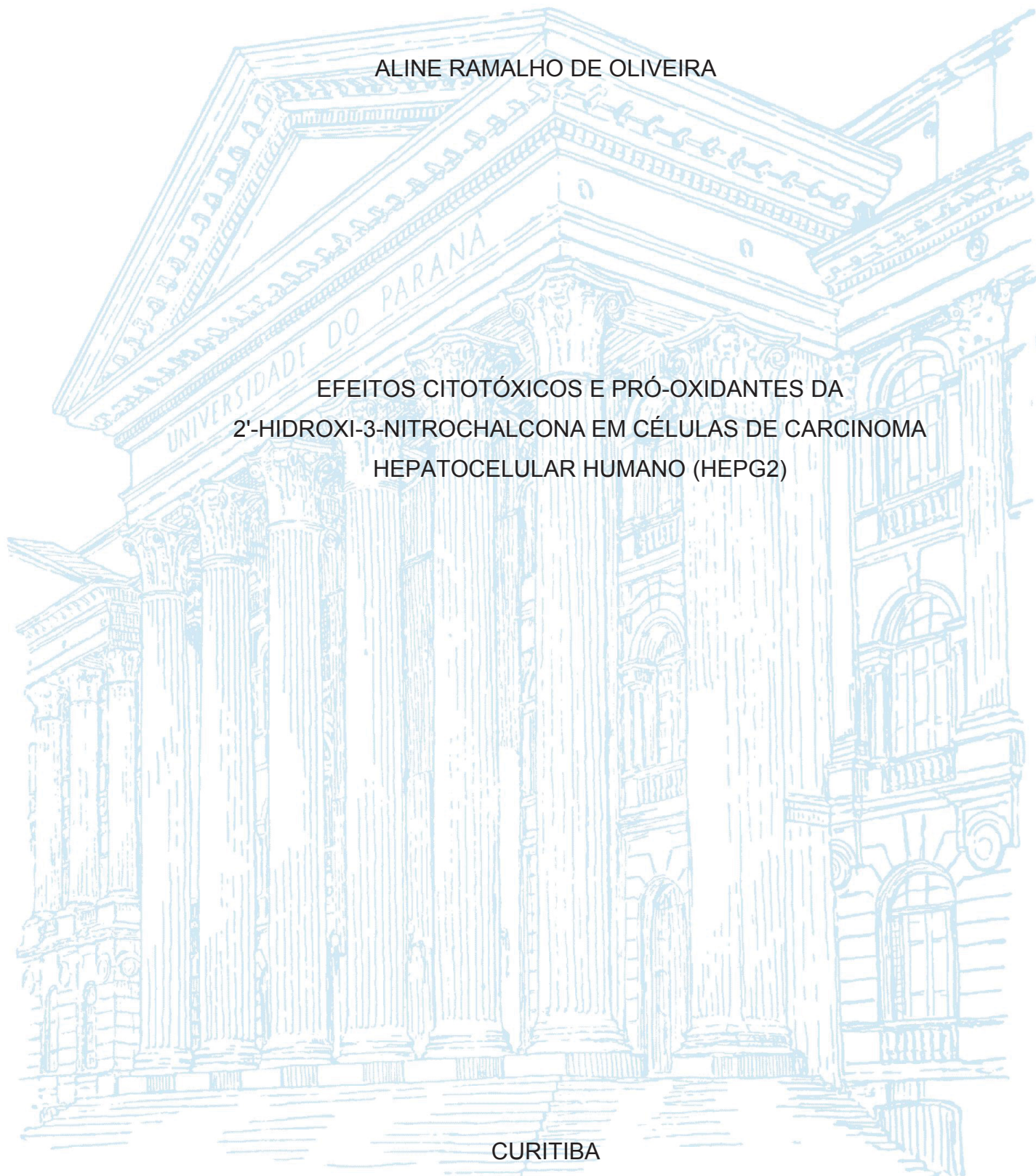
UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ

ALINE RAMALHO DE OLIVEIRA

EFEITOS CITOTÓXICOS E PRÓ-OXIDANTES DA
2'-HIDROXI-3-NITROCHALCONA EM CÉLULAS DE CARCINOMA
HEPATOCELULAR HUMANO (HEPG2)

CURITIBA

2018



ALINE RAMALHO DE OLIVEIRA

EFEITOS CITOTÓXICOS E PRÓ-OXIDANTES DA
2'-HIDROXI-3-NITROCHALCONA EM CÉLULAS DE CARCINOMA
HEPATOCELULAR HUMANO (HEPG2)

Dissertação de mestrado apresentada ao curso de Pós-Graduação em Ciências - Bioquímica, Setor de Ciências Biológicas, Universidade Federal do Paraná, como requisito parcial à obtenção do título de Mestre em Ciências – Bioquímica.

Orientadora: Profa. Dra. Maria Eliane Merlin
Rocha

Coorientadores: Profa. Dra. Sheila Maria Brochado
Winnischofer
Prof. Dr. Glaucio Valdameri

CURITIBA

2018

Universidade Federal do Paraná. Sistema de Bibliotecas.
Biblioteca de Ciências Biológicas.
(Carla Fabiane Rasmussen – CRB/9-940).

Oliveira, Aline Ramalho de.

Efeitos citotóxicos e pró-oxidantes da 2'-hidroxi-3-nitrochalcona em células de carcinoma hepatocelular humano (HEPG2). / Aline Ramalho de Oliveira. – Curitiba, 2018.

74 p. : il. ; 30cm.

Orientadora: Maria Eliane Merlin Rocha.

Coorientadora: Sheila Maria Brochado Winnischofer.

Coorientador: Glaucio Valdameri.

Dissertação (Mestrado) – Universidade Federal do Paraná, Setor de Ciências Biológicas. Programa de Pós-Graduação em Ciências – Bioquímica.

1. Mitochondria. 2. Carcinoma. I. Título. II. Rocha, Maria Eliane Merlin. III. Winnischofer, Sheila Maria Brochado. IV. Valdameri, Glaucio. V. Universidade Federal do Paraná. Setor de Ciências Biológicas. Programa de Pós-Graduação em Ciências – Bioquímica.

CDD (20. ed.) 574.87342

TERMO DE APROVAÇÃO

Os membros da Banca Examinadora designada pelo Colegiado do Programa de Pós-Graduação em CIÊNCIAS (BIOQUÍMICA) da Universidade Federal do Paraná foram convocados para realizar a arguição da Dissertação de Mestrado de **ALINE RAMALHO DE OLIVEIRA**, intitulada: **EFEITOS CITOTÓXICOS E PRÓ-OXIDANTES DA 2'-HIDROXI-3-NITROCHALCONA EM CÉLULAS DE CARCINOMA HEPATOCELULAR HUMANO (HEPG2)**, após terem inquirido a aluna e realizado a avaliação do trabalho, são de parecer pela sua aprovação no rito de defesa.

A outorga do título de Mestre está sujeita à homologação pelo colegiado, ao atendimento de todas as indicações e correções solicitadas pela banca e ao pleno atendimento das demandas regimentais do Programa de Pós-Graduação.

Curitiba, 29 de Agosto de 2018.



MARIA ELIANE MERLIN ROCHA(UFPR)
(Presidente da Banca Examinadora)



GLÁUCIA REGINA MARTINEZ(UFPR)



LIA SUMIE NAKAO(UFPR)

AGRADECIMENTOS

Primeiro de tudo, gostaria de agradecer a Deus por me conceder saúde, sabedoria e tranquilidade para seguir em frente e não desistir em frente as dificuldades.

Agradeço a minha orientadora, Profa. Maria Eliane, pela orientação, conversas, conhecimento transmitido, paciência e carinho.

A minha co-orientadora Prof. Sheila, pelas conversas sobre os experimentos, sugestões e também pelo carinho.

Ao meu coorientador Prof. Glaucio pela ajuda nos experimentos de citometria de fluxo.

Ao Prof. Emanuel Maltempi de Souza por facilitar o uso do citômetro de fluxo.

Ao Prof. Silvio Sanches (Biologia Celular) por permitir o uso do leitor de microplaca.

Agradeço a minha família pelo apoio e compreensão nos meus momentos de ausência.

Agradeço ao Henrique, pelo amor, carinho e paciência.

Agradeço a todos os amigos que fiz durante esses dois anos: Elaine, Beth, Leo, Carol, Ana P, Ju K, Ju C, Day, Diego, Aninha e Rafa. Vocês me ajudaram muito e fizeram com que essa caminhada fosse leve e divertida.

Agradeço às técnicas do laboratório de Cultivo Celular, por toda dedicação e organização do laboratório.

Agradeço à Pós-Graduação em Ciências-Bioquímica representada pelos professores Glaucia e Guilherme e pelo secretário Thiago.

Agradeço a CAPES e CNPQ pelo auxílio financeiro.

RESUMO

Chalconas são compostos intermediários na via de síntese dos flavonoides. As chalconas possuem uma grande diversidade estrutural, o que contribui para as diferentes atividades biológicas que elas exercem. São conhecidos os efeitos de algumas chalconas hidroxiladas na posição 2' sobre células tumorais, contudo sabe-se pouco em relação aos efeitos citotóxicos sobre células tumorais promovidos com a adição de grupamento nitro na estrutura das chalconas. A presença do grupo nitro pode contribuir para aumentar a reatividade da região da carbonila α,β -insaturada (sistema ceto-enona) das chalconas. Neste estudo foi avaliada a citotoxicidade da 2'-hidroxi-3-nitrochalcona (HNC) em células de carcinoma hepatocelular humano (HepG2). A HNC foi capaz de induzir citotoxicidade de forma estatisticamente significativa a partir da concentração de 15 μM após 24 horas de incubação pelo método do MTT e 20 μM pelo método da LDH. A HNC (15 e 20 μM) foi capaz de promover o aumento dos níveis de espécies reativas de oxigênio (EROs), sendo esse aumento parcialmente revertido pela pré-incubação com o antioxidante NAC na concentração de 20 μM da HNC, sugerindo a participação de EROs no mecanismo citotóxico. O mecanismo de morte celular induzido pela HNC (15 e 20 μM) foi investigado, utilizando marcação com anexina-V / iodeto de propídio e inibidores específicos de vias de sinalização de ferroptose, necroptose e autofagia, e os resultados mostram um possível processo apoptótico. Foi demonstrado através da avaliação da respiração celular que a HNC (15 e 20 μM – 24 horas) provocou disfunção mitocondrial, diminuindo o consumo de oxigênio no estado basal e com a adição de substratos para o complexo I e II, porém essa diminuição não foi observada com a adição de substrato para o complexo IV. Também foi observada uma diminuição no potencial da membrana mitocondrial com a concentração de 20 μM . Diante dos resultados, pode-se concluir que a HNC exerce atividade citotóxica por alterar os níveis de EROs, promover disfunção mitocondrial e possivelmente causar morte celular por apoptose.

Palavras-chave: Nitrochalconas. Células HepG2. EROs. Mitocôndria. Apoptose

ABSTRACT

Chalcones are intermediate compounds in the synthesis pathway of flavonoids. Chalcones have great structural diversity, contributing to the different biological activities that they display. It is known that hydroxyl group in chalcones contributes to the cytotoxic effect in cancer cells. The nitro group is widely found in various pharmacological compounds. However, little is known about its effect on chalcones. In this study, the cytotoxicity of 2'-hydroxy-3-nitrochalcone was evaluated in human hepatocellular carcinoma cells (HepG2). HNC was able to induce cytotoxicity from the 15 μM concentration assessed by the MTT method and 20 μM by the LDH method in 24 hours of treatment. The effect of HNC (15 and 20 μM) on the increase of reactive oxygen species (ROS) was evaluated, and an increase in ROS caused by both concentrations was observed. This increase was partially reversed with the pre-incubation of the antioxidant NAC at the concentration of 20 μM , suggesting the participation of ROS in the cytotoxic mechanism. The results of the experiment using annexin-V/propidium iodide indicate that the possible mechanism of cell death induced by HNC (15 and 20 μM) in 24 hours is apoptosis. Results from the cell viability assay using inhibitors of ferroptosis, necroptosis and autophagy suggested that these mechanisms are not involved in the cytotoxic effect caused by HNC. It was demonstrated by the cellular respiration evaluation that HNC (15 and 20 μM - 24 hours) caused mitochondrial dysfunction, reducing the oxygen consumption in the basal state and with the addition of substrates for the complexes I and II, but this decrease was not observed with the addition of substrate for IV complex. A decrease in the mitochondrial membrane potential with the concentration of 20 μM was also observed. Thus, we conclude that HNC exerts cytotoxic activity by altering ROS levels, mitochondrial function and possibly causing apoptosis cell death.

Keywords: Nitrochalcones. HepG2 cells. ROS. Mitochondria. Apoptosis

LISTA DE FIGURAS

FIGURA 1 – FLUXOGRAMA EXPERIMENTAL.....	18
FIGURA 2- VIAS DE ATIVAÇÃO DE APOPTOSE EXTRÍNSECA E INTRÍNSECA..	23
FIGURA 3 – ESTRUTURA BÁSICA DAS CHALCONAS	30
FIGURA 4 - ESTRUTURA QUÍMICA DA HNC.....	32

LISTA DE FIGURAS DO ARTIGO CIENTÍFICO

FIGURE 1 – STRUCTURE OF HNC	39
FIGURE 2– CYTOTOXIC EFFECT OF HNC ON HEPG2 CELLS ASSESSED BY MTT ASSAY.....	40
FIGURE 3 – CYTOTOXIC EFFECT OF HNC ON HEPG2 CELLS ASSESSED BY LDH RELEASE ASSAY.....	41
FIGURE 4 - EFFECTS OF HNC ON INTRACELLULAR ROS LEVELS.....	42
FIGURE 5 – EFFECTS OF NAC ON CELL CYTOTOXICITY INDUCED BY HNC...43	
FIGURE 6 – CYTOTOXIC EFFECT OF HNC USING CELL DEATH INHIBITORS...44	
FIGURE 7 – FLOW CYTOMETRY ANALYSIS OF CELL DEATH USING ANNEXIN V-FITC AND PI.....	45
FIGURE 8 – ANNEXIN V-FITC/PI DOUBLE STAINING ANALYSIS OF APOPTOSIS IN HEPG2 CELLS AT 24 HOURS POST-HNC TREATMENT.....	46
FIGURE 9 – EFFECT OF HNC ON MRC.....	47
FIGURE 10– EFFECTS OF HNC ON MITOCHONDRIAL MEMBRANE POTENTIAL.....	48

LISTA DE TABELAS

TABELA 1 – CARACTERÍSTICAS MORFOLÓGICAS E BIOQUÍMICAS DE CÉLULAS APOPTÓTICAS.....	21
--	----

LISTA DE ABREVIATURAS OU SIGLAS

ADP	- Difosfato de adenosina
APO-1	- Apolipoproteína
APAF-1	- Fator de ativação de apoptose 1
AIF	- Fator de indução de apoptose
BECN1	- <i>Beclin 1</i>
CARD	- Fator de ativação protease-apoptótica
CD95	- Membro da superfamília de receptores TNF
clAP	- Inibidor de apoptose 1
CHC	- Carcinoma hepatocelular
DISC	- Complexo sinalizador de indução de morte
DMSO	- Dimetilsulfóxido
DCFH-DA	- 2'-7'- Diacetato de diclorofluoresceína
EROs/ROS	- Espécies reativas de oxigênio/ Reactive oxygen species
EGF	- Fator de crescimento epidermal
ESCRT	- <i>Endosomal Sorting Complex Required of Transport</i>
FADD	- Proteína associada a FAS com domínio de morte
FASL	- Ligante do receptor FAS
FCCP	- Fluorocarbonil-cianeto fenilhidrazona
GPX4	- Glutaciona peroxidase 4
IFN	- Interferon
LDH	- Lactato desidrogenase
MLKL	- Mixed lineage kinase domain like pseudokinase
MMP	- Mitochondrial membrane potential
MRC	- <i>Mitochondrial respiratory chain</i>
MTT	- Brometo de 3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difeniltetrazólio
NAC	- N-acetil cisteína
PBS	- Solução salina tamponada
PI3K	- Fosfoinosítideo 3-quinase
RAB7	- Proteína relacionada ao RAS
RAF-1	- <i>Proto-oncogene serine/threonine-protein kinase</i>
RIP1	- <i>Receptor-interacting serine/threonine-protein kinase 1</i>
RIP3	- <i>Receptor-interacting serine/threonine-protein kinase 3</i>

Rho123	- Rodamina 123
SNARES	- <i>Soluble NSF attachment protein receptors</i>
TMPD	- N,N,N,N-tetrametil-p-fenileno-diamina
TNF	- Fator de necrose tumoral
TRADD	- <i>TNFR1-associated death domain protein</i>
TRAIL	- Ligante indutor de apoptose relacionado ao TNF
VPS34	- <i>Vacuolar Protein Sorting</i>

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	16
1.1	JUSTIFICATIVA.....	17
1.2	OBJETIVOS	18
1.2.1	Objetivo geral	18
1.2.2	Objetivos específicos.....	18
1.3	ESTRATÉGIA EXPERIMENTAL.....	18
2	REVISÃO DE LITERATURA.....	18
2.1	CARCINOMA HEPATOCELULAR.....	18
2.2	MECANISMOS DE AÇÃO CITOTÓXICA.....	20
2.2.1	Apoptose	20
2.2.1.1	Apoptose via extrínseca.....	22
2.2.1.2	Apoptose via intrínseca.....	22
2.2.2	Ferroptose.....	23
2.2.3	Necroptose.....	24
2.2.4	Autofagia.....	25
2.3	PARTICIPAÇÃO DE EROS EM MECANISMOS DE MORTE CELULAR.....	26
2.4	ESTRESSE OXIDATIVO.....	26
2.5	MITOCÔNDRIAS COMO ALVO ANTITUMORAL.....	28
2.6	FLAVONÓIDES.....	29
2.7	CHALCONAS.....	30
2.7.1	Chalconas hidroxiladas.....	30
2.7.2	Chalconas nitradas.....	31
3	ARTIGO CIÊNTÍFICO	32
1	INTRODUCTION.....	34
2	MATERIALS AND METHODS.....	35
2.1	MATERIALS.....	35
2.2	CELL CULTURE.....	36
2.3	METHODS.....	36
2.3.1	MTT assay.....	36
2.3.2	LDH release assay.....	36
2.3.3	Annexin-V-FITC/propidium iodide double labeling assay.....	37

2.3.4	Measurement of intracellular ROS.....	37
2.3.5	Analysis of mitochondrial respiratory chain complexes.....	37
2.3.6	Measurement of mitochondrial membrane potential.....	38
2.3.7	Statistical Analysis.....	38
3	RESULTS.....	39
3.1	Cytotoxic effects of HNC on HepG2 cells.....	39
3.2	HNC-induced ROS generation and its relationship with cytotoxicity in HepG2 cells.....	41
3.3	Effect of HNC on cell death induction.....	43
3.4	Effect of HNC on mitochondrial respiratory chain in HepG2.....	46
3.5	Effect of HNC on mitochondrial membrane potential ($\Delta\Psi_m$).....	48
4	Discussion	48
5	Conclusion	52
6	References	53
4	CONSIDERAÇÕES FINAIS	60
5	CONCLUSÃO	62
	REFERÊNCIAS	63

1 INTRODUÇÃO

O câncer é um problema crescente de saúde pública sendo a segunda causa de morte ficando atrás apenas das doenças cardiovasculares (AMERICAN CANCER SOCIETY, 2018). São estimados perto de 1,7 milhões de novos casos diagnosticados em 2018 nos Estados Unidos (AMERICAN CANCER SOCIETY, 2018). No Brasil, são estimados mais de 600 mil novos casos para o ano de 2018 (INCA, 2018). O câncer pode ser caracterizado como um conjunto de doenças que atinge diferentes órgãos e tecidos onde as células afetadas compartilham de características similares como crescimento celular desregulado e capacidade de invasão e metástase (COLEMAN; TSONGALIS, 2017).

Um dos tipos mais comuns de câncer no mundo é o carcinoma hepatocelular (CHC) ou hepatocarcinoma. O CHC é o câncer primário mais frequente dentre as neoplasias que acometem o fígado (FORNER et al., 2018). Esse tipo de tumor pode se originar devido as mutações causadas, por exemplo, por agentes externos, como o vírus da hepatite (GOMES et al., 2013). O CHC é extremamente agressivo e os sintomas aparecem apenas quando o tumor atingiu estágio avançado (GOMES et al. 2013). Os tratamentos disponíveis atualmente dependem do estadiamento do tumor. Para tumores em estágio inicial e intermediário, onde a doença ainda é localizada apenas no fígado, é recomendado transplante, ressecção, ablação e quimioembolização (FORNER et al., 2018). Quando a doença se encontra em estágio avançado, os quimioterápicos disponíveis são o sorafenibe e o regorafenibe (BRUIX et al., 2017; LLOVET et al., 2008). Porém, essas drogas são pouco efetivas e apresentam vários efeitos colaterais (BRUIX et al., 2017; LLOVET et al., 2008). Como as opções de tratamento disponíveis para as fases mais avançadas não possibilitam a cura, o desenvolvimento de novas drogas é necessário.

Neste contexto, os flavonoides têm sido cada vez mais estudados pois vários deles têm mostrado grande variedade de atividades biológicas como anti-inflamatória (PELUSO et al., 2013), cardioprotetora (WALLACE; TAYLOR, 2011), e anticancerígena (SOUZA et al., 2018). As chalconas, uma classe de compostos incluída no grupo dos flavonoides, também possuem diversas atividades biológicas descritas na literatura, com destaque para o seu potencial citotóxico em células tumorais (NAKHJAVANI et al., 2014; JAIN et al., 2014). Os diversos efeitos biológicos exercidos pelas chalconas se devem a sua diversidade estrutural, ou seja, a presença

de diferentes grupos substituintes em ambos os anéis aromáticos que compõe a sua estrutura. Muitos estudos relatam a presença e influência do grupo hidroxila nas chalconas. Chalconas hidroxiladas, incluindo grupos hidroxilas na posição 2' (Anel A), exerceram atividade citotóxica em várias linhagens celulares como de melanoma (NAVARINI et al., 2009) e de carcinoma hepatocelular (WEI et al., 2013) (ECHEVERRIA et al., 2009). O efeito biológico do grupo nitro, apesar de estar presente em vários fármacos (CHIN CHUNG et al., 2011), ainda é pouco explorado nas chalconas. Sabe-se que esse substituinte tem grande potencial em produzir espécies reativas de oxigênio (EROs) (BOELSTERLI et al., 2006). A capacidade de induzir aumento nos níveis de EROs em células tumorais é um dos mecanismos citotóxicos utilizados tanto por quimioterápicos convencionais (TEPPO et al., 2017), como por terapias recém desenvolvidas como a imunoterapia (HABTETSION et al., 2018).

Ainda, compostos que têm como alvo a mitocôndria tem sido reportados na literatura como promissores no tratamento do câncer (NEUZIL et al., 2013). Esses compostos além de alterarem o metabolismo mitocondrial, podem induzir morte celular por apoptose (SHIAU et al., 2006).

Logo, considerando a necessidade de desenvolver novos compostos mais eficazes no tratamento do CHC e a quantidade limitada de estudos sobre os efeitos citotóxicos das nitrochalconas, neste estudo foi avaliado os efeitos citotóxicos e pró-oxidantes da 2'-hidroxi-3-nitrochalcona (HNC) em células de hepatocarcinoma humano (linhagem HepG2).

1.1 JUSTIFICATIVA

Existe uma constante busca de novas abordagens para o tratamento do CHC. Neste contexto, destacam-se as chalconas devido as suas diversas atividades biológicas e, ainda, em razão da possibilidade de potencialização de seus efeitos pela substituição por diversos grupos químicos. Chalconas nitradas têm sido pouco exploradas no contexto antitumoral. Diante disso, foram propostos os seguintes objetivos:

1.2 OBJETIVOS

1.2.1 Objetivo geral

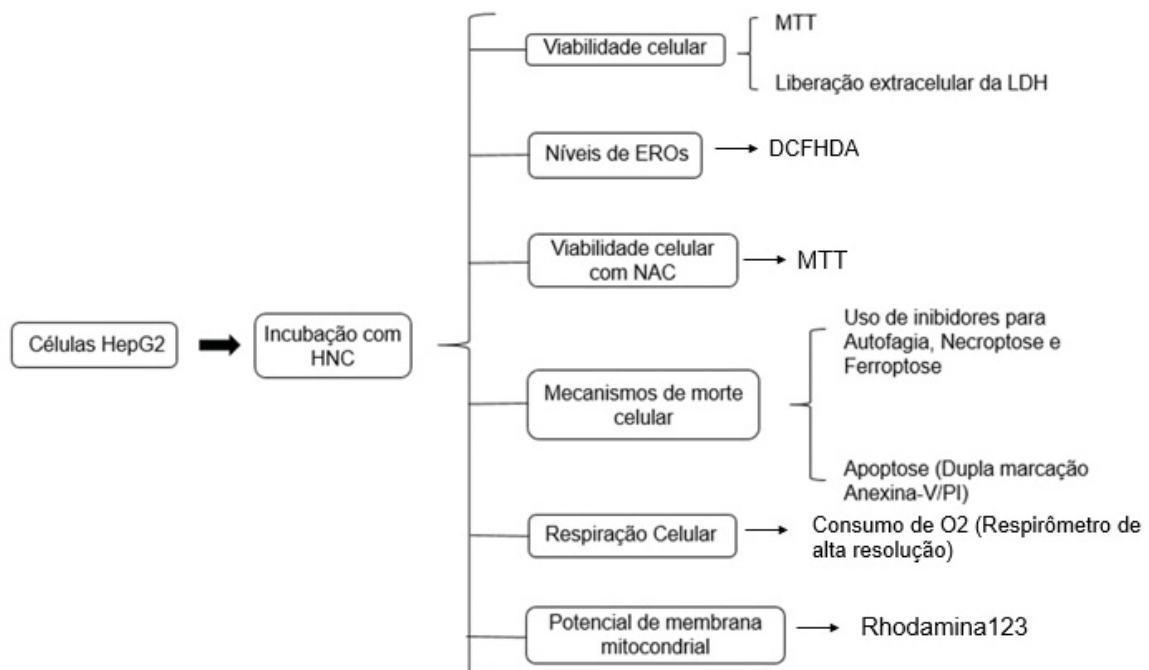
Avaliar os efeitos citotóxicos, pró-oxidantes e mitocondriais da HNC em células HepG2 de forma a contribuir no entendimento do seu mecanismo de ação.

1.2.2 Objetivos específicos

- Avaliar a citotoxicidade da HNC.
- Avaliar se existe aumento de EROs causado pela HNC e se esse aumento está relacionado com o seu efeito citotóxico.
- Avaliar possíveis mecanismos de morte celular causado pela HNC.
- Avaliar os efeitos da HNC na respiração celular e no potencial de membrana mitocondrial.

1.3 Estratégia experimental

Figura 1: Fluxograma experimental



Fonte: O autor (2018)

2. REVISÃO DE LITERATURA

2.1 CARCINOMA HEPATOCELULAR

O carcinoma hepatocelular (CHC) é o tumor primário mais comum que ocorre no fígado e o sexto mais diagnosticado no mundo (BALOGH et al., 2016). O CHC ocorre mais em homens do que mulheres (2,4:1) com uma maior incidência em países da Ásia e África subsaariana (GRAZIE et al., 2017). A alta incidência nessas regiões pode ser parcialmente explicada pela alta prevalência de fatores de risco, especialmente infecção de vírus da Hepatite B e a presença de aflatoxina em alimentos (LLOVET et al., 2004).

Em países como o Brasil, Reino Unido e EUA, o CHC não está entre as neoplasias mais incidentes. Porém, essa incidência vem aumentando (CARRILHO et al., 2010) principalmente devido ao aumento no consumo de álcool. De acordo com os dados do Sistema Único de Saúde (SUS), de 2011 a 2015 mais de 44 mil pessoas morreram devido ao CHC no Brasil (SOCIEDADE BRASILEIRA DE ONCOLOGIA CLÍNICA, 2018).

Outros fatores de risco comuns relacionados ao CHC são as infecções causadas pelos vírus da hepatite C, esteatose hepática alcoólica e não alcoólica. Aproximadamente 80% dos casos de CHC são causados por hepatite B ou C (ARZUMANYAN et al. 2013). No período de 1999 a 2016, foram notificados 212.031 casos confirmados de hepatite B no Brasil. Com relação a hepatite C no mesmo período, foram detectados 319.751 casos (GOMES et al., 2013). Além do fato preocupante de um grande número de casos notificados no Brasil, o risco de desenvolver CHC é ainda maior quando os pacientes infectados por esses vírus são expostos a aflatoxinas e ao álcool (EL-SERAG; RUDOLPH., 2007)

Geralmente, o diagnóstico do CHC é feito através de exames de imagens como a tomografia e para a confirmação, é utilizada a biópsia do órgão (EL-SERAG et al., 2008). A escolha do tratamento para esse tipo de neoplasia depende do estágio de desenvolvimento do tumor. Em estágios iniciais são realizados ablação, ressecção ou transplante. Em estágios intermediários onde as opções cirúrgicas não são recomendadas, é feita a quimioembolização (FORNER et al., 2018). Quando a doença se encontra em estágio avançado, a quimioterapia via sistêmica se faz necessária (FORNER et al., 2018). Vários compostos têm sido testados ou estão em

desenvolvimento, porém apenas dois se mostraram relativamente efetivos: sorafenibe e regorafenibe (BRUIX et al., 2017) (LLOVET et al., 2008). Ambos são quimioterápicos (inibidores de quinases como a Raf-1) que exercem atividade antiproliferativa e antiangiogênica. O aumento da sobrevivência dos pacientes utilizando esses compostos foi de 3 meses comparado ao grupo de pacientes tratados com placebo (BRUIX et al., 2017; LLOVET et al., 2008). Também foi verificado efeitos adversos como diarreia, perda de peso, síndrome mão-pé e hipofosfatemia em pacientes tratados com sorafenibe e regorafenibe (BRUIX et al., 2017; LLOVET et al., 2008). Devido ao pequeno aumento da resposta clínica a esses quimioterápicos, a procura de novos compostos que proporcionem um potencial maior de cura e menores efeitos colaterais é cada vez mais crescente.

2.2 MECANISMOS DE AÇÃO CITOTÓXICA

Compostos quimioterápicos são capazes de causar a morte de células cancerígenas de várias maneiras. A cisplatina, um quimioterápico clássico, se liga ao DNA formando adutos, impedindo a transcrição e replicação do DNA levando as células a morte por apoptose (ROSEMBERG et al. 1965; LOEHER, PATRICK 1984). Quimioterápicos desenvolvidos recentemente têm causado efeito citotóxico por outras vias de morte além da apoptose. Para conhecer o efeito desses compostos nas células, é necessário conhecimento das vias de sinalização que levam a morte da célula. Nos próximos tópicos, serão apresentados alguns desses mecanismos de morte.

2.2.1 Apoptose

Apoptose é um tipo de morte celular programada essencial para o bom desenvolvimento de organismos multicelulares. Fisiologicamente, esse processo é necessário em várias etapas do desenvolvimento do organismo e sua regulação é crucial para a manutenção da homeostase celular (FUCHS; STELLER 2011). No entanto, a desregulação da sinalização dessa via tem sido observada em várias patologias como em doenças degenerativas (doença de Alzheimer e Parkinson), autoimunes, doenças cardíacas e no câncer (FULDA et al. 2010; MATTSON; 2000; LOWE; LIN, 2000).

No processo carcinogênico, estudos sugerem que essa via de morte é em algum momento inibida, impedindo a morte celular e conseqüentemente, a proliferação de células cancerígenas (HANAHAN; WEINBERG, 2011). Ao contrário das células normais, células tumorigênicas estão sob constante estresse e condição de hipóxia. Seria esperado a ativação da apoptose em resposta a essas condições não favoráveis a sobrevivência da célula, porém algumas células tumorais conseguem evitar que a via de sinalização apoptótica seja ativada. Os mecanismos utilizados pelas células para desviar da apoptose são vários, como a inativação de caspases ou a superexpressão de proteínas antiapoptóticas como BCL-2 (BRUNELLE et al., 2009; RUMMEL et al., 2004).

Logo, para fins terapêuticos, o uso de substâncias que induzam a apoptose em células tumorais tem se mostrado promissor (LOPEZ; TAIT, 2015). Vários quimioterápicos já aprovados pelas agências reguladoras têm seu mecanismo baseado na indução de morte celular por apoptose, como por exemplo a substância bortezomide que atua em mieloma múltiplo (KANE et al., 2003).

A apoptose possui características bioquímicas e fisiológicas peculiares (Tabela 1) permitindo a sua diferenciação com relação aos outros tipos de morte celular. A apoptose possui duas vias: via intrínseca e via extrínseca que serão descritas a seguir.

Tabela 1: Características morfológicas e bioquímicas de células apoptóticas.

Características morfológicas	Características bioquímicas
Condensação da cromatina	Degradação do DNA
Fragmentação do núcleo	Externalização da fosfatidilserina
Formação de corpos apoptóticos	Perda do potencial de membrana mitocondrial
Retração celular	Ativação de caspases
Fagocitose das células (in vivo)	Aumento de cálcio livre no citosol
Protusões da membrana plasmática	Ativação/Inativação de proteínas da família Bcl-2 (intrínseca). Ativação por receptores na membrana celular (extrínseca)

Fonte: O autor (2018)

2.2.1.1 Apoptose via extrínseca:

A via extrínseca da apoptose, como o nome sugere, se inicia através da ativação de ligantes externos específicos aos receptores de morte localizados na membrana celular (GALLUZZI et al., 2018) (Figura 1). Essa ativação ocorre principalmente através da interação de ligantes como TNF (fator de necrose tumoral) e ligantes indutores de apoptose relacionados ao TNF (TRAILs e FasL) (SHERIDAN et al., 1997) com os receptores TNF-R1/R2 (receptor tipo 1 e 2 do fator de necrose tumoral), TRAIL-R1/R2 (receptor tipo 1 e 2 de ligantes indutores de apoptose relacionados ao TNF) e Fas (também conhecido como Apo-1 e CD95) (LOWE, LIN, 2000). A ligação do ligante ao receptor provoca oligomerização do receptor, recrutando moléculas adaptadoras TRADD (domínio de morte associado ao receptor TRAIL) e FADD (domínio de morte associado ao receptor Fas). Isso permite a ligação da pró caspase 8, formando o DISC (complexo de sinalização de indução de morte). A formação do complexo DISC induz a autoclivagem da procaspase 8, permitindo a sua ativação (LOWE, LIN, 2000). A caspase 8 ativa as caspases efetoras (caspase 3 e 7), culminando na morte celular (GALLUZZI et al., 2018).

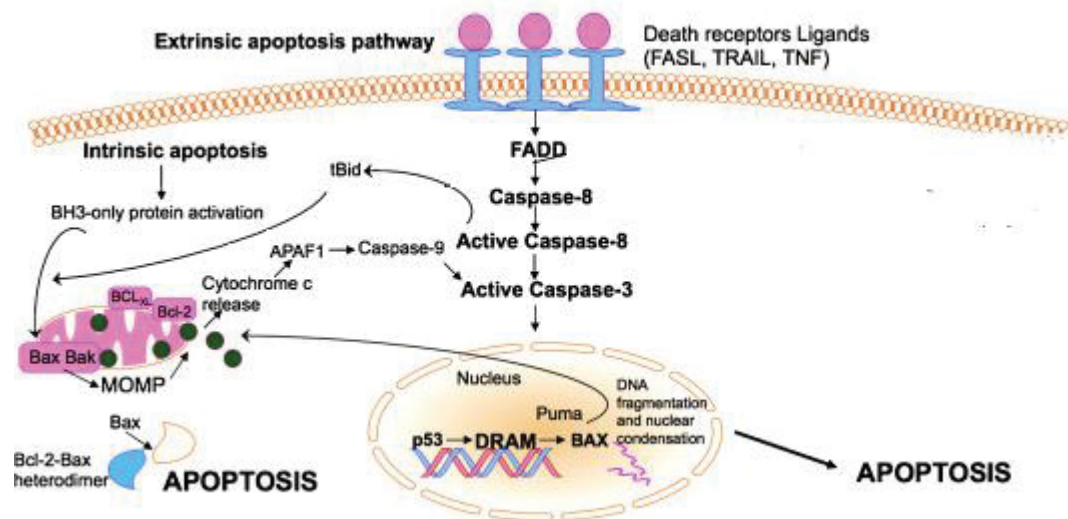
2.2.1.2 Apoptose via intrínseca

A apoptose por via intrínseca é caracterizada pela permeabilização da mitocôndria e da liberação do citocromo C no citoplasma (COSENTINO; GARCÍA-SÁEZ, 2014) (Figura 1). Uma grande variedade de fatores pode desencadear essa via, tais com quimioterápicos, radiação, choque térmico, EROs e etc (GU et al., 2014). Esses estímulos culminam em apoptose quando o equilíbrio entre as proteínas antiapoptóticas (Bcl-2 e Bcl-XL) (HOCKENBERY et al., 1990) e pró-apoptóticas (Bax, Bak, Bim e Bid) (YIN et al., 1997) da família de proteínas Bcl-2 (célula B de linfoma 2) é alterado (SIDDIK, ZAHID, 2013). A proteína Bcl-2 é localizada na mitocôndria e no retículo endoplasmático, sendo responsável por manter íntegra a membrana mitocondrial e o equilíbrio de cálcio no retículo endoplasmático (COSENTINO; GARCÍA-SÁEZ, 2014). Juntamente com outros membros da família, a proteína Bcl-2 previne a liberação de citocromo C no citosol, promovendo a sobrevivência da célula.

Por outro lado, membros da família Bcl-2 pró-apoptóticos promovem a liberação de citocromo C no citosol. Sob estímulos apoptóticos, a proteína Bax se desloca do citosol e se insere na membrana mitocondrial externa, conjugando-se com

a proteína Bak. Essa oligomerização promove a formação de um poro, induzindo a permeabilização da membrana mitocondrial externa e permitindo a saída de componentes do espaço intermembrana da mitocôndria (GREEN; KROEMER, 2004). Entre esses componentes estão endonuclease G, fator de indução de apoptose (AIF), Smac/Diablo, Omi/Htra2 e citocromo C. Uma vez no citoplasma, citocromo C se associa ao domínio recrutador de caspase (CARD) e fator 1 ativador de peptidase apoptótica (Apaf-1). O CARD e Apaf-1 recrutam pró-caspases 9, formando o apoptossomo. Então a pró-caspase 9 é ativada, ativando pró-caspases 3, 6 e 7 para a execução da apoptose (ACEHAN et al., 2002) .

Figura 2: Vias de ativação de apoptose extrínseca e intrínseca.



Fonte: Adaptado de Mohammad et al. (2015), com autorização de *Elsevier and Copyright ClearanceCenter* (número da licença 4406061428281)

2.2.2 Ferroptose:

Ferroptose é um tipo de morte celular programada recentemente descoberta (DIXON et al., 2012). Bioquimicamente, o processo de ferroptose é caracterizado pelo acúmulo de ferro, levando a um aumento de EROs e consequentemente a peroxidação de lipídios presentes na célula (CAO; DIXON, 2016). A peroxidação lipídica dependente de ferro é essencial para que ferroptose aconteça. Ela pode

ocorrer devido a desregulação do tráfico endossomal de ferro ligado à transferrina aos lisossomos, levando a ruptura de lisossomos contendo ferro (TORII et al., 2016) e que por sua vez, catalisa reações de Fenton, levando à peroxidação lipídica excessiva. Outro mecanismo de desencadeamento da peroxidação lipídica é a hiperativação da lipoxigenase dependente de ferro através de sua atividade aumentada, que é obtida pela perda da função da enzima glutathiona peroxidase 4 (Gpx4) (FRIEDMANN ANGELI et al., 2014). A perda da atividade da Gpx4 leva a um aumento na concentração de peróxidos, que por sua vez é necessário para a oxidação do ferro no centro catalítico das lipoxigenases, ativando assim essas enzimas (LOSCALZO, 2008).

Até agora, sabe-se que esse tipo de morte está envolvido em vários processos patológicos como insuficiência renal aguda, neurodegeneração, obesidade e lesão por isquemia/reperfusão (MÜLLER et al., 2017; DO VAN et al., 2016; KILLION et al., 2018). Em células tumorais, a ferroptose pode ser induzida através da depleção de glutathiona ou de cistina, pois sem esses componentes, a síntese da enzima glutathiona peroxidase 4, a qual é responsável por neutralizar radicais livres derivados de lipídios, fica comprometida (STOCKWELL et al., 2017). Em estudos *in vitro*, o antioxidante lipofílico ferrostatina-1 é usado para inibir a ferroptose, ressaltando a importância da peroxidação lipídica nesse processo (DIXON et al., 2012).

Alguns quimioterápicos como o sorafenibe, o qual inibe o transportador de cistina e o artesunato, que diminui a concentração de glutathiona, exercem sua atividade citotóxica em células tumorais através da ferroptose (LACHAIER et al., 2014) (ROH et al., 2017). Logo, a indução da ferroptose pode ser uma estratégia para vencer a resistência de células cancerígenas à morte celular por apoptose.

2.2.3 Necroptose:

A necroptose é um tipo de morte celular semelhante a necrose, contudo é regulada. Estudos mostram o envolvimento da necroptose em doenças como arteriosclerose, isquemia cerebral e respostas antivirais (LIN et al., 2013; VIEIRA et al., 2014; UPTON et al., 2012). Ela é iniciada pela ligação de moléculas como TNF- α , FASL, TRAIL, dsRNA (RNA de dupla fita), IFN (interferon) em seus respectivos receptores. Então, é formado um complexo protéico com as proteínas TRADD (domínio de morte associado ao receptor TRAIL), TRAF2 (fator 2 do receptor

associado ao TNF), cIAP 1 e 2 (proteína celular de inibição de apoptose), resultando na ubiquitinação da proteína RIP1 (proteína de interação do receptor 1) (CHEN et al., 2016). Com a inibição da caspase 8, RIP1 se liga a RIP3 (proteína de interação do receptor 3) formando o necrossomo com a subsequente ativação da RIP3 (CHO et al., 2009). Quando a RIP3 se encontra ativada, a proteína MLKL (domínio de quinase de linhagem mista) é recrutada. MLKL é a principal molécula executora da necroptose, se deslocando do citosol até as membranas intra e extracelulares, danificando-as (CHEN et al., 2014). As características morfológicas de células que sofreram necroptose são semelhantes as células necróticas, como por exemplo a perda da integridade da membrana plasmática, aumento no volume celular e inchamento de organelas (DUNAI et al., 2011). Alguns quimioterápicos já utilizados na clínica, como 5-fluoracil e cisplatina também demonstram atividade citotóxica através da morte celular por necroptose (METZIG et al., 2016; RATOVITSKI et al., 2015).

2.2.4 Autofagia

A autofagia é um processo fisiológico responsável pela degradação e reciclagem de componentes celulares (RUSSO; RUSSO, 2018). O início da autofagia ocorre com a formação de uma estrutura inicial formada por uma membrana lipídica conhecida como fagóforo. As proteínas envolvidas nessa fase são a PI3K III (fosfatidilinositol 3-cinase de classe III) também chamada Vps34, beclina 1 (mAtg6) entre outras (YAN; BACKER, 2007). A expansão do fagóforo, na qual culmina na formação do autofagossomo, é mediada pela interação de proteínas como Atg5 e Atg12, que por sua vez interagem com Atg10 e Atg7 (MIZUSHIMA et al., 1998).

As proteínas Atg10 e Atg7 recrutam outras proteínas como a LC3. Modificações causadas pela Atg4 transformam a LC3 em LC3-I, então LC3-I é conjugada com a fosfatidiletanolamina e acoplado a membrana do autofagossomo, formando a proteína LC3-II (WU et al., 2006). A quantificação da LC3-II é normalmente utilizada para estimar a abundância de autofagossomos (YAN; BACKER, 2007). Os autofagossomos então se fundem primeiro com os endossomos e depois com os lisossomos. A fusão ocorre com a participação de proteínas como Rab7, SNAREs (*soluble NSF attachment protein receptors*), ESCRT (*endosomal sorting complex required for transport*) e proteínas Vps (*vacuolar protein sorting*) classe C, induzindo a fusão com endossomas tardios e lisossomos (YAN; BACKER, 2007).

A autofagia tem sido descrita como sendo um processo que pode tanto colaborar para a morte da célula quanto ajudar na sua sobrevivência (FITZWALTER; THORBURN, 2015). Quando a autofagia ajuda na sobrevivência das células tumorais, ela pode colaborar para a resistência ao tratamento.

2.3 PARTICIPAÇÃO DE EROS EM MECANISMOS DE MORTE CELULAR

Vários mecanismos que induzem morte celular programada têm em comum a participação de EROS como mediadores na via de sinalização. O papel de EROS na indução da morte celular por apoptose via intrínseca é fundamental. O radical superóxido, por exemplo, pode induzir a liberação de citocromo C, etapa crucial para a ativação da via intrínseca da apoptose (MADESH; HAJNÓCZKY 2001). Também é relatado na literatura a participação do peróxido de hidrogênio como indutor da morte celular por autofagia (PALLICHANKANDY et al., 2015). No mecanismo da ferroptose a participação de hidroperóxidos de lipídios é essencial para a indução desse tipo de morte (DIXON et al., 2012). A papel direto de EROS na indução da morte celular pelo mecanismo da necroptose é pouco conhecido, porém alguns estudos mostram que o aumento de EROs é visto em células que sofrem de necroptose (ARDESTANI et al., 2013). Portanto, o conhecimento não apenas da relação entre EROs e indução de morte celular, mas do estresse oxidativo em si, é necessário devido a grande influência de EROs em diferentes mecanismos de morte celular.

2.4 ESTRESSE OXIDATIVO

Estresse oxidativo é uma condição bioquímica caracterizada pelo desequilíbrio entre os níveis de espécies reativas de oxigênio (EROs) e nitrogênio (ERNs) e os níveis de defesa antioxidante (THANNICKAL, 2000). EROs e ERNs são moléculas derivadas do oxigênio e nitrogênio, respectivamente, podendo ser não radiculares ou possuírem um ou mais elétrons desemparelhados, sendo chamados de radicais livres (EMANUELE et al., 2018). As três EROs mais importantes no contexto fisiológico são o ânion superóxido ($O_2^{\cdot -}$), radical hidroxila ($\cdot OH$) e o peróxido de hidrogênio (H_2O_2) (BIRBEN et al., 2012).

EROs são produzidos por consequência do metabolismo celular em condições fisiológicas normais. As principais fontes de geração de EROs são o

retículo endoplasmático, peroxissomos, as enzimas NADPH oxidases e principalmente a cadeia respiratória mitocondrial (AL-DALAEN, 2014). Na mitocôndria 1% a 2% do total de oxigênio consumido é transformado em $O_2^{\cdot-}$. Os complexos I e III da cadeia respiratória são os principais sítios de produção, sendo o $O_2^{\cdot-}$ e H_2O_2 os principais envolvidos (GENOVA et al., 2001; TURRENS et al., 1995). No entanto, estudos recentes mostram a participação do complexo II na geração de EROs, tanto em condições fisiológicas como com a inibição do mesmo (QUINLAN et al., 2012; MORENO-SÁNCHEZ et al., 2013).

Diante de um cenário de estresse oxidativo, as EROs podem danificar vários componentes celulares. EROs podem reagir com proteínas, modificando-as e alterando suas atividades enzimáticas ou promovendo sua desnaturação (VAN HOUTEN et al., 2018). Também podem induzir peroxidação lipídica, causando modificações estruturais na membrana plasmática (GASCHLER; STOCKWELL, 2017). A maioria dos efeitos a longo prazo do estresse oxidativo ocorre na molécula de DNA, envolvendo modificação de bases, quebra de fita simples e dupla, mutações, etc (VAN HOUTEN et al., 2018).

EROs estão envolvidos em inúmeros processos biológicos importantes para homeostasia celular. Porém, EROs também estão envolvidos em condições patológicas como diabetes, arteriosclerose, obesidade, doenças cardiovasculares e câncer (SCHIEBER; CHANDEL, 2014). Células cancerígenas possuem um nível aumentado de EROs comparado com células normais (GALADARI et al., 2017). Esse aumento é causado pela alteração no metabolismo mitocondrial e pela necessidade de aumentar vias de sinalização que promovem crescimento, proliferação, diferenciação e sobrevivência da célula (TAFANI et al., 2016). O aumento de EROs em células cancerígenas é contrabalanceado pelo aumento de enzimas antioxidantes (GALADARI et al., 2017). Logo, compostos que induzem aumento de EROs ou a diminuição nas defesas antioxidantes podem contribuir para a ativação de mecanismos de morte, limitando o crescimento tumoral (GALADARI et al., 2017). Antitumorais já utilizados na clínica como bevacizumabe e axitinibe além de atuarem em receptores celulares, aumentam os níveis de EROs, contribuindo com efeito tóxico em células cancerígenas (TEPPO et al., 2017).

2.5 MITOCÔNDRIAS COMO ALVO ANTITUMORAL

As mitocôndrias exercem um papel essencial na produção de energia através da oxidação de biomoléculas, gerando NADH e FADH₂. Os elétrons provenientes do NADH e FADH₂ oferecem energia para o bombeamento de prótons, convertendo ADP em ATP pela fosforilação oxidativa (COOPER, 2000). As mitocôndrias também são importantes mediadores da morte celular por apoptose, e por essas razões são consideradas alvos para tratamentos quimioterápicos (VAKIFAHMETOGLU-NORBERG et al., 2017). Compostos antitumorais que agem na mitocôndria, os chamados *mitocans* (acrônimo de mitocôndria e câncer), são candidatos proeminentes pois, dependendo do fenótipo do tumor, eles podem ser seletivos para células tumorigênicas (FULDA et al., 2010). Por exemplo, alguns tipos de células tumorais exibem níveis mais altos da proteína anti apoptótica Bcl-2 como células de leucemia linfocítica crônica (MASON et al., 2008) e células cancerígenas de pulmão (OLTERSDORF et al., 2005). Portanto, drogas que inibem a proteína Bcl-2 nesse tipo de neoplasia podem combater a resistência dessas células ao processo apoptótico.

Interessantemente várias diferenças, tanto na estrutura como na função das mitocôndrias, têm sido vistas em células tumorais quando comparadas as células normais (MODICA-NAPOLITANO; SINGH, 2004). Análise proteômica de células normais e de tumores de fígado humano mostrou uma diminuição nas expressões de proteínas como as enzimas superóxido dismutase 1 e 2 e glutathione S-transferase A1 e A2 nas células tumorais, tornando-as mais sensíveis à morte celular mediante a um composto que induza uma condição de estresse oxidativo (YE et al., 2013).

Logo, devido a essas diferenças, substâncias capazes de alterar o metabolismo mitocondrial podem apresentar grau de citotoxicidade diferentes em células tumorais de fígado quando comparadas a hepatócitos saudáveis. Vários compostos têm sido identificados como capazes de perturbar o metabolismo mitocondrial em células tumorais. Por exemplo, moléculas que se ligam a proteínas anti-apoptóticas da família Bcl-2, como por exemplo o polifenol gossipol, pode inibir a atividade dessas proteínas (ZEITLIN et al., 2008). Vários tumores apresentam superexpressão dessas proteínas (LESSENE et al., 2008) logo, inibindo-as induziria as células tumorais a morte celular por apoptose.

Além do seu importante papel na apoptose, as mitocôndrias são responsáveis pela produção de energia através do transporte de elétrons do NADH e FADH₂ ao

acceptor final de elétrons, o oxigênio (RYAN, MICHAEL 2018). Alterações nesses processos, desde a passagem dos elétrons, atividades enzimáticas, alterações de propriedades da membrana mitocondrial até o bombeamento de prótons, podem comprometer a produção de ATP (NELSON; COX, 2011). Vários compostos descritos na literatura têm como alvo os complexos da cadeia respiratória. O quimioterápico tamoxifeno (25 μM), utilizado em pacientes com câncer de mama, induz apoptose e inibição do complexo I da cadeia respiratória em mitocôndrias de fígado de rato (MOREIRA et al., 2006). O alfa tocoferil succinato (α -TOS), um análogo da vitamina E, é considerado como antitumoral por desestabilizar a mitocôndria. O α -TOS (150 μM) é capaz de inibir em aproximadamente 40% a taxa de respiração do complexo I da cadeia respiratória em mitocôndrias isoladas de fígado de rato (DOS SANTOS et al., 2012). Em outro estudo, a injeção intra-arterial de ácido bromopirúvico (injeção única de 0.0125 mM), um potente inibidor da síntese de ATP, em câncer de fígado de camundongos causou a morte de quase 100% das células tumorais sem afetar os hepatócitos saudáveis (GESCHWIND et al., 2002). Poucos estudos sobre o efeito das chalconas na mitocôndria são relatados na literatura. Martineau (2012) observou que a 4'-hidroxichalcona (50 μM) reduziu a velocidade respiratória em aproximadamente 30 % no estado 3 (adição de ADP e succinato). Muitos estudos ainda são necessários, porém os *mitocans* têm sido considerados promissores para o tratamento do câncer.

2.6 FLAVONOIDES

Os flavonoides são metabólitos secundários e estão entre os mais abundantes na flora. Quimicamente, eles são formados por um esqueleto de 15 carbonos que consiste em dois anéis aromáticos nomeados A e B ligados por uma cadeia carbônica, podendo ou não formar um terceiro anel (C). Alguns flavonoides são classificados como flavonas, flavononas, isoflavona, entre outros que possuem o anel C e as chalconas que não possuem este anel na sua estrutura (CORRADINI et al., 2011). Aproximadamente 6000 diferentes flavonoides já foram identificados, sendo encontrados em flores, frutos e folhas (PANCHE et al., 2016). Os flavonoides têm mostrado grande variedade de atividades biológicas, sendo estas moléculas de grande potencial para a descoberta de novas drogas (WALLACE, TAYLOR 2011; BOUBAKEUR et al., 2015; PELUSO et al., 2013; BEKING; VIEIRA; 2010). Neste trabalho foram estudados os efeitos de um derivado sintético das chalconas, grupo de

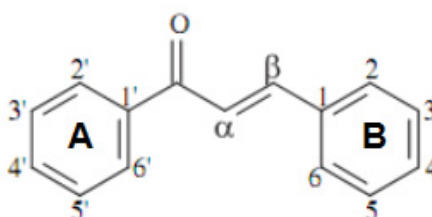
moléculas cujas principais atividades serão descritas a seguir.

2.7 CHALCONAS

As chalconas possuem uma estrutura básica que consiste em dois anéis aromáticos (A e B) ligados covalentemente por uma cadeia de três carbonos que contém uma carbonila α,β -insaturada (PRABHAKAR et al., 2014) (Figura 2). O grupo cetona α,β -insaturada é o responsável por várias atividades biológicas observadas, uma vez que a remoção dessa estrutura resulta em perda da maioria das atividades biológicas (SAHU et al., 2012). A principal reação que ocorre com as chalconas é a adição de Michael, onde a chalcona age como eletrófilo reagindo com nucleófilos tais como grupos tíóis presentes em uma grande variedade de proteínas (PRABHAKAR et al., 2014).

As chalconas podem possuir grande diversidade estrutural, onde vários grupos substituintes podem estar presentes em ambos os anéis como: metil, metoxil, hidroxil, nitro, amino, etc. (LEON-GONZALEZ et al., 2015). A adição de substituintes e o número deles e suas posições interferem de forma significativa em seus efeitos biológicos (MAHAPATRA et al., 2015). Entre os grupamentos encontrados nas chalconas que tem demonstrado importância para seus efeitos estão o grupamento hidroxil e o nitro.

Figura 3: Estrutura básica das chalconas



Fonte: O autor (2018)

2.7.1 Chalconas hidroxiladas

As chalconas que possuem o grupo hidroxila como substituintes são relatadas em vários estudos. As posições e o número de grupos hidroxila ligados aos anéis aromáticos das chalconas têm mostrado influenciar os efeitos citotóxicos promovidos em células tumorais (KARTHIKEYAN et al., 2014). Esta substituição faz com que uma

ligação de hidrogênio se forme entre o grupo carbonila e o grupo hidroxila, tornando o composto mais eletrófilo, aumentando a sua reatividade (AMSLINGER et al., 2012).

Wei et al. (2013) mostraram que duas chalconas hidroxiladas (2',4'-dihidroxi-6'-methoxy-3',5'-dimetilchalcona e 2',4'-dihidroxi-6'-metoxi-3'-metilchalcona) isoladas da samambaia *Cyclosorus parasiticus* exibiram citotoxicidade significativa em células HepG2 apresentando valor de IC₅₀ de 1,6 e 2,82 µM respectivamente após 24 horas. Yang et al. (1998) verificaram que após a incubação com 20 µM de buteína (2',4',3,4-tetrahidroxichalcona) por 30 minutos ocorre a inibição do EGF (fator de crescimento epidermal) que estimula o crescimento e a proliferação celular.

A hidroxila localizada no carbono 2' do anel A das chalconas têm chamado a atenção por ser importante em provocar alteração na progressão do ciclo celular e apoptose em células tumorais. A chalcona *phloretin* (2',4',6,4-tetrahidroxichalcona) (100 µM durante 24 horas) induziu a morte celular por apoptose em células de melanoma B164A5 e em células leucêmicas humanas HL-60 (KOBORI et al., 1999). A isoliquiritigenina (2',4',4-trihidroxichalcona) induziu apoptose e provocou alteração na progressão do ciclo celular em células HepG2 na concentração de 20 µg/mL em 24 horas (HSU et al., 2005). O mesmo composto extraído de uma leguminosa (*Millettia pachycarpa*) induz alteração no ciclo celular e morte celular por apoptose em células metastática de fígado SK-Hep 1 (IC₅₀: 95,9 µM após incubação de 48 h) (WU et al., 2013). Echeverria et al., (2009) verificaram que a 2'-hidroxichalcona (50 µM) provoca a diminuição de 50% da viabilidade de células HepG2. .

2.7.2 Chalconas nitradas

Quimicamente, o grupo nitro ligado a um anel aromático nas chalconas aumenta sua reatividade por atrair os elétrons, tornando a carbonila α,β-insaturada ainda mais eletrofílica. O grupo nitro pode ser reduzido enzimaticamente pela xantina oxidase, diaforase, tioredoxina redutase, entre outras (CENAS et al., 2006; ARLT et al., 2005). A redução por seis elétrons gera um grupo amina e alguns intermediários como o grupo nitroso, radical nitroxil e hidroxilamina, os quais podem reagir com biomoléculas (OLENDER et al., 2018). A redução por um elétron do grupo nitro gera o radical ânion nitro, que em condições aeróbicas se reoxida novamente a grupo nitro pelo oxigênio molecular, formando o radical superóxido (OLENDER et al., 2018). Existem pouquíssimos estudos relacionando chalconas nitradas e seus efeitos em

células cancerígenas. Lawrence et al., (2001) mostrou que entre as 20 chalconas testadas com diferentes grupos substituintes (metoxila, bromo, cloro e nitro), aquela que possuía o grupo nitro na posição 4 do anel A apresentou ser uma das mais citotóxicas ($IC_{50}= 1,2 \mu\text{M}$ em 72 horas) em células leucêmicas K562.

Em nosso laboratório já foram realizadas algumas análises utilizando chalconas nitradas. Tamiello, C. (2013) realizou um estudo usando 3-nitrochalcona em células HepG2 e verificou perda de 22 % de viabilidade na concentração de $15 \mu\text{M}$ após 24 horas de incubação. A perda de viabilidade causada pela 3-nitrochalcona foi reduzida com a pré-incubação de N-acetilcisteína (NAC), sugerindo um possível envolvimento de EROs na indução do efeito citotóxico nestas células. Outra nitrochalcona estudada em nosso laboratório foi a 4-nitrochalcona, que induziu citotoxicidade (em torno de 16 %) em células HeLa a partir da concentração de $15 \mu\text{M}$ em 24 horas (ARÉVALO, 2018). Igualmente, a perda da viabilidade também foi parcialmente reduzida usando pré-incubação com 10 mM de NAC. Neste trabalho foi realizada a análise dos efeitos citotóxicos e prooxidantes da 2'-hidroxi-3-nitrochalcona (HNC) (Figura 2). Estudos preliminares em nosso laboratório mostraram que a HNC exerce atividade citotóxica em células HepG2 ($IC_{50}\sim 25 \mu\text{M}$ – 24 horas de incubação) (SCOPARO, 2015), porém seu mecanismo de ação não foi elucidado.

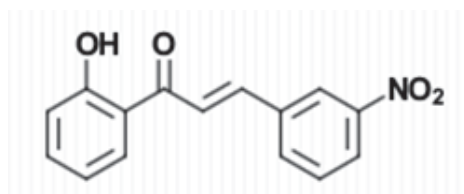


Figura 4: Estrutura química da HNC

2 ARTIGO CIENTÍFICO

Essa dissertação foi escrita conforme a Norma Interna 13/2018 do Programa de Pós-Graduação em Ciências – Bioquímica da Universidade Federal do Paraná (UFPR), a qual prevê no Art. 1º que as dissertações devem ser apresentadas segundo as Normas de Apresentação de Documentos Científicos publicadas pela editora da UFPR ou em formato de artigo científico. O artigo científico apresentado neste trabalho será submetido a revista *Bioorganic and Medicinal Chemistry*.

Title: Cytotoxic and pro-oxidant effects of 2'-hidroxy-3-nitrochalcone in HepG2 cells

Aline Ramalho de Oliveira¹, Glaucio Valdameri², Glauca Regina Martinez¹, Sheila Maria Brochado Winnischofer¹, Maria Eliane Merlin Rocha¹.

¹: Department of Biochemistry and Molecular Biology – Universidade Federal do Paraná – Curitiba – Brasil.

² Laboratory of Cancer Drug Resistance, Pharmaceutical Sciences Program, Federal University of Paraná, 80210-170 Curitiba, PR, Brazil

Corresponding author: memrocha@ufpr.br or maelimerlin.rocha@gmail.com

Abstract

Chalcones have a great structural diversity, contributing to the different biological activities. It is known that hydroxyl group in chalcones structure contributes to the cytotoxic effect in cancer cells. However, little is known about nitrochalcones effect on tumor cells. In this study, the cytotoxicity of 2'-hydroxy-3-nitrochalcone (HNC) was evaluated in HepG2 cells. HNC was able to induce cytotoxicity with an IC₅₀ of 21.9 µM in 24 hours. HNC (15 and 20 µM) increased ROS levels and this effect were partially reversed with the pre-incubation with 10 mM NAC, suggesting the participation of ROS in the cytotoxic mechanism. The results of the Annexin-V-FITC/propidium iodide double labeling assay indicate that the possible mechanism of cell death induced by HNC (15 and 20 µM) is apoptosis. Inhibitors of ferroptosis, necroptosis and autophagy were tested but the results suggested that these mechanisms are not involved in the cytotoxic effect caused by HNC. After treatment with 15 and 20 µM HNC for 24 h, a mitochondrial dysfunction was observed, showing a decrease in the the oxygen consumption and in the mitochondrial membrane potential (observed for 20 µM HNC). Thus, we conclude that HNC exerts cytotoxic activity by altering ROS levels, mitochondrial dysfunction and possibly causing apoptosis cell death.

1. Introduction

Liver cancer is the fifth most common cancer diagnosed worldwide, accounting for more than 600,000 deaths every year¹. Hepatocellular carcinoma (HCC) is the dominant type of primary liver tumor². The main risk factors for the development of HCC are hepatitis B and C infections, high alcohol intake, non-alcoholic fatty liver disease and exposure to aflatoxins^{3,4,5,6}. Even though many treatments are going through clinical trials, the current treatment of HCC presents challenges such as high toxicity and unsatisfactory response. Therefore, there is a clear necessity to find potent and efficient treatments to reduce the mortality of HCC.

Chalcones, precursors of flavonoids, are present in a large number of plants and have shown multifarious biological activities, which include anti-inflammatory⁷, antimicrobial⁸, anti-HIV⁹, antimalarial¹⁰ and anticancer¹¹ properties. Regarding its antitumoral effects, chalcones have been able to cause cell cycle arrest¹², disruption of microtubular network¹³, apoptosis¹⁴ and autophagy¹⁵ cell death. Chalcones are also promising *in vivo* as anti-tumor and cell proliferating blockers¹⁶.

Chemically, chalcones are formed by two rings (A and B) linked by an α,β -unsaturated ketone¹⁷. This structure acts as Michael acceptors with good nucleophiles, which is responsible for most of its biological effects.¹⁸ Those effects are frequently associated with their reactivity with thiol groups¹⁸, which can alter intracellular redox status. To provide a wide structural diversity, substitutions on ring A or B are made using groups such as hydroxyl, methoxyl, prenyl, etc.

The hydroxyl group has been commonly found among the naturally occurring chalcones and have shown cytotoxic effects in a diverse variety of cancer cell lines^{19,20}. Structurally, the hydroxyl group interacts with the carboxyl group through a hydrogen bond, increasing its reactivity²¹. A chalcone containing this functional group at the 2' position (A ring), was able to induce cytotoxicity, DNA fragmentation and caspase 9 activation in HepG2 cells (200 μ M for 24 hours)²². Another chemical group typically found in different types of drugs²³, but little studied in chalcones is the nitro group. Structure-activity relationship studies have demonstrated that nitro group in the B ring of a 2'-amino-4-nitrochalcone confers higher cytotoxic effects (IC₅₀~13 μ M) compared to methoxyl (2'-amino-4-methoxylchalcone IC₅₀~72 μ M) and chlorine substitutions (2'-amino-4-chlorinechalcone IC₅₀ > 100 μ M) after 72h-treatment in HepG2 cells²⁴. The electron withdrawing effect of the nitro group increases chalcone reactivity and when

it is bonded to the aromatic ring, is prone to produce reactive oxygen species²⁵.

Cancer cells usually show higher levels of ROS compared to normal cells²⁶. For that reason, compounds that induce ROS elevation to a toxic level are suitable candidates to be used as anticancer drugs. The ability of chalcones to induce apoptosis and ROS production in a variety of cancer cell lines^{27,28} has led to the suggestion of its use in chemotherapy. Furthermore, compounds targeting mitochondria have been reported in the literature as promising in the treatment of cancer²⁹. These compounds may induce apoptosis cell death, in addition to altering mitochondrial metabolism³⁰. Since there are minimal studies involving nitro chalcones and some 2'-hydroxychalcone have display cytotoxicity effects, we aimed, for the first time, to explore the cytotoxic and prooxidant effects of 2'-hydroxy-3-nitrochalcone (HNC) (Figure 1) in HepG2 cells.

2 Materials and Methods

2.1 Materials

Dulbecco's modified Eagle's medium (DMEM) and fetal bovine serum (FBS) were obtained from Cultilab (São Paulo, Brazil). 3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide (MTT), 2',7'-dichlorofluorescein diacetate (DCFH-DA), N-acetylcysteine (NAC), rhodamine 123, carbonyl cyanide *p*-trifluoromethoxyphenylhydrazone (FCCP), propidium iodide, dimethyl sulfoxide (DMSO), rotenone, antimycin A, chloroquine, ferostatin-1, necrostatin-1, quercetin and cisplatin were obtained from Sigma-Aldrich. Annexin V-FITC and was obtained from BD Biosciences. All other reagents were commercial products of the highest available purity grade.

The compound used in this study, 2'-hydroxy-3-nitrochalcone, was synthesized by Dr. Alfredo S. E. Bates (Chemistry Department, UFPR, Curitiba, Parana, BR). It was dissolved in DMSO and stored at - 20 °C. The respective treatments were prepared in DMEM before use. The maximal concentration of DMSO was 0.1% in all the treatments and controls.

2.2 Cell culture

The human hepatocarcinoma cell line (HepG2) was obtained from ATCC. Cells were maintained in DMEM medium, supplemented with 10% FBS and 100 U/ml penicillin/streptomycin, and incubated at 37°C and 5% CO₂, under controlled humidity.

2.3 Methods

2.3.1 MTT assay

HepG2 cells were seeded at a density of 1×10^4 cells per well into 96-well culture plates for 24 hours. After, cells were incubated with HNC (5,10,15,20 and 30 μ M) for 24 and 48 hours. Then, cell viability was measured through MTT method²⁸. Briefly, after 24 and 48 hours of exposure, the supernatants were removed, and 200 μ L of a MTT solution prepared in PBS (0.5mg/ml) was added and incubated for 3 hours. MTT solution was discarded and the formazan was dissolved in 200 μ L of DMSO. The absorbance at 550 nm was measured using a microplate reader (Epoch Bioteck). Cytotoxicity was also evaluated with and without incubation with NAC (10 mM) for 2 hours prior to the treatment with HNC. The results were expressed as the percentage of viable cells compared to control (0.1% DMSO).

2.3.2 Lactate dehydrogenase (LDH) release assay

Cytotoxicity was also evaluated through the LDH release assay, which can only be measured in the medium if membrane integrity is impaired. HepG2 cells were cultivated (1×10^4 cells/well) in 96 well plates for 24 hours. Then, HNC (5, 10, 15, 20 and 30 μ M) were added and incubated for 24 and 48 hours. After, the supernatant was collected, the LDH activity was analyzed following the manufacturer's instructions (Analisa Gold, Brazil). The absorbance at 320 nm was measured using a microplate reader (Epoch Bioteck). Triton 1% was used as a positive control of cell membrane rupture. The results were expressed as the percentage of LDH release in comparison to control.

2.3.3 Annexin-V-FITC/propidium iodide double labelling assay

The appearance of phosphatidyl-serine on the extracellular side of the cell membrane was quantified by annexin V and cell membrane permeabilization was analyzed by PI staining³¹. HepG2 cells (6×10^4) were seeded into 24-well plates for 24 hours. After removing the medium, the treatment containing 15 and 20 μM HNC was added for another 24 hours. A combined incubation with quercetin (50 μM) and cisplatin (10 μM) was used as a positive control for apoptosis³². After centrifugation (700g for 4 min) of both detached and adherent cells, the pellet was resuspended in 100 μL of Annexin binding buffer, and stained with 5 μL of Annexin-V and 5 μL (1 mg/mL) of PI for 15 min at 25°C in the dark. Samples were diluted in 400 μL of binding buffer and analyzed using a flow cytometer Accuri C5 BD.

2.3.4 Measurement of intracellular ROS

The intracellular ROS generation was measured by staining the cells with 2', 7' - dichlorofluorescein-diacetate DCFH-DA³³. HepG2 cells were seeded at a density of 6×10^4 cells per well into 24-well culture plates for 24 hours. After, the cells were exposed for 24 h to HNC (15 and 20 μM), vehicle control (0,1% DMSO) and 400 μM of H_2O_2 as a positive control. ROS detection in cells pre-incubated with NAC (10 mM) for 2 hours prior to the treatment with HNC and vehicle control were also performed. Lastly, the treatments were replaced by a solution of DCFH-DA in PBS (5 μM) and incubated for an additional 30 min at 37°C. Cells were washed with PBS, harvested using trypsin, centrifuged (700g for 4 min) and resuspended in PBS. The fluorescence was measured using a flow cytometer Accuri C5 BD. DCFH-DA was excited with a 488 nm laser and the emission fluorescence was recorded through a FL-1 filter (533/30).

2.3.5 Analysis of mitochondrial respiratory chain complexes

Respiration was measured by high-resolution respirometry (Oxygraph-2k, Oroboros® Instruments, Innsbruck, Austria)³⁴. HepG2 cells were seeded in 60 mm-plates (5×10^5 cells/plate). After 24 hours, cells were incubated with 15 and 20 μM HNC for 24 hours. Then, cells were harvested, centrifuged (2000 rpm for 3 min) and

suspended in mitochondrial respiration medium, containing 125 mM mannitol, 65 mM KCl, 10 mM HEPES, 0,1% BSA and 1 mM EDTA, solubilized in ultrapure water and pH 7,2. Then, cells were permeabilized with digitonin⁴³ (20 $\mu\text{g}/10^6$ cells), for 10 min at 37° C and the respiration was evaluated. The basal state was evaluated in oxygraph respiration medium in the absence of substrates and inhibitors. The activity of mitochondrial complexes was measured as following: NADH oxidase - by addition of glutamate/malate (10 and 5 mM, respectively) as oxidizable substrates and ADP (2mM); Succinate oxidase – by addition of rotenone (0,5 μM) for inhibition of complex I and succinate (10 mM), as oxidizable substrate, plus ADP (2 mM) and, Complex IV –by addition of antimycin A (2,5 μM) as inhibitor of Complex III and (TMPD)/ascorbate (0,5 mM and 2 mM, respectively) as oxidizable substrates.

2.3.6 Measurement of mitochondrial membrane potencial ($\Delta\Psi\text{m}$)

Mitochondrial membrane potential ($\Delta\Psi\text{m}$) was assessed using Rhodamine 123 (Rho123), a mitochondrial dye that stains mitochondria in living cells in a membrane potential-dependent fashion³⁵. HepG2 cells (6×10^4 cells/well) were plated in 24-well plate for 24 hours. After, the cells were incubated with HNC (15 e 20 μM) and vehicle control for 24 hours. Also, FCCP (0.5 $\mu\text{g}/\text{mL}$ for 30 min), a protonophore capable of disrupting the mitochondrial membrane potential was used as positive control. Then, the medium was removed and cells were washed with PBS and incubated with 10 $\mu\text{g}/\text{mL}$ of Rho123 for 30 min at 37°C in the dark. Then, cells were harvested, centrifuged (700g for 4 min) and resuspended in 500 μL of PBS. The fluorescence was measured using a flow cytometer Accuri C5 BD. Rho123 was excited with 488 nm laser and the emission fluorescence was recorded through a FL-1 filter (533/30). Cells with reduced fluorescence were counted as having lost some of its mitochondrial membrane potential.

2.3.7 Statistical Analysis

Analysis of variance (one-way ANOVA) followed by Tukey test was used to compare means, using the Graph Pad Prism 5.0 software. Values of mean \pm SD were used. For all comparisons, *p* values less than 0.05 were considered statistically

significant. The 50% inhibitory concentration (IC_{50}) values were calculated by nonlinear regression.

3 RESULTS

3.1 Cytotoxic effect of HNC on HepG2 cells

Using tetrazolium-based colorimetric assay (MTT), the cytotoxic effect of HNC was evaluated in HepG2 cells. As shown in figure 2A and 2B, 5 and 10 μ M HNC did not alter cell viability. However, the number of viable cells was reduced to approximately 80 %, 54% and 29 % with 15, 20 and 30 μ M for 24 h of incubation, respectively. Figure 2B shows the reduction of the cell viability, especially at 15 μ M (55%), 20 μ M (37 %) and 30 μ M (27%) when cells were incubated for 48 hours. The IC_{50} values are 21.9 in 24h (Figure 2A insert) and 17.3 μ M in 48 h (Figure 2B insert). In order to evaluate the cytotoxicity by another method, we measured the activity of the LDH (lactate dehydrogenase) released into the supernatant. Figure 3A shows the LDH released (%) in the medium after 24 h of incubation. The effects of HNC were statistically different at the concentration of 20 and 30 μ M, reaching 23 % and 28% of LDH release, respectively. After 48 h of incubation with 15, 20 and 30 μ M HNC the LDH release were 39%, 60%, 65%, respectively (figure 3B).

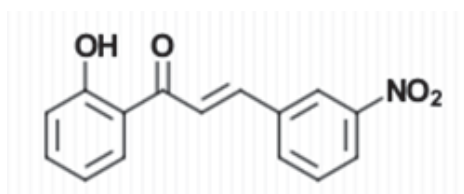


Figure 1. Structure of HNC

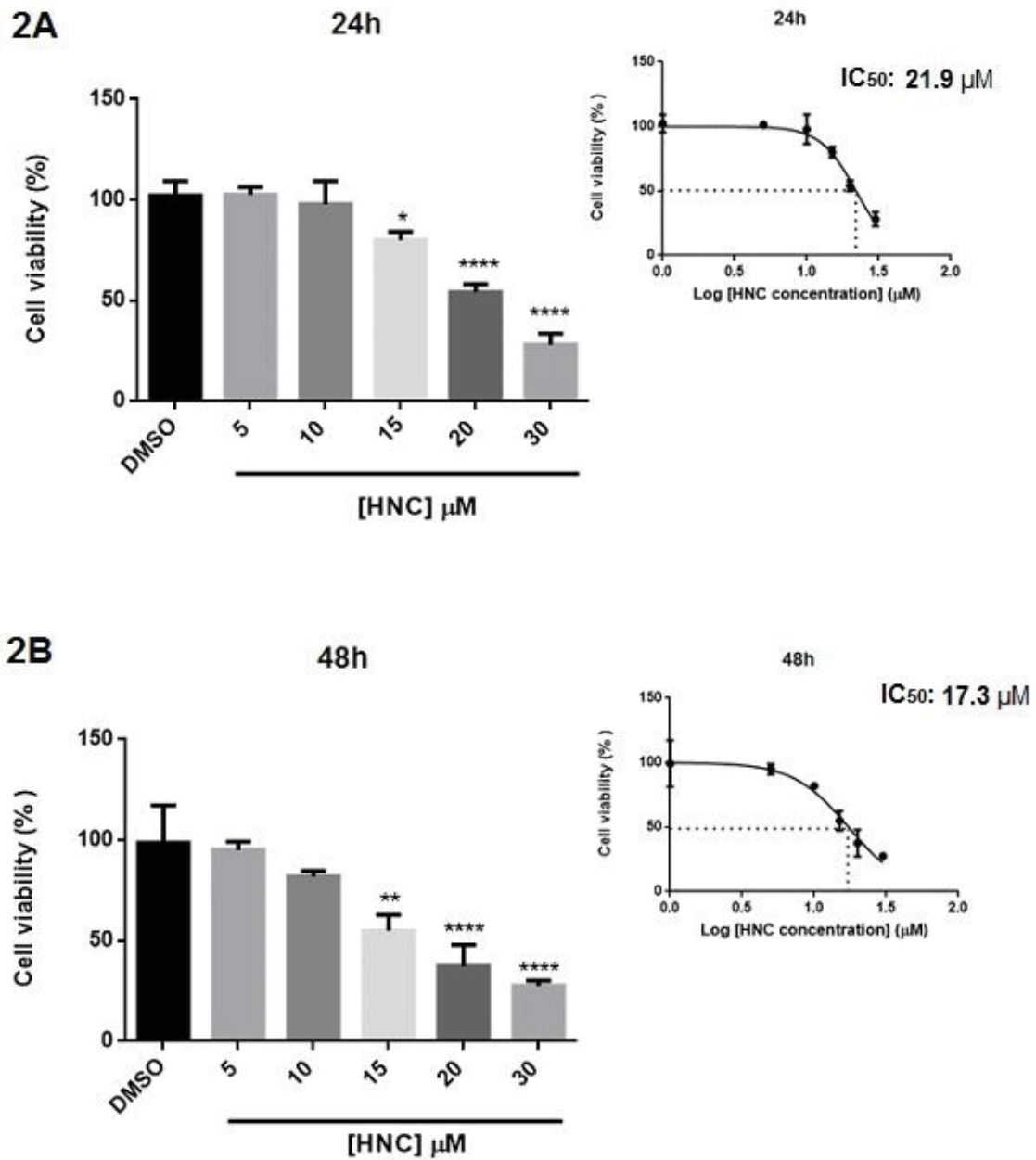


Figure 2. Cytotoxic effect of HNC on HepG2 cells assessed by MTT assay. HepG2 cells were incubated with control (DMSO 0,1% in DMEM) and HNC (5 – 30 μM) for 24 (A and log dose response as an insert) and 48 (B and log dose response as an insert) hours. Results are expressed as a percentage of the control and represent the mean \pm standard deviation of three independent experiments performed in triplicate, * $p < 0.05$, ** $p < 0.001$ and **** $p < 0.0001$.

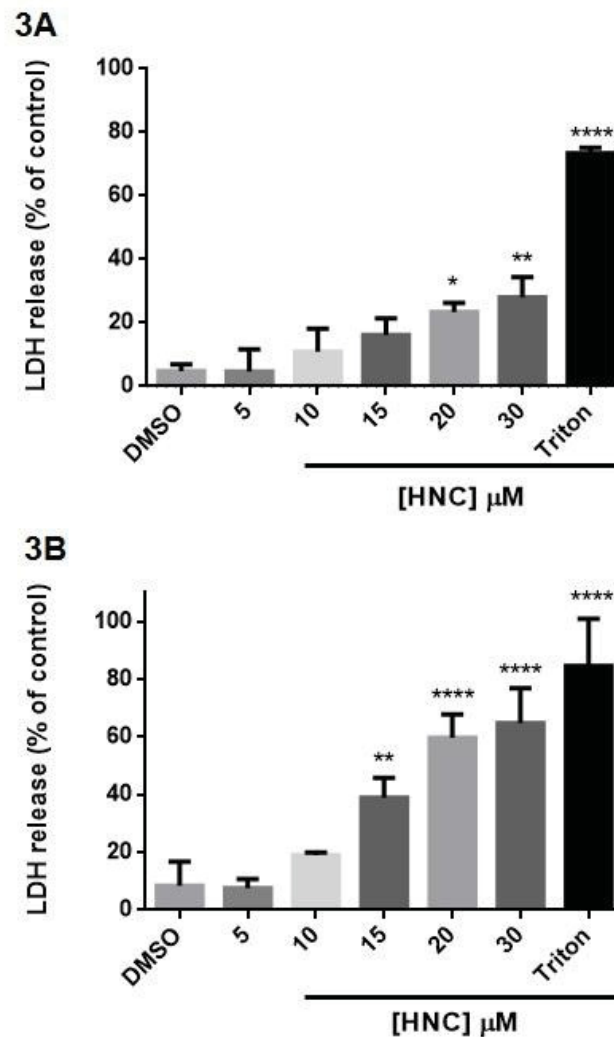


Figure 3. Cytotoxic effect of HNC on HepG2 cells assessed by LDH release assay. HepG2 cells were incubated with control (DMSO 0,1%), triton (1%) and HNC (5 – 30 μM) for 24 (A) and 48 (B) hours. Results are expressed as a percentage of the control and represent the mean \pm standard deviation of three independent experiments performed in triplicate, * $p < 0.05$, ** $p < 0.001$ and **** $p < 0.0001$.

3.2 HNC-induced ROS generation and its relationship with cytotoxicity in HepG2 cells.

Some studies have reported that an increase in ROS production is involved in cancer cell death induced by chalcones^{36,37}. Here we tested if HNC is capable of promoting an increase in ROS levels (Figure 4A and 4B). The rise of ROS levels was observed when 15 (1.4-fold) and 20 μM (1.5-fold) of HNC was used and compared with control (1.0) (Figure 4B). This rise was partially blocked by 10mM NAC (an antioxidant) considering the 20 μM HNC treatment (1.24-fold increase). When HepG2

cells were treated with 15 μM HNC the effect of NAC was not statistically significant however, a tendency in ROS reduction (1.12-fold increase) was observed. These data indicate that the increase in ROS may play a role in cytotoxicity caused by HNC.

To determine the relationship between the elevation of cellular ROS and HNC-induced cell cytotoxicity, the HepG2 cells were pretreated with 10 mM NAC for 2 hours followed the treatment with HNC 15 and 20 μM for 24 h. Cell viability was confirmed by MTT assay. Figure 5 shows that the pre-incubation with NAC was able to increase the percentage of viable HepG2 cells (around 28%) when compared to 20 μM HNC treatment alone. Since NAC is also a precursor of glutathione (GSH) synthesis³⁸, we tested if the depletion of GSH contributes to cell viability reduction caused by HNC. Pre-treatment using 400 μM BSO, which decreases GSH synthesis³⁹, did not significantly alter HNC cytotoxicity (15 and 20 μM) (data not shown). These results demonstrated that ROS plays, at least in part, a role in mediating HNC-induced cell cytotoxicity.

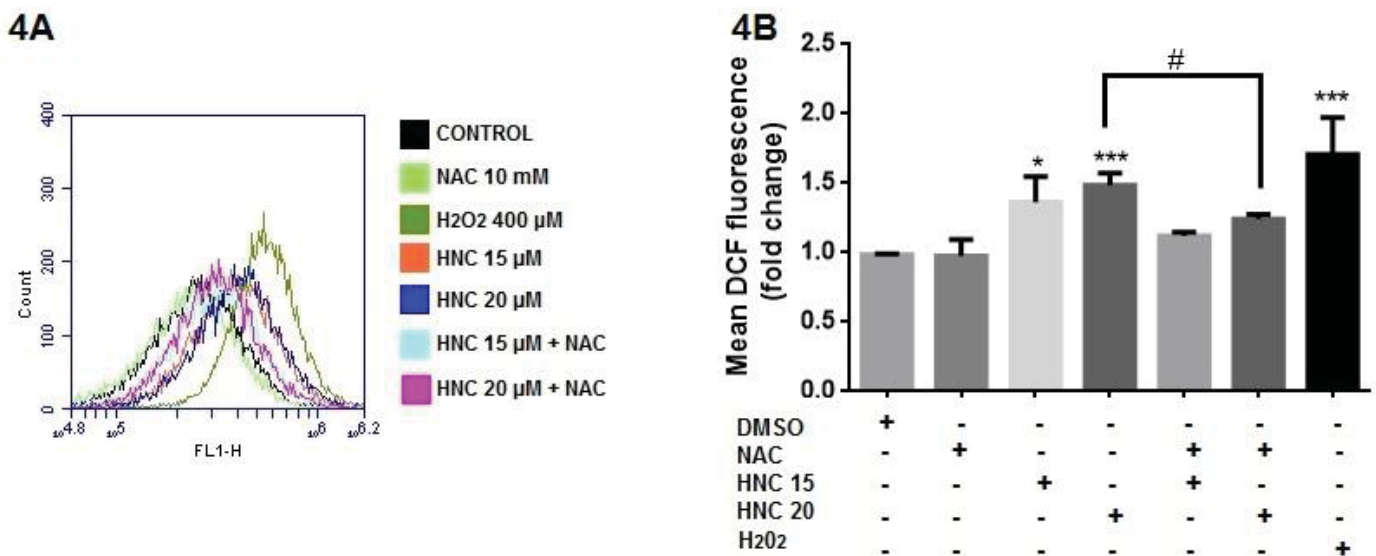


Figure 4. Effects of HNC on intracellular ROS levels . (A) Representative histogram by flow cytometry data of ROS levels. HepG2 cells were incubated for 24 h with vehicle (0.1% DMSO) (control), 15 and 20 μM HNC and pre-incubated for 2 h with NAC (10 mM) as indicated . H₂O₂ (400 μM) was added as positive control. (B) The results are expressed as relative fold change and expressed as the mean \pm standard deviation of three independent experiments performed in duplicate. * $p < 0.05$, *** $p < 0.0001$.

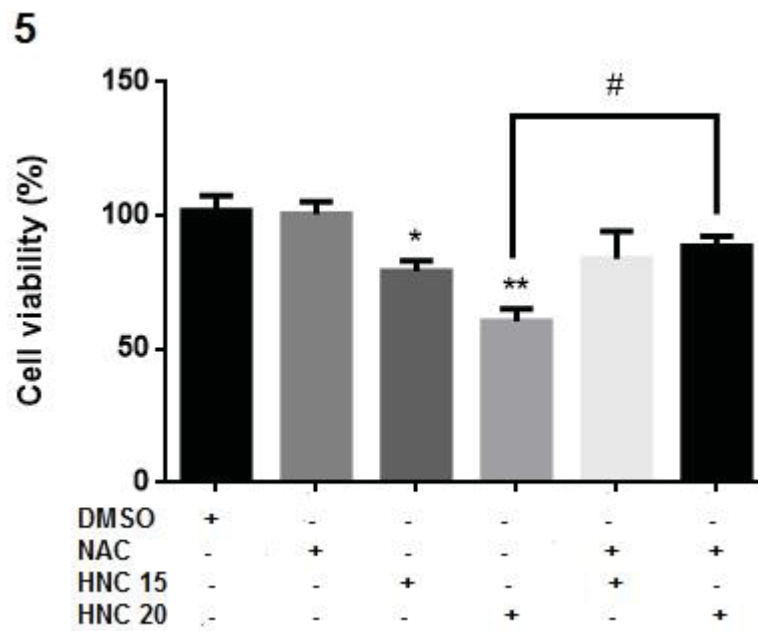


Figure 5. Effects of NAC on cytotoxicity induced by HNC. HepG2 cells were incubated for 24 hours with vehicle (0.1% DMSO), 15 and 20 μ M of HNC. NAC (10 mM) was added 2 hours prior the incubation with vehicle and both concentrations of HNC. Results are expressed as a percentage of the control and represent the mean \pm standard deviation of three independent experiments performed in duplicate. * p < 0.05, ** p < 0.001.

3.3 Effects of HNC on cell death induction

Since ROS is involved in the cytotoxic mechanism induced by HNC and as ROS is linked to different types of programmed cell death^{40,41,42}, we decided to investigate the HNC-induced cell death mechanism. We analysed different types of programmed cell death using a set of compounds which are known to selectively inhibit a type of cell death. Chloroquine (10 μ M) is an autophagy inhibitor that raises the lysosomal pH, leading to fusion inhibition of autophagosome with lysosome and protein degradation⁴³. Ferrostatin-1 (5 μ M) inhibits lipid reactive oxygen species, was used to block ferroptosis⁴⁴. Necrostatin-1 (50 μ M), a selective allosteric inhibitor of death domain receptor-associated adaptor kinase (RIPK1), was used to inhibit RIPK1-dependent necroptosis⁴⁵. Figure 6 shows that none of these inhibitors was able to restore or increase cytotoxicity caused by HNC. Next, to evaluate if HepG2 cells are undergoing apoptosis, we assessed phosphatidylserine exposure and membrane integrity using

annexin and propidium iodide staining assay, respectively (Figure 7). As shown in figure 8A, treatment with both 15 and 20 μM HNC were able to increase the number of annexin positive cells by around 9% and 13%, respectively when compared to 1% in control HepG2 cells. An increase of around 11% and 23% of annexin/PI double-positive cells were found for HNC-treated cells with 15 and 20 μM respectively (figure 8B). No statistical difference was found for only PI-positive cells (figure 8C). Taken all together, the results have shown that HNC possibly induces apoptosis cell death.

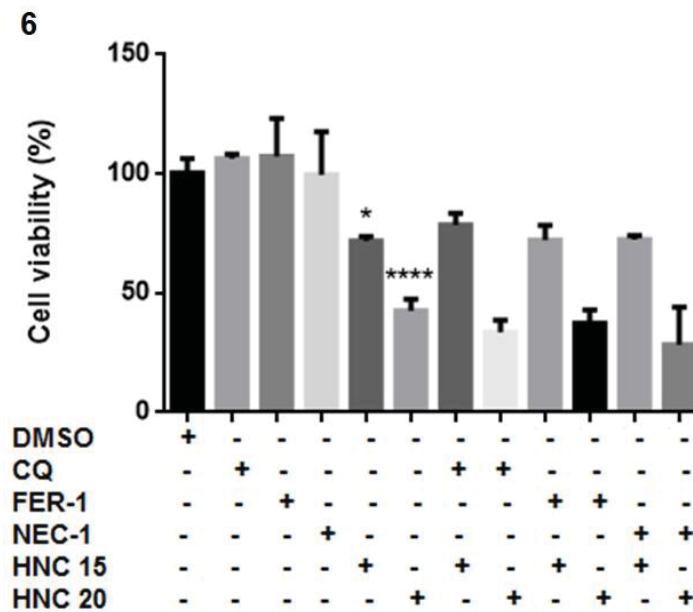


Figure 6. Cytotoxic effect of HNC using cell death inhibitors. HepG2 cells were incubated for 24 hours with vehicle (0.1% DMSO), 15 and 20 μM of HNC. Chloroquine (CQ 10 μM) was added 2 hours before the incubation with HNC. Ferrostatin-1 (5 μM) and Necrostatin-1 (50 μM) were co-incubated with HNC for 24 hours. Results are expressed as a percentage of the control and represent the mean \pm standard deviation of three independent experiments performed in triplicate, * $p < 0.05$, **** $p < 0.00001$.

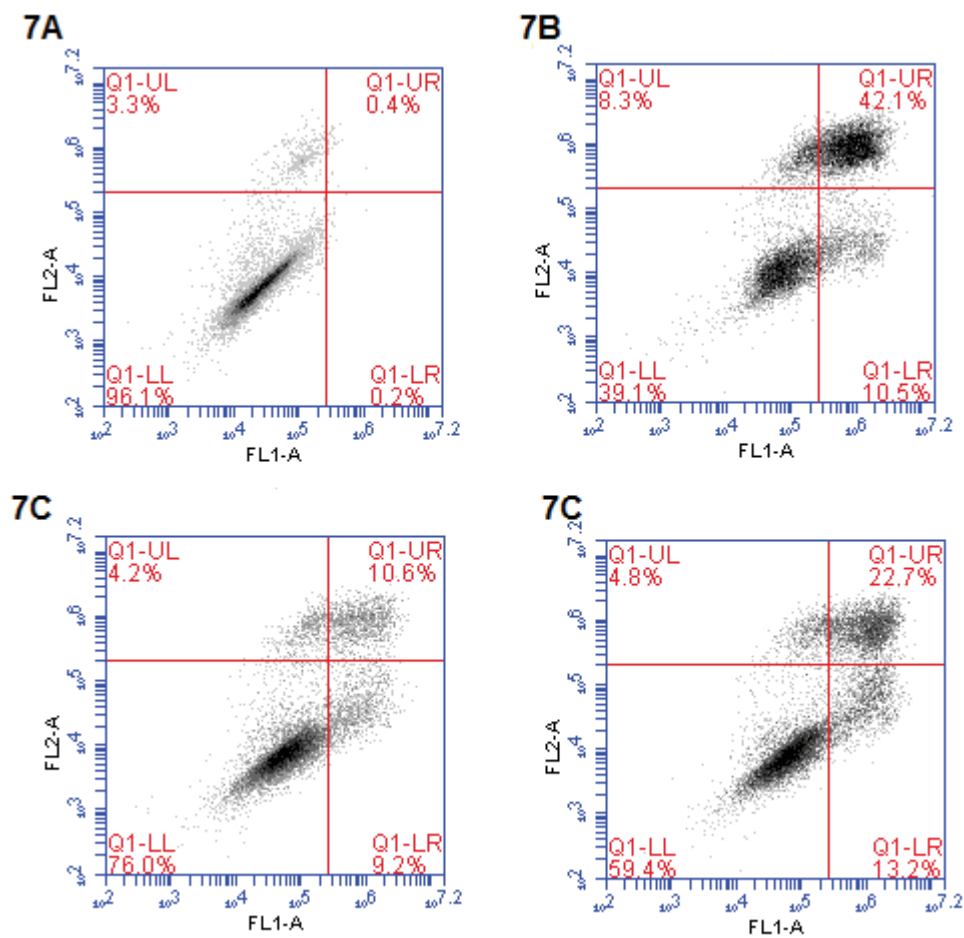


Figure 7. Flow cytometry analysis of cell death using Annexin V-FITC and PI. (A) control, (B) positive control (cisplatin (10 μ M) and quercetin (50 μ M)), (C) HNC 15 μ M and (D) HNC 20 μ M, all at 24 hours. FL1: Annexin-V/FITC FL2: PI. 10^4 events were recorded using flow cytometer Accuri C5 BD and analyzed using the Accuri C5 BD software.

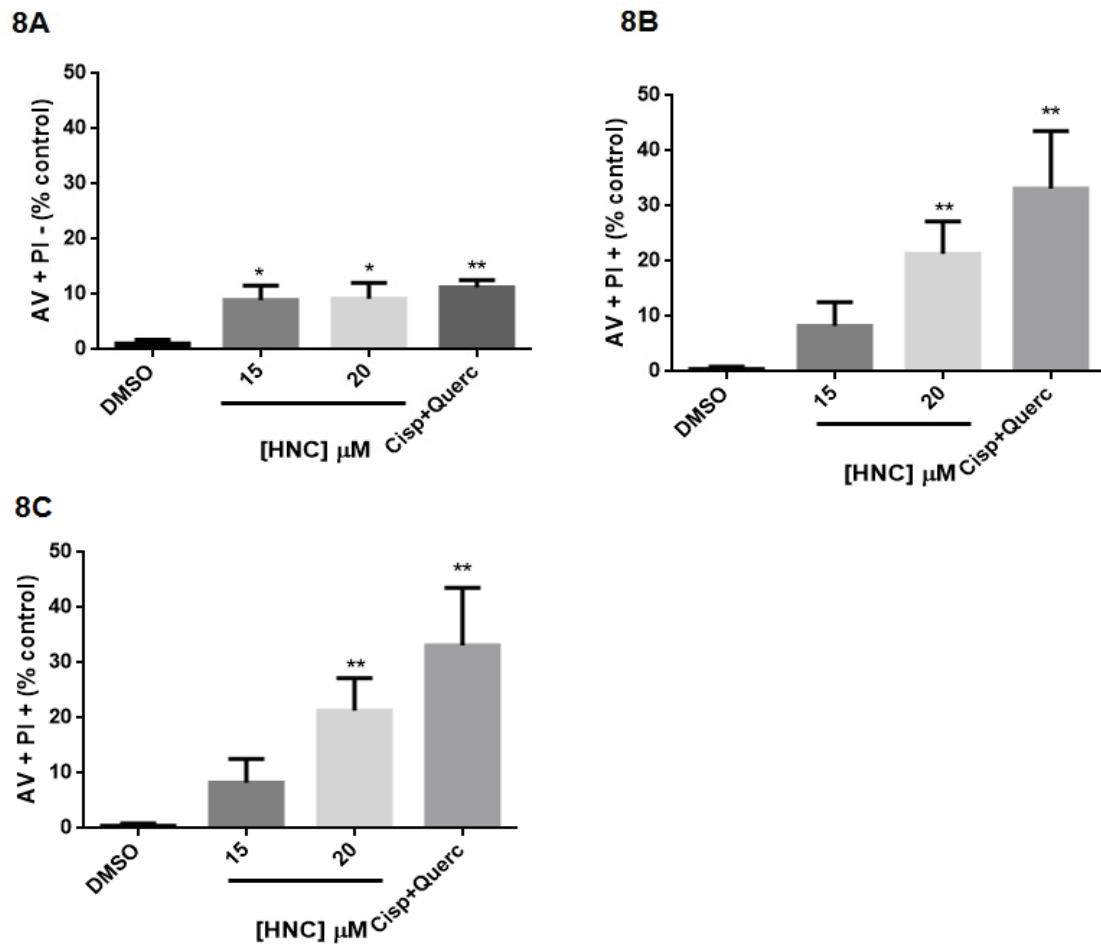


Figure 8. Annexin V-FITC/PI double staining analysis of apoptosis in HepG2 cells at 24 hours post-HNC treatment. (A) Populations testing annexin V positive/PI negative were classified as early-stage apoptotic cells, (B) double-positive cells were classified as late-stage apoptotic cells and (C) annexin V negative/ PI positive were considered necrotic cells. The values shown are the mean \pm standard deviation of three independent experiments in duplicate. * $p < 0.05$, ** $p < 0.001$.

3.4 Effect of HNC on the mitochondrial respiratory chain in HepG2 cells.

Some chalcones are capable of inducing apoptosis by the intrinsic pathway¹⁵ as well as by the extrinsic pathway²⁰. Effects on the respiratory chain are usually involved in the intrinsic pathway mechanism. For this reason, HNC effects on the mitochondrial respiratory chain (MRC) was analyzed.

HNC-treated HepG2 cells showed a decrease in the respiration rate, reaching

39% and 44% reduction for 15 and 20 μM HNC, respectively, when compared to the control at basal state (Figure 9A). After glutamate and malate addition, NADH oxidase respiration rate was also reduced at both HNC concentrations (41% and 51% of reduction for 15 and 20 μM HNC, respectively) (Figure 9B). Interestingly, succinate oxidase complex showed to be most affected by 15 and 20 μM HNC (59% and 60% of reduction, respectively) (Figure 9C). However, HNC in the same concentrations did not affect complex IV activity (91 and 102 %, respectively) (Figure 9D). These results indicated that the effects of HNC could be between complex I and III of the mitochondrial respiratory chain.

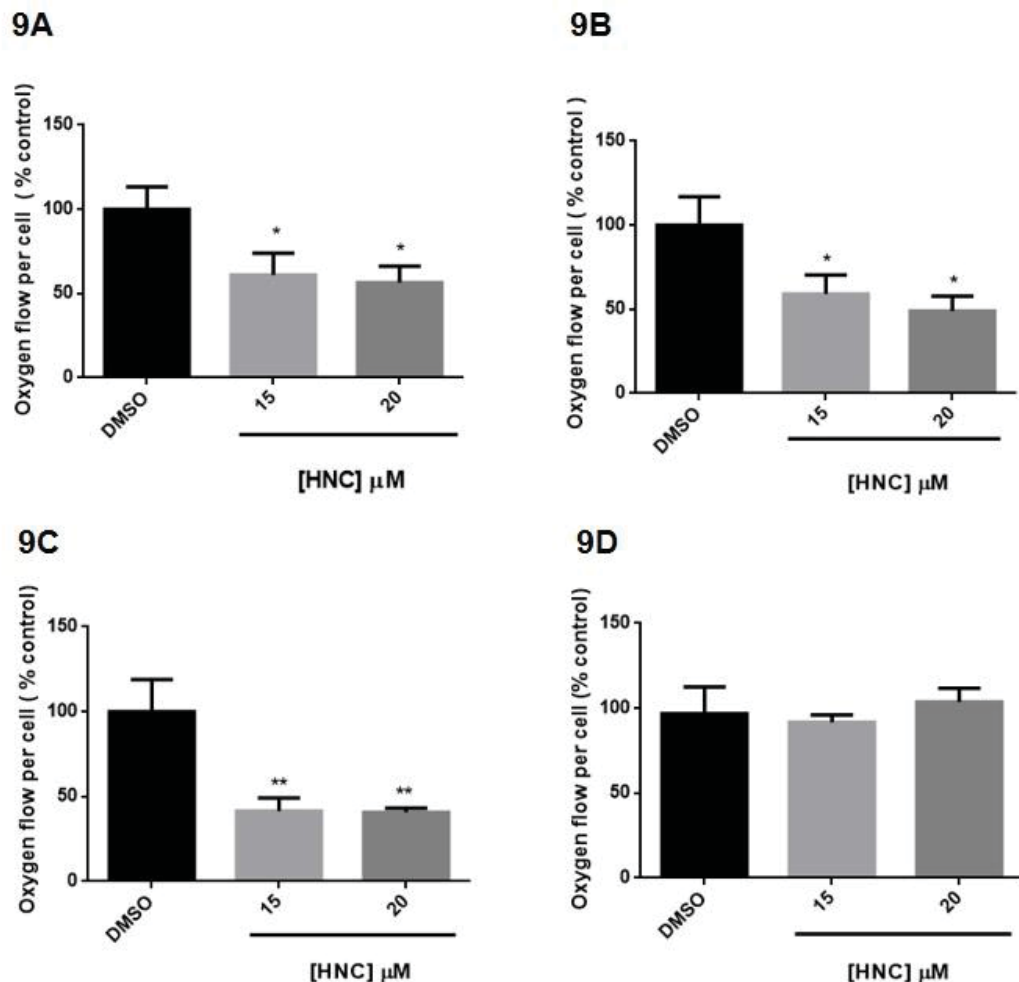


Figure 9. Effect of HNC on MRC. The respiration was determined in the absence of substrates and inhibitors (A), in the presence of glutamate, malate and ADP (B), in the presence of rotenone, succinate and ADP (C) and in the presence of antimycin A, TMPD and ascorbate (D). The values represent the mean \pm standard deviation of three independent experiments in duplicate, * $p < 0.05$, ** $p < 0.001$.

3.5 Effect of HNC on mitochondrial membrane potential ($\Delta\Psi_m$)

Mitochondrial membrane potential assay was performed using Rhodamine 123 (figure 10A). Treatment with HNC was able to reduce the intake of Rhodamine 123 in 13 % and 28 % (15 and 20 μM , respectively) compared to the control group (figure 10B). These findings showed that the treatment with 20 μM of HNC depolarizes the mitochondria membrane potential significantly.

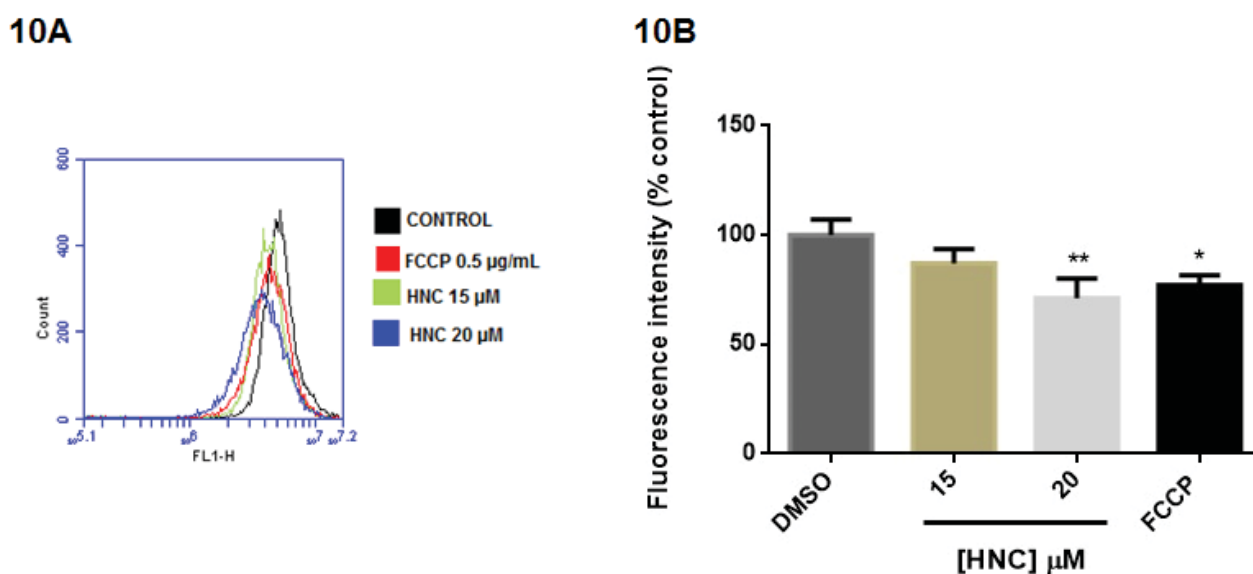


Figure 10. Effects of HNC on mitochondrial membrane potential. HepG2 cells were incubated for 24 hours with vehicle (0.1% DMSO), 15 and 20 μM of HNC. FCCP (0.5 $\mu\text{g}/\text{ml}$) was added 30 min before the addition of Rhodamine 123 (10 $\mu\text{g}/\text{ml}$) for 30 min. (A) Flow cytometry analysis of Rhodamine123 staining in HepG2 cells. 10^4 events were recorded using flow cytometer Accuri C5 BD and analyzed using the software Accuri C5 BD. (B) The results are expressed as the mean \pm standard deviation of three independent experiments performed in duplicates, * $p < 0.05$, ** $p < 0.001$.

4 Discussion

In the present study, we investigated the cytotoxic effects of 2'-hydroxy-3-nitrochalcone (HNC) in HepG2 cells. Hydroxylated chalcones are well studied as they possess several biological activities including antitumor activity⁴⁷. Hydroxylated chalcones at the 2' position are capable of causing cell cycle disruption and apoptosis

in human prostate cancer cell line (PC-3)⁴⁸. However, the presence of the nitro group in its structure is rarely seen in the literature. Pati et al, 2005⁴⁹ have shown that 3',4',5',4-methoxyl-3-nitrochalcone triggered cytotoxic effects in melanoma cancer cells (B16F10) ($IC_{50} > 100 \mu\text{M}$ - 72 hours).

Nitro groups are present in a wide range of drugs exerting antibiotic, antidepressive and immunosuppressive properties⁵⁰. In biological systems, especially in the liver, this group is biotransformed, being reduced enzymatically through nitroreductases⁵¹. In many cases, this process is linked to the cytotoxic effect of the drug as it induces ROS generation in the reducing steps⁵⁰. Some cancer cells, including liver cancer, exhibit highest levels of DT-diaforase, a nitroreductase, compared to healthy cells⁵². Therefore, nitro-aromatic prodrugs are prone to be metabolized more intensively in cancer cells, becoming attractive targets for chemotherapy. Thus, we aimed to evaluate the effects of 3-nitro substitution at ring B in chalcones, along with 2'-hydroxyl group at ring A.

In vitro cytotoxicity assays are used to anticipate a possible human toxicity. It has been reported that different cytotoxicity assays show different results depending on the compound used and the method employed⁵³. The results obtained from the cytotoxicity assays indicate that there are some differences between the two methods concerning their sensitivity to HNC effect. Through the MTT assay, we observed a viability reduction starting at 15 μM . It was seen little difference between the reduction of viable cells between the 24 h and 48 h of treatment at the MTT assay. The amount of LDH release significantly increases at 20 μM in 24 hours. However, the percentage of LDH release increase in a time-dependent manner. The MTT assay is based on the enzymatic conversion of MTT through desidrogenases in the mitochondria and cytosol, reflecting the metabolic status of the cell. On the other hand, LDH assay measures the release of the enzyme into the culture medium after cell membrane damage. The results obtained from the MTT assay indicate an early metabolic dysfunction caused by HNC in 24 hours as it is seen a cytotoxic effect with 15 μM treatment, while a significant effect on the LDH assay was seen with 20 μM treatment. Comparing the cytotoxic effect of HNC to a chalcone that does not display nitro substitution, HNC was more cytotoxic (IC_{50} : 21.9 μM – 24 h) than 2'-hydroxylchalcone (IC_{50} : 50 μM – 24 h) in HepG2 cells²².

The cytotoxicity properties of many chemotherapeutic drugs, such as oxaliplatin and bevacizumab, are related to the increase of ROS production in

hepatocarcinoma cells^{54,55}. Novel therapeutic approaches, such as adoptive T cell immunotherapy, have their effect also based on ROS generation⁵⁶. In order to verify the possibility of ROS increase due to HNC treatment, we evaluated ROS levels using the probe DCFH-DA. An increase in ROS levels was observed after HNC treatment in both concentrations tested (15 and 20 μM). These results corroborate the previous finding that some chalcones possessing 2' hydroxyl group are able to induce ROS-increased levels. The compound 3,4,2',4'- tetrahydroxychalcone (30 μM - 24 hours) caused an increase of approximately 23% in ROS levels in hepatocarcinoma (Hep3B) cells⁵⁸. The natural chalcone, Flavokawain B (2'-hydroxy-4,6-methoxychalcone 50 μM – 30 minutes) induced an increase of approximately 20% of ROS in human colon cancer cells (HCT 116)⁵⁷. The alteration in ROS levels found in our results can be related to the electrophilic characteristic of chalcones, which can decrease the availability of reduced glutathione⁵⁹ and to generate ROS, especially superoxide, through the reduction of the nitro group⁵⁰. The antioxidant NAC acts as a direct and indirect ROS scavenger since it is a precursor of glutathione⁶⁰. Pre-treatment with NAC decreased the cytotoxic effect of 20 μM HNC, indicating that the cytotoxic effect triggered by HNC at this concentration is, at least, partially due to ROS. These results demonstrate the importance of ROS for the cytotoxic effects observed with HNC.

These findings are similar to results obtained when HepG2 cells were treated with 3,4,2',4'- tetrahydroxychalcone (30 μM - 24 hours)⁵⁷. Pre-treatment with NAC (10 μM – 1 hour) decreased in almost 50% the annexin-V exposure, indicating apoptosis⁵⁷. Since NAC abrogated part of the cytotoxic effect and it is related to GSH synthesis, we investigated if a reduction of GSH could intensify HNC-caused cytotoxicity. Our results from the cell viability assay using 400 μM BSO (pre-treatment for 2 hours), an inhibitor of GSH synthesis, demonstrated that blocking glutathione synthesis does not enhance significantly the cytotoxic profile of HNC (data not shown), indicating that only inhibiting GSH synthesis is not enough to cause a expressive decrease in the cell viability⁶¹. Besides the role of NAC in GSH synthesis, NAC has been shown to act as a direct oxidant scavenger. It is a potent scavenger of $\cdot\text{OH}$ radical and also reacts slowly with H_2O_2 ⁷³. The scavenging activity of NAC seems to be the reason why ROS levels are recovered and consequently cell viability is partially restored.

The increase in ROS levels is involved in different cell death pathways^{40,41,42}. Our preliminary results using inhibitors for autophagy, ferroptosis and necroptosis

suggest that probably none of these mechanisms is involved in HNC mode of action. However, further analysis is needed to definitively decline this hypothesis.

Increasing ROS levels may trigger apoptosis through different pathways. For instance, DNA damage caused by ROS activates the p53 protein, which can activate both intrinsic and extrinsic apoptosis cell death pathways⁶². The results obtained from annexin V-FITC/PI assays showed a slight, but significant, increase in HepG2 cells exposing phosphatidylserine after HNC treatment (15 and 20 μ M), indicating an early apoptotic process. It was found a greater increase in annexin/PI double-positive cells at higher HNC concentration used (20 μ M), suggesting that HNC-treated HepG2 cells were in the late stages of apoptosis after 24 h. These data support the results of LDH assay, where a significant change in cell membrane integrity was found in cells treated with 20 μ M HNC. Our results showed a greater toxic effect when comparing HNC-treated HepG2 cells to studies using 2'-hydroxychalcone-treated HepG2 cells, as only 100 μ M 2'-hydroxychalcone was able to induce DNA fragmentation, caspase 9 activation and 50% of the reduction in cell viability in 24 hours²¹.

Apoptosis plays an important role in cell homeostasis and in growth control⁶³. It is also an important anticancer mechanism of chemotherapy compounds, and it is being used to develop new anticancer agents⁶⁴. Apoptosis can be triggered by different stimuli leading to extrinsic or intrinsic pathways. The extrinsic pathway activation involves the binding of death receptors with their respective ligands. Mitochondria and Bcl-2 family proteins play a crucial function in the initiation of intrinsic apoptosis⁶⁵. Loss of mitochondrial membrane potential and ROS production in the mitochondria are early events related to the intrinsic apoptotic cell death. Indeed, mitochondrial targeted anticancer compounds are promising drugs in order to overcome cell death resistance by promoting pro-oxidative stress and offering new strategies to defeat cancer⁶⁷.

To our knowledge, this is the first report demonstrating the effect of HNC on mitochondria respiration. Our results of the evaluation of the respiratory status of the cell showed a significant decrease in cell respiration at basal state in both HNC concentrations (15 and 20 μ M). This profile was seen in the segments of the NADH and succinate oxidase, excluding the complex IV. These data demonstrate that HNC may be causing a disruption of complex I, II or III. However, further analysis is necessary to eliminate the possible effect of HNC in the transportation of substrates, such as malate/aspartate shuttle, or the activity of dehydrogenases. Effects of HNC on mitochondrial membrane could also contribute to the reduction of oxygen consumption

and consequent synthesis of ATP. Studies have analyzed the effect of hydroxylchalcones on mitochondrial function of rats, such as 4-hydroxylchalcone (70nmol/mg of protein), which the results showed a reduction of 60 % in the oxygen consumption at state 3, as ADP is added⁶⁷. Decreased oxygen consumption at state 3 indicates inhibition of mitochondrial electron transfer chain⁶⁸ which is one of the possible effect of HNC on HepG2 cells. Blocking or slowing electron movement from complex I-III to complex IV raises the possibility of superoxide and hydrogen peroxide formation⁶⁹. This data indicates the possible inhibition of complex I to III of the respiratory chain could be the source of ROS production proceeding via electron leakage from the complexes I-III.

Continuing the analysis of the mitochondrial damage caused by HNC, we used Rhodamine 123 which indicates the mitochondrial membrane potential (MMP). The significant reduction in the MMP was verified in the HepG2 cells treated with 20 μ M HNC, and a slight reduction at 15 μ M HNC. The disruption of MMP caused by 20 μ M HNC was similar to the treatment using FCCP, an ionophore capable of depolarizing MMP. Our results agree with other studies, where 4,2',4'-trihydroxychalcone (20 μ M/mL for 6 hours) was able to decrease MMP in 60% using human prostate cancer cell lines (DU145 and MLL)⁷⁰.

The role of mitochondria in controlling apoptosis can be seen in different levels: ATP production, mitochondrial membrane potential and mitochondrial membrane permeability⁷¹. The disruption of the mitochondrial membrane permeability is a consequence of the charge difference within the mitochondria caused by the disturbance of mitochondrial membrane potential⁷². As a result, mitochondrial proteins are released into the cytosol, such as cytochrome C, triggering intrinsic apoptosis. The effect of HNC on the mitochondria may be related to intrinsic apoptosis, however, further experiments on proteins related to this pathway, such as Bcl-2, BAX, cytochrome c and caspase 9 are needed to confirm this hypothesis.

5 Conclusion

There is a great volume of studies demonstrating the anticancer potential of chalcone derivatives, however, few studies were conducted to define their mechanism of action. Compounds containing nitro groups are present in a variety of drugs, but its effect in chalcones are yet not known. The present study has assessed, for the first

time, the *in vitro* cytotoxic effect of 2'-hidroxi-3-nitrochalcone (HNC) in HepG2 cells. Our results have demonstrated that HNC promotes cell death, which can be due to the change in ROS levels and HNC's inhibitory effect on the mitochondrial respiratory chain. Apoptosis seems to be cell death mechanism caused by HNC since it induced phosphatidylserine exposure as well as a decrease in the mitochondria membrane potential. Even though the effect on mitochondria is apparent, additional studies are needed to confirm the role of the intrinsic apoptotic pathway as being the main cell death mechanism. Taken all together, these results show the promising use of HNC as an anti-cancer agent to CHC.

Conflicts of interest

The authors declare no conflicts of interest.

Acknowledgments

The authors would like to thank the financial support from CNPq (Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico) and CAPES (Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior).

6 REFERENCES

1. AMERICAN CANCER SOCIETY. Key statistics about liver cancer.
2. Balogh J, Iii DV, Gordon S, Li X, Ghobrial RM, Jr HPM. Hepatocellular carcinoma : a review. 2016:41-53.
3. Arzumanyan a, Reis HM, Feitelson M a. Pathogenic mechanisms in HBV- and HCV-associated hepatocellular carcinoma. *Nat Rev Cancer*. 2013;13(2):123-135. doi:10.1038/nrc3449.
4. Lieber CS. Hepatic, metabolic, and nutritional disorders of alcoholism: From pathogenesis to therapy. *Crit Rev Clin Lab Sci*. 2000;37(6):551-584. doi:10.1080/10408360091174312
5. Kumar A, Acharya SK, Singh SP, et al. The Indian National Association for Study of the Liver (INASL) Consensus on Prevention, Diagnosis and Management of Hepatocellular Carcinoma in India: The Puri Recommendations. *J Clin Exp Hepatol*. 2014;4(August):S3-S26. doi:10.1016/j.jceh.2014.04.003
6. Groopman JD, Kensler TW, Wild CP. Protective interventions to prevent aflatoxin-

- induced carcinogenesis in developing countries. *Annu Rev Public Health*. 2008;29:187-203. doi:10.1146/annurev.publhealth.29.020907.090859.
7. Maria K, Dimitra H-L, Maria G. Synthesis and Anti-Inflammatory Activity of Chalcones and Related Mannich Bases. *Med Chem (Los Angeles)*. 2008;4(6):586-596. doi:10.2174/157340608786242070.
 8. Chiaradia LD, Mascarello A, Purificação M, et al. Synthetic chalcones as efficient inhibitors of Mycobacterium tuberculosis protein tyrosine phosphatase PtpA. *Bioorganic Med Chem Lett*. 2008;18(23):6227-6230. doi:10.1016/j.bmcl.2008.09.105.
 9. Wu JH, Wang XH, Yi YH, Lee KH. Anti-AIDS agents 54. A potent anti-HIV chalcone and flavonoids from genus Desmos. *Bioorganic Med Chem Lett*. 2003;13(10):1813-1815. doi:10.1016/S0960-894X(03)00197-5.
 10. Domínguez JN, Charris JE, Lobo G, et al. Synthesis of quinolinyl chalcones and evaluation of their antimalarial activity. *Eur J Med Chem*. 2001;36(6):555-560. doi:10.1016/S0223-5234(01)01245-4.
 11. Go ML, Wu X, Liu XL. Chalcones: an update on cytotoxic and chemoprotective properties. *Curr Med Chem*. 2005;12(117543):481-499. doi:10.2174/0929867053363153.
 12. Fu Y, Hsieh TC, Guo J, et al. Licochalcone-A, a novel flavonoid isolated from licorice root (*Glycyrrhiza glabra*), causes G2 and late-G1 arrests in androgen-independent PC-3 prostate cancer cells. *Biochem Biophys Res Commun*. 2004;322(1):263-270. doi:10.1016/j.bbrc.2004.07.094.
 13. Salum LB, Altei WF, Chiaradia LD, et al. Cytotoxic 3,4,5-trimethoxychalcones as mitotic arresters and cell migration inhibitors. *Eur J Med Chem*. 2013;63:501-510. doi:10.1016/j.ejmech.2013.02.037.
 14. Jung JI, Lim SS, Choi HJ, et al. Isoliquiritigenin induces apoptosis by depolarizing mitochondrial membranes in prostate cancer cells. *J Nutr Biochem*. 2006;17(10):689-696. doi:10.1016/j.jnutbio.2005.11.006.
 15. Growth inhibitory effect of paratocarpin E, a prenylated chalcone isolated from *Euphorbia humifusa* Wild., by induction of autophagy and apoptosis in human breast cancer cells.
 16. Middleton Jr. E, Kandaswami C, Theoharides TC. The effects of plant flavonoids on mammalian cells: implications for inflammation, heart disease, and cancer. *Pharmacol Rev*. 2000;52(4):673-751. doi:10.1093/toxsci/kfm014.

17. Gomes MN, Muratov EN, Pereira M, et al. Chalcone derivatives: Promising starting points for drug design. *Molecules*. 2017;22(8). doi:10.3390/molecules22081210.
- 18 Dimmock JR.; Elias, DW, Beazely, MA, Kandepu, N.M. Bioactivities of chalcones. *Crit Rev Clin Lab Sci*, 1999;12(6):1125–1149.
- 19 Kobori M, Iwashita K, Shinmoto H, Tsushida T. Phloretin-induced apoptosis in B16 melanoma 4A5 cells and HL60 human leukemia cells. *Biosci Biotechnol Biochem*. 1999;63(4):719-725. doi:org/10.1271/bbb.63.719.
- 20 Hsu Y-L, Kuo P-L, Lin C-C. Isoliquiritigenin induces apoptosis and cell cycle arrest through p53-dependent pathway in Hep G2 cells. *Life Sci*. 2005;77(3):279-292. doi:10.1016/j.lfs.2004.09.047.
- 21 Amslinger S, Al-Rifai N, Winter K, Wörmann K, Scholz R, Wild PB and M. Reactivity assessment of chalcones by a kinetic thiol assay. *Org Biomol Chem*. 2012:2-5. doi:10.1039/b000000x.
- 22 Echeverria C, Santibañez JF, Donoso-Taouda O, Escobar CA, Ramirez-Tagle R. Structural antitumoral activity relationships of synthetic chalcones. *Int J Mol Sci*. 2009;10(1):221-231. doi:10.3390/ijms10010221.
- 23 Chin Chung M, Longhin Bosquesi P, Leandro dos Santos J. A Prodrug Approach to Improve the Physico-Chemical Properties and Decrease the Genotoxicity of Nitro Compounds. *Curr Pharm Des*. 2011;17(32):3515-3526. doi:10.2174/138161211798194512.
- 24 Mai CW, Yaeghoobi M, Abd-Rahman N, Kang YB, Pichika MR. Chalcones with electron-withdrawing and electron-donating substituents: Anticancer activity against TRAIL resistant cancer cells, structure-activity relationship analysis and regulation of apoptotic proteins. *Eur J Med Chem*. 2014;77:378-387. doi:10.1016/j.ejmech.2014.03.002.
- 25 Kovacic P, Somanathan R. Nitroaromatic compounds: Environmental toxicity, carcinogenicity, mutagenicity, therapy and mechanism. *J Appl Toxicol*. 2014;34(8):810-824. doi:10.1002/jat.2980.
- 26 Trachootham D, Alexandre J, Huang P. Targeting cancer cells by ROS-mediated mechanisms: A radical therapeutic approach? *Nat Rev Drug Discov*. 2009;8(7):579-591. doi:10.1038/nrd2803.
- 27 Champelovier P, Mininno M, Duchamp E, et al. Cytotoxicity of chalcone derivatives towards glioblastoma. *Anticancer Res*. 2011;31(10):3213-3218.

- 28 Kuo YF, Su YZ, Tseng YH, Wang SY, Wang HM, Chueh PJ. 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 Radic Biol Med*. 2010;49(2):214-226. doi:10.1016/j.freeradbiomed.2010.04.005.
- 29 Neuzil J, Dong LF, Rohlena J, Truksa J, Ralph SJ. Classification of mitocans, anti-cancer drugs acting on mitochondria. *Mitochondrion*. 2013;13(3):199-208. doi:10.1016/j.mito.2012.07.112.
- 30 Shiau C-W, Huang J-W, Wang D-S, et al. alpha-Tocopheryl succinate induces apoptosis in prostate cancer cells in part through inhibition of Bcl-xL/Bcl-2 function. *J Biol Chem*. 2006;281(17):11819-11825. doi:10.1074/jbc.M511015200.
- 31 Aubry JP, Blaecke A, Lecoanet-Henchoz S, et al. Annexin V used for measuring apoptosis in the early events of cellular cytotoxicity. *Cytometry*. 1999;37(3):197-204. doi:10.1002/(SICI)1097-0320(19991101)37:3<197::AID-CYTO6>3.0.CO;2-L.
- 32 Zhao JL, Zhao J, Jiao HJ. Synergistic growth-suppressive effects of quercetin and cisplatin on HepG2 human hepatocellular carcinoma cells. *Appl Biochem Biotechnol*. 2014;172(2):784-791. doi:10.1007/s12010-013-0561-z.
- 33 LeBel CP, Ischiropoulos H, Bondy SC. Evaluation of the Probe 2',7'-Dichlorofluorescein as an Indicator of Reactive Oxygen Species Formation and Oxidative Stress. *Chem Res Toxicol*. 1992;5(2):227-231. doi:10.1021/tx00026a012.
- 34 Kuznetsov A V., Veksler V, Gellerich FN, Saks V, Margreiter R, Kunz WS. Analysis of mitochondrial function in situ in permeabilized muscle fibers, tissues and cells. *Nat Protoc*. 2008;3(6):965-976. doi:10.1038/nprot.2008.61.
- 35 Baracca A, Sgarbi G, Solaini G, Lenaz G. Rhodamine 123 as a probe of mitochondrial membrane potential: Evaluation of proton flux through F₀ during ATP synthesis. *Biochim Biophys Acta - Bioenerg*. 2003;1606(1-3):137-146. doi:10.1016/S0005-2728(03)00110-5.
- 36 Kuo YF, Su YZ, Tseng YH, Wang SY, Wang HM, Chueh PJ. 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 Radic Biol Med*. 2010;49(2):214-226.

- doi:10.1016/j.freeradbiomed.2010.04.005.
- 37 Navarini ALF, Chiaradia LD, Mascarello A, et al. Hydroxychalcones induce apoptosis in B16-F10 melanoma cells via GSH and ATP depletion. *Eur J Med Chem.* 2009;44(4):1630-1637. doi:10.1016/j.ejmech.2008.09.009.
- 38 Zafarullah M, Li WQ, Sylvester J, Ahmad M. Molecular mechanisms of N-acetylcysteine actions. *Cell Mol Life Sci.* 2003;60(1):6-20. doi:10.1007/s000180300001.
- 39 Drew R, Miners JO. The effects of buthionine sulphoximine (BSO) on glutathione depletion and xenobiotic biotransformation. *Biochem Pharmacol.* 1984;33(19):2989-2994. doi:10.1016/0006-2952(84)90598-7.
- 40 Scherz-Shouval R, Elazar Z. Regulation of autophagy by ROS: Physiology and pathology. *Trends Biochem Sci.* 2011;36(1):30-38. doi:10.1016/j.tibs.2010.07.007.
- 41 Yang WS, Stockwell BR. Ferroptosis: Death by Lipid Peroxidation. *Trends Cell Biol.* 2016;26(3):165-176. doi:10.1016/j.tcb.2015.10.014.
- 42 Wu W, Liu P, Li J. Necroptosis: An emerging form of programmed cell death. *Crit Rev Oncol Hematol.* 2012;82(3):249-258. doi:10.1016/j.critrevonc.2011.08.004.
- 43 Fan HY, Heerklotz H. Digitonin does not flip across cholesterol-poor membranes. *J Colloid Interface Sci.* 2017;504:283-293. doi:10.1016/j.jcis.2017.05.034.
- 44 Zhou M, Wang R. Small-Molecule Regulators of Autophagy and Their Potential Therapeutic Applications. *ChemMedChem.* 2013;8(5):694-707. doi:10.1002/cmdc.201200560.
- 45 Dixon SJ, Lemberg KM, Lamprecht MR, et al. Ferroptosis: An iron-dependent form of nonapoptotic cell death. *Cell.* 2012;149(5):1060-1072. doi:10.1016/j.cell.2012.03.042.
- 46 Degterev A, Hitomi J, Gemscheid M, et al. Identification of RIP1 kinase as a specific cellular target of necrostatins. *Nat Chem Biol.* 2008;4(5):313-321. doi:10.1038/nchembio.83.
- 47 Kim SY, Lee IS, Moon A. 2-Hydroxychalcone and xanthohumol inhibit invasion of triple negative breast cancer cells. *Chem Biol Interact.* 2013;203(3):565-572. doi:10.1016/j.cbi.2013.03.012.
- 48 Zhang B, Lai Y, Li Y, et al. Antineoplastic activity of isoliquiritigenin, a chalcone compound, in androgen-independent human prostate cancer cells linked to G2/M

- cell cycle arrest and cell apoptosis. *Eur J Pharmacol*. 2018;821(May 2017):57-67. doi:10.1016/j.ejphar.2017.12.053.
- 49 Pati HN, Holt HL, LeBlanc R, Dickson J, Stewart M, Brown T, Lee M (2005) Synthesis and cytotoxic properties of nitro-and aminochalcones. *Med Chem Res* 14:19–25
- 50 Olender D, Żwawiak J, Zaprutko L. Multidirectional efficacy of biologically active nitro compounds included in medicines. *Pharmaceuticals*. 2018;11(2). doi:10.3390/ph11020054.
- 51 Macherey AC, Dansette PM. *Biotransformations Leading to Toxic Metabolites: Chemical Aspects*. Elsevier Ltd; 2015. doi:10.1016/B978-0-12-417205-0.00025-0.
- 52 Cresteil T, Jaiswal a K. High levels of expression of the NAD(P)H:quinone oxidoreductase (NQO1) gene in tumor cells compared to normal cells of the same origin. *Biochem Pharmacol*. 1991;42(5):1021-1027. doi:10.1016/0006-2952(91)90284-C.
- 53 Lobner D. Comparison of the LDH and MTT assays for quantifying cell death: Validity for neuronal apoptosis? *J Neurosci Methods*. 2000;96(2):147-152. doi:10.1016/S0165-0270(99)00193-4.
- 54 Ding Z Bin, Hui B, Shi YH, et al. Autophagy activation in hepatocellular carcinoma contributes to the tolerance of oxaliplatin via reactive oxygen species modulation. *Clin Cancer Res*. 2011;17(19):6229-6238. doi:10.1158/1078-0432.CCR-11-0816.
- 55 Guo XL, Li D, Sun K, et al. Inhibition of autophagy enhances anticancer effects of bevacizumab in hepatocarcinoma. *J Mol Med*. 2013;91(4):473-483. doi:10.1007/s00109-012-0966-0.
- 56 Habtetsion T, Ding ZC, Pi W, et al. Alteration of Tumor Metabolism by CD4+ T Cells Leads to TNF- α -Dependent Intensification of Oxidative Stress and Tumor Cell Death. *Cell Metab*. 2018:1-15. doi:10.1016/j.cmet.2018.05.012.
- 57 Kuo YF, Su YZ, Tseng YH, Wang SY, Wang HM, Chueh PJ. 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 Radic Biol Med*. 2010;49(2):214-226. doi:10.1016/j.freeradbiomed.2010.04.005.
- 58 Moon DO, Kim MO, Choi YH, Hyun JW, Chang WY, Kim GY. Butein induces G2/M phase arrest and apoptosis in human hepatoma cancer cells through

- ROS generation. *Cancer Lett.* 2010;288(2):204-213.
doi:10.1016/j.canlet.2009.07.002.
- 59 Navarini ALF, Chiaradia LD, Mascarello A, et al. Hydroxychalcones induce apoptosis in B16-F10 melanoma cells via GSH and ATP depletion. *Eur J Med Chem.* 2009;44(4):1630-1637. doi:10.1016/j.ejmech.2008.09.009.
- 60 Zafarullah M, Li WQ, Sylvester J, Ahmad M. Molecular mechanisms of N-acetylcysteine actions. *Cell Mol Life Sci.* 2003;60(1):6-20.
doi:10.1007/s000180300001.
- 61 Han YH, Moon HJ, You BR, Kim SZ, Kim, SH, Park, WH. The effects of buthionine sulfoximine, diethyldithiocarbamate or 3-amino-1, 2, 4-triazole on propyl gallate-treated HeLa cells in relation to cell growth, reactive oxygen species and glutathione. *Inter J Mol Med.* 2009;24(2): 261-268.
- 62 Liu B, Chen Y, St. Clair DK. ROS and p53: A versatile partnership. *Free Radic Biol Med.* 2008;44(8):1529-1535. doi:10.1016/j.freeradbiomed.2008.01.011.
- 63 Lowe SW, Lin a W. Apoptosis in cancer. *Carcinogenesis.* 2000;21(3):485-495.
doi:10.1093/carcin/21.3.485.
- 64 Fulda S. Seminars in Cancer Biology Targeting apoptosis for anticancer therapy. 2015;31:84-88. doi:10.1016/j.semcancer.2014.05.002.
- 65 Cosentino K, García-Sáez AJ. Mitochondrial alterations in apoptosis. *Chem Phys Lipids.* 2014;181:62-75. doi:10.1016/j.chemphyslip.2014.04.001.
- 66 Neuzil J, Dong LF, Rohlena J, Truksa J, Ralph SJ. Classification of mitocans, anti-cancer drugs acting on mitochondria. *Mitochondrion.* 2013;13(3):199-208.
doi:10.1016/j.mito.2012.07.112.
- 67 Guzy J, Vašková-Kubálková J, Rozmer Z, et al. Activation of oxidative stress response by hydroxyl substituted chalcones and cyclic chalcone analogues in mitochondria. *FEBS Lett.* 2010;584(3):567-570.
doi:10.1016/j.febslet.2009.11.098.
- 68 Chen Q, Camara AKS, Stowe DF, Hoppel CL, Lesnefsky EJ. Modulation of electron transport protects cardiac mitochondria and decreases myocardial injury during ischemia and reperfusion. *AJP Cell Physiol.* 2006;292(1):C137-C147. doi:10.1152/ajpcell.00270.2006.
- 69 Murphy MP. How mitochondria produce reactive oxygen species. *Biochem J.* 2009;417(1):1-13. doi:10.1042/BJ20081386.
- 70 Jung JI, Lim SS, Choi HJ, et al. Isoliquiritigenin induces apoptosis by depolarizing

mitochondrial membranes in prostate cancer cells. *J Nutr Biochem*.

2006;17(10):689-696. doi:10.1016/j.jnutbio.2005.11.006.

71 Kroemer G, Reed JC. Mitochondrial control of cell death. *Nat Med*. 2000;6(5):513-519. doi:10.1038/74994.

72 Ly JD, Grubb DR, Lawen a. The mitochondrial membrane potential in apoptosis; an update. *Apoptosis*. 2003;8(2):115-128. doi:5119089 [pii].

73 ARUOMA OI et al. "The antioxidant action of N-acetylcysteine: its reaction with hydrogen peroxide, hydroxyl radical, superoxide, and hypochlorous acid." *Free Radical Biology and Medicine* 1989; 6(6): 593-597. doi: 10.1016/0891-5849(89)90066-X.

4 CONSIDERAÇÕES FINAIS

Devido à baixa eficácia e alta toxicidade que os atuais antitumorais apresentam, torna-se importante a busca de novos agentes terapêuticos. O potencial citotóxico das chalconas em células cancerígenas é bem conhecido, entre elas algumas chalconas hidroxiladas na posição 2'. Porém, estudos com chalconas que possuem o grupo nitro são limitados, e os mesmos, envolvem, em geral, a presença de outros grupos funcionais diferentes do hidroxil. Alguns compostos com grupamento nitro são utilizados como pró-drogas no tratamento de várias doenças (CHIN CHUNG et al., 2011). Além disso, a presença do grupamento nitro pode colaborar para aumentar a reatividade do grupo cetona α,β -insaturada com GSH e grupos SH de proteínas, o que pode colaborar com o aumento de EROs (GUZY et al., 2010). Um dos mecanismos de ação promovidos por vários quimioterápicos que colabora para a indução da morte das células tumorais envolve a indução do aumento de EROs. (TRACHOOTHAM et al., 2009).

Em nosso trabalho buscamos juntamente com o prof. Alfredo R. M. de Oliveira do Departamento de Química da UFPR, sintetizar uma chalcona nitrada (posição 3 do anel B). A adição do grupo hidroxil na posição 2' da chalcona nitrada foi realizada com a finalidade de aumentar a solubilidade e, eventualmente, contribuir para o seu efeito citotóxico.

A HNC provocou diminuição no consumo de oxigênio e alteração no potencial da membrana mitocondrial. A redução do consumo de oxigênio verificada desde o estado basal e entre os complexos I e III da cadeia respiratória poderiam ser

consequência da capacidade intrínseca da HNC em gerar EROs e causar danos sobre estes complexos ou uma inibição da atividade deles por interação direta da HNC. Além disso, como os valores de redução da respiração celular no estado basal se modificaram pouco ao longo da cadeia, efeitos sobre as propriedades da membrana mitocondrial também poderiam estar ocorrendo colaborando para o comprometimento do transporte de elétrons, aumento de EROs e redução dos valores de potencial transmembrana.

A apoptose pode ser induzida por vias distintas, e algumas delas envolve a participação de EROs. EROs podem ativar a proteína p53, que ativa a transcrição de genes essenciais para a indução da apoptose pela via intrínseca (YOSHIDA; MIKI 2010). EROs como H_2O_2 e $O_2^{\cdot-}$ podem causar oxidação de componentes da membrana mitocondrial, causando a liberação de citocromo C, culminando em apoptose por via intrínseca (PALLEPATI; AVERILL-BATES, 2011). Foi possível verificar neste trabalho que a HNC provocou um aumento de EROs capaz de colaborar para a indução da morte das células de hepatocarcinoma e que a apoptose por via intrínseca é o provável mecanismo de morte celular causado pela HNC devido aos efeitos mitocondriais observados. Contudo, outras análises seriam necessárias para comprovar esta hipótese.

Além da via apoptótica, novos tipos de morte celular têm sido descritos na literatura, contudo pouco se sabe sobre a indução deles promovida por chalconas. Entre estes novos mecanismos encontramos a necroptose e ferroptose e com isso novos compostos têm sido desenvolvidos com o objetivo de induzir estas vias alternativas de morte. A autofagia tem sido implicada tanto na promoção da morte celular quanto na resistência ao tratamento com antitumorais (FITZWALTER; THORBURN, 2015). Há relatos na literatura de chalconas capazes de induzir autofagia (GAO et al, 2016) e necroptose (SHI et al., 2015) quando associada com a cisplatina.

Nossos resultados utilizando inibidores para os tipos de morte citados anteriormente indicam que a HNC, a princípio, não participa na indução de nenhum deles, porém mais experimentos utilizando outros inibidores e considerando as várias fases destes processos seriam necessários para descartar totalmente essa possibilidade. Outra questão importante é a capacidade destas vias se cruzarem e interferirem no efeito final da HNC que também precisaria ser investigada, visto que

alguns autores já demonstram a influência de mais de uma via nos efeitos de algumas chalconas (SHI et al., 2015).

Nossos resultados mostram que a HNC é uma molécula promissora para estudo de novos agentes terapêuticos contra o carcinoma hepatocelular.

5. CONCLUSÃO

A partir dos resultados obtidos nos experimentos realizados utilizando o composto HNC em células de carcinoma hepatocelular (HepG2), podemos concluir:

- A HNC foi capaz de diminuir a viabilidade celular em 24 e 48 horas de incubação.
- A HNC promoveu diminuição do consumo de oxigênio e do potencial de membrana mitocondrial.
- A HNC provocou aumento dos níveis de EROs e esse aumento contribui para o seu efeito citotóxico.
- O mecanismo de morte celular induzido pela HNC envolve o aumento de EROs com alterações mitocondriais e juntamente com os resultados da análise utilizando anexina e PI, sugere-se que o tipo de morte celular envolvido é a apoptose.

REFERÊNCIAS

ACEHAN, D.; JIANG, X.; MORGAN, D. G.; et al. Three-dimensional structure of the apoptosome: Implications for assembly, procaspase-9 binding, and activation. **Molecular Cell**, v. 9, n. 2, p. 423–432, 2002.

AL-DALAEN, S. M. Review Article: Oxidative Stress Versus Antioxidants. **American Journal of Bioscience and Bioengineering**, v. 2, n. 5, p. 60, 2014.

AMERICAN CANCER SOCIETY. Cancer facts and figures 2018. Disponível em <https://www.cancer.org/research/cancer-facts-statistics/all-cancer-facts-figures/cancer-facts-figures-2018.html>. Acesso em 12/06/2018.

AMSLINGER, S.; AL-RIFAI, N.; WINTER, K.; et al. Reactivity assessment of chalcones by a kinetic thiol assay. **Organic & Biomolecular Chemistry**, p. 2–5, 2012.

ANTÓNIO, M.; GONÇALVES, D. Hepatocellular carcinoma : epidemiology , biology , diagnosis , and therapies q. , v. 59, n. 5, p. 514–524, 2013.

ARDESTANI, S.; DESKINS, D. L.; YOUNG, P. P. Membrane TNF-alpha-activated programmed necrosis is mediated by Ceramide-induced reactive oxygen species. **Journal of Molecular Signaling**, v. 8, p. 1–10, 2013.

ARÉVALO, J. M. C. Efeitos pró-oxidantes e citotóxicos de nitrochalconas sintéticas livres ou encapsuladas em nanopartículas de poli metacrilato de metila sobre células hela. 127f. Tese (Doutorado em ciências – bioquímica). Pós-graduação em ciências – bioquímica, Universidade Federal do Paraná. 2018.

ARLT, V. M. et al. Environmental pollutant and potent mutagen 3-nitrobenzanthrone forms DNA adducts after reduction by NAD(P)H:quinone oxidoreductase and conjugation by acetyltransferases and sulfotransferases in human hepatic cytosols. **Cancer Research**, v. 65, n. 7, p. 2644–2652, 2005.

ARZUMANYAN, A; REIS, H. M.; FEITELSON, M. A. Pathogenic mechanisms in HBV- and HCV-associated hepatocellular carcinoma. **Nat Rev Cancer**, v. 13, n. 2, p. 123–135, 2013.

BALOGH, J.; III, D. V.; GORDON, S.; et al. Hepatocellular carcinoma : a review. , p. 41–53, 2016.

BEKING, K.; VIEIRA, A. Flavonoid intake and disability-adjusted life years due to Alzheimers and related dementias: A population-based study involving twenty-three developed countries. **Public Health Nutrition**, v. 13, n. 9, p. 1403–1409, 2010.

BIRBEN, E.; MURAT, U.; MD, S.; et al. Oxidative Stress and Antioxidant Defense. **WAO Journal**, v. 5, n. January, p. 9–19, 2012.

BOELSTERLI, U. A et al. Bioactivation and hepatotoxicity of nitroaromatic drugs. **Current drug metabolism**, v. 7, n. 7, p. 715–727, 2006.

BOUBAKEUR, B.; TIRTOUIL, A.; MEDDAH, B.; KHADEM, H. The evaluation of the effect of synthetic flavonoids on growth of pathogenic and probiotic bacteria. **Journal of Chemical and Pharmaceutical Research**, v. 7, n. 10, p. 228–236, 2015.

BRUIX, J.; QIN, S.; MERLE, P.; et al. Regorafenib for patients with hepatocellular carcinoma who progressed on sorafenib treatment (RESORCE): a randomised, double-blind, placebo-controlled, phase 3 trial. **The Lancet**, v. 389, n. 10064, p. 56–66, 2017.

BRUNELLE, J. K.; RYAN, J.; YECIES, D.; OPFERMAN, J. T.; LETAI, A. MCL-1-dependent leukemia cells are more sensitive to chemotherapy than BCL-2-dependent counterparts. **Journal of Cell Biology**, v. 187, n. 3, p. 429–442, 2009.

CAO, J. Y.; DIXON, S. J. Mechanisms of ferroptosis. **Cellular and Molecular Life Sciences**, v. 73, n. 11–12, p. 2195–2209, 2016.

CENAS, N. et al. Interactions of nitroaromatic compounds with the mammalian selenoprotein thioredoxin reductase and the relation to induction of apoptosis in human cancer cells. **Journal of Biological Chemistry**, v. 281, n. 9, p. 5593–5603, 2006.

CHEN, D.; YU, J.; ZHANG, L. Biochimica et Biophysica Acta Necroptosis: an alternative cell death program defending against cancer. **BBA - Reviews on Cancer**, v. 1865, n. 2, p. 228–236, 2016.

CHEN, X.; LI, W.; REN, J.; et al. Translocation of mixed lineage kinase domain-like protein to plasma membrane leads to necrotic cell death. **Cell Research**, v. 24, n. 1, p. 105–121, 2014.

CHIN CHUNG, M.; LONGHIN BOSQUESI, P.; LEANDRO DOS SANTOS, J. A Prodrug Approach to Improve the Physico-Chemical Properties and Decrease the Genotoxicity of Nitro Compounds. **Current Pharmaceutical Design**, v. 17, n. 32, p. 3515–3526, 2011.

CHO, Y. S.; CHALLA, S.; MOQUIN, D.; et al. Phosphorylation-Driven Assembly of the RIP1-RIP3 Complex Regulates Programmed Necrosis and Virus-Induced Inflammation. **Cell**, v. 137, n. 6, p. 1112–1123, 2009.

COLEMAN, W.; TSONGALIS, G. *Molecular Pathology*. Academic Press, 2017.

COOPER, G.M. *The cell: a molecular approach*. ASM, 2000.

CORRADINI, E., et al. *Flavonoids: chemical properties and analytical methodologies*

of identification and quantitation in foods and plants. *Natural Product Research*, v. 25, p. 469-495, 2011.

COSENTINO, K.; GARCÍA-SÁEZ, A. J. Mitochondrial alterations in apoptosis. ***Chemistry and Physics of Lipids***, v. 181, p. 62–75, 2014.

DIXON, S. J.; LEMBERG, K. M.; LAMPRECHT, M. R.; et al. Ferroptosis: An iron-dependent form of nonapoptotic cell death. ***Cell***, v. 149, n. 5, p. 1060–1072, 2012.

DO VAN, B.; GOUEL, F.; JONNEAUX, A.; et al. Ferroptosis, a newly characterized form of cell death in Parkinson's disease that is regulated by PKC. ***Neurobiology of Disease***, v. 94, p. 169–178, 2016.

DOS SANTOS, G. A. S.; ABREU E LIMA, R. S.; PESTANA, C. R.; et al. (+) α -Tocopheryl succinate inhibits the mitochondrial respiratory chain complex I and is as effective as arsenic trioxide or ATRA against acute promyelocytic leukemia in vivo. ***Leukemia***, v. 26, n. 3, p. 451–460, 2012.

DUNAI, Z.; BAUER, P. I.; MIHALIK, R. Necroptosis: Biochemical, physiological and pathological aspects. ***Pathology and Oncology Research***, v. 17, n. 4, p. 791–800, 2011.

ECHEVERRIA, C.; SANTIBAÑEZ, J. F.; DONOSO-TAUDA, O.; ESCOBAR, C. A.; RAMIREZ-TAGLE, R. Structural antitumoral activity relationships of synthetic chalcones. ***International Journal of Molecular Sciences***, v. 10, n. 1, p. 221–231, 2009.

EMANUELE, S.; D'ANNEO, A.; CALVARUSO, G.; et al. The Double-Edged Sword Profile of Redox Signaling: Oxidative Events as Molecular Switches in the Balance Between Cell Physiology and Cancer. ***Chemical Research in Toxicology***, p. acs.chemrestox.7b00311, 2018.

EL-SERAG, H. B.; MARRERO, J. A.; RUDOLPH, L.; REDDY, K. R. Diagnosis and Treatment of Hepatocellular Carcinoma. ***Gastroenterology***, v. 134, n. 6, p. 1752–1763, 2008.

EL-SERAG, H. B.; RUDOLPH, K. L. Hepatocellular Carcinoma: Epidemiology and Molecular Carcinogenesis. ***Gastroenterology***, v. 132, n. 7, p. 2557–2576, 2007.

FITZWALTER, B. E.; THORBURN, A. Recent insights into cell death and autophagy. **FEBS Journal**, v. 282, p. 4279–4288, 2015.

FORNER, A.; REIG, M.; BRUIX, J. Hepatocellular carcinoma. **The Lancet**, p. 1301–1314, 2018.

FRIEDMANN ANGELI, J. P.; SCHNEIDER, M.; PRONETH, B.; et al. Inactivation of the ferroptosis regulator Gpx4 triggers acute renal failure in mice. **Nature Cell Biology**, v. 16, n. 12, p. 1180–1191, 2014.

FUCHS, Y.; STELLER, H. Programmed cell death in animal development and disease. **Cell**, v. 147, n. 4, p. 742–758, 2011.

FULDA, S.; GALLUZZI, L.; KROEMER, G. Targeting mitochondria for cancer therapy. **Nature Reviews Drug Discovery**, v. 9, n. 6, p. 447–464, 2010.

FULDA, S.; GORMAN, A. M.; HORI, O.; SAMALI, A. Cellular stress responses: Cell survival and cell death. **International Journal of Cell Biology**, v. 2010, 2010.

GALADARI, S.; RAHMAN, A.; PALLICHANKANDY, S.; THAYYULLATHIL, F. Reactive oxygen species and cancer paradox: To promote or to suppress? **Free Radical Biology and Medicine**, v. 104, n. August 2016, p. 144–164, 2017.

GALLUZZI, L.; VITALE, I.; AARONSON, S. A.; et al. Molecular mechanisms of cell death: Recommendations of the Nomenclature Committee on Cell Death 2018. **Cell Death and Differentiation**, v. 25, n. 3, p. 486–541, 2018.

GAO, S.; SUN, D.; WANG, G.; et al. Bioorganic Chemistry Growth inhibitory effect of paratocarpin E, a prenylated chalcone isolated from *Euphorbia humifusa* Wild., by induction of autophagy and apoptosis in human breast cancer cells. **Bioorganic Chemistry**, v. 69, p. 121–128, 2016.

GASCHLER, M. M.; STOCKWELL, B. R. Lipid peroxidation in cell death. **Biochemical and Biophysical Research Communications**, v. 482, n. 3, p. 419–425, 2017.

GENOVA, M. L.; VENTURA, B.; GIULIANO, G.; et al. The site of production of superoxide radical in mitochondrial Complex I is not a bound ubiquinone but presumably iron-sulfur cluster N2. **FEBS Letters**, v. 505, n. 3, p. 364–368, 2001.

GESCHWIND, J.-F. H.; KO, Y. H.; TORBENSON, M. S.; MAGEE, C.; PEDERSEN, P.

L. Novel therapy for liver cancer: direct intraarterial injection of a potent inhibitor of ATP production. **Cancer research**, v. 62, n. 14, p. 3909–13, 2002.

GOMES, M. A.; PRIOLLI, D. G.; TRALHÃO, J. G.; BOTELHO, M. F. Carcinoma hepatocelular: epidemiologia, biologia, diagnóstico e terapias. **Revista da Associação Médica Brasileira**, v. 59, n. 5, p. 514–524, 2013.

GRAZIE, M. LE; BIAGINI, M. R.; TAROCCHI, M.; POLVANI, S.; GALLI, A. Chemotherapy for hepatocellular carcinoma: The present and the future. **World Journal of Hepatology**, v. 9, n. 21, p. 907–920, 2017.

GREEN, D. R.; KROEMER, G. The pathophysiology of mitochondrial cell death. **Science**, v. 305, n. 5684, p. 626–629, 2004.

GREEN, D. R.; REED, J. C. Mitochondria and apoptosis. (Cover story). **Science**, v. 281, n. 5381, p. 1309, 1998.

GU, Z. T.; WANG, H.; LI, L.; et al. Heat stress induces apoptosis through transcription-independent p53-mediated mitochondrial pathways in human umbilical vein endothelial cell. **Scientific Reports**, v. 4, p. 1–10, 2014.

GUZY, J.; VAŠKOVÁ-KUBÁLKOVÁ, J.; ROZMER, Z.; et al. Activation of oxidative stress response by hydroxyl substituted chalcones and cyclic chalcone analogues in mitochondria. **FEBS Letters**, v. 584, n. 3, p. 567–570, 2010.

HABTETSION, T.; DING, Z. C.; PI, W.; et al. Alteration of Tumor Metabolism by CD4+ T Cells Leads to TNF- α -Dependent Intensification of Oxidative Stress and Tumor Cell Death. **Cell Metabolism**, p. 1–15, 2018.

HANAHAN, D.; WEINBERG, R.A. Hallmarks of cancer: the next generation. **Cell**, v.

HOCKENBERY, D.; NUÑEZ, G.; MILLIMAN, C.; SCHREIBER, R. D.; KORSMEYER, S. J. Bcl-2 is an inner mitochondrial membrane protein that blocks programmed cell death. **Nature**, 1990.

HSU, Y.-L.; KUO, P.-L.; LIN, C.-C. Isoliquiritigenin induces apoptosis and cell cycle arrest through p53-dependent pathway in Hep G2 cells. **Life Sciences**, v. 77, n. 3, p. 279–292, 2005.

INCA. Estimativa 2018. Disponível em:

<http://www.inca.gov.br/estimativa/2018/introducao.asp>. Acesso em 13/06/2018

JAIN, U. K.; BHATIA, R. K.; RAO, A. R.; et al. Design and Development of Halogenated Chalcone Derivatives as Potential Anticancer Agents. , v. 13, n. January, p. 73–80, 2014.

KANE, R. C.; BROSS, P. F.; FARRELL, A. T.; PAZDUR, R. Velcade: U.S. FDA approval for the treatment of multiple myeloma progressing on prior therapy. **The oncologist**, v. 8, n. 6, p. 508–513, 2003.

KARTHIKEYAN, C.; NARAYANA MOORTHY, N. S.; RAMASAMY, S.; et al. Advances in Chalcones with Anticancer Activities. **Recent Patents on Anti-cancer Drug Discovery**, v. 10, n. February 2016, p. 97–115, 2014.

KILLION, E. A.; REEVES, A. R.; EL AZZOUNY, M. A.; et al. A role for long-chain acyl-CoA synthetase-4 (ACSL4) in diet-induced phospholipid remodeling and obesity-associated adipocyte dysfunction. **Molecular Metabolism**, v. 9, n. January, p. 43–56, 2018.

KOBORI, M.; IWASHITA, K.; SHINMOTO, H.; TSUSHIDA, T. Phloretin-induced apoptosis in B16 melanoma 4A5 cells and HL60 human leukemia cells. **Bioscience, biotechnology, and biochemistry**, 1999.

LACHAIER, E.; LOUANDRE, C.; GODIN, C.; et al. Sorafenib induces ferroptosis in human cancer cell lines originating from different solid tumors. **Anticancer Research**, v. 34, n. 11, p. 6417–6422, 2014.

LAWRENCE, N. J.; RENNISON, D.; MCGOWN, A. T.; et al. Linked Parallel Synthesis and MTT Bioassay Screening of Substituted Chalcones. **Journal of Combinatorial Chemistry**, v. 3, n. 5, p. 421–426, 2001.

LEON-GONZALEZ, A.; ACERO, N.; MUNOZ-MINGARRO, D.; NAVARRO, I.; MARTIN-CORDERO, C. Chalcones as Promising Lead Compounds on Cancer Therapy. **Current Medicinal Chemistry**, v. 22, n. 30, p. 3407–3425, 2015.

LESSENE, G., CZABOTAR, P.E., COLMAN, P. Bcl-2 family antagonists for cancer therapy. **Nature Review Drug Discovery**. v. 7, p. 989–1000. 2008.

LEVINE, B.; KROEMER, G. Autophagy in the Pathogenesis of Disease. **Cell**, v. 132, n. 1, p. 27–42, 2008.

LIN, J.; LI, H.; YANG, M.; et al. A Role of RIP3-Mediated Macrophage Necrosis in Atherosclerosis Development. **Cell Reports**, v. 3, n. 1, p. 200–210, 2013.

LLOVET, J. M.; FUSTER, J.; BRUIX, J. The Barcelona approach: Diagnosis, staging, and treatment of hepatocellular carcinoma. **Liver Transplantation**, v. 10, n. S2, p. S115–S120, 2004.

LLOVET, J. M.; RICCI, S.; MAZZAFERRO, V.; et al. Sorafenib in advanced hepatocellular carcinoma. **The New England journal of medicine**, v. 359, n. 4, p. 378–390, 2008.

LOEHRER, P. J. Cisplatin. **Annals of Internal Medicine**, v. 100, n. 5, p. 704, 1984.

LOPEZ, J.; TAIT, S. W. G. Mitochondrial apoptosis: Killing cancer using the enemy within. **British Journal of Cancer**, v. 112, n. 6, p. 957–962, 2015.

LOSCALZO, J. Membrane Redox State and Apoptosis: Death by Peroxide. **Cell Metabolism**, v. 8, n. 3, p. 182–183, 2008.

LOWE, S. W.; LIN, A W. Apoptosis in cancer. **Carcinogenesis**, v. 21, n. 3, p. 485–495, 2000.

MAHAPATRA, D. K.; BHARTI, S. K.; ASATI, V. Anti-cancer chalcones: Structural and molecular target perspectives. **European Journal of Medicinal Chemistry**, v. 98, p. 69–114, 2015.

MARTINEAU, L. C. e **Biochimica et Biophysica Acta**. v. 1820, p. 133–150, 2012.

MASON, K. D.; VANDENBERG, C. J.; SCOTT, C. L.; et al. In vivo efficacy of the Bcl-2 antagonist ABT-737 against aggressive Myc-driven lymphomas. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 105, n. 46, p. 17961–17966, 2008.

MATTSON, M. P. Apoptosis in neurodegenerative disorders. , v. 1, n. October, p. 120–129, 2000.

METZIG, M. O.; FUCHS, D.; TAGSCHERER, K. E.; et al. Inhibition of caspases primes colon cancer cells for 5-fluorouracil-induced TNF- α -dependent necroptosis driven by RIP1 kinase and NF- κ B. **Oncogene**, v. 35, n. 26, p. 3399–3409, 2016.

MIZUSHIMA, N et al. A protein conjugation system essential for autophagy. **Nature**, v.

395, n. 6700, p. 395, 1998.

MODICA-NAPOLITANO, J.S., SINGH, K.K. Mitochondrial dysfunction in cancer. **Mitochondrion** 4, p. 755–762, 2004.

MOREIRA, P.I., CUSTÓDIO, J., MORENO, A., OLIVEIRA, C.R., SANTOS, M.S. Tamoxifen and estradiol interact with the flavin mononucleotide site of complex I leading to mitochondrial failure. **Journal of Biological Chemistry**. v. 281, p. 10143–10152. 2006.

MORENO-SÁNCHEZ, R.; HERNÁNDEZ-ESQUIVEL, L.; RIVERO-SEGURA, N. A.; et al. Reactive oxygen species are generated by the respiratory complex II - Evidence for lack of contribution of the reverse electron flow in complex I. **FEBS Journal**, v. 280, n. 3, p. 927–938, 2013.

MÜLLER, T.; DEWITZ, C.; SCHMITZ, J.; et al. Necroptosis and ferroptosis are alternative cell death pathways that operate in acute kidney failure. **Cellular and Molecular Life Sciences**, v. 74, n. 19, p. 3631–3645, 2017.

NAKHJAVANI, M.; ZARGHI, A.; H SHIRAZI, F. Cytotoxicity of selected novel chalcone derivatives on human breast, lung and hepatic carcinoma cell lines. **Iranian journal of pharmaceutical research : IJPR**, v. 13, n. 3, p. 953–8, 2014.

NAVARINI, A. L. F.; CHIARADIA, L. D.; MASCARELLO, A.; et al. Hydroxychalcones induce apoptosis in B16-F10 melanoma cells via GSH and ATP depletion. **European Journal of Medicinal Chemistry**, v. 44, n. 4, p. 1630–1637, 2009.

NELSON, David L.; COX, Michael M. Principípios de bioquímica de **Lehninger**. Artmed, 2011.

NEUZIL, J.; DONG, L. F.; ROHLENA, J.; TRUKSA, J.; RALPH, S. J. Classification of mitocans, anti-cancer drugs acting on mitochondria. **Mitochondrion**, v. 13, n. 3, p. 199–208, 2013.

OLENDER, D.; ŻWAWIAK, J.; ZAPRUTKO, L. Multidirectional efficacy of biologically active nitro compounds included in medicines. **Pharmaceuticals**, v. 11, n. 2, 2018.

OLTERS DORF, T.; ELMORE, S. W.; SHOEMAKER, A. R.; et al. An inhibitor of Bcl-2

family proteins induces regression of solid tumours. **Nature**, v. 435, n. 7042, p. 677–681, 2005.

PALLICHANKANDY, S.; RAHMAN, A.; THAYYULLATHIL, F.; GALADARI, S. ROS-dependent activation of autophagy is a critical mechanism for the induction of anti-glioma effect of sanguinarine. **Free Radical Biology and Medicine**, v. 89, p. 708–720, 2015.

PANCHE, A. N.; DIWAN, A. D.; CHANDRA, S. R. Flavonoids: An overview. **Journal of Nutritional Science**, v. 5, 2016.

PELUSO, I.; RAGUZZINI, A.; SERAFINI, M. Effect of flavonoids on circulating levels of TNF- α and IL-6 in humans: A systematic review and meta-analysis. **Molecular Nutrition and Food Research**, v. 57, n. 5, p. 784–801, 2013.

PRABHAKAR, V.; BALASUBRAMANIAN, R.; SATHE, P.; KRISHNA, C. M.; JUVEKAR, A. In vitro anticancer activity of monosubstituted chalcone derivatives. **International Journal of Tumor Therapy**, v. 3, n. 1, p. 1–9, 2014.

QUINLAN, C. L.; ORR, A. L.; PEREVOSHCHIKOVA, I. V.; et al. Mitochondrial complex II can generate reactive oxygen species at high rates in both the forward and reverse reactions. **Journal of Biological Chemistry**, v. 287, n. 32, p. 27255–27264, 2012.

RATOVITSKI, E. A. Phospho- Δ Np63 α -responsive microRNAs contribute to the regulation of necroptosis in squamous cell carcinoma upon cisplatin exposure. **FEBS Letters**, v. 589, n. 12, p. 1352–1358, 2015.

ROH, J. L.; KIM, E. H.; JANG, H.; SHIN, D. Nrf2 inhibition reverses the resistance of cisplatin-resistant head and neck cancer cells to artesunate-induced ferroptosis. **Redox Biology**, v. 11, n. November 2016, p. 254–262, 2017.

ROSENBERG, B.; VAN CAMP, L.; KRIGAS, T. Inhibition of cell division in *Escherichia coli* by electrolysis products from a platinum electrode [17]. **Nature**, v. 205, n. 4972, p. 698–699, 1965.

RUMMEL, M. J.; DE VOS, S.; HOELZER, D.; KOEFFLER, H. P.; HOFMANN, W.-K. Altered Apoptosis Pathways in Mantle Cell Lymphoma. **Leukemia & Lymphoma**, v. 45, n. 1, p. 49–54, 2004.

RUSSO, M.; RUSSO, G. L. Autophagy inducers in cancer. **Biochemical Pharmacology**, , n. February, p. 0–1, 2018.

RYAN, M. T. Mitochondria – The energy powerhouses. **Seminars in Cell and Developmental Biology**, v. 76, p. 130–131, 2018.

SCHIEBER, M.; CHANDEL, N. S. ROS function in redox signaling and oxidative stress. **Current Biology**, v. 24, n. 10, p. R453–R462, 2014.

SCOPARO, C. T. Efeitos da Hispidulina e de chalconas sintéticas sobre células de hepatocarcinoma humano (HepG2). 112f. Tese (Doutorado em ciências – bioquímica). Pós-graduação em ciências – bioquímica, Universidade Federal do Paraná. 2016.

SHERIDAN, J. P.; MARSTERS, S. A.; PITTI, R. M.; et al. Control of TRAIL-induced apoptosis by a family of signaling and decoy receptors. **Science**, v. 277, n. 5327, p. 818–821, 1997.

SHI, S.; WANG, Q.; XU, J.; et al. Synergistic anticancer effect of cisplatin and Chal-24 combination through IAP and c-FLIP L degradation , Ripoptosome formation and autophagy-mediated apoptosis. , v.6, n.3. 2015.

SHIAU, C.-W.; HUANG, J.-W.; WANG, D.-S.; et al. alpha-Tocopheryl succinate induces apoptosis in prostate cancer cells in part through inhibition of Bcl-xL/Bcl-2 function. **The Journal of biological chemistry**, v. 281, n. 17, p. 11819–11825, 2006.

SIDDIK, Z. H. **Apoptosis in Cancer. Mechanisms, Deregulation, and Therapeutic Targeting**. Second Edi ed. Elsevier, 2013.

SOCIEDADE BRASILEIRA DE ONCOLOGIA CLÍNICA. Carcinoma hepatocelular: barreiras ao acesso ao diagnóstico e tratamento no cenário brasileiro atual. Disponível em: https://www.vencerocancer.org.br/.../11Folder_Carcinoma_Hepatocelular_2018.pdf. Acesso em 23/07/2018

SOUZA, P. O. DE; BIANCHI, S. E.; FIGUEIRÓ, F.; et al. Anticancer activity of flavonoids isolated from *Achyrocline satureioides* in gliomas cell lines. **Toxicology in Vitro**, v. 51, p. 23–33, 2018.

STOCKWELL, B. R.; FRIEDMANN ANGELI, J. P.; BAYIR, H.; et al. Ferroptosis: A Regulated Cell Death Nexus Linking Metabolism, Redox Biology, and Disease. **Cell**, v. 171, n. 2, p. 273–285, 2017.

TAFANI, M.; SANSONE, L.; LIMANA, F.; et al. The Interplay of Reactive Oxygen Species, Hypoxia, Inflammation, and Sirtuins in Cancer Initiation and Progression.

Oxidative Medicine and Cellular Longevity, v. 2016, 2016.

TAMIELLO, C.S. Efeitos da 3-nitrochalcona sobre células de hepatoma humano (HepG2). 82f. Dissertação (Mestrado em ciências – bioquímica). Pós-graduação em ciências – bioquímica, Universidade Federal do Paraná. 2013.

TEPPO, H.-R.; SOINI, Y.; KARIHTALA, P. Reactive Oxygen Species-Mediated Mechanisms of Action of Targeted Cancer Therapy. **Oxidative Medicine and Cellular Longevity**, v. 2017, p. 1–11, 2017.

THANNICKAL, V. J. Reactive oxygen species in cell signaling. **American Journal of Physiology - Lung Cellular and Molecular Physiology**, v. 279, n. 78, p. L1005–L1028, 2000.

TORII, S.; SHINTOKU, R.; KUBOTA, C.; et al. An essential role for functional lysosomes in ferroptosis of cancer cells. **Biochemical Journal**, v. 473, n. 6, p. 769–777, 2016.

TRACHOOTHAM, D.; ALEXANDRE, J.; HUANG, P. Targeting cancer cells by ROS-mediated mechanisms: A radical therapeutic approach? **Nature Reviews Drug Discovery**, v. 8, n. 7, p. 579–591, 2009

TURRENS, J. F.; ALEXANDRE, A.; LEHNINGER, A. L. Ubisemiquinone is the electron donor for superoxide formation by complex III of heart mitochondria. **Archives of Biochemistry and Biophysics**, v. 237, n. 2, p. 408–414, 1985.

UPTON, J. W.; KAISER, W. J.; MOCARSKI, E. S. DAI/ZBP1/DLM-1 complexes with RIP3 to mediate virus-induced programmed necrosis that is targeted by murine cytomegalovirus vIRA. **Cell Host and Microbe**, v. 11, n. 3, p. 290–297, 2012.

VAKIFAHMETOGLU-NORBERG, H.; OUCHIDA, A. T.; NORBERG, E. The role of mitochondria in metabolism and cell death. **Biochemical and Biophysical Research Communications**, v. 482, n. 3, p. 426–431, 2017.

VAN HOUTEN, B.; SANTA-GONZALEZ, G. A.; CAMARGO, M. DNA repair after oxidative stress: Current challenges. **Current Opinion in Toxicology**, v. 7, p. 9–16, 2018.

VIEIRA, M.; FERNANDES, J.; CARRETO, L.; et al. Ischemic insults induce necroptotic

cell death in hippocampal neurons through the up-regulation of endogenous RIP3. **Neurobiology of Disease**, v. 68, p. 26–36, 2014.

WALLACE, T. C. Anthocyanins in Cardiovascular Disease. **Advances in Nutritional**, v. 2, n. 7, p. 1–7, 2011.

WEI, H.; ZHANG, X.; WU, G.; et al. Chalcone derivatives from the fern *Cyclosorus parasiticus* and their anti-proliferative activity. **Food and Chemical Toxicology**, v. 60, p. 147–152, 2013.

WU, J.; DANG, Y.; SU, W.; et al. Molecular cloning and characterization of rat LC3A and LC3B - Two novel markers of autophagosome. **Biochemical and Biophysical Research Communications**, v. 339, n. 1, p. 437–442, 2006.

WU, W.; YE, H.; WAN, L.; et al. Millepachine, a novel chalcone, induces G2/M arrest by inhibiting CDK1 activity and causing apoptosis via ROS-mitochondrial apoptotic pathway in human hepatocarcinoma cells in vitro and in vivo. **Carcinogenesis**, v. 34, n. 7, p. 1636–1643, 2013.

YANG, E.; ZHANG, K.; CHENG, L.; MACK, P. Butein, a specific protein tyrosine kinase inhibitor. **Biochemical and biophysical**, v. 438, n. 245, p. 435–438, 1998.

YAN, Y.; BACKER, J. M. Regulation of class III (Vps34) PI3Ks. **Biochemical Society transactions**, v. 35, n. Pt 2, p. 239–41, 2007.

YE, Y.; HUANG, A.; HUANG, C.; et al. Comparative mitochondrial proteomic analysis of hepatocellular carcinoma from patients. **Journal of Clinical Proteomics**, v. 7, 2013.

YIN, C.; KNUDSON, C. M.; KORSMEYER, S. J.; VAN DYKE, T. Bax suppresses tumorigenesis and stimulates apoptosis in vivo. **Nature**, 1997.

YOSHIDA, K; MIKI, Y. The cell death machinery governed by the p53 tumor suppressor in response to DNA damage. **Cancer science**, v. 101, n. 4, p. 831-835, 2010.

ZEITLIN, B.D., ZEITLIN, I.J., NÖR, J.E. Expanding circle of inhibition: small-molecule inhibitors of Bcl-2 as anticancer cell and antiangiogenic agents. *Journal of Clinical Oncology*. v. 26, p. 4180–4188, 2008.