



**UNIVERSIDADE FEDERAL DE SANTA CATARINA**  
Centro de Ciências da Saúde  
Programa de Pós-Graduação em Farmácia

**ATIVIDADE ANTILEUCÊMICA DE CHALCONAS SINTÉTICAS**

**Syntia Sorgato**

Florianópolis - SC, Março 2007.

**SYNTIA SORGATO**

**ATIVIDADE ANTILEUCÊMICA DE CHALCONAS SINTÉTICAS**

Dissertação apresentada ao programa de Pós-graduação em Farmácia da Universidade Federal de Santa Catarina, como requisito parcial para obtenção do grau de Mestre em Farmácia. Área de concentração: Fármacos e Medicamentos

Orientadora: Prof.<sup>a</sup> Dr.<sup>a</sup> Tânia Beatriz  
Creczynski Pasa

Florianópolis - SC, Março 2007.

**Syntia Sorgato**

**ATIVIDADE ANTILEUCÊMICA DE CHALCONAS SINTÉTICAS**

Esta Dissertação foi julgada e aprovada para a obtenção do título de **Mestre em Farmácia** no **Programa de Pós-Graduação em Farmácia** da Universidade Federal de Santa Catarina.

Florianópolis-SC, 26 de março de 2007.

---

Prof. Dr.<sup>o</sup> Marcos Antônio Segatto Silva  
Coordenador do Programa

**BANCA EXAMINADORA:**

---

Prof.<sup>a</sup> Dr.<sup>a</sup> Tânia B. Creczynski Pasa  
Orientadora

---

Prof.<sup>a</sup> Dr.<sup>a</sup> Cidônia Lourdes Vituri  
(ACL - UFSC)

---

Prof.<sup>a</sup> Dr.<sup>a</sup> Maria Luiza Bazzo  
(ACL - UFSC)

---

Prof.<sup>a</sup> Dr.<sup>a</sup> Ionara Rodrigues Siqueira  
(UFRGS)

## **AGRADECIMENTOS**

Mais árduo que realizar este trabalho é encontrar palavras certas para agradecer às pessoas especiais que fazem parte da minha vida, e sem as quais eu jamais teria chegado até aqui. Através destas páginas simbólicas, deixo registrado meu profundo agradecimento:

A Deus, pela vida e por proporcionar-me diferentes caminhos, dando-me sempre oportunidades de escolha e guiando-me através delas.

Aos meus pais, Anacleto e Terezinha, pela contribuição na formação do meu caráter, pelo amor incondicional, apoio, incentivo e dedicação da vida toda.

Aos meus irmãos, Márcio e Vinícius, pela valiosa ajuda nos problemas encontrados com programas, computadores e pelo apoio durante a realização de todo este trabalho.

Ao meu namorado, Osmar, pelo amor, compreensão e incentivo durante toda esta trajetória.

A Prof.<sup>a</sup> Tânia Pasa, pela orientação, amizade e significativo aprendizado científico durante estes dois anos.

A Prof.<sup>a</sup> Maria Cláudia, por ter guiado meus primeiros passos na cultura celular.

A Prof.<sup>a</sup> Maria Luiza, pelas valiosas contribuições, em que curtas conversas nos corredores do laboratório fizeram grandes diferenças na realização dos experimentos.

A Prof.<sup>a</sup> Cidônia, por propiciar o desenvolvimento dos testes de toxicidade em células progenitoras no seu laboratório.

A todos os amigos e colegas do Laboratório de Bioenergética e Bioquímica de Macromoléculas, que propiciaram o desenvolvimento deste trabalho, especialmente “as meninas da cultura de células”.

Às amigas Patrícia Decker, Tatiana Becker e Tadiane Dacroce pela amizade sincera e ombro amigo nos momentos difíceis.

À amiga Angela Juliani Melo, pela amizade, compreensão e ajuda nos momentos conturbados.

Ao Prof.º Rosendo A. Yunes e seus alunos Louise D. Chiaradia e Paulo C. Leal, pela colaboração, síntese das chalconas utilizadas neste trabalho e discussões sobre reações e estruturas químicas.

Ao Laboratório de Análises Clínicas (HU-UFSC), aos Laboratórios de Pesquisa I, II e III (HU) e ao Hospital Universitário, pela disponibilidade da estrutura para realização de parte deste trabalho.

Ao Programa de Pós Graduação em Farmácia da Universidade Federal de Santa Catarina, por ter proporcionado a realização desta minha formação acadêmica e científica.

E, finalmente, a todos que contribuíram, direta ou indiretamente, para a realização deste trabalho.

*“No meio de qualquer dificuldade encontra-se a oportunidade”.*  
*“Algo só é impossível até que alguém duvide e acabe provando o contrário”.*

*Albert Einstein*

## SUMÁRIO

<b>LISTA DE FIGURAS</b>	8
<b>LISTA DE TABELAS</b>	9
<b>LISTA DE ABREVIATURAS, SIMBOLOS E SIGLAS</b>	10
<b>RESUMO</b>	11
<b>ABSTRACT</b>	12
<b>1. INTRODUÇÃO</b>	13
<b>2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA</b>	18
2.1 Leucemia linfóide aguda	19
2.1.1 Manifestações clínicas	21
2.1.2 Classificação FAB, imunofenotipagem, citogenética e diagnóstico	22
2.1.3 Alterações genéticas	24
2.1.4 Tratamento	25
2.2 Morte celular: apoptose e necrose	27
2.3 Mitocôndria, potencial energético celular e GSH	32
2.4 Flavonóides	38
2.5 Chalconas	39
<b>3. OBJETIVOS</b>	43
3.1 Objetivo Geral	44
3.2 Objetivos Específicos	44
<b>4. MATERIAIS E MÉTODOS</b>	45
4.1 Reagentes	46
4.2 Síntese das chalconas	46
4.2.1 Procedimento geral para a preparação das chalconas derivadas do 3,4-metilenodioxibenzaldeído	47
4.3 Cultura de células	47

4.3.1	Tratamento das células	48
4.4	Ensaio de viabilidade celular (teste do MTT)	48
4.5	Análise de apoptose pelo método de fragmentação nuclear	49
4.6	Análise de apoptose e viabilidade celular pelo método de fluorescência com laranja de acridina e brometo de etídio	50
4.7	Determinação das curvas de tempo-resposta e concentração-resposta	51
4.8	Determinação da concentração de glutathione total	52
4.9	Determinação da concentração de ATP	52
4.10	Ensaio de células progenitoras grânulo-monocíticas (Ensaio GM-CFC)	53
4.11	Análise estatística	55
4.12	Desenho experimental	56
<b>5.</b>	<b>RESULTADOS E DISCUSSÃO</b>	<b>58</b>
5.1	Síntese	59
5.2	Determinação da atividade citotóxica através da viabilidade celular	61
5.3	Análise da apoptose por fragmentação do DNA	65
5.4	Análise da apoptose e viabilidade celular por fluorescência	66
5.5	Tempo resposta	69
5.6	Concentração resposta	70
5.7	Concentração de glutathione	73
5.8	Concentração de ATP	75
5.9	Citotoxicidade em células normais e células progenitoras grânulo-monocíticas	77
<b>6.</b>	<b>CONCLUSÕES</b>	<b>81</b>
<b>7.</b>	<b>PERSPECTIVAS</b>	<b>84</b>
<b>8.</b>	<b>REFERÊNCIAS</b>	<b>86</b>
<b>9.</b>	<b>Anexos</b>	<b>99</b>
9.1	Trabalhos apresentados em congressos	100
9.2	Artigo submetido na revista "Bioorganic & Medicinal Chemistry"	101



## LISTA DE FIGURAS

<b>Figura 1.</b>	Mecanismos de morte celular: necrose e apoptose	29
<b>Figura 2.</b>	As duas principais vias apoptóticas	31
<b>Figura 3.</b>	Mitocôndria	33
<b>Figura 4.</b>	Estrutura da glutatona	36
<b>Figura 5.</b>	Núcleo fundamental das chalconas	39
<b>Figura 6.</b>	Desenho Experimental	57
<b>Figura 7.</b>	Etapas de deprotonação e ataque nucleofílico para formação do produto de condensação	59
<b>Figura 8.</b>	Etaapa de desidratação para obtenção da chalcona	60
<b>Figura 9.</b>	Síntese de chalconas derivadas do 3,4-metilenodioxibenzaldeído	61
<b>Figura 10.</b>	Efeito citotóxico das chalconas sobre células L1210	62
<b>Figura 11.</b>	Fragmentação do DNA induzida por chalconas em células L1210	66
<b>Figura 12.</b>	Células normais e apoptóticas coradas com laranja de acridina e brometo de etídio	67
<b>Figura 13.</b>	Viabilidade das chalconas sobre células L1210 por fluorescência	69
<b>Figura 14.</b>	Tempo resposta da atividade das chalconas sobre células L1210	70
<b>Figura 15.</b>	Concentração resposta da atividade das chalconas sobre células L1210 em 24h	71
<b>Figura 16.</b>	Concentração resposta da atividade das chalconas sobre células L1210 em 48h	72
<b>Figura 17.</b>	Comparação entre o efeito das chalconas sobre a concentração de GSH total e a viabilidade em células L1210	74
<b>Figura 18.</b>	Efeito das chalconas sobre a concentração de ATP em células L1210	76
<b>Figura 19.</b>	Efeito citotóxico das chalconas sobre células VERO (células não tumorais)	78

## LISTA DE TABELAS

<b>Tabela 1.</b>	Constituintes das camadas de cultura em meio semi-sólido/placa	54
<b>Tabela 2.</b>	Comparação da viabilidade celular pelos métodos de microscopia de fluorescência (MF) com laranja de acridina e brometo de etídio e teste do MTT	72
<b>Tabela 3.</b>	Comparação da viabilidade celular entre as linhagens L1210 e VERO	78
<b>Tabela 4.</b>	Ensaio de células progenitoras grânulo-monocíticas (Ensaio GM-CFC)	79

## LISTA DE ABREVIATURAS, SÍMBOLOS E SIGLAS

AIF	Fator de indução a apoptose
Apaf-1	Protease apoptótica ativadora de fator-1
ATP	Adenosina trifosfato
B16-4A5	Linhagem de células de melanoma murino
BFM	Protocolo Berlim-Frankfurt-Munique para tratamento de leucemias
CFC-GM	Células formadoras de colônia de granulócitos e macrófagos
GM-CSF	Fator estimulador de colônias de macrófagos e granulócitos
COX	Ciclooxigenase
DMEM	Meio Eagle modificado por Dulbecco
DMSO	Dimetil sulfóxido
DNA	Ácido desoxirribonucléico
DNTB	Ácido 5,5'-ditio-bis-2-nitrobenzóico
EDTA	Ácido etilenodiaminotetraacético
EGIL	Grupo Europeu para a Classificação Imunológica das Leucemias
EROs	Espécies Reativas de Oxigênio
GPx	Glutathione Peroxidase
GR	Glutathione Redutase
GSH	Glutathione (forma reduzida)
GSSG	Glutathione dissulfeto (forma oxidada)
GST	Glutathione S-transferase
HEPES	Ácido N-[2-Hidroxi-etil]piperazina-N'-[2-etanosulfônico]
HL-60	Linhagem de células de leucemia humana
HLA	Antígeno de histocompatibilidade
IAP	Proteínas inibidoras de apoptose
IC <sub>50</sub>	Concentração que inibe 50% do crescimento celular
IMDM	Meio Dulbecco modificado por Iscove
K562	Linhagem de células de leucemia humana
Kb	Kilobase
L1210	Linhagem de células de leucemias linfoblástica murina
LLA	Leucemia Linfóide Aguda
MRPs	Proteínas associadas à resistência a múltiplas drogas
MTT	Brometo de dimetiazol difeniltetrazólio
NADPH	Fosfato de nicotinamida adenina dinucleotídeo
NK	Células "Natural Killer"
OMS	Organização Mundial da Saúde
PCK	Proteína C quinase
SFB	Soro fetal bovino
SNC	Sistema nervoso central
TNB	Ácido 5-tio-2-nitrobenzóico
TNF	Fator de necrose tumoral
TNF-R	Receptor do fator de necrose tumoral
VERO	Linhagem de células normais, de rim de macaco

## RESUMO

As chalconas são compostos intermediários essenciais na biossíntese dos flavonóides. São amplamente distribuídas no reino vegetal e encontradas em pequenas e grandes plantas. Muitos trabalhos demonstraram efeitos biológicos para as chalconas, incluindo efeito antiinflamatório, antioxidante, antimalárico e antitumoral. Diferentes substituintes nos anéis das chalconas podem resultar em compostos com diferentes atividades biológicas. O objetivo deste trabalho foi estudar a atividade antitumoral de dez chalconas derivadas quimicamente do 3,4-metilenodioxibenzaldeído nas células leucêmicas linfoblásticas L1210. Foram analisadas a viabilidade celular, o mecanismo de morte celular, as concentrações intracelulares de GSH e ATP e a toxicidade in vitro das chalconas em células progenitoras da medula óssea. Foi observado que as chalconas **5**, **7** e **11** reduziram fortemente o número de células viáveis em  $90.5 \pm 1.2\%$ ,  $87.1 \pm 1.1\%$  e  $86.3 \pm 2.2\%$ , respectivamente, quando comparadas com o controle, e induziram a fragmentação do DNA na concentração de 100  $\mu\text{M}$ . Dentre as dez chalconas testadas somente a **5**, a **7** e a **11** apresentaram efeito citotóxico acentuado. A chalcona **5** mostrou o menor valor de  $\text{IC}_{50}$  em 24h e em 48h, nas concentrações de 45 e 22  $\mu\text{M}$ , respectivamente. Os grupos metóxi que aumentam a densidade eletrônica do anel A, presentes nos compostos **5**, **7**, e **11**, parecem aumentar sua citotoxicidade. A depleção de GSH mostrou-se proporcional à morte celular. As concentrações intracelulares de ATP foram esgotadas de maneira concentração-dependente, sugerindo que os compostos podem interferir no potencial de membrana mitocondrial e na síntese do ATP. A chalcona **7** foi o composto menos tóxico para células normais da medula óssea. Nossos resultados mostraram que as chalconas **5**, **7** e **11** induziram à apoptose células L1210 e apresentam a chalcona **7** como a mais promissora para dar continuidade às investigações.

## ABSTRACT

Chalcones are essential intermediate compounds in the flavonoids biosynthesis. They are widely distributed in nature and easily found in arboreal or smaller plants. Many works have demonstrated biological effects from chalcones including anti-inflammatory, antioxidant, antimalaric and antitumoral. Different substitutions at rings of chalcones molecules can result in compounds with different biological actions. The objective of this work was study the antitumoral activity of ten chalcones chemically derived from 3,4-metilenodioxibenzaldeide in murine lymphoblastic leukemia cells L1210. The cellular viability, the mechanism of cell death, intracellular concentration of ATP and glutathione and in vitro toxicity from chalcones to normal cells from bone marrow were analyzed. We observed that the chalcones **5**, **7** and **11** strongly reduced the number of viable cells in  $90,5 \pm 1,2\%$ ,  $87,1 \pm 1,1\%$  and  $86,3 \pm 2,2\%$ , respectively, when compared with the control and induced DNA fragmentation at concentration  $100 \mu\text{M}$ . Among ten chalcones tested, only the number **5**, **7** and **11** showed accentuated cytotoxic effect. Compound **5** showed the lower  $\text{IC}_{50}$  value in 24 and 48 hours,  $45$  and  $22 \mu\text{M}$ , respectively. The methoxy groups which increase the electronic density of the A-ring, present in the compounds **5**, **7**, and **11**, seem to increase the cytotoxicity. GSH depletion was proportional to cell death. ATP concentration was depleted showing a concentration-dependent profile. These results suggest that the compounds may be interfering in mitochondrial membrane potential and ATP synthesis. Chalcone **7** was the compound which showed smaller toxic effects to normal cells from bone marrow. Our results showed that the synthetic chalcones **5**, **7** and **11** induced apoptosis in L1210 cells and present the chalcone **7** as a prominence compound to follow with mechanistic investigations.

# 1. INTRODUÇÃO

Leucemia é uma doença decorrente da proliferação neoplásica de células hematopoiéticas linfóides ou mielóides, resultante da mutação de uma única célula-tronco, cuja prole forma um clone de células leucêmicas. As mutações podem ocorrer em diferentes fases da diferenciação de precursores linfóides ou mielóides ou, ainda, em uma célula-tronco pluripotente, com capacidade para diferenciar-se, tanto em células mielóides quanto linfóides. Geralmente, ocorrem várias alterações genéticas para transformação maligna, incluindo expressão inadequada de oncogenes e perda de função de genes supressores de tumor. As leucemias agudas caracterizam-se por um defeito na maturação, o que ocasiona um desequilíbrio entre a proliferação e a maturação celular; uma vez que as células do clone leucêmico continuam a proliferar-se, sem chegar aos estágios de maturação e morte, ocorrendo uma expansão contínua do clone leucêmico e predomínio das células imaturas (BAIN, 2003).

As bases do tratamento com compostos antileucêmicos estão suportadas na inibição da proliferação celular (HERR & DEBATIN, 2001), na indução à apoptose ou na diferenciação dos blastos leucêmicos, que invariavelmente evoluirão para apoptose (LESZCZYNIECKA *et al.*, 2001).

Os mecanismos que regulam a apoptose são complexos e consistem na ativação de numerosas sinalizações que integram vários sistemas paralelos ou inter-relacionados, culminando na autodestruição celular. Deficiências nos mecanismos de apoptose podem contribuir para a carcinogênese, criando um ambiente permissivo à instabilidade genética e acúmulo de mutações, contribuindo para persistência e expansão de células neoplásicas (REED, 1999).

A mitocôndria é responsável por 80% a 90% do ATP necessário para respiração e sobrevivência celular, regula o fluxo de cálcio e tem um papel importante nos estímulos

pró e anti-apoptóticos (DIAS & BAILLY, 2005). Alguns trabalhos demonstram que a deficiência energética ou depleção de ATP (trifosfato de adenosina) induz as células a apoptose. CARIATI *et al.* (2003) mostraram que o composto mofaroteno (um retinóide ativo) induziu à apoptose células de linfoma de Burkitt's através da despolarização da membrana mitocondrial, ativação das caspases 3 e 9, e aumento da produção de espécies reativas de oxigênio. Estes efeitos foram relacionados à pequena quantidade do conteúdo intracelular de ATP. GARLAND & HALESTRAP (1997) mostraram que a depleção intracelular de ATP, pelo desacoplamento da ATPase mitocondrial, induziu a morte celular apoptótica exibindo fragmentação do DNA em células pré-B dependentes de interleucina-3. Substâncias que comprometem a integridade estrutural e funcional da mitocôndria, conseqüentemente o metabolismo energético celular, podem ser novas oportunidades para impedir a proliferação de células tumorais.

O entendimento da complexa interação entre os diferentes mecanismos de defesa, em resposta ao estresse celular, pode identificar alvos moleculares de sensibilidade ou resistência em células tumorais e contribuir para novas intervenções na terapia do câncer. A demonstração de que a depleção de glutathione aumenta a sensibilização de células tumorais aos efeitos citotóxicos de vários compostos alquilantes e radiações já está bem descrita na literatura. Em contrapartida, concentrações elevadas de glutathione intracelular estão associados à resistência de várias linhagens celulares tumorais a fármacos quimioterápicos, como leucemia linfoblástica L1210 (KRAMER *et al.*, 1987), plasmocitoma humano (MEDH *et al.*, 1991), carcinoma gástrico (BARRANCO *et al.*, 1990) e carcinoma ovariano (LOUIE *et al.*, 1985).

Chalconas são precursores biossintéticos de flavonóides e isoflavonóides. São largamente distribuídas na natureza, desde sementes até grandes plantas.



Quimicamente, apresentam dois anéis aromáticos ligados por três carbonos, uma carbonila e dois carbonos  $\alpha$ -,  $\beta$ -insaturados. Apresentam diversas atividades biológicas, são potentes agentes antiinflamatórios e têm sido identificadas como compostos com interessantes propriedades citotóxicas e antitumorais. SAYDAM *et al.* (2003) estudaram o efeito citotóxico e inibitório da proliferação da 4,4' dihidroxichalcona em células de leucemia humana. Estes pesquisadores mostraram que a 4,4' dihidroxichalcona apresenta uma alta citotoxicidade e atividade antitumoral nas células HL-60. Porém, não conseguiram demonstrar o mecanismo pelo qual a chalcona inicia o processo de morte das células. Entretanto, foi demonstrada a degradação do DNA e, conseqüentemente, concluído que a morte ocorre por apoptose.

NAKATANI *et al.* (2005) mostraram que dihidroxichalconas C-benziladas isoladas da *Uvaria acuminata*, uvauretina, isouvaretina e diuvaretina, inibiram o crescimento de células de leucemia promielocítica humana HL-60. O mecanismo de citotoxicidade foi avaliado pela observação da fragmentação do DNA, da ativação da caspase-3 e da morfologia celular. Foi demonstrado que estas hidroxichalconas induzem as células HL-60 a morte, por apoptose (ICHIMARU *et al.*, 2004; NAKATANI *et al.*, 2005).

Um estudo realizado com hidroxichalconas por SABZEVARI *et al.* (2004) mostrou que todas as hidroxichalconas estudadas depletaram GSH de hepatócitos isolados de rato e oxidaram GSH à GSSG. Todas as chalconas estudadas também causaram citotoxicidade nos hepatócitos. O mecanismo de citotoxicidade foi por desacoplamento mitocondrial, evidenciado pelo aumento de consumo de oxigênio e colapso do potencial de membrana mitocondrial. Em algumas hidroxichalconas, o mecanismo de citotoxicidade também foi associado à oxidação da GSH.

Nosso objetivo foi estudar o efeito citotóxico (atividade antitumoral) de chalconas sintéticas derivadas do 3,4-metilenodioxibenzaldeído sobre células leucêmicas linfoblásticas L1210.

# 2.

## REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

## 2.1 Leucemia linfóide aguda

Leucemia linfóide aguda (LLA) é uma doença caracterizada pela proliferação descontrolada de células progenitoras linfóides imaturas na medula óssea, que resulta em acúmulo de células neoplásicas (PLASSCHAERT *et al.*, 2004). A etiologia das leucemias não é conhecida, embora fatores possam contribuir para o desenvolvimento da doença, como as mutações genéticas (VIELE, 2003).

A LLA ocorre em adultos e crianças, mas a maior incidência verifica-se em crianças abaixo dos cinco anos de idade, sendo responsável por cerca de 80% dos casos de leucemia aguda na infância (LAKS *et al.*, 2003) e 50% de todas as malignidades hematopoiéticas (DOWNING & SHANNON, 2002). Segundo a revisão realizada por PLASSCHAERT *et al.*, (2004) a incidência em crianças de até cinco anos é de 5,7 por 100.000 pessoas por ano, e em adultos é de 0,4 por 100.000 pessoas aos 40 anos, aumentando para 0,8 acima dos 75 anos de idade. Em adultos a LLA é uma leucemia relativamente rara, contabilizando 2% a 3 % das malignidades hematopoiéticas (DOWNING & SHANNON, 2002).

O prognóstico, em crianças, é o mais favorável de todos os cânceres, com mais de 95% de remissão completa e taxas de sobrevida, sem a doença, de 63% a 83% (SCHRAPPE *et al.*, 2000). PUI & EVANS (1988) citam que a taxa de cura na infância, com quimioterapia intensiva, é de 70% a 80%. Adultos com LLA apresentam prognóstico pior, com remissão completa de 75% a 89% e taxa de sobrevida a longo prazo, sem a doença, de 28% a 39% (GOKBUGET & HOELZER, 2002). Os progressos no tratamento de pacientes com LLA levaram a melhora das taxas de sobrevida, sendo as crianças as mais beneficiadas. A taxa de cura nos

adultos, com quimioterapia, é de apenas 25% a 40%, por causa do alto risco de reincidência (POPAT *et al.*, 2003).

Sugeriu-se que cânceres pediátricos resultam de defeitos genéticos relacionados com o crescimento e desenvolvimento de diferentes órgãos e tecidos, durante períodos de risco de estresse proliferativo (GREAVES, 1993). Esta sugestão é baseada na observação de diferentes períodos de risco para tumores pediátricos, dependendo da idade. O pico de incidência de LLA é entre dois e cinco anos, quando células progenitoras de linfócitos B estão proliferando extensivamente e rearranjando seus genes para imunoglobulinas (GREAVES, 1986).

Diferenças nas características e no prognóstico da LLA em adultos, comparando-se com crianças, podem resultar do fato de que, na infância, a LLA acomete células progenitoras linfóides maduras, enquanto que na idade adulta acomete células-tronco multipotentes “stem cell” (GREAVES, 1993; GREAVES, 1999). Estas células sofrem transformações na LLA e mantêm algumas das suas características equivalentes às células normais. Os progenitores linfóides acometidos têm uma capacidade limitada de renovação e são dependentes de citocinas e de fatores de crescimento para sua proliferação e diferenciação, sendo mais sensíveis à indução a apoptose, por quimioterapia ou retirada de citocinas. As células-tronco multipotentes têm uma grande capacidade de renovação e são mais resistentes à quimioterapia do que os progenitores linfóides. Portanto, o acometimento de células tronco multipotentes poderia originar um clone leucêmico mais agressivo (GREAVES, 1993).

Crianças com alterações genéticas, como trissomia do cromossomo 21, anemia de Fanconi e síndrome de Bloom, têm maior risco de desenvolverem LLA. Ambas anemia de Fanconi e síndrome de Bloom apresentam defeitos no reparo do

DNA. Pacientes com história precedente de hemopatias malignas, como hemoglobinúria paroxística noturna, síndrome mielodisplásica, doenças mieloproliferativas e anemia aplástica apresentam risco aumentado de desenvolver leucemia aguda. A exposição a substâncias químicas, como benzeno e radiação ionizante, também aumentam o risco de desenvolver leucemia aguda (VIELE, 2003).

### **2.1.1 Manifestações clínicas**

As manifestações clínicas das leucemias devem-se, diretamente ou indiretamente, à proliferação de células leucêmicas e à sua infiltração nos tecidos normais. A elevada proliferação celular tem conseqüências metabólicas, e as células infiltrantes também causam distúrbios na função dos tecidos (BAIN, 2003). As manifestações clínicas podem ser divididas em primárias e secundárias. As manifestações primárias envolvem infiltração da medula óssea pelas células leucêmicas, impedindo a proliferação de células normais. Como conseqüência estes pacientes podem apresentar anemia, trombocitopenia e neutropenia. Como resultado da neutropenia e da plaquetopenia pode-se observar infecções sucessivas e hemorragias (BAIN, 2003; VIELE, 2003). Fadiga, palidez, sangramentos, equimoses, febre e suscetibilidade a infecções são sintomas da leucemia aguda (VIELE, 2003). As manifestações secundárias são indicativas de outros sistemas do organismo envolvido. Além do sistema nervoso central, outros órgãos podem ser suscetíveis à infiltração de blastos leucêmicos, como o fígado, o baço e os linfonodos, causando hepatoesplenomegalia e linfadenopatia. O sistema nervoso central (SNC) é o local extramedular mais freqüentemente envolvido. Pacientes com

infiltração no SNC já no diagnóstico, tanto adultos como crianças, requerem direcionamento adicional do tratamento para o SNC. Uma estratégia comum é a aplicação de antineoplásicos via intratecal e, em alguns casos, radioterapia (PLASSCHAERT *et al.*, 2004).

Crianças podem ser mais suscetíveis ao envolvimento do SNC devido a diferenças na composição da barreira hemato-encefálica. Entretanto, células leucêmicas de adultos e crianças podem diferir na sua habilidade em infiltrar-se no SNC, mas até agora isto não foi estudado (PLASSCHAERT *et al.*, 2004).

### **2.1.2 Classificação FAB, imunofenotipagem, citogenética e diagnóstico**

A Classificação Franco-Americana-Britânica (FAB), proposta por um grupo de colaboração de hematologistas Franceses, Americanos e Britânicos, desde 1976 divide a LLA em três subtipos, L1, L2 e L3, de acordo com a morfologia microscópica (BENNETT *et al.*, 1976). Os subtipos L1 e L2 podem envolver linfócitos B ou T. O subtipo L1 é observado mais freqüentemente em crianças (76% a 89%) do que em adultos (31% a 43%), (BENNETT *et al.*, 1981; LILLEYMAN *et al.*, 1992; KAMPS *et al.*, 2000), enquanto que o subtipo 2 é observado mais freqüentemente em adultos (49% a 60% em adultos versus 14% a 22% em crianças), (BENNETT *et al.*, 1981; LILLEYMAN *et al.*, 1992; KAMPS *et al.*, 2000). O subtipo 3 está associado com LLA de células-B maduras. É raro, sendo observado mais freqüentemente em adultos do que em crianças.

O prognóstico nos diferentes subtipos da classificação FAB permanece obscuro. Em crianças ou adultos, alguns estudos têm mostrado um melhor

prognóstico para pacientes do tipo L1 e uma maior taxa de recaída para pacientes L2 (MILLER *et al.*, 1981; MANDELLI *et al.*, 1996; KANERVA *et al.*, 1999). Entretanto, existem controvérsias com outros estudos que não confirmam o mesmo prognóstico para subtipos L1 e L2 da classificação FAB (DAVEY *et al.*, 1983; DURRANT & RICHARDS, 1993).

Embora, historicamente, a classificação FAB para LLA tenha sido amplamente utilizada, seu uso clínico é discutido atualmente. A reprodutibilidade desta classificação é limitada devido à heterogeneidade dos blastos leucêmicos ao microscópio ótico e a subjetividade na subclassificação. A eficácia atual da imunofenotipagem e da citogenética, em combinação com prognósticos duvidosos dos diferentes subtipos, tem limitado o uso da classificação FAB na conduta clínica da LLA.

O diagnóstico e a classificação precisos são fundamentais na identificação exata do tipo de leucemia e na determinação do melhor tratamento para cada paciente. Com o desenvolvimento de anticorpos monoclonais, a caracterização de progenitores linfóides normais e leucêmicos pode ser realizada por imunofenotipagem. A diferenciação de progenitores das linhagens B e T e de células maduras B e T se caracteriza pela expressão de antígenos específicos durante os estágios de desenvolvimento. A citogenética identifica variações no cariótipo de células leucêmicas. O número de cromossomos e as anormalidades cromossômicas estruturais podem ser identificados e são eficientes indicadores do prognóstico para escolha da terapêutica.

Com a finalidade de superar as limitações da classificação FAB, e considerando as características morfológicas, imunofenotípicas e genética/moleculares dos blastos, em 2001, a Organização Mundial de Saúde



(OMS), em conjunto com a Sociedade de Hematologia Americana e a Associação Européia de Hematologia, publicou uma nova classificação para neoplasias do sistema hematopoiético e linfóide. A LLA foi subdividida conforme a marcação imunofenotípica em linhagem B (Pró-B, Comum, Pré-B e LLA-B) e linhagem T (Pré-T e LLA-T), (JAFFE *et al.*, 2001). Segundo o Grupo Europeu para a Classificação Imunológica das Leucemias (EGIL), os blastos da linhagem B expressam antígenos específicos para anticorpos monoclonais CD19, CD79a e CD22, e os blastos de linhagem T para o anticorpo CD3. Deve-se observar que o antígeno de histocompatibilidade de classe 2 (HLA-DR) é expresso, na grande maioria dos casos, de LLA de linhagem B, independente do grau de maturação da célula, ao passo que na LLA-T a expressão do HLA-DR está relacionada com um imunofenótipo mais maduro (SZCZEPANSKI *et al.*, 2003).

Para confirmar o diagnóstico de LLA, a aspiração da medula óssea e a imunofenotipagem dos blastos do sangue periférico ou da medula óssea são essenciais. Também é recomendável fazer a análise citogenética, para identificar subgrupos de importância diagnóstica.

### **2.1.3 Alterações genéticas**

As alterações genéticas que levam a uma transformação leucêmica geralmente são provocadas por alterações importantes nos cromossomos. O número de cromossomos no clone leucêmico pode ser subdividido em: alta hiperdiploidia (com mais de 50 cromossomos), baixa hiperdiploidia (com 47 a 50 cromossomos), pseudodiploidia (46 cromossomos com anormalidades estruturais),

diploidia (46 cromossomos normais) e hipodiploidia (menos que 46 cromossomos). Clinicamente, hiperploidia com mais de 50 cromossomos está fortemente associada com um bom prognóstico (PLASSCHAERT *et al.*, 2004).

A translocação Filadélfia t(9;22) ocorre em células leucêmicas de 3% a 5% das crianças e 15% a 25% dos adultos (PUI & EVANS, 1998). Vários estudos têm mostrado um aumento na incidência da translocação Filadélfia, com o aumento da idade. A translocação está associada com um mau prognóstico (SECKER-WALKER *et al.*, 1991).

Pacientes com translocação t(4;11) têm o pior prognóstico de todas as alterações cromossômicas conhecidas. Foi observada a incidência em crianças até o primeiro ano de vida de 70% a 80% (RUBNITZ *et al.*, 1994; PUI *et al.*, 1995), enquanto que em crianças de até 15 anos de idade a incidência é de 2% e, em adultos, parece estar próxima de 8%.

A translocação t(12;21) é a alteração genética mais comum observada em crianças com LLA. Mais de 26% das crianças e 3% a 4% dos adultos com LLA têm esta alteração (PUI & EVANS, 1998). Considera-se a presença desta translocação favorável para o prognóstico (RUBNITZ *et al.*, 1997; SEEGER *et al.*, 1998).

Em resumo, as translocações t(4;11) e t(9;22) estão associadas com um prognóstico desfavorável, enquanto que hiperdiploidia e translocação t(12;21) são indicadores de bom prognóstico.

#### **2.1.4 Tratamento**

Em geral, os protocolos de tratamento são comparáveis entre si. Iniciam com terapia de indução, usando múltiplos quimioterápicos, seguido das fases de

consolidação e manutenção. Os quimioterápicos utilizados incluem vincristina, dexametasona, daunorrubicina, doxorubicina, metotrexato e mercaptopurina. A profilaxia do sistema nervoso central é necessária para aumentar as taxas de sobrevida e evitar infiltração no SNC (PLASSCHAERT *et al.*, 2004).

Para crianças, o tratamento profilático consiste em metotrexato intratecal para os casos de baixo risco, com adicional metotrexato intravenoso para os grupos de alto risco (PUI, 1995). Em adultos, há poucas terapias direcionadas à profilaxia do SNC, e a prioridade é ter uma remissão completa e duradoura da medula óssea, além da prevenção de infiltração no SNC. Os resultados mais favoráveis são obtidos com altas doses de quimioterapia, combinada com terapia intratecal e irradiação do SNC. A maioria dos regimes de tratamento em adultos para LLA já inclui altas doses de quimioterapia para reduzir os riscos de recaída (BENNETT *et al.*, 1981).

Um dos protocolos de maior notoriedade internacional é o desenvolvido pelo grupo alemão Berlim-Frankfurt-Munique (BFM), (VIANA *et al.*, 1994; SACKMANN-MURIEL *et al.*, 1999). Esse protocolo utiliza a estratificação dos pacientes conforme grupos de risco para ocorrência de recidiva. Os pacientes com maior risco são tratados com quimioterapia intensiva. O tratamento inclui quatro fases: indução de remissão, consolidação, manutenção e profilaxia do SNC. O principal objetivo do tratamento é induzir a remissão completa, ou seja, atingir menos de 5% de blastos na medula óssea e restaurar a hematopoiese normal. Logo após, inicia-se a fase de consolidação, cujo objetivo é reduzir a doença residual mínima (presença de células leucêmicas na medula óssea indetectáveis à microscopia ótica, entretanto detectáveis por citometria de fluxo) e ajustar a intensidade do tratamento, conforme a estratificação do risco de recidiva. O protocolo BFM utiliza a chamada terapia de reindução durante a fase de consolidação, que consiste na utilização dos mesmos

fármacos administrados durante a fase de indução. Após esta fase é realizada a terapia de manutenção, cujo objetivo é a erradicação de células leucêmicas residuais. Nesta fase, a quimioterapia é menos intensiva. A profilaxia do SNC é iniciada durante a fase de indução, e inclui radioterapia e quimioterapia (LAKS *et al.*, 2003).

A maioria das crianças e alguns adultos com LLA podem ser curados com quimioterapia intensiva. Para aqueles pacientes que sofrem recaída ou não conseguem remissão completa, o transplante de células-tronco hematopoiéticas oferece melhores possibilidades de controle da doença, a longo prazo. O risco da relação transplante/mortalidade precisa ser balanceado com o potencial de cura apenas pela quimioterapia convencional. O transplante de células-tronco, após a terapia de indução, é recomendável em pacientes que têm um alto risco de recaída após a quimioterapia (POPAT *et al.*, 2003).

Os fármacos quimioterápicos provêm benefício terapêutico, mas também significativa toxicidade. A sensibilidade e resistência das células tumorais aos agentes quimioterápicos dependem da capacidade destes fármacos induzirem a morte celular.

## **2.2 Morte celular: apoptose e necrose**

A morte celular pode ocorrer por vias distintas, apoptose ou necrose. Entretanto, os eventos bioquímicos que precedem o fenômeno e que direcionam o mecanismo de morte celular permanecem obscuros. Segundo HIGUCHI (2004), o mesmo insulto pode levar à apoptose ou à necrose, dependendo da sua intensidade,

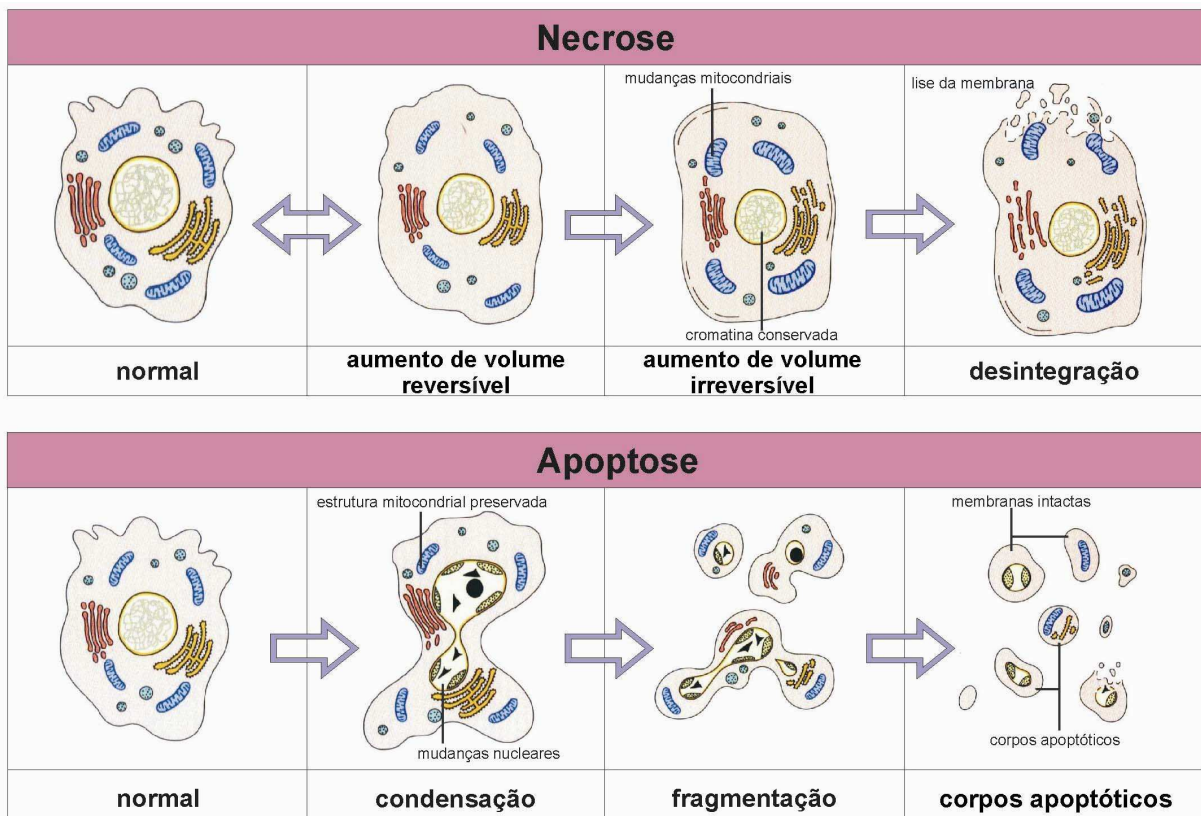
da subpopulação de células envolvidas, das espécies e do genótipo do organismo envolvido.

A necrose aparece como resultado de uma disfunção celular aguda em resposta a condições severas de estresse ou depois da exposição a agentes tóxicos. É um processo relativamente passivo, associado com a rápida depleção de ATP celular. Morfologicamente, a necrose é caracterizada pelo aumento do volume celular e ruptura da membrana plasmática, em que todo o conteúdo intracelular extravasa para o meio intercelular (GORES *et al.*, 1990) (Figura 1). Esta saída do conteúdo de células mortas para o espaço extracelular pode causar dano ao tecido, por afetar as células vizinhas ou por atrair células pró-inflamatórias à lesão (HASLETT, 1992).

Apoptose ou morte celular programada é um processo fisiológico essencial envolvido no desenvolvimento e homeostasia dos tecidos. É um fenômeno que apresenta um papel fundamental na embriogênese, homeostasia celular, renovação de tecidos e regressão de tumores. No sistema imune, tem sido descrito que a apoptose é crucial na seleção de células T, depleção de células T e de linfócitos B reativos, remoção de células T efetoras periféricas após o término da resposta imune, regulação da memória imunológica e regulação da citotoxicidade de células alvo por células NK ("Natural Killer") (GUPTA, 2003). Entretanto, a apoptose também ocorre em várias situações patológicas (CHANDRA *et al.*, 2000; ZIMMERMANN *et al.*, 2001). O desenvolvimento de tumores malignos resulta da proliferação desregulada ou de uma inabilidade das células em seguir para morte apoptótica (HERR & DEBATIN, 2001).

A apoptose foi primeiramente descrita por KERR *et al.*, (1972), e foi definida pela aparência morfológica das células, incluindo enrugamento da membrana

(“blebbing”), condensação da cromatina, fragmentação nuclear e diminuição do tamanho celular (Figura 1). As características bioquímicas, associadas com a apoptose, incluem clivagem do DNA internucleossomal, externalização da fosfatidilserina (MARTIN *et al.*, 1995) e clivagem proteolítica de substratos intracelulares (MARTIN & GREEN, 1995). Como resultado das mudanças na membrana plasmática, as células apoptóticas são rapidamente fagocitadas antes do extravasamento do conteúdo intracelular e sem indução de uma resposta inflamatória.

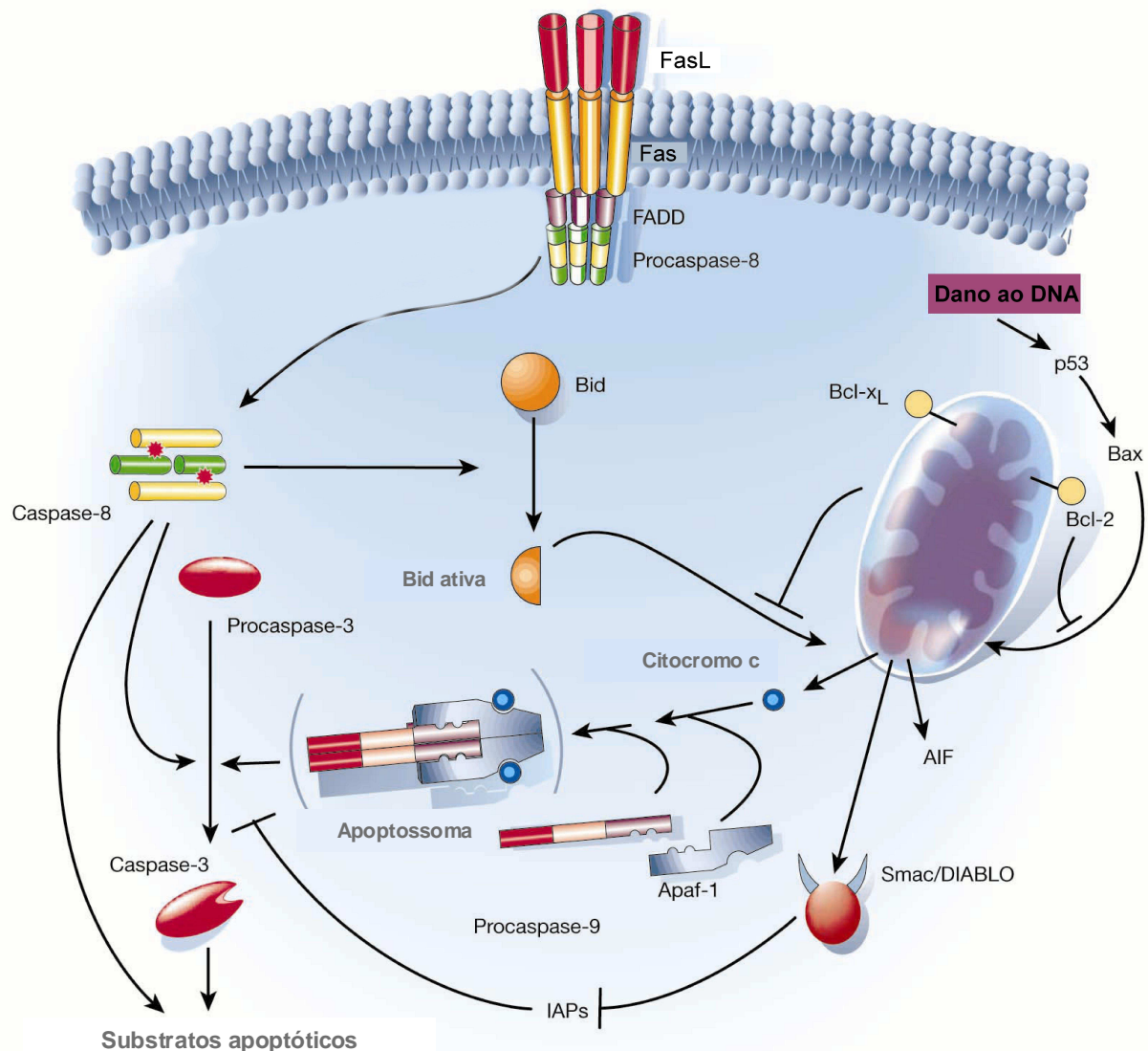


**Figura 1: Mecanismos de morte celular: necrose e apoptose.**

Fonte: Adaptado do Catálogo BioAgency 2004-05, Cap. 9 - Apoptose e Inflamação. Disponível em: <http://www.bioagency.com.br/informacao/default.asp>. Acesso em 22 de dezembro de 2006.

A apoptose é firmemente regulada pela ativação de uma cascata de aspartato-cisteína proteases (caspases). As caspases são zimogênios solúveis no

citoplasma, no espaço intermembrana mitocondrial e na matriz nuclear de todas as células (NICHOLSON & THORNBERRY, 1997). Existem duas vias principais que levam à ativação das caspases. A primeira destas depende da participação da mitocôndria (receptor-independente) e a segunda envolve interação dos receptores da superfície celular como Fas ou TNF-R (receptor do fator de necrose tumoral), chamados de “receptores de morte”, com seus ligantes (CHANDRA *et al.*, 2000; ZIMMERMANN *et al.*, 2001; GUPTA, 2003). Membros pró e anti-apoptóticos da família Bcl-2 regulam a via mitocondrial. O estresse celular induz a translocação de membros pró-apoptóticos da família Bcl-2 do citosol para a mitocôndria, induzindo a saída do citocromo c, enquanto proteínas anti-apoptóticas da família Bcl-2 trabalham para prevenir a saída do citocromo c da mitocôndria e preservar a sobrevivência celular (ZIMMERMANN *et al.*, 2001). Uma vez no citoplasma, o citocromo c catalisa a oligomerização da protease apoptótica ativadora de fator-1 (Apaf-1), promovendo a ativação da procaspase-9 (CHANDRA *et al.*, 2000; ZIMMERMANN *et al.*, 2001), formando um complexo chamado “apoptossoma” (HERR & DEBATIN 2001), o qual ativa a procaspase-3 (ZIMMERMANN *et al.*, 2001). Apaf-1 contém sítios de ligação para o citocromo c e ATP (CHANDRA *et al.*, 2000). Alternativamente, a ligação nos receptores de morte, como o TNF-R e o receptor Fas, causam a ativação da procaspase-8. A caspase-8 ativada pode ativar diretamente a procaspase-3 ou clivar a proteína pro-apoptótica Bid, a qual subsequente induz a saída do citocromo c (ZIMMERMANN *et al.*, 2001), (Figura 2).



**Figura 2: As duas principais vias apoptóticas.** Na via mitocondrial o estresse celular induz a translocação de membros da família Bcl-2 pró-apoptóticos do citosol para a mitocôndria, onde induzem a saída do citocromo c. O citocromo c no citosol promove a ativação do Apaf-1 e da pró-caspase 9, formando o apoptossoma, o qual ativa a pró-caspase 3, induzindo à apoptose. O citocromo c e o Smac/DIABLO são liberados da mitocôndria após estímulos apoptóticos. Enquanto o citocromo c ativa o Apaf-1, o Smac/DIABLO inibe a ligação das caspases as IAPs (Proteínas Inibidoras da Apoptose). A segunda via é dependente do receptor. A ativação da pró-caspase 8 pela ligação ao receptor de morte está ilustrada. O Fas-ligante (FasL) associa-se a FADD na região intracelular. Este complexo ativa a pró-caspase 8. A caspase-8 ativada pode ativar diretamente a pró-caspase-3 ou clivar a proteína pró-apoptótica Bid, a qual subsequente induz a saída do citocromo c.

Fonte: Adaptado de HENGARTNER, 2000.

Os mecanismos fundamentais dos quimioterápicos, para induzirem a morte celular, podem ser causando dano ao DNA, aos lipídios componentes da membrana celular e a proteínas celulares, o que ocasiona um desequilíbrio na homeostasia



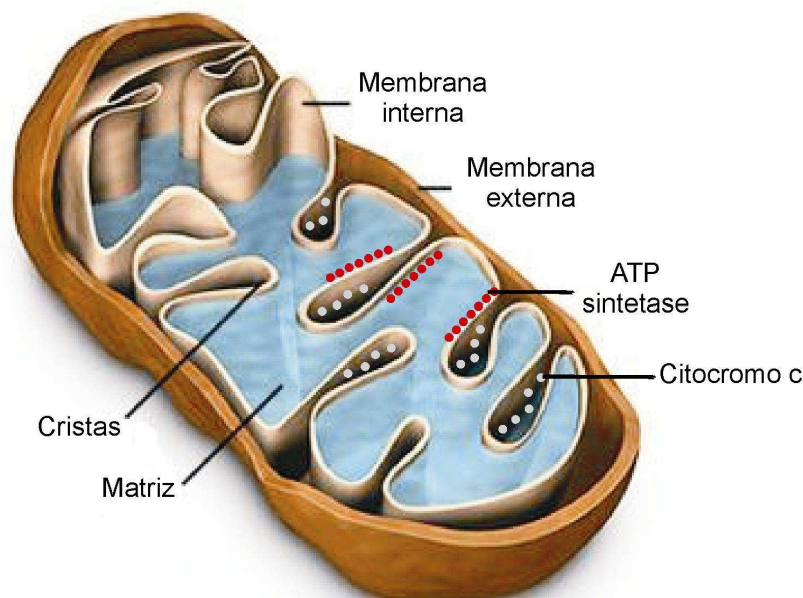
celular, comumente designada de estresse celular. Estas mudanças iniciam a ativação de uma complexa cascata de moléculas sinalizadoras induzidas na tentativa de retornar ao equilíbrio celular. Como resposta aos danos no DNA acionam-se a regulação do ciclo celular e os mecanismos de reparo (como a proteína p53). O tipo e a dose de estresse dentro do contexto celular parecem ditar o resultado da resposta celular, o qual é convertido a vias complexas para controle do ciclo celular ou a morte celular. A apoptose parece ser induzida quando o dano excede a capacidade a mecanismos de reparo (HERR & DEBATIN, 2001).

### **2.3 Mitocôndria, potencial energético celular e GSH**

As mitocôndrias têm um papel central no metabolismo energético. Geram 80% a 90% do ATP necessário para respiração e sobrevivência celular por fosforilação oxidativa, regulam o fluxo de cálcio e têm um importante papel na integração de estímulos pró e anti-apoptóticos (DIAS & BAILLY, 2005).

Nos últimos anos, aumentou o entendimento do papel da mitocôndria na morte celular (KROEMER & REED, 2000; MARTINOU & GREEN, 2001; GREEN & EVAN, 2002). Numerosos estímulos, incluindo agentes quimioterápicos, radiação UV, espécies reativas de oxigênio e nitrogênio, e falta do fator de crescimento parecem mediar a apoptose via mitocondrial, uma via independente de receptor (GUPTA, 2003). A mitocôndria é uma organela com dois compartimentos bem definidos: a matriz, circundada por uma membrana interna, e um espaço intermembrana, circundado pela membrana externa (Figura 3). A membrana interna contém várias moléculas, incluindo ATP sintetase e cadeia transportadora de

elétrons. Em condições fisiológicas estas moléculas possibilitam que a cadeia respiratória crie um gradiente eletroquímico (potencial de membrana). A membrana externa contém canais voltagem-dependente. O espaço intermembrana contém citocromo c, algumas pro-caspases, adenilato quinase 2, Smac/Diablo (Segundo ativador mitocondrial de caspases/Inibidor da ligação das caspases as IAPs) e fatores de indução da apoptose (AIF). Também estão presentes na mitocôndria, proteínas inibidoras de apoptose (IAPs). A permeabilização da membrana externa, conseqüentemente, resulta na saída destas moléculas para o citoplasma. A permeabilização da membrana interna leva a mudanças no potencial de membrana mitocondrial. A saída do citocromo c é um dos principais passos na via mitocondrial da apoptose, está associada com a permeabilização da membrana externa, e promove a formação do apoptossoma, o qual ativa as caspases executoras da apoptose (GUPTA, 2003).



**Figura 3: Mitocôndria**

Fonte: Figura adaptada. Disponível em: <http://linux.ajusco.upn.mx/fotosintesis/mitocondria.html>. Acesso em 19 dezembro de 2006.

As mitocôndrias são induzidas a liberar o citocromo c em resposta a quimioterápicos e outros estresses celulares, por abertura de canais na membrana externa ou por causa do aumento de tamanho e rompimento da organela, que ocorre pela transição de permeabilidade, após abertura de poros (REED, 1999; KROEMER & REED, 2000). A família de proteínas Bcl-2 tem um papel central no controle da via mitocondrial de apoptose. Em humanos, mais de 20 membros desta família já foram identificados, incluindo proteínas supressoras da apoptose (Bcl-2, Bcl-xl e outras) e proteínas promotoras da apoptose (Bax, Bak, Bad, Bid, Bim, Bcl-Xs, entre outras), (HERR & DEBATIN, 2001).

Como a mitocôndria é o principal local a consumir oxigênio na célula, também é o principal local para gerar espécies reativas de oxigênio (EROs). Embora o transporte de elétrons normal na mitocôndria envolva a redução de quatro elétrons do oxigênio molecular para água, reações de redução parciais podem ocorrer, desequilibrando situações fisiológicas, causando liberação de ânion superóxido e peróxido de hidrogênio. Condições patológicas, como o estresse oxidativo, podem levar a danos na função mitocondrial, aumentando a liberação de EROs. Um grande número de enzimas mitocondriais, incluindo desidrogenases e ATPases transportadoras, contém grupos sulfidril que devem ser mantidos na forma reduzida para exercerem a função. Além disso, componentes sensíveis ao estado redox na cadeia transportadora de elétrons, como íons de ferro no grupo prostático heme, podem ser oxidados com a perda do balanço redox, produzindo disfunções mitocondriais (LASH, 2006).

O desequilíbrio entre a produção de espécies reativas de oxigênio e de nitrogênio e o sistema de defesa antioxidante endógeno é o fator predominante para causar uma série de mudanças fisiológicas que caracterizam o estresse oxidativo. A

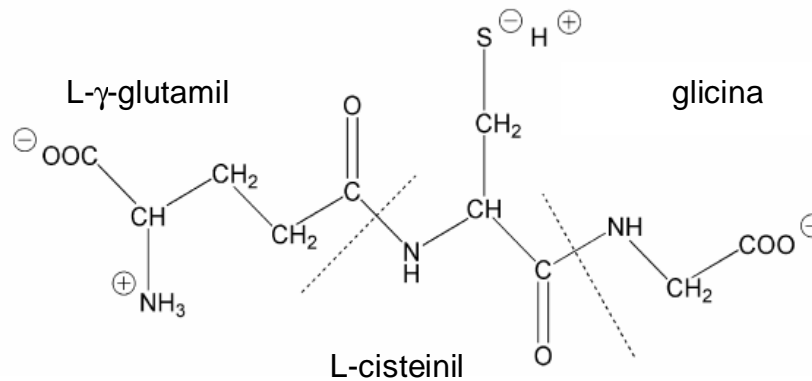
produção destas moléculas reativas é neutralizada pelas defesas antioxidantes, estabelecendo uma homeostase no metabolismo oxidativo. Porém, em certas condições patológicas, pode haver um desequilíbrio na homeostase, ocasionando um excesso de produção de espécies reativas, causando ações deletérias aos organismos (SIES, 1997).

Para minimizar os efeitos deletérios associados à constante formação de EROs, oriundas da presença e da utilização do oxigênio nas células e nos tecidos, os organismos aeróbicos foram dotados, ao longo do tempo evolutivo, de distintas defesas antioxidantes enzimáticas e não enzimáticas. Dentre as defesas enzimáticas destacam-se as enzimas catalase, superóxido dismutase, glutatona redutase (GR), glutatona peroxidase (GPx) e o conjunto das glutatonas S-transferases (GSTs). As glutatonas S-transferases, embora não atuem diretamente contra os radicais livres, são importantes na defesa celular, pois estão associadas a biotransformação de xenobióticos, como herbicidas, inseticidas e agentes carcinogênicos. Estas enzimas catalisam a reação de conjugação da glutatona na forma reduzida (GSH) com estes compostos, aumentando a solubilidade e facilitando a excreção.

Falhas ou danos mitocondriais podem levar rapidamente à inibição da sobrevivência e da proliferação celular. Fármacos que comprometem a integridade estrutural e funcional da mitocôndria podem prover novas oportunidades para combater a proliferação de células neoplásicas. Locais específicos na mitocôndria podem ser alvos moleculares, tais como: a cadeia respiratória, o DNA mitocondrial, os canais de potássio, a família de proteínas Bcl-2 e os poros de transição da permeabilidade (DIAS & BAILLY, 2005).

A glutatona (GSH) é um tripeptídeo,  $\gamma$ -glutamilcisteinilglicina, o principal tiol não protéico, de baixo peso molecular, presente em todas as células aeróbicas. Sua

importância funcional como antioxidante está na presença do grupo tiol no resíduo de cisteína (Figura 4).



**Figura 4: Estrutura da glutationa**

Fonte: Retirado de LASH, 2006.

Os aminoácidos L-glutamina, cisteína e glicina são precursores na síntese da GSH. A síntese ocorre por uma reação dependente de ATP no citoplasma, e é catalisada pela  $\gamma$ -glutamil-cisteína-sintetase e pela GSH sintase. A maior parte, se não toda atividade biossintética, reside no citoplasma, com pouca ou nenhuma atividade em outras organelas (GRIFFITH & MEISTER, 1985; MCKERNAN *et al.*, 1991). As mitocôndrias são organelas importantes na manutenção do balanço redox. O balanço entre as concentrações de glutathiona reduzida e oxidada depende do estado redox da célula, como também da síntese de GSH.

O papel antioxidante da GSH contra compostos oxidantes e eletrofílicos compreende a oxidação da GSH em glutathiona dissulfeto (GSSG). As concentrações de GSH são restauradas através da reação catalisada pela glutathiona redutase (GR) dependente de NADPH (Fosfato de nicotinamida adenina dinucleotídeo), (SANTOS-SILVA, *et al.*, 2006). Alterações no status de GSH mitocondrial são associadas com ativação de vias de sinalização e expressão de genes que regulam a apoptose

(RICHTER *et al.*, 1996; ZAMZAMI *et al.*, 1996; KLUCK *et al.*, 1997; MARCHETTI *et al.*, 1997; YANG *et al.*, 1997; DAVIS *et al.*, 2001), o crescimento e a diferenciação celular (HAMMOND *et al.*, 2001; FILOMENI *et al.*, 2002).

O conteúdo de GSH nas células tumorais é relevante nos mecanismos de regulação mutagênica, na síntese do DNA, no crescimento e para a resistência a múltiplas drogas (MDR). Nos tumores malignos, a resistência está associada, na maioria dos casos, com altas concentrações de GSH no interior das células tumorais. Desta maneira, tentativas de tratamento para o câncer baseado na modulação de GSH deveriam controlar possíveis mudanças no crescimento, associadas a GSH e sua síntese nestas células. Apesar do potencial benéfico da estratégia de depleção seletiva de GSH na terapia do câncer, esta abordagem em tratamentos ainda permanece indefinida (ESTRELA *et al.*, 2006).

Vários mecanismos têm sido descritos como mediadores da resistência a fármacos quimioterápicos: a) aqueles que aumentam a taxa de efluxo do fármaco pela célula, reduzindo a interação do fármaco com seu alvo, e os exemplos são a glicoproteína-P e proteínas associadas à resistência a múltiplas drogas (MRPs); b) diminuição da sensibilidade aos fármacos pelo aumento do alvo, superando a dose do fármaco, ou pela mutação do alvo, tornando deste modo o fármaco inefetivo; c) aumento dos mecanismos de reparo de DNA e d) processos de detoxificação que protegem a célula contra o dano. Este último mecanismo pode ser mediado pelo sistema de detoxificação glutathiona/glutathiona-S-transferase (GSH/GST). A conjugação da GSH com o composto, espontaneamente, ou catalisada pela GST, confere ao composto menos toxicidade contra os alvos celulares, tornando-o mais hidrofílico e, desta maneira, facilmente excretável (O'BRIEN & TEW, 1996).

## 2.4 Flavonóides

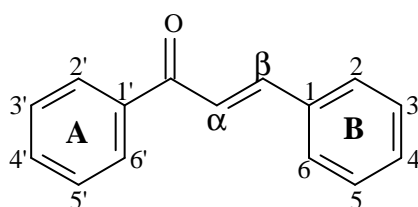
Os flavonóides constituem um grupo de pigmentos vegetais de ampla distribuição na natureza. São biossintetizados a partir da via dos fenilpropanóides e estão presentes em relativa abundância entre os metabólitos secundários. Mais de 4200 flavonóides são conhecidos, os quais são agrupados em diferentes classes de acordo com suas características químicas e biossintéticas (ZUANAZZI, 2000). Sua presença nos vegetais parece estar ligada com funções de defesa (proteção contra raios ultravioleta, ações antifúngicas e antibacterianas) e de atração de polinizadores (SANTOS, 2000).

Além disso, estes compostos possuem importância farmacológica, que resulta de algumas propriedades importantes, atribuídas a representantes da classe, como por exemplo: anticarcinogênicas, antialérgicas, antiulcerogênicas, antivirais, entre outras (ZUANAZZI, 2000). Muitos estudos têm demonstrado que os flavonóides são potentes inibidores de enzimas-chaves, que fazem a transdução de sinais celulares. Eles inibem várias quinases, como a proteína C quinase (PCK), tirosina quinases ou lipídio quinases (AGULLO *et al.*, 1997). Afetam várias vias metabólicas, como ativação de enzimas glicolíticas ou síntese de proteínas (LEE *et al.*, 1994); promovem interrupção do ciclo celular nas fases  $G_0/G_1$  ou  $G_2/M$ , dependendo da sua estrutura e do modelo celular (LEPLEY *et al.*, 1996; KANG & LIANG, 1997; LEPLEY & PELLING, 1997); interagem nos locais de ligação do estrogênio tipo II, regulando o crescimento de células mamárias (SCAMBIA *et al.*, 1993) e induzem a apoptose em diferentes linhagens celulares (KUNTZ *et al.*, 1999; WANG *et al.*, 1999).

## 2.5 Chalconas

As chalconas são consideradas precursoras biossintéticas dos flavonóides. Uma característica marcante neste grupo é a de apresentar pigmentação amarela, que passa a vermelha em meio alcalino. Chalconas e auronas são identificadas em geral nas mesmas plantas, tendo um papel importante em sistemas ecológicos em função das cores que produzem nos vegetais. As cores estão implicadas na polinização como atraentes de insetos e/ou pássaros (ZUANAZZI, 2000). Ocorrem principalmente no pigmento de pétalas. Também são encontradas no cerne, na casca da árvore, nas folhas, nas frutas e nas raízes, numa variedade de árvores e plantas (NI *et al.*, 2004).

Quimicamente, apresentam dois anéis aromáticos ligados por três carbonos, uma carbonila e dois carbonos  $\alpha$ -,  $\beta$ -insaturados (Figura 5). Uma classificação primária das chalconas leva em conta o número de substituintes presentes no núcleo B, que podem ser um, dois ou três. As chalconas de origem vegetal são sempre substituídas e, entre as mais comuns, localizadas no núcleo aromático, estão hidroxilas, metoxilas, O-glicosilas, C-glicosilas e C-alquilas (ZUANAZZI, 2000).



**Figura 5: Núcleo fundamental das chalconas.**

As chalconas são de grande interesse químico e farmacológico por apresentarem diversas atividades biológicas, as quais variam conforme os diferentes



substituintes presentes nas moléculas. Vários trabalhos têm demonstrado atividades biológicas para chalconas isoladas de plantas ou sintetizadas. Dentre as atividades relatadas estão: atividade antibacteriana (DIMMOCK *et al.*, 1999; NIELSEN *et al.*, 2004) e bacteriostática (inclusive contra *Mycobacterium tuberculosis* (PAPPANO *et al.*, 1985)), atividade antiviral (ISHITSUKA *et al.*, 1982; NINOMIYA *et al.*, 1990; DIMMOCK *et al.*, 1999), atividade antifúngica (DIMMOCK *et al.*, 1999; OPLETALOVA & SEDIVY, 1999; LOPEZ *et al.*, 2001; BOECK *et al.*, 2005), atividade antimalárica (LI *et al.*, 1995; DIMMOCK *et al.*, 1999; RAM *et al.*, 2000; DOMINGUEZ *et al.*, 2001; LIU *et al.*, 2001; DOMINGUEZ *et al.*, 2005) e atividade antileishmânia (NIELSEN *et al.*, 1998; DIMMOCK *et al.*, 1999; KAYSER & KIDERLEN, 2001; BOECK *et al.*, 2006). Ainda são descritos efeitos antioxidante (ANTO *et al.*, 1995; DIMMOCK *et al.*, 1999; MUKHERJEE *et al.*, 2001), antiinflamatório (BATT *et al.*, 1993; SOGAWA *et al.*, 1993; HERENCIA *et al.*, 1998; DESHPANDE *et al.*, 1999; DIMMOCK *et al.*, 1999; HERENCIA *et al.*, 1999; HERENCIA *et al.*, 2002; ROJAS *et al.*, 2002; KO *et al.*, 2003; MENG *et al.*, 2004; RANI *et al.*, 2004; WON *et al.*, 2005) e antitumoral (YAMAMOTO *et al.*, 1991; SHIBATA, 1994; ANTO *et al.*, 1995; DIMMOCK *et al.*, 1999; XIA *et al.*, 2000; MUKHERJEE *et al.*, 2001; NAM *et al.*, 2003; RAO *et al.*, 2004; TAKAHASHI *et al.*, 2004; WON *et al.*, 2005).

Todas as chalconas com atividade antioxidante têm, no mínimo, um grupo fenol livre na molécula. A presença de cetonas insaturadas e grupos hidroxila também é considerada essencial para a atividade antioxidante (DIMMOCK *et al.*, 1999). Xanthohumol (HARAGUCHI *et al.*, 1998), a principal chalcona encontrada no lúpulo e na cerveja, mostrou ser um antioxidante mais efetivo na inibição da oxidação de lipoproteína de baixa densidade (LDL) do que o  $\alpha$ -tocoferol (MIRANDA *et al.*, 2000). LEBEAU *et al.* (2000) demonstraram que uma chalcona sintética teve

melhor potência antioxidante que a vitamina E ou a quercetina, num sistema de oxidação da LDL induzido por íons Cu(II).

Várias chalconas têm mostrado inibir estímulos inflamatórios e atenuar a inflamação. Conforme publicado por NI *et al.* (2004), o *Instituto Statens Serum* da Dinamarca divulgou uma patente com chalconas que inibem potencialmente a produção de TNF- $\alpha$  (citocina pró-inflamatória), em células mononucleares de sangue periférico humano, estimuladas por exoantígeno malárico ou por lipopolisacarídeos bacterianos (LPS). Os *Laboratórios Nippon Hypox* publicaram uma patente com uma série de 3,4-dihidrochalconas como agentes antiinflamatórios. Muitos compostos desta série mostraram efeito inibitório sobre a ciclooxigenase (COX), (NI *et al.* 2004). O dano induzido pela inflamação crônica é uma causa bem conhecida da carcinogênese de colo de útero. A COX-2, enzima que converte ácido araquidônico a prostanóides, é conhecida por ter um papel importante na inflamação. Foi relatado que a chalcona isoliquiritigenina suprime o nível de COX-2, em macrófagos murinos RAW264.7, e inibe a proliferação celular, via indução da apoptose, em células de câncer de colo (TAKAHASHI *et al.*, 2004).

Vários trabalhos mostram atividade antitumoral das chalconas em diversos tipos de cânceres. Dentre eles, alguns descrevem atividade antileucêmica. DUCKI *et al.*, (1998) sintetizaram uma série de chalconas substituídas e estudaram a atividade citotóxica contra a linhagem de células de leucemia humana K562 - a chalcona com mais atividade foi a (*E*)-3-(3''-Hidroxi-4''-metoxifenil)-2-metil-1-(3',4',5'-trimetoxifenil)-prop-2-en-1-one com IC<sub>50</sub> de 0,21 nM. KOBORI *et al.* (1999) mostraram que a chalcona floretina induziu, a apoptose, células HL-60 de leucemia humana e células B16-4A5 de melanoma murino. Os autores sugerem que a floretina induziu células B16 a apoptose, pela inibição do transportador de glicose, pela indução da

expressão da proteína Bax e ativação de caspases. Entretanto, a indução à de células HL-60 a apoptose, pela floretina, utilizou vias diferentes. Os autores sugerem que ocorreu através da inibição da atividade da proteína C quinase. Nas células HL-60, a floretina reduziu os níveis de caspase-3, não alterando os níveis da Bcl-2 e não aumentando os níveis da Bax.

Nesse sentido, em busca de novas moléculas anticarcinogênicas, que ofereçam efetividade no tratamento, seletividade contra células tumorais e redução da intensidade e dos efeitos adversos, realizou-se, neste trabalho, um estudo sobre a atividade antileucêmica de uma série de dez chalconas derivadas do 3,4 metilenodioxibenzaldeído.

3.

OBJETIVOS

### **3.1 Objetivo Geral:**

Estudar a sensibilidade da linhagem de células linfoblásticas leucêmicas L1210 aos compostos derivados do 3,4-metilenodioxibenzaldeído.

### **3.2 Objetivos Específicos:**

1. Avaliar o efeito citotóxico dos compostos derivados do 3,4-metilenodioxibenzaldeído (chalconas) sobre linhagem de células linfoblásticas leucêmicas L1210;
2. Identificar a via pela qual as chalconas causam morte celular, se por apoptose ou por necrose;
3. Relacionar as concentrações intracelulares de glutathione e a proteção celular contra os efeitos citotóxicos causados pelas chalconas;
4. Avaliar a influência das chalconas no teor energético das células (concentração de ATP);
5. Analisar o efeito das chalconas sobre células não tumorais VERO;
6. Investigar o efeito sobre o crescimento de células progenitoras grânulo-monocíticas da medula óssea, em decorrência do tratamento com as chalconas.

4.

# MATERIAIS E MÉTODOS

## 4.1 Reagentes

O meio de cultura Eagle modificado por Dulbecco (DMEM) e o soro fetal bovino (SFB) foram adquiridos da Cultilab (São Paulo, Brasil). A penicilina e a estreptomicina foram compradas da Gibco® (Grand Island, NY). O ácido clorídrico, o isopropanol, o dimetil sulfóxido (DMSO) e o tris(hidroximetil)aminometano foram adquiridos da Merck® (Darmstat, Alemanha). O ácido etilenodiaminotetraacético (EDTA) foi adquirido da Reagen (Rio de Janeiro, Brasil). A proteinase K foi adquirida da Invitrogen® (Alemanha). O brometo de dimetiazol difeniltetrazólio (MTT), o ácido N-[2-Hidroxietil]piperazina-N'-[2-etanosulfônico] (HEPES), a albumina, o meio de cultura Dulbecco modificado por Iscove (IMDM), a agarose, a RNase, a glutationa redutase (GR), o fosfato de nicotinamida adenina dinucleotídeo (NADPH), o ácido 5,5'-ditio-bis-2-nitrobenzóico (DTNB), e outros reagentes utilizados nos experimentos foram adquiridos da Sigma® (St. Louis, MO, USA). O Kit luciferin-luciferase foi adquirido da Biorbit (Tuku, Finland).

## 4.2 Síntese das chalconas

A síntese das chalconas derivadas do 3,4-metilenodioxibenzaldeído foi realizada no Departamento de Química da Universidade Federal de Santa Catarina (UFSC), pelo grupo de pesquisa do Prof. Rosendo Augusto Yunes.

#### **4.2.1 Procedimento geral para a preparação das chalconas derivadas do 3,4 metilenodioxibenzaldeído**

Em um balão de 100 mL e uma boca, colocou-se o 3,4-metilenodioxibenzaldeído (1,50 g; 10 mM), a acetofenona (10 mM) e o metanol (30 mL). Dissolveram-se os reagentes sob agitação magnética e, em seguida, adicionou-se o KOH 50% v/v (10 mL). Deixou-se a reação sob agitação magnética, à temperatura ambiente, por 24h. Após este período, adicionou-se água destilada à reação e acidificou-se a mesma, com ácido clorídrico 10%, o que provocou a precipitação dos compostos. Filtrou-se em funil de Büchner, verificou-se a pureza por cromatografia em camada delgada (CCD) e, quando necessário, as chalconas foram recristalizadas em hexano e diclorometano. Para todos os compostos, foram realizadas análises de RMN de  $^1\text{H}$  e de  $^{13}\text{C}$ , espectroscopia no IV e leitura do ponto de fusão.

#### **4.3 Cultura de células**

Foram utilizadas linhagens de células leucêmicas linfoblásticas de origem murina (L1210) e células não tumorais, fibroblastos de rim de macaco (VERO). As células L1210 foram obtidas da American Type Culture Cell (ATCC) e as células VERO da Associação Técnico-Científica Paul Ehrlich (APABCAM, Rio de Janeiro, Brasil). As células foram mantidas em garrafas plásticas de cultura, contendo meio DMEM, suplementado com 10% de soro fetal bovino, 100 U/mL de penicilina, 100  $\mu\text{g/mL}$  de estreptomicina, 10 mM HEPES, pH 7.4, em estufa umidificada, a 37°C e com 5%  $\text{CO}_2$ . Antes da realização de todos os experimentos, o número de células



viáveis foi avaliado pelo método de Azul de Trypan (FRESHNEY, 1987), e a contagem realizada em câmara de Neubauer.

#### **4.3.1 Tratamento das células**

As chalconas sintéticas derivadas do 3,4-metilenodioxibenzaldeído foram dissolvidas em uma solução de DMSO 10 mM e armazenadas, à temperatura de 4°C a 8°C. Estas soluções-estoque foram diluídas em meio de cultura para atingir as concentrações de 10 a 200 µM utilizadas nos experimentos. As células foram incubadas em placas de 24 ou 96 poços, tratadas com os compostos e mantidas em estufa úmida, a 37°C, com 5% de CO<sub>2</sub>, por um período de 6h a 48h, conforme o procedimento experimental. As células VERO, que crescem aderidas, foram incubadas em placas de 96 poços e mantidas a 37°C em estufa com 5% de CO<sub>2</sub>, por um período de 3h, antes do tratamento com os compostos.

Foram utilizados controles de células sem tratamento e com tratamento de DMSO diluído em meio de cultura, na mesma proporção utilizada para dissolver os compostos.

#### **4.4 Ensaio de viabilidade celular (teste do MTT)**

A viabilidade celular foi analisada pelo método do MTT (brometo de dimetiazol difeniltetrazólio), (VAN DE LOOSDRECHT *et al.*, 1991). O MTT é um sal de tetrazólio de cor amarela, que é reduzido a formazan de cor azulada pela atividade

oxidativa das células, funcionando, portanto, como um indicador da função mitocondrial e, por conseguinte, da viabilidade celular. Brevemente,  $3 \times 10^5$  células L1210 e  $7 \times 10^4$  células VERO foram incubadas em triplicata com os compostos, em placas de 96 poços. Depois de decorrido o tempo de incubação, foi retirado e acrescentado um novo meio de cultura e, então, o MTT ( $0,25 \mu\text{g}/\mu\text{L}$ ) foi adicionado, seguido de incubação por 3h, a  $37^\circ\text{C}$ . O meio de cultura foi retirado, o precipitado formazan foi dissolvido com uma solução ácida de isopropanol (isopropanol com HCL 0,04 N) e a absorbância foi medida a 540 nm, com o uso de um leitor de microplacas (Organon Teknika, Belgium). A densidade óptica obtida do grupo controle, ou seja, das células sem tratamento, foi considerada como 100% de células viáveis.

#### **4.5 Análise de apoptose pelo método de fragmentação nuclear**

O isolamento de fragmentos apoptóticos do DNA foi realizado seguindo o método de HAN (1997). As células,  $1 \times 10^6$ , foram incubadas com as chalconas sintéticas, em placas de 24 poços, na concentração de  $100 \mu\text{M}$  e mantidas por 24 horas, a  $37^\circ\text{C}$ , com 5% de  $\text{CO}_2$ , em estufa umidificada. As células foram lavadas duas vezes com PBS gelado e após foram lisadas com tampão de lise (10 mM EDTA, 50 mM Tris-HCl pH 8.0, 0.25% NP-40, 0.5 mg/mL proteinase K) a  $50^\circ\text{C}$ , por 2h. O DNA foi precipitado com 2,5 vol de etanol-NaCl overnight, a  $-25^\circ\text{C}$ . Após foi centrifugado a 12.000g, por 30 minutos. O *pellet* foi lavado duas vezes com etanol 70%, gelado, secado à temperatura ambiente, dissolvido em tampão (10 mM Tris-

HCl pH 8.0, 0,1 mM EDTA), contendo 0,6 g/mL de RNase A e incubado a 37°C, por 1h.

A concentração do DNA extraído de cada amostra foi determinada espectrofotometricamente (SAMBROOK, J. & RUSSELL, D. W., 2001). As amostras foram diluídas a 1:100 em água destilada, a absorbância foi medida em 260 nm e a concentração de DNA calculada pela equação: Concentração DNA (mg/mL) =  $(\text{Abs}/\epsilon) \times \text{diluição}$ . O coeficiente de extinção ( $\epsilon$ ) foi considerado igual a 20. As bases nitrogenadas da dupla fita de DNA apresentam uma absorção máxima no comprimento de onda de 260 nm. Neste comprimento de onda, o coeficiente de extinção ( $\epsilon_{0,1\%;1\text{cm}}$ ) igual a 20 indica que o DNA, em uma concentração de 1 mg/mL, terá uma absorbância ( $A_{260\text{nm}}$ ) igual a 20. A relação entre a concentração do DNA e a absorbância ( $A_{260\text{nm}}$ ) é linear até o valor de 2,0.

A fragmentação do DNA foi analisada por eletroforese em gel de agarose a 1%, corado com 1  $\mu\text{L}$  de brometo de etídio (1g/100mL). A corrida foi realizada a 200V, por 10 minutos, em tampão TAE (Tris - ácido acético – EDTA). Foram aplicados 2  $\mu\text{g}$  de DNA de cada amostra. Os géis foram fotografados sob iluminação ultravioleta de 320nm (Hoefler-MacroVue UV-20), utilizando-se um sistema de fotodocumentação de géis (Doc-Print®).

#### **4.6 Análise de apoptose e viabilidade celular pelo método de fluorescência com laranja de acridina e brometo de etídio**

Inicialmente,  $3 \times 10^5$  células foram tratadas com as chalconas estudadas e mantidas por 24h, a 37°C, com 5% de  $\text{CO}_2$ , em estufa umidificada. Após o tempo de incubação, as células foram concentradas por centrifugação, o meio de cultura com

as chalconas foi descartado, o *pellet* celular resuspenso com PBS contendo laranja de acridina e brometo de etídio, nas concentrações de 10 e 5 µg/mL, respectivamente, seguido de incubação por um minuto, à temperatura ambiente. As células, então, foram observadas em microscópio de fluorescência entre lâmina e lamínula no aumento de 40X para contagem. Para fotografar as células foi utilizado o aumento de 100X. Células não-apoptóticas e apoptóticas foram contadas em quatro campos, até um total de 100 células. O resultado foi obtido em percentual.

#### **4.7 Determinação das curvas de tempo-resposta e concentração-resposta**

Para determinação da curva de tempo-resposta,  $3 \times 10^5$  células foram incubadas com as chalconas na concentração de 100 µM, em estufa umidificada a 37°C, com 5% de CO<sub>2</sub>, por 6h, 12h, 18h e 24h. Após cada período de incubação, foi realizada a análise da viabilidade celular pelo método do MTT.

Para determinação da curva de concentração-resposta,  $3 \times 10^5$  células foram incubadas com as chalconas sintéticas em concentrações crescentes (0, 10, 25, 50, 75, 100, 150 e 200 µM), em estufa umidificada, a 37°C, com 5% de CO<sub>2</sub>, seguido pelo método do MTT, após 24h. Além disso, após 48 horas, outra curva de concentração resposta foi realizada com incubação de  $1 \times 10^5$  células, com os compostos em concentrações crescentes (0, 10, 20, 30 e 50 µM), em estufa umidificada, a 37°C, com 5% CO<sub>2</sub>, seguido do ensaio do MTT.

A IC<sub>50</sub>, concentração que inibe 50% do crescimento celular, foi calculada em 24 e 48 horas, através da equação de Hill (curva Sigmoidal de concentração-resposta).

#### **4.8 Determinação da concentração de glutathiona total**

A glutathiona total (GSH + GSS) foi quantificada empregando-se o método da glutathiona redutase, proposto por TIETZE (1969). Nesse método, os grupamentos sulfidrilas da GSH interagem com o DTNB, originando a GSTNB (forma oxidada de GSH), que, na presença da glutathiona redutase e de NADPH, é reduzida novamente à GSH. Concomitantemente à formação de GSTNB e GSH, há liberação de ácido 5-tio-2-nitrobenzóico (TNB), um composto de coloração amarela. Sendo assim, a intensidade de cor produzida pelo TNB é diretamente proporcional à atividade da glutathiona redutase sobre a GSTNB e GSH intracelular. Brevemente,  $1 \times 10^6$  células foram tratadas com compostos na concentração de 100  $\mu\text{M}$  e incubadas durante 24h. Em seguida, foram lavadas três vezes com PBS, resuspensas em 100  $\mu\text{L}$  de EDTA 1 mM e submetidas a ultra-som por 10 segundos. Vinte  $\mu\text{L}$  de cada homogenato foram transferidos para placas de 96 poços, seguido da adição de 180  $\mu\text{L}$  da solução de reação (DTNB 75  $\mu\text{M}$ ; NADPH 120  $\mu\text{M}$ , glutathiona redutase 1 U/mL e EDTA 10 mM em tampão fosfato 100 mM, pH 7.4). A absorbância foi medida após 15 minutos a 412 nm, com um leitor de microplacas (Organon Teknika). Os valores foram expressos em percentual em relação ao controle.

#### **4.9 Determinação da concentração de ATP (Luciferin – luciferase)**

O método luciferin/luciferase é muito utilizado na determinação da concentração de ATP em amostras biológicas. Foi inicialmente desenvolvido por STREHLER & TOTTER (1954), e adaptado por FROMME *et al.* (1987). O primeiro

passo da reação consiste na ativação da enzima luciferase pela ligação no ATP, na presença de  $MgCl_2$ . O ATP é hidrolisado a AMP que permanece ligado à luciferin e ao pirofosfato (PPi). Este complexo reage subsequentemente com  $O_2$ , resultando na emissão de um feixe de luz ( $h\nu$ ), na liberação de AMP,  $CO_2$  e oxiluciferin (DELUCA, 1976). A quantidade de luz emitida é naturalmente proporcional à quantidade inicial de ATP existente no meio de reação, o qual foi medido da seguinte forma: Em uma cubeta de plástico adicionou-se o tampão luciferin/luciferase. Em seguida adicionou-se, ao tampão, a solução contendo luciferin/luciferase, misturou-se cuidadosamente. A cubeta foi colocada no luminômetro para a medida do sinal de fundo, o qual foi medido através de um registrador previamente calibrado. Tendo o sinal de fundo registrado, a amostra foi adicionada e então foi realizada uma segunda leitura, na qual o sinal da amostra foi adicionado ao sinal do fundo e registrado. A terceira adição foi da solução padrão de ATP, com concentração conhecida, que foi registrada e somada às leituras anteriores. A concentração de ATP foi calculada com a utilização de um programa de computador LUMI (FROMME *et al.*, 1987).

#### **4.10 Ensaio de células progenitoras grânulo-monocíticas (Ensaio GM-CFC)**

O ensaio GM-CFC foi realizado no Laboratório de Citologia Clínica do Departamento de Análises Clínicas da Universidade Federal de Santa Catarina (UFSC) e coordenado pela Prof.<sup>a</sup> Cidônia de Lourdes Vituri. O procedimento foi realizado de acordo com o método descrito por TESTA & MOLINEUS (1993), modificado e validado pela European Centre for the Validation of Alternative Methods (ECVAM), em 1995 (BALLS *et al.*, 1995). A cultura em meio semi-sólido foi

constituída de duas camadas distintas: camada base e camada de células (Tabela 1).

**Tabela 1.** Constituintes das camadas de cultura em meio semi-sólido/placa.

	Camada Base (%)	Camada de Células (%)
IMDM com 1 % albumina bovina	40%	20%
SFB	20%	30%
rmGM-CSF (100ng/mL)	-	10%
Suspensão celular ( $10^6$ /mL)	-	10%
Ágar 1,25%	40%	30%

IMDM: Meio Dulbecco modificado por Iscove

SFB: Soro fetal bovino

rmGM-CSF: Fator estimulador de colônias de macrófagos e granulócitos (rm – recombinante)

A camada base foi preparada contendo 40% de meio IMDM duas vezes concentrado, 20% de soro fetal bovino e 40% de ágar, a 1,25%. Com auxílio de uma pipeta tipo Pasteur, a mistura foi rapidamente homogeneizada e distribuída em placas de Petri de 35 mm de diâmetro, em volume de 1 mL, conferindo uma concentração final de 0,5% de ágar. As placas foram mantidas a 4°C, por 10 minutos, para consolidar o gel.

A camada de células foi preparada contendo IMDM, acrescido de 1% de albumina bovina duas vezes concentrada, 30% de soro fetal bovino, 10% de rmGM-CSF (fator estimulante de colônia de granulócito-macrófago), em concentração de 100 ng/mL, e 10% de uma solução contendo  $10^6$  células/mL de células hematopoiéticas nucleadas, retiradas da medula óssea do fêmur de camundongos. Acrescentou-se ágar a 1,25% na camada de células, para se chegar à concentração final de 0,38%. Após a mistura ser rapidamente homogeneizada, alíquotas de  $10^5$  células/placa foram semeadas em triplicata, nas placas de Petri, sobre a camada base previamente consolidada. As placas foram mantidas a 4°C, por 5 minutos, para consolidar o gel e incubadas a 36,8°C em atmosfera contendo 5% de CO<sub>2</sub>, durante sete dias. Após fixação em vapor de formol 10%, *overnight*, o número de colônias foi

avaliado através de contagem em microscópio invertido. Para identificação das células presentes nas colônias, o meio semi-sólido foi removido das placas de Petri em banho de água gelada e transferido para lâminas de microscopia, as quais foram secas à temperatura ambiente. Posteriormente foram fixadas, sob imersão, em corante May-Grünwald por três minutos e lavadas em água corrente. As lâminas foram, então, imersas em corante Giemsa diluído 1:20 em tampão de Sorensen pH 6,8, por 15 minutos. Depois de lavadas em água corrente, as lâminas foram secas à temperatura ambiente e as colônias observadas sob microscopia óptica convencional.

#### **4.11 Análise estatística**

Os resultados foram expressos como a média  $\pm$  erro-padrão da média (EPM). Cada experimento foi repetido pelo menos três vezes. Para a análise estatística, foi utilizada a análise de variância de uma via (ANOVA), seguida do teste *t* de Bonferroni. Para comparação da viabilidade celular entre as linhagens L1210 e VERO foi utilizado o teste *t Student*. Um valor de  $P < 0,05$  foi considerado estatisticamente significativo.



#### **4.12 Desenho experimental**

Foi estudado o efeito citotóxico de todos compostos, por meio do ensaio de viabilidade celular (Teste do MTT). Os compostos que apresentaram citotoxicidade estatisticamente significativa foram avaliados quanto à forma de morte celular, pela técnica de fragmentação nuclear e pela técnica de fluorescência com laranja de acridina e brometo de etídio. Para os compostos que induziram à morte celular por apoptose, foi avaliada a possibilidade da indução de depleção de glutatona e de ATP intracelulares. A toxicidade em células não tumorais (linhagem VERO) e a inibição do crescimento de células progenitoras grânulo-monocíticas da medula óssea também foram verificadas (Figura 6).

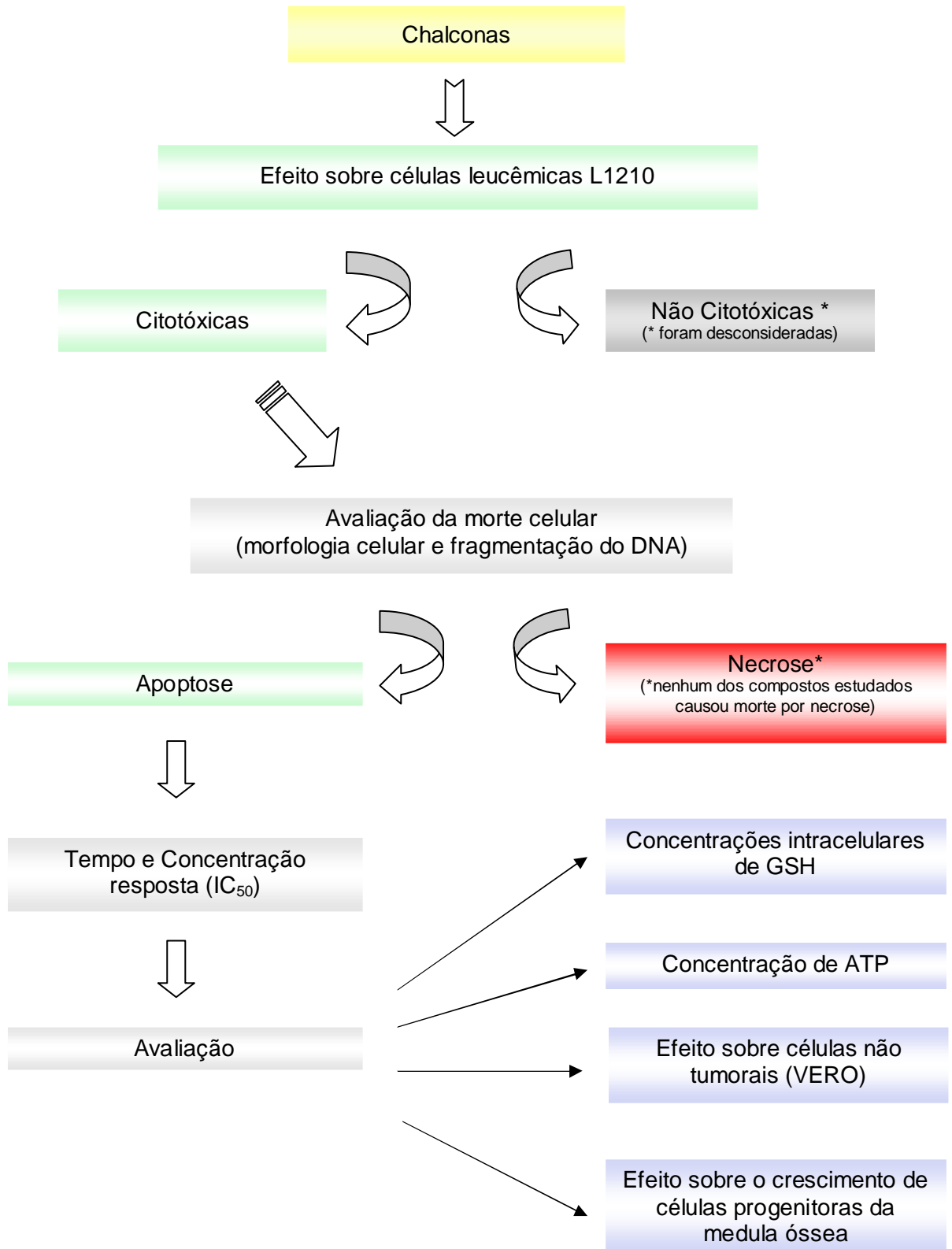


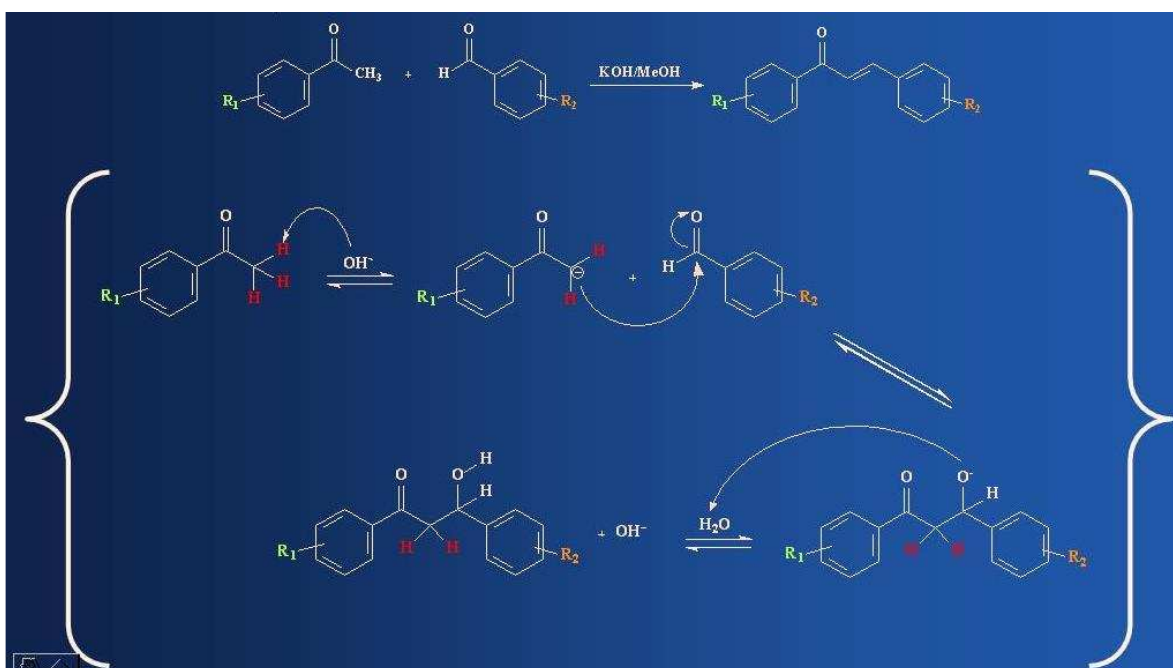
Figura 6: Desenho Experimental

# 5.

## RESULTADOS E DISCUSSÃO

## 5.1 Síntese

O mecanismo de ação na formação das chalconas foi o da condensação aldólica, seguida de desidratação básica (Figuras 7 e 8). Primeiramente, ocorreu a etapa de deprotonação, em que a base removeu um hidrogênio alfa ácido da molécula de cetona, para formar o íon enolato, estabilizado por ressonância. Através de ataque nucleofílico, o íon enolato atacou uma molécula de aldeído (na posição alfa ao grupo carbonila eletrofílico), formando um íon alcóxido (intermediário tetraédrico). A protonação do íon alcóxido gerou o produto de condensação e regenerou o catalisador básico (Figura 7).

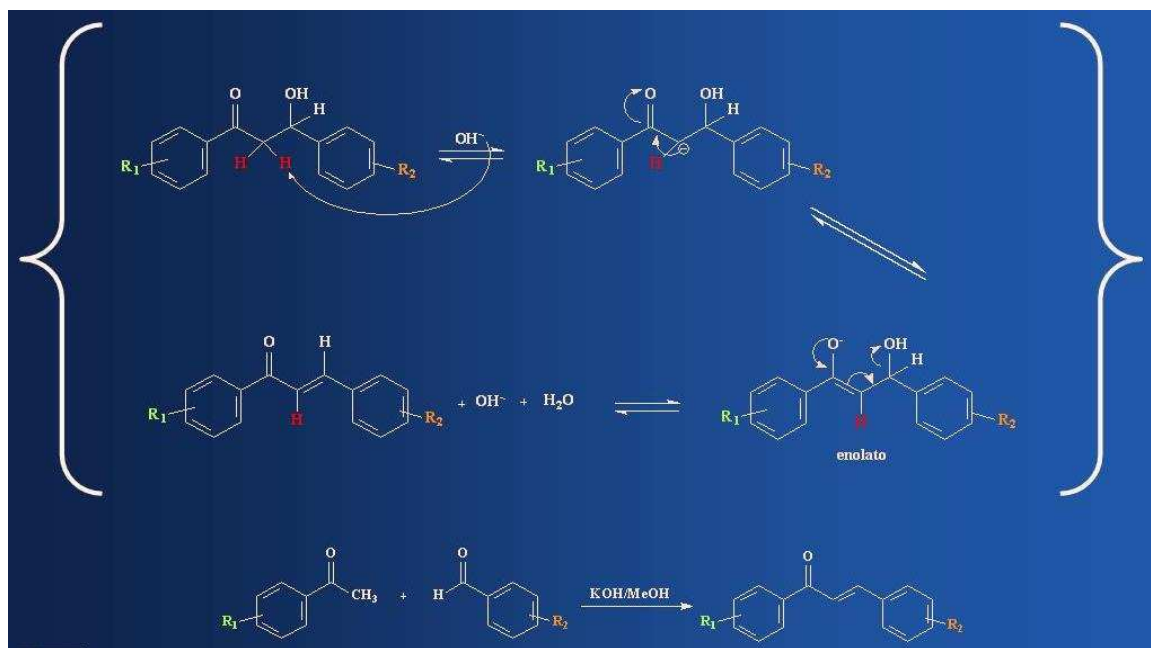


**Figura 7: Etapas de deprotonação e ataque nucleofílico para formação do produto de condensação.**

Fonte: CHIARADIA, 2006.

A formação da enona conjugada ocorreu por desidratação, que pode ser catalisada por base ou por ácido. Neste caso, em condições básicas, um hidrogênio

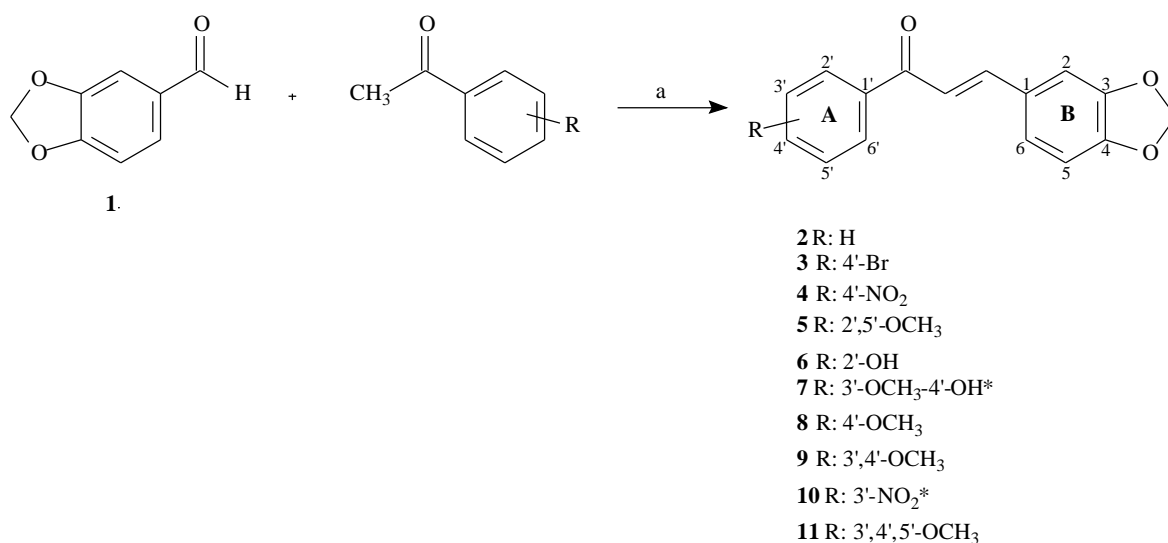
ácido foi abstraído da posição alfa para resultar em um íon enolato, que eliminou o grupo de saída  $-\text{OH}$ , formando a chalcona (Figura 8). Em condições ácidas, seria formado o enol, o grupo  $-\text{OH}$  seria protonado e a água, eliminada.



**Figura 8: Etapa de desidratação para obtenção da chalcona.**

Fonte: CHIARADIA, 2006.

Foram sintetizadas dez chalconas a partir da condensação aldólica entre o 3,4-metilenodioxibenzaldeído (**1**) e diferentes acetofenonas, utilizando hidróxido de potássio como base e metanol como solvente, à temperatura ambiente por 24h, como apresentado na figura 9. Oito compostos já foram descritos na literatura (**2, 3, 4, 5, 6, 8, 9, 11**), (ARIYAN & SUSCHITZKY, 1961; SCHWARTZ *et al.*, 1977; WATTANASIN & MURPHY, 1980; LI *et al.*, 2002; PATHAK *et al.*, 2003; POTTER & BUTLER, 2003) e dois são inéditos (**7, 10**).



**Figura 9: Síntese de chalconas derivadas do 3,4-metilenodioxibenzaldeído (1).**

a) KOH 50% v/v, metanol, t.a., 24 h (\*novos compostos).

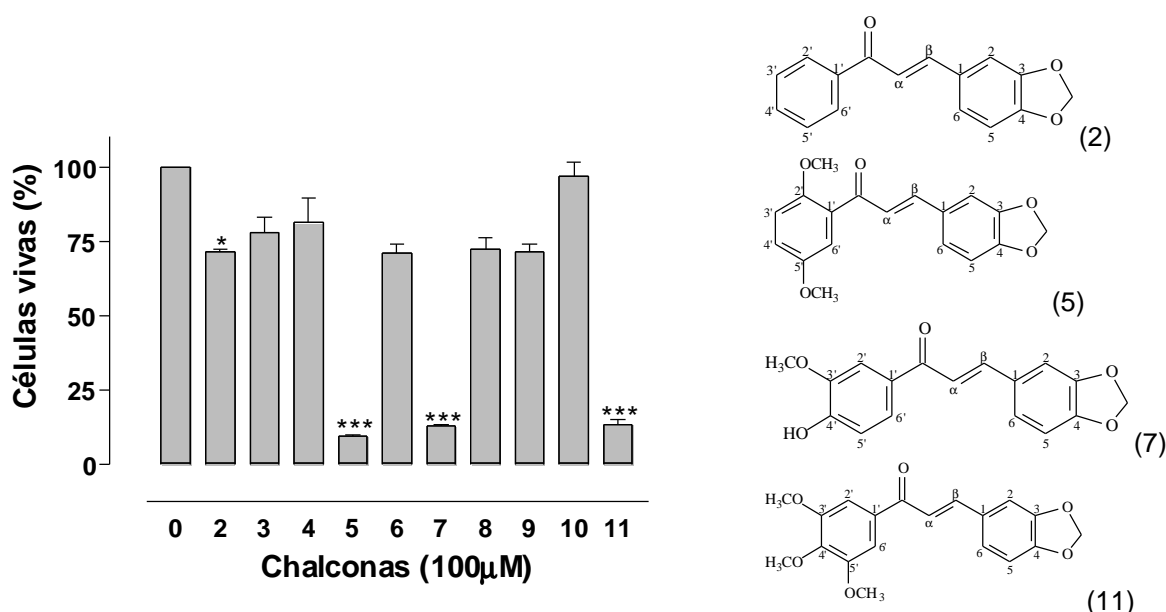
## 5.2 Determinação da atividade citotóxica através da viabilidade celular

A síntese de chalconas para atividade citotóxica parece ser um campo pouco explorado, ainda. Os mecanismos de toxicidade contra várias linhagens celulares tumorais humanas ainda é obscuro. Neste sentido, a identificação de novos análogos de chalconas pode ser importante para continuar o desenvolvimento desta classe de compostos como agentes antitumorais.

Foi realizado um estudo com todas as chalconas sintetizadas (Figura 9), nas concentrações 1, 10 e 100  $\mu\text{M}$ , para investigar a sensibilidade das células L1210. Verificou-se que as concentrações de 1 e 10  $\mu\text{M}$  não apresentaram efeito sobre a viabilidade celular (dados não mostrados). Portanto, a concentração de 100  $\mu\text{M}$  foi escolhida para realizar uma triagem das chalconas que viessem apresentar atividade citotóxica.

Os resultados de viabilidade celular dos controles, ou seja, células submetidas ao tratamento de DMSO nas mesmas concentrações utilizadas para dissolver os compostos não mostraram diferença significativa comparando-se com os resultados obtidos com as células sem tratamento (dados não mostrados). Por conseguinte, em todos os gráficos estão representados somente como controles.

Os compostos que apresentaram efeito citotóxico pronunciado foram os de número **5**, **7** e **11**, diminuindo a viabilidade celular em  $90,5 \pm 1,2\%$ ,  $87,1 \pm 1,1\%$  e  $86,3 \pm 2,2\%$ , respectivamente, pelo teste do MTT. A chalcona **2** reduziu a viabilidade celular somente em  $28,6 \pm 2,7\%$ , quando comparada ao controle. Entretanto, a morte celular foi estatisticamente significativa. As chalconas **3**, **4**, **6**, **8** e **9** não mostraram efeito citotóxico significativo e a chalcona **10** não apresentou citotoxicidade (Figura 10).



**Figura 10: Efeito citotóxico das chalconas sobre células L1210.** As células foram incubadas com as chalconas, por 24h. A viabilidade celular foi avaliada pelo método do MTT. A densidade óptica do grupo controle (0, células sem tratamento) foi considerada como 100% de viabilidade celular. Cada ponto representa a média  $\pm$  E.P.M. Um valor de \* $P < 0,05$  e \*\*\* $P < 0,001$  foi considerado estatisticamente significativo quando comparado com o controle, usando ANOVA seguido de teste *t* de Bonferroni. Estruturas químicas das chalconas: (2), (5), (7) e (11).

Os grupos Br e NO<sub>2</sub> diminuem a densidade eletrônica no anel A, diminuindo a citotoxicidade. Estes grupos estão presentes nas chalconas **3**, **4** e **10**. NAM *et al.*

(2003) sintetizaram e testaram a toxicidade de uma série 2',5'-dihidroxicalconas contra células tumorais e células endoteliais venosas umbilicais humanas (HUVEC), mostrando que as chalconas com substituintes, que retiram elétrons do anel **B**, apresentam potente atividade citotóxica em várias linhagens tumorais, enquanto que os compostos com grupos que doam elétrons para o anel foram menos potentes, de uma forma geral. Já neste trabalho está sendo mostrado que modificações que provocam o aumento da densidade eletrônica no anel **A**, aparentemente, resultam em maior citotoxicidade dos compostos. Observamos que os grupos metóxi que aumentam a densidade eletrônica no anel A, e estão presentes nos compostos **5**, **7** e **11**, parecem aumentar sua citotoxicidade. Entretanto, a chalcona **9**, que possui dois grupos metóxi ligados ao anel A, não apresentou atividade citotóxica significativa. As chalconas **5** e **9** possuem dois grupos metóxi ligados ao anel A. No entanto, na chalcona **5** os grupos metóxi estão em posição *para* e na chalcona **9** em posição *orto* entre si. A chalcona **7** possui um grupo metóxi e um grupo hidroxila ligado ao anel A, em posição *orto* entre si, e a chalcona **11** possui três grupos metóxi nas posições 3', 4' e 5'. O resultado obtido com a chalcona **7**, vem de acordo com as observações de DIMMOCK *et al.* (1998), em que a introdução de grupos hidroxila na estrutura das chalconas aumenta o efeito citotóxico. LEBLANC *et al.* (2005) compararam o efeito da substituição no anel A de estruturas relacionadas com chalconas e mostraram que os compostos contendo três grupos metóxi, geralmente, são mais ativos contra as linhagens celulares L1210 e B16, quando comparados com os compostos com dois grupos metóxi. Comparando com nossos resultados, com exceção da chalcona **9**, os compostos com dois ou três grupos metóxi, ligados ao anel A (chalconas **5** e **11**), apresentaram atividade citotóxica semelhante.



NAKATANI *et al.* (2005) mostraram que as toxicidades da uvaretina e da diuvaretina (Dihidroxichalconas C-benziladas isoladas da raiz da planta *Uvaria acuminata*) foram mais intensas do que a da isovauretina. Os autores sugerem que a substituição 5' pelo grupo 2-hidroxibenzil aumentou a citotoxicidade. Nossos resultados sugerem que a substituição na mesma posição, pelo grupo metóxi, aumentou a citotoxicidade das chalconas. O grupo metóxi na posição 5' do anel A, presente na chalcona **5**, e na posição 3', nas chalconas **7** e **11**, estão estericamente na mesma posição.

A chalcona **11**, chamada por SALE *et al.* (2006) DMU-135, foi testada por estes pesquisadores, tendo sido adicionada na dieta de camundongos (0,2%). Nestas condições, o composto não apresentou efeitos sistêmicos. Ao contrário, reduziu a multiplicidade do adenoma gastrointestinal em  $46 \pm 18,3\%$ , quando comparado com os controles.

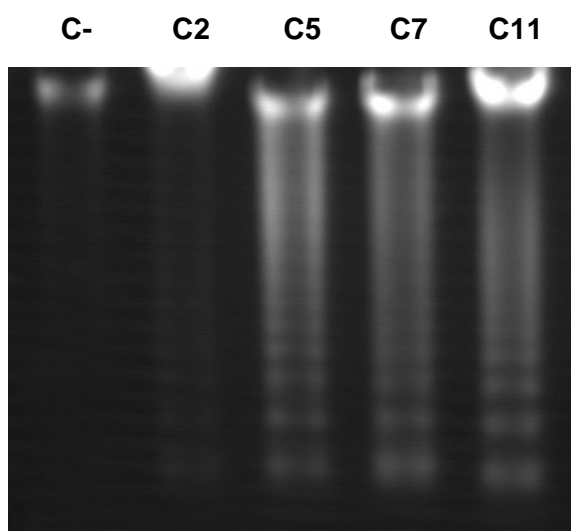
Vários mecanismos de ação foram propostos para a atividade antitumoral das chalconas, como inibição da angiogênese (NAM *et al.*, 2003), indução do desacoplamento mitocondrial, colapso da membrana mitocondrial (SABZEVARI *et al.*, 2004) e interrupção do ciclo celular (DUCKI *et al.*, 1998; LAWRENCE *et al.*, 2000; FU *et al.*, 2004; WON *et al.*, 2005). As chalconas também apresentaram atividade antimetabólica, ligando-se no sítio de ligação da colchicina à tubulina, provocando a inibição da polimerização da tubulina e interrupção da mitose (EDWARDS *et al.*, 1990; DUCKI *et al.*, 1998). A associação de chalconas metoxiladas com atividade antimetabólica também foi descrita na literatura, em parte pela observação de que inibidores conhecidos da polimerização da tubulina, como a combretastatina A e a colchicina, apresentam vários grupos metóxi na estrutura (EDWARDS *et al.*, 1990; DUCKI *et al.*, 1998; LAWRENCE *et al.*, 2000; LEBLANC *et al.*, 2005).

Com base na atividade citotóxica, escolhemos as chalconas **5**, **7** e **11** para dar continuidade à pesquisa. A chalcona **2** também foi usada para comparação, já que possui a estrutura mais simples, sem nenhum substituinte ligado ao anel A.

### **5.3 Análise da apoptose por fragmentação do DNA**

O desenvolvimento de novos compostos, para o tratamento de leucemias e tumores malignos, é baseado na capacidade destes compostos de inibirem a proliferação celular e induzirem à apoptose (HERR & DEBATIN, 2001). Na apoptose, em contraste com a necrose, ocorre a ativação de uma cascata de eventos, os quais resultam na destruição da célula, sem causar reação inflamatória (FRIEDLANDER, 2003). Algumas mudanças celulares que ocorrem durante a apoptose são a condensação da cromatina, a fragmentação nuclear (KERR *et al.*, 1972), a clivagem do DNA internucleossomal e a externalização da fosfatidilserina (MARTIN & GREEN, 1995). A degradação do DNA durante a apoptose é regulada e inicia com a formação de fragmentos maiores, de 300 a 50 Kilobases (Kb) (OBERHAMMER *et al.*, 1993; WALKER *et al.*, 1999). Quando a endonuclease ataca as regiões de ligação entre as duas fitas de DNA, ocorre a clivagem internucleossomal, que resulta na formação de fragmentos de 180 a 200 pares de base e seus múltiplos. Na eletroforese em gel de agarose, corada com brometo de etídio, estes fragmentos apresentam um padrão de bandas característico quando visualizados em luz UV. Em contraste, os eventos de clivagem do DNA na necrose são randômicos e mostram degradação das histonas, produzindo uma mancha difusa na eletroforese de DNA. Os fragmentos de DNA necrótico são maiores, e significativamente em menor número do que os fragmentos do DNA apoptótico (ALLEN *et al.*, 1997). Através da eletroforese em gel de agarose verificamos que as chalconas **5**, **7** e **11** causaram

fragmentação do DNA nas células leucêmicas L1210, com padrão de bandas característico de apoptose (Figura 11). A chalcona **2** também causa morte por apoptose. Entretanto, na foto, a banda **C2** ficou pouco visível, provavelmente por conter pouco DNA fragmentado, em virtude de causar apenas  $28,6 \pm 2,7\%$  de morte. Para análise da apoptose em gel de agarose, foi utilizada a concentração de 100  $\mu\text{M}$ , por ser a concentração que causa maior morte celular e, conseqüentemente, maior fragmentação do DNA.

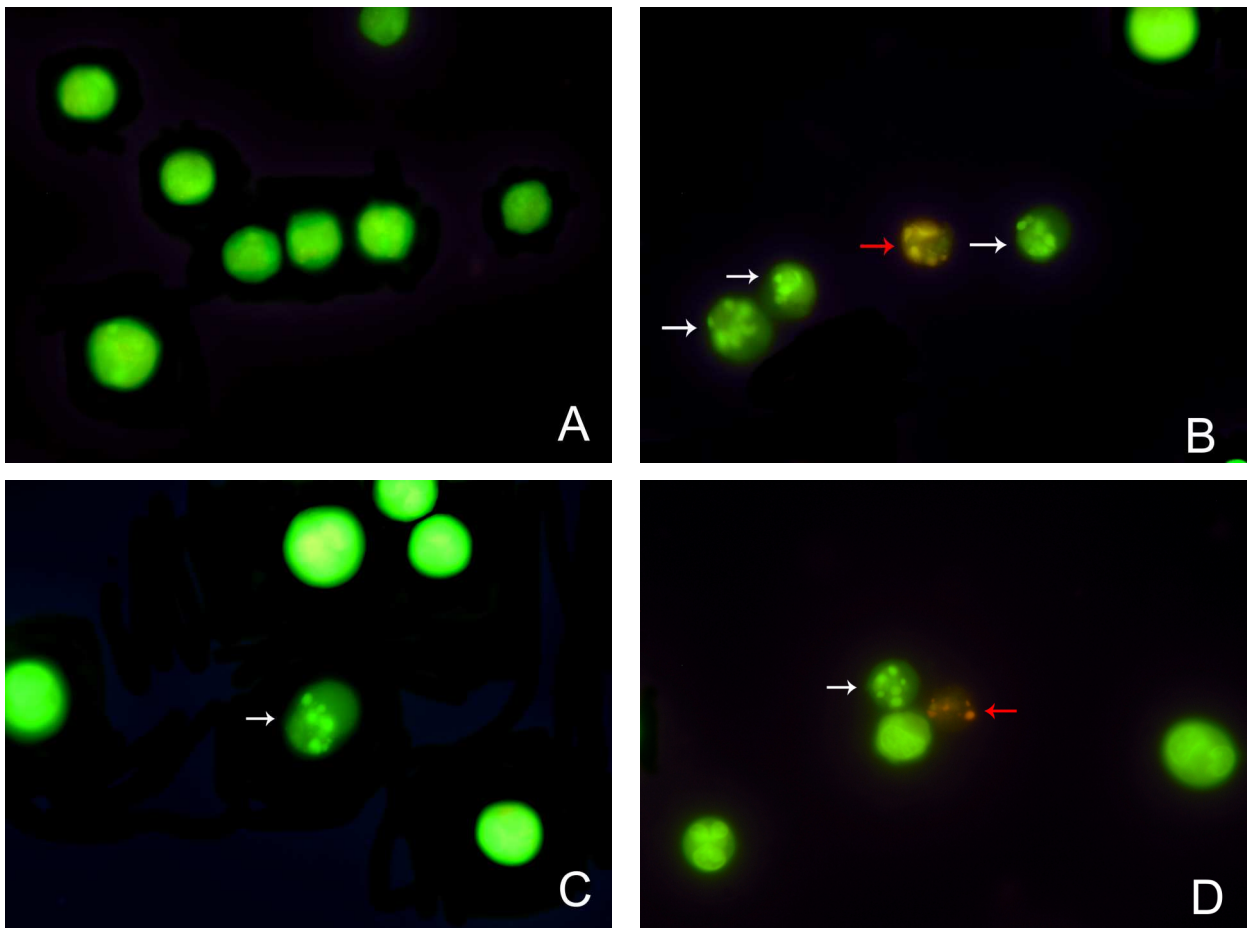


**Figura 11: Fragmentação do DNA induzida por chalconas em células L1210.** As células foram incubadas com os compostos na concentração de 100 $\mu\text{M}$ , por 24h (C - controle negativo, células sem tratamento; **C2**, **C5**, **C7** e **C11** chalconas 2, 5, 7 e 11, respectivamente). Os extratos nucleares foram obtidos e a fragmentação do DNA foi analisada por eletroforese em gel de agarose 1,0%, corado pelo brometo de etídio, como descrito nos materiais e métodos.

#### 5.4 Análise da apoptose e viabilidade celular por fluorescência

A apoptose também foi analisada pelo método de fluorescência com laranja de acridina e brometo de etídio. O método consiste na ligação do laranja de acridina ao DNA e RNA, que cora o núcleo, mesmo quando a membrana encontra-se intacta ou danificada, emitindo uma coloração verde-fluorescente. O brometo de etídio liga-se ao DNA, corando o núcleo somente se a membrana estiver danificada, emitindo uma coloração vermelha-fluorescente que predomina sobre o laranja de acridina.

Células normais apresentam uma coloração verde-brilhante uniforme do núcleo e coloração laranja do citoplasma (Figura 12 – Painel A), (LEITE *et al.*, 1999). As células L1210 são linfoblastos murinos e apresentam pouca quantidade de citoplasma. Nas células apoptóticas precoces, o núcleo é corado em verde. Entretanto, a condensação da cromatina é visível pela forma de manchas verde-brilhantes (Figura 12 – setas brancas painéis B, C e D). Células apoptóticas tardias apresentam a cromatina condensada no núcleo, com coloração laranja (Figura 12 – setas vermelhas painéis B e D). Células necróticas apresentam o núcleo com uma coloração laranja-brilhante uniforme (LEITE *et al.*, 1999).



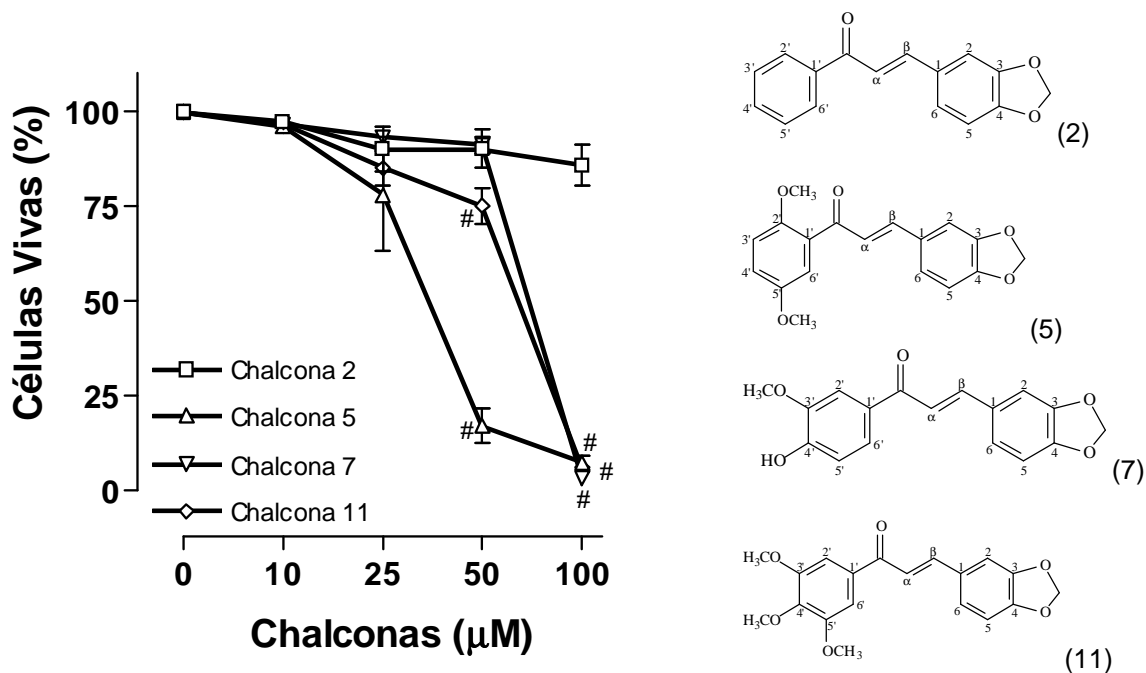
**Figura 12: Células normais e apoptóticas coradas com laranja de acridina e brometo de etídio.** Células L1210 foram incubadas com os compostos (50  $\mu$ M) por 24h. Foram observadas ao microscópio de fluorescência (aumento 1000X): A - controle (células sem tratamento); B - chalcona **5**; C - chalcona **7**; D - chalcona **11**. Obs.: as setas brancas nos painéis B, C e D indicam as células apoptóticas precoces; as setas vermelhas nos painéis B e D indicam as células apoptóticas tardias.

Na análise da apoptose por fluorescência foi utilizada a concentração de 50  $\mu\text{M}$ , pois a maior concentração (100  $\mu\text{M}$ ) causa morte celular muito acentuada, dificultando a visualização das células.

Enquanto uma grande quantidade de dados indica que fármacos citotóxicos induzem e ativam componentes da via de apoptose, em resposta ao estresse celular, um grande número de questões-chave ainda está aberto e não resolvido. Por exemplo, o ponto de vista de que a apoptose representa o principal mecanismo pelo qual as células tumorais morrem pode não ser uma verdade universal (SCHMITT *et al.*, 2000). Células com dano no DNA, suficiente para tornar incapaz a proliferação, podem morrer por causa de uma falha mitótica, a qual não é detectada na análise da apoptose. Elementos-chave na via de morte celular são ligados a outros sistemas complexos de sinalização, como resposta ao dano ao DNA e controle do ciclo celular (LAKIN & JACKSON, 1999; VOUSDEN, 2000).

As análises *in vitro* têm demonstrado convincentemente que a desregulação na expressão de moléculas mediadoras da apoptose pode conferir resistência a uma diversidade de fármacos (KAUFMANN & EARNSHAW, 2000; ZHANG *et al.*, 2000).

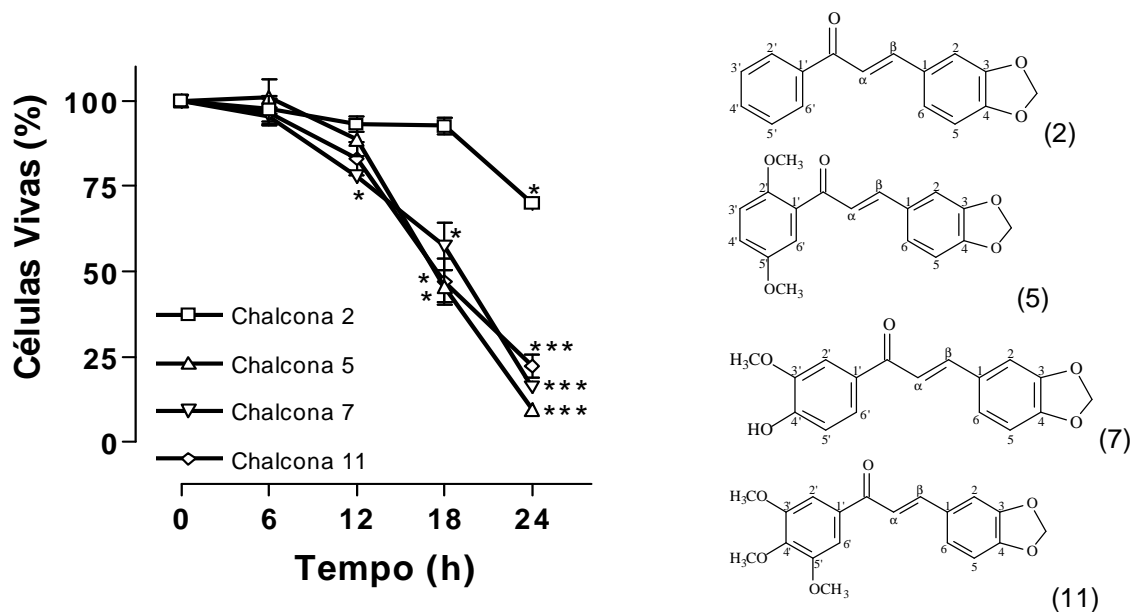
A viabilidade celular também foi avaliada pelo método de fluorescência com laranja de acridina e brometo de etídio (Figura 13). Pelo método de fluorescência, foram analisadas as concentrações de 10, 25, 50 e 100  $\mu\text{M}$ .



**Figura 13: Viabilidade das chalconas sobre células L1210 por fluorescência.** Células foram incubadas com as chalconas (10, 25, 50 e 100 µM) por 24h. A viabilidade celular foi analisada por microscopia de fluorescência. A densidade óptica do grupo controle (0, células sem tratamento) foi considerada como 100% de viabilidade celular. Cada ponto representa a média ± E.P.M. Um valor de  $^{\#}P < 0,001$  foi considerado estatisticamente significativo, quando comparado com o controle, usando ANOVA, seguido de teste *t* de Bonferroni. Estruturas químicas das chalconas: (2), (5), (7) e (11).

### 5.5 Tempo resposta

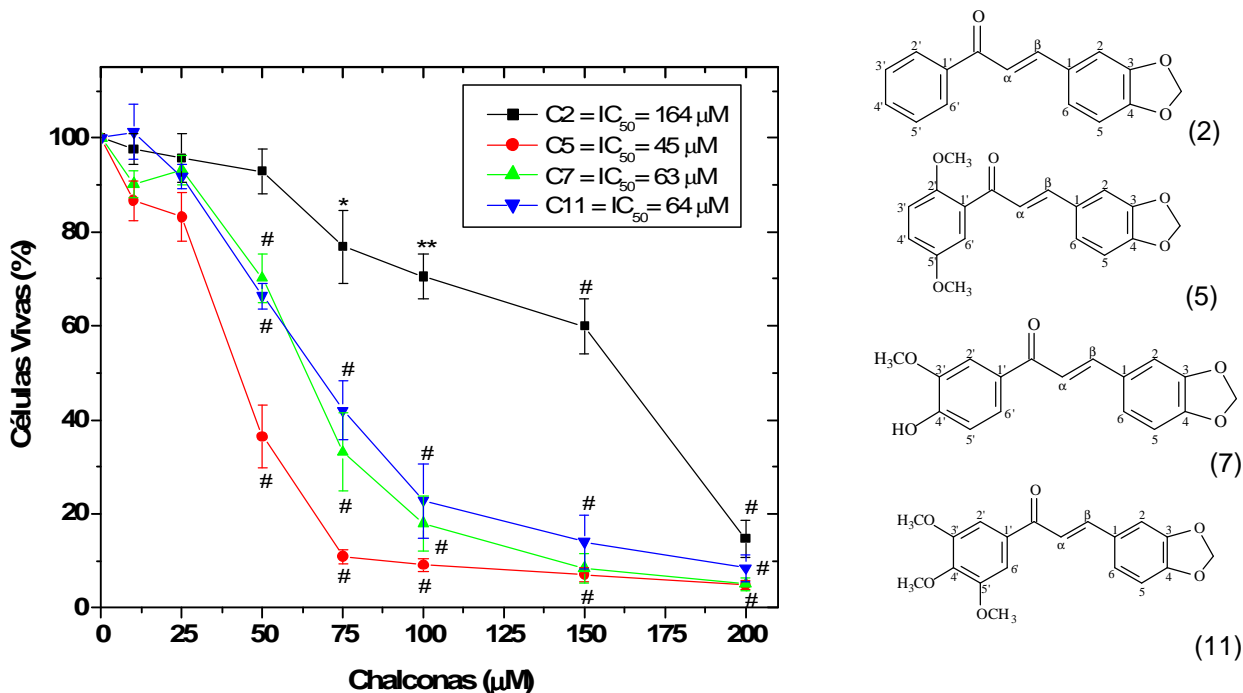
Foi estudado o efeito citotóxico das chalconas **5**, **7** e **11** em relação ao tempo. A toxicidade foi analisada nos tempos de 6, 12, 18 e 24 horas, comparando-se com a chalcona **2**, que não foi tão efetiva para causar morte nas células leucêmicas quanto às outras chalconas selecionadas, e é a estrutura mais simples (Figura 14). Em 18h de incubação, na concentração de 100 µM, as chalconas **5**, **7** e **11** começaram a induzir significativamente a morte celular. Como esperado, a chalcona **2**, em 18h, não causou efeito citotóxico significativo. Apenas o composto **7** diminuiu a viabilidade celular de forma significativa em 12h e os compostos **5**, **7** e **11** causaram alta citotoxicidade em 24h como mostrado nas figuras 10 e 14.



**Figura 14: Tempo resposta da atividade das chalconas sobre células L1210.** As células foram incubadas com os compostos (100  $\mu\text{M}$ ) por 6, 12, 18 e 24 horas. A viabilidade celular foi avaliada pelo método do MTT. A densidade óptica do grupo controle (0, células sem tratamento) foi considerada como 100% de viabilidade celular. Cada ponto representa a média  $\pm$  E.P.M. Um valor de  $*P < 0,05$  e  $***P < 0,001$  foi considerado estatisticamente significativo, quando comparado com o controle, usando ANOVA, seguido de teste *t* de Bonferroni. Estruturas químicas das chalconas: (2), (5), (7) e (11).

## 5.6 Concentração resposta

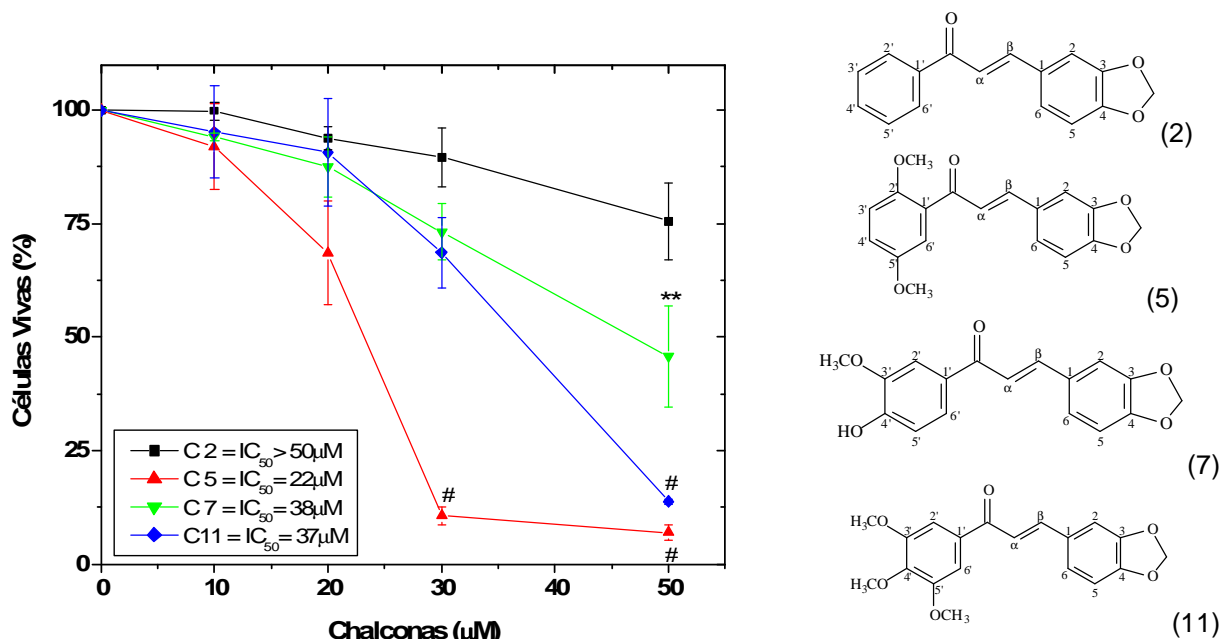
A influência do aumento da concentração dos compostos na toxicidade, nos tempos de 24 e 48 horas de incubação, foi analisada e os resultados são mostrados nas figuras 15 e 16. As chalconas **2**, **5**, **7** e **11** causaram morte celular de forma concentração-dependente (Figura 15). Os valores de  $\text{IC}_{50}$  dos compostos **2**, **5**, **7** e **11**, em 24h, foram 164, 45, 63, e 64  $\mu\text{M}$ , respectivamente. A chalcona **5** apresentou o menor valor de  $\text{IC}_{50}$ , em 24h, e a chalcona **2** o valor mais elevado.



**Figura 15: Concentração resposta da atividade das chalconas sobre células L1210 em 24h.** Células,  $3 \times 10^6$ , células foram incubadas com as chalconas (10 µM - 200 µM). A viabilidade celular foi avaliada pelo método do MTT. A densidade óptica do grupo controle (0, células sem tratamento) foi considerada como 100% de viabilidade celular. Cada ponto representa a média  $\pm$  E.P.M. Um valor de \*P < 0,05, \*\*P < 0,01 e #P < 0,001 foi considerado estatisticamente significativo, quando comparado com o controle, usando ANOVA, seguido de teste *t* de Bonferroni.

Em 48h de incubação (Figura 16), concentrações menores foram utilizadas, considerando que o tempo de exposição das células aos compostos foi maior. As chalconas **5**, **7** e **11** mostraram valores de IC<sub>50</sub> de 22, 38 e 37 µM, respectivamente. Não foi possível determinar a IC<sub>50</sub> da chalcona **2**, em 48h, pois esta chalcona apresentou pouca citotoxicidade e a concentração máxima testada nesta condição foi de 50 µM. Os compostos **5**, **7** e **11** diminuiriam aproximadamente à metade o valor da IC<sub>50</sub>, quando analisados em 48h.





**Figura 16: Concentração resposta da atividade das chalconas sobre células L1210 em 48h.** As células,  $1 \times 10^6$ , foram incubadas com as chalconas (10, 20, 30 e 50  $\mu\text{M}$ ). A viabilidade celular foi avaliada pelo método do MTT. A densidade óptica do grupo controle (0, células sem tratamento) foi considerada como 100% de viabilidade celular. Cada ponto representa a média  $\pm$  E.P.M. Um valor de  $**P < 0,01$  e  $\#P < 0,001$  foi considerado estatisticamente significativo, quando comparado com o controle, usando ANOVA, seguido de teste *t* de Bonferroni.

Abaixo, na tabela 2, encontra-se a comparação da viabilidade celular realizada em concentração resposta pelos métodos do MTT e fluorescência. Ocorreram variações entre os dois métodos. No entanto, estas variações não alteraram o comportamento dos compostos. Em ambos os métodos, a morte celular ocorreu de maneira concentração-dependente.

**Tabela 2:** Comparação da viabilidade celular pelos métodos de microscopia de fluorescência (MF) com laranja de acridina e brometo de etídio e teste do MTT.

Concentração ( $\mu\text{M}$ )	Chalcona 2		Chalcona 5		Chalcona 7		Chalcona 11	
	MF (%)	MTT (%)	MF (%)	MTT (%)	MF (%)	MTT (%)	MF (%)	MTT (%)
0	100	100	100	100	100	100	100	100
10	97	98	96	87	97	90	97	101
25	90	96	78	83	93	93	85	92
50	90	93	17	36	91	70	75	66
100	86	71	7	9	3	12	6	13

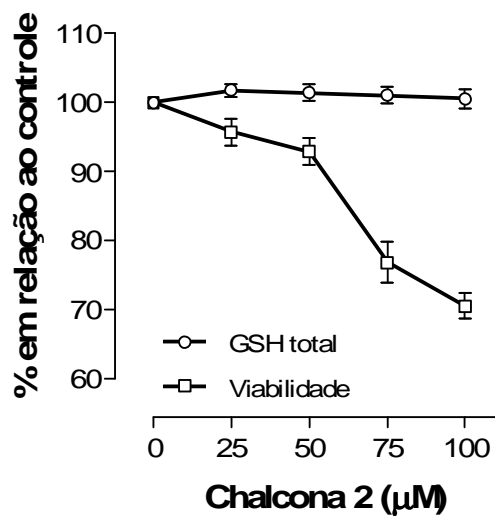
\* Células L1210 foram incubadas com as chalconas por 24h.

## 5.7 Concentração de glutathiona

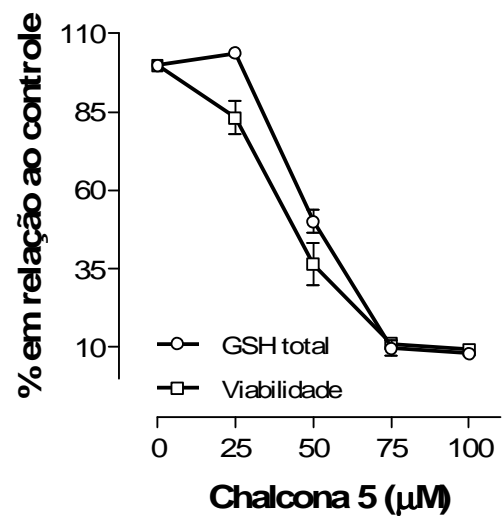
A glutathiona (GSH) é um importante antioxidante e o mais abundante tiol não protéico intracelular, presente na faixa de concentração milimolar, na maioria das células aeróbicas (SIES, 1999; NORDBERG & ARNER, 2001). A GSH, associada à glutathiona S-transferase (GST), representa a maior via de detoxificação do metabolismo de xenobióticos e produtos endógenos do estresse oxidativo, a qual tem sido extensivamente estudada pelo seu papel em metabolizar agentes antitumorais (O'BRIEN *et al.*, 1999).

SABZEVARI *et al.* (2004) investigaram o mecanismo de citotoxicidade da floretina, isoliquiritigenina e outras chalconas hidroxiladas sobre hepatócitos isolados de rato. Todas as chalconas estudadas causaram citotoxicidade nos hepatócitos. A mais citotóxica foi a 2'-hidroxichalcona com LD<sub>50</sub> de 115 ± 13 µM (concentração das chalconas para causar 50% de citotoxicidade após 2 horas de incubação, a 37°C) e a floretina foi a chalcona com maior LD<sub>50</sub> sendo igual a 400 ± 35 µM. Todas as chalconas depletaram GSH dos hepatócitos, algumas por oxidação da GSH em GSSG, outras provavelmente pela formação de um conjugado com a GSH.

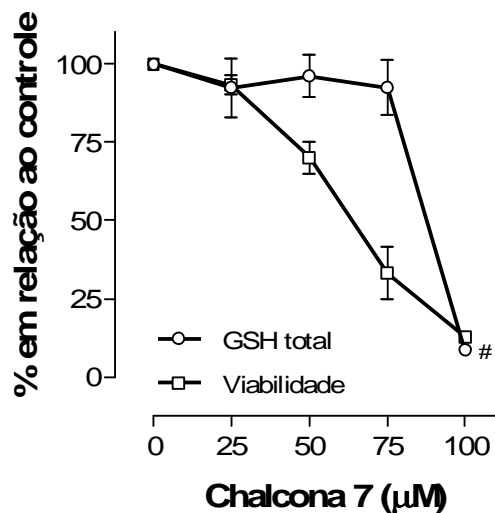
Nossos resultados mostraram que a chalcona **2** não apresentou depleção da concentração de GSH total (Figura 17 –A). As chalconas **5**, **7** e **11** causaram depleção da GSH total, entretanto, praticamente nas mesmas concentrações em que ocorreu significativa morte celular (Figura 17). A chalcona **5** apresentou depleção de GSH total de maneira concentração dependente igual à morte celular (Figura 17 – B). A chalcona **7** apresentou maior depleção de GSH total que morte celular na concentração de 100 µM, nas concentrações de 50 e 75 µM a morte induzida nas células L1210 foi mais significativa do que a depleção de GSH (Figura 17 – C).



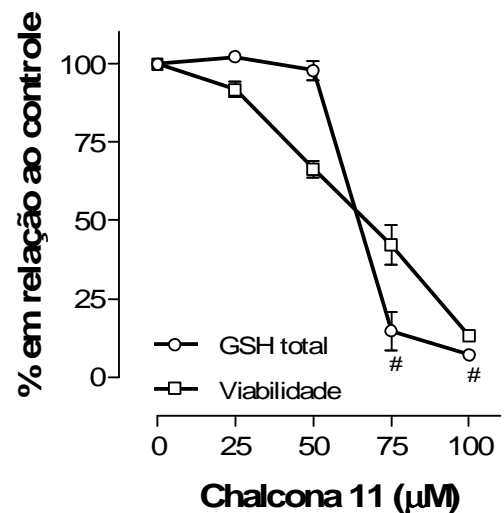
A



B



C



D

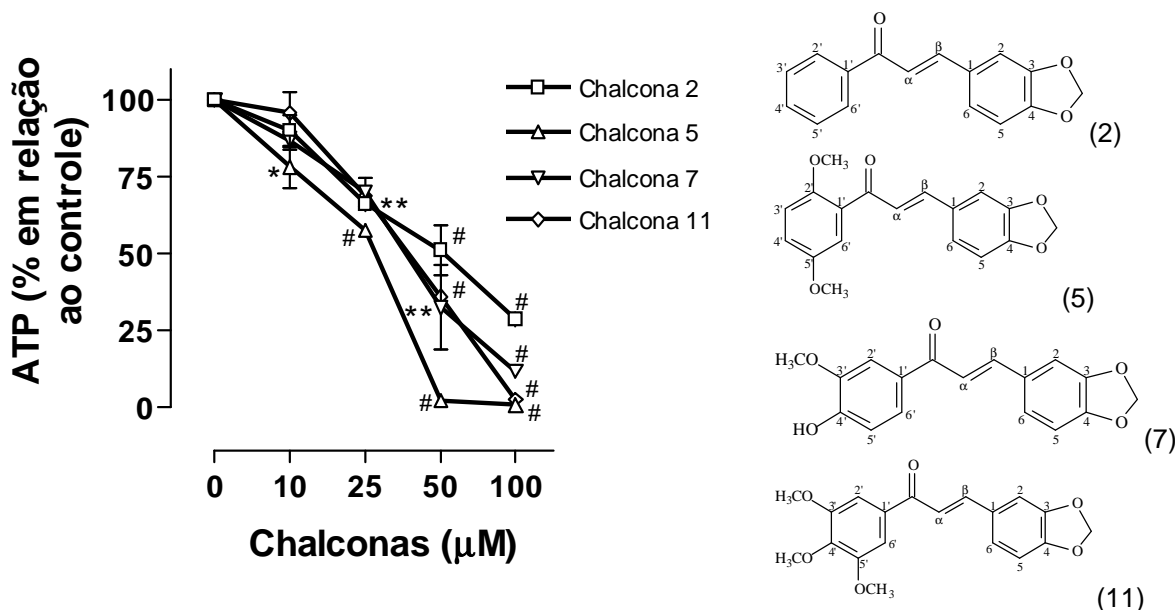
**Figura 17: Comparação entre o efeito das chalconas sobre a concentração de GSH total e a viabilidade em células L1210.** Os compostos (25, 50, 75 e 100 µM) foram adicionados às células e incubados, por 24h. As células foram lisadas e a concentração de GSH foi quantificada pelo método de Tietze (1969). A viabilidade celular foi avaliada pelo método do MTT. O controle (0, células sem tratamento) apresentou 598 nM de GSH total e foi considerado como 100% da concentração de GSH total (GSH+GSSG) e 100% de viabilidade celular. Cada ponto representa a média ± E.P.M. Um valor de <sup>#</sup>P < 0,05 foi considerado estatisticamente significativo.

Com a chalcona 11, nas concentrações de 75 e 100µM, a depleção de glutathiona foi significativa e maior do que a indução à morte celular (Figura 17 – D). Estes resultados sugerem que as chalconas 5 e 7 não exercem seu efeito via depleção de GSH, entretanto, mais estudos serão necessários para comprovar o não envolvimento da glutathiona no mecanismo de morte celular causado pelas

chalconas, que poderia ocorrer tanto por consumo da glutathione reduzida quanto por conjugação da GSH com estes compostos.

## 5.8 Concentração de ATP

As mitocôndrias possuem um duplo papel, atuando tanto no metabolismo energético quanto na morte celular (REGULA *et al.*, 2003). Diversos compostos podem afetar a bioenergética mitocondrial, o que significa um grande risco para a sobrevivência celular. Estas substâncias podem provocar alterações na permeabilidade da membrana mitocondrial interna e/ou na velocidade do transporte de elétrons, através da cadeia respiratória. Os compostos conhecidos como desacopladores promovem o aumento da permeabilidade da membrana mitocondrial interna a prótons. Desta forma, ocorre a transferência de elétrons, mas não há formação do potencial eletroquímico de prótons e, conseqüentemente, não ocorre síntese de ATP. Entre os compostos que agem como desacopladores estão alguns antiinflamatórios com grupos ionizáveis, incluindo os agentes não esteroidais: diclofenaco, piroxicam, meloxicam, aspirina, indometacina e nimesulida (MAHMUD *et al.*, 1996). A ação desacopladora destes compostos foi observada em mitocôndrias isoladas e em fígado de rato perfundido, em concentrações que correspondem às doses utilizadas na terapêutica (PETRESCU & TARBA, 1997; MORENO-SANCHEZ *et al.*, 1999). Outros compostos, que também tiveram seus efeitos desacopladores demonstrados, incluem alguns fármacos antitumorais, antipsicóticos, antidepressivos, antimicóticos, antihelmínticos, além de herbicidas e inseticidas (WALLACE & STARKOV, 2000).



**Figura 18: Efeito das chalconas sobre a concentração de ATP em células L1210.** Os compostos (10, 25, 50 e 100 µM) foram adicionados às células e incubados, por 24h. As células foram lisadas e a concentração de ATP foi quantificada pelo método luciferin-luciferase conforme descrito em Materiais e Métodos. O controle (0, células sem tratamento), contendo  $70 \pm 1,2$  µM de ATP foi considerado como 100% da concentração de ATP. Cada ponto representa a média  $\pm$  E.P.M. Um valor de \* $P < 0,05$ , \*\* $P < 0,01$  e # $P < 0,001$  foi considerado estatisticamente significativo, usando ANOVA, seguida de teste *t* de Bonferroni. Estruturas químicas das chalconas: (2), (5), (7) e (11).

Nossos resultados demonstraram que as chalconas **2**, **5**, **7** e **11** depletaram ATP de maneira concentração-dependente, ou seja, quanto maior a concentração do composto, maior foi a depleção intracelular de ATP. Até mesmo a chalcona **2**, que causou pouca morte celular nas células L1210, depletou o ATP de maneira significativa. A chalcona **5** apresentou depleção significativa a partir da concentração de 10 µM, a chalcona **7** depletou ATP de forma significativa nas concentrações de 50 e 100 µM e a chalcona **11** apresentou depleção significativa a partir da concentração de 25 µM. (Figura 18)

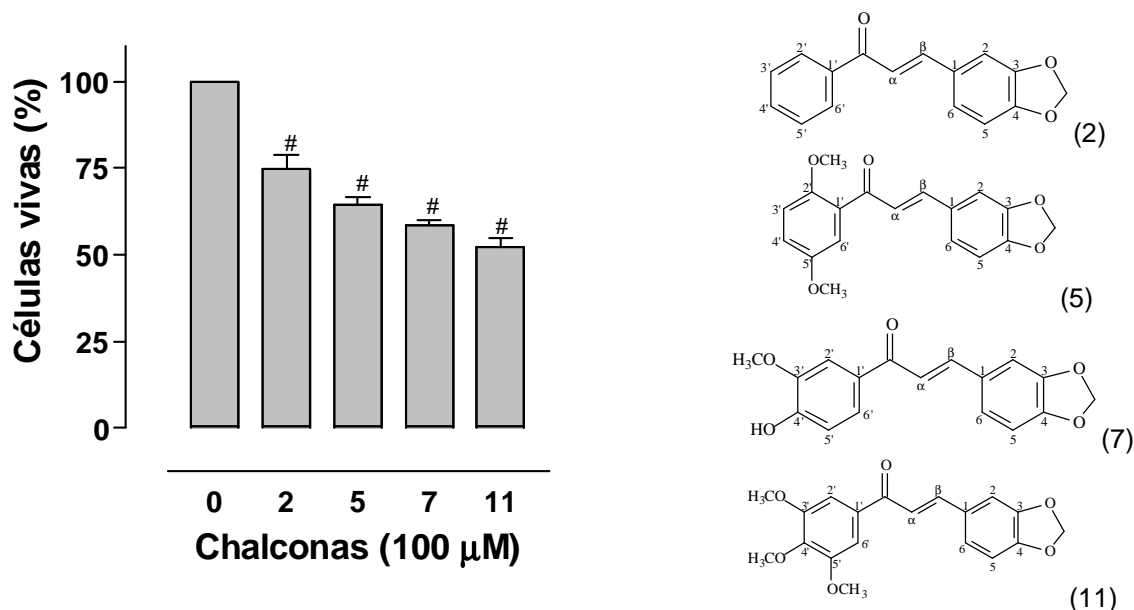
As chalconas hidroxiladas estudadas por Sabzevari *et al.* (2004) causaram um desacoplamento na fosforilação oxidativa mitocondrial, ou seja, um colapso no potencial de membrana mitocondrial e aumentaram o consumo de oxigênio. Além disso, substratos da via glicolítica ou do ciclo do ácido cítrico (como sorbitol, xilitol, frutose e piruvato) preveniram a citotoxicidade e o colapso no potencial de

membrana mitocondrial. O mais alto pKa das chalconas foi o mais efetivo para causar colapso no potencial de membrana mitocondrial, o que sugere que a atividade citotóxica destas chalconas está, provavelmente, relacionada à habilidade de causar desacoplamento na mitocôndria.

Nossos resultados mostraram depleção de ATP, sugerindo que as chalconas podem estar interferindo no potencial de membrana mitocondrial, diminuindo a respiração celular e prejudicando a síntese de ATP.

### **5.9 Citotoxicidade em células normais e células progenitoras grânulo-monocíticas**

Estudamos os efeitos das chalconas numa linhagem de células não tumorais (VERO). Na figura 19, é possível observar a toxicidade dos compostos **2**, **5**, **7** e **11** sobre estas células. A quantidade de morte celular foi  $25,1 \pm 4,0\%$ ,  $35,5 \pm 2,1\%$ ,  $41,7 \pm 1,7\%$  e  $47,8 \pm 2,5\%$ , respectivamente, quando comparadas ao controle (100% de células viáveis). Comparando as figuras 10 e 19 é possível observar que a viabilidade nas células não tumorais VERO foi maior do que nas células leucêmicas L1210.



**Figura 19: Efeito citotóxico das chalconas sobre células VERO (células não tumorais).** As células foram incubadas com as chalconas por 24h. A viabilidade celular foi avaliada pelo método do MTT. A densidade óptica do grupo controle (0, células sem tratamento) foi considerada como 100% de viabilidade celular. Cada ponto representa a média  $\pm$  E.P.M. de pelo menos três experimentos idênticos. Um valor de  $^{\#}P < 0,001$  foi considerado estatisticamente significativo, quando comparado com o controle, usando ANOVA, seguido de teste *t* de Bonferroni. Estrutura química das chalconas: (2), (5), (7) e (11).

Na tabela 3, foi comparada a viabilidade celular dos compostos **5**, **7** e **11** entre as duas linhagens celulares. O valor de P foi extremamente significativo, mostrando que a morte induzida pelas chalconas foi mais evidente nas células tumorais.

**Tabela 3:** Comparação da viabilidade celular entre as linhagens L1210 e VERO.

Chalconas	L1210 (Células viáveis em relação ao controle)	VERO (Células viáveis em relação ao controle)	P
<b>5</b>	9,5 $\pm$ 1,2%	64,5 $\pm$ 2,1%	< 0.0001
<b>7</b>	12,9 $\pm$ 1,1%	58,3 $\pm$ 1,7%	< 0.0001
<b>11</b>	13,7 $\pm$ 2,2%	52,2 $\pm$ 2,5%	= 0.0002

\* As células foram incubadas com os compostos (100μM), por 24h. A viabilidade celular foi analisada pelo método do MTT. O controle foi considerado 100% de células viáveis para as células L1210 e VERO. O valor de P foi determinado pelo teste *t Student*.

A toxicidade dos fármacos antineoplásicos para as células progenitoras normais da medula óssea é um dos obstáculos encontrados na maioria das terapias

antitumorais. O ensaio de formação de colônias é empregado para investigar reações adversas, causadas por xenobióticos na formação de células sangüíneas. Células-tronco hematopoiéticas, também chamadas de unidades formadoras de colônias (CFU), originam progenitores comprometidos a diferenciarem-se em diferentes linhagens de células sangüíneas maduras, dependendo dos fatores de crescimento e citocinas presentes no microambiente. Neste sentido, para investigar a toxicidade das chalconas **5**, **7** e **11**, foi realizado o ensaio com células formadoras de colônias grânulo-monocíticas (Ensaio GM-CFC). Neste ensaio foram utilizadas células de medula óssea murina, que foram tratadas com as chalconas nas concentrações descritas na tabela 4. As concentrações utilizadas no tratamento foram baseadas no valor de  $IC_{50}$ , em 24 horas; foi utilizada uma concentração menor que a  $IC_{50}$  e outra sendo aproximadamente o valor da  $IC_{50}$  ( $IC_{50}$  em 24h: chalcona **5** = 45  $\mu$ M, chalcona **7** = 63  $\mu$ M e chalcona **11** = 64  $\mu$ M).

**Tabela 4:** Ensaio de células progenitoras grânulo-monocíticas (Ensaio GM-CFC)

Composto	Inibição do crescimento de colônias
Chalcona <b>5</b> - 20 $\mu$ M	100%
Chalcona <b>5</b> - 50 $\mu$ M	100%
Chalcona <b>7</b> - 30 $\mu$ M	9,90% $\pm$ 0,6%
Chalcona <b>7</b> - 60 $\mu$ M	28,5% $\pm$ 1,3%
Chalcona <b>11</b> - 30 $\mu$ M	100%
Chalcona <b>11</b> - 60 $\mu$ M	100%

As chalconas **5** e **11** inibiram totalmente o crescimento de colônias, nas duas concentrações testadas, sendo altamente citotóxicas para células da medula óssea progenitoras de granulócitos e macrófagos. Somente a chalcona **7** permitiu o crescimento de colônias a partir das células progenitoras hematopoiéticas. Este



resultado mostra que a chalcona **7** é a menos citotóxica para células normais da medula óssea, permitindo o crescimento de granulócitos e macrófagos.

Após a quimioterapia, a medula óssea precisa se restabelecer, sendo que antineoplásicos que sejam menos tóxicos para células normais da medula óssea podem apresentar mais benefícios para o tratamento e recuperação do paciente

# 6. CONCLUSÕES

As chalconas compõem ou fazem parte de uma classe de estruturas naturais ou sintéticas de grande interesse, devido às suas várias propriedades biológicas. Uma área de grande interesse, evidenciada na literatura, é seu potencial como agente antitumoral.

A presente pesquisa, nas condições que foi desenvolvida, permite as seguintes conclusões:

- Dos dez compostos testados, as chalconas **5**, **7** e **11** mostraram efeito citotóxico pronunciado sobre as células L1210 e foram escolhidas para dar continuidade à investigação;
- Os substituintes no anel A destas chalconas têm papel fundamental para a toxicidade. O efeito dos substituintes na toxicidade é evidenciado pela comparação com a chalcona **2**, que não tem substituintes ligados ao anel A e apresentou menor citotoxicidade;
- A morte celular, induzida pelos compostos **5**, **7** e **11**, ocorreu por apoptose;
- Em 18h de incubação, estas chalconas começaram a induzir, significativamente, a morte celular;
- Os compostos **2**, **5**, **7** e **11** demonstraram causar a morte celular de forma concentração-dependente;
- A chalcona **5** apresentou o menor valor de  $IC_{50}$ , em 24 horas, e a chalcona **2**, o valor mais elevado;
- A chalcona **7** parece não exercer seu efeito via depleção de glutathiona, entretanto, os resultados não são conclusivos e este efeito terá que ser mais estudado;
- Os compostos depletaram ATP de maneira concentração-dependente. A depleção de ATP foi maior que a morte celular e ocorreu até nas menores

concentrações testadas, sugerindo que as chalconas podem estar interferindo no potencial de membrana mitocondrial, diminuindo a respiração celular e, conseqüentemente, prejudicando a síntese de ATP;

- A toxicidade das chalconas estudadas foi significativamente melhor nas células leucêmicas L1210, do que nas células não tumorais VERO;
- A chalcona **7** não inibiu o crescimento de granulócitos e macrófagos a partir das células progenitoras normais da medula óssea. Este resultado nos mostra que o composto **7** é o menos tóxico para células da medula óssea, sendo um composto promissor para a continuidade das investigações de novos fármacos antitumorais.

7.

PERSPECTIVAS

A depleção de GSH e de ATP é um indicativo de que as chalconas provocam um estresse oxidativo celular. Não conhecemos, nas células L1210, o mecanismo do estímulo inicial, que resulta na morte celular por apoptose. Duas hipóteses podem ser levantadas: uma seria por meio de dano direto ao DNA, proteínas ou lipídios de membrana e a outra seria pela interferência no ciclo celular pela ligação à tubulina.

Realizamos ensaios em modelos de membrana lipídica (lipossomos e microsossomos de fígado de rato), com altas concentrações de chalconas, e estas não causaram peroxidação lipídica nestas estruturas. Na célula, a peroxidação lipídica poderia ocorrer através de metabólitos secundários das chalconas. Entretanto, pela técnica colorimétrica disponível no laboratório, este processo não foi detectado, provavelmente pela baixa sensibilidade da metodologia em detectar pequenas concentrações dos marcadores da peroxidação lipídica, como esperado para células em cultura.

A continuidade da pesquisa para elucidar o mecanismo que a chalcona **7** utiliza para desencadear a apoptose e o desenvolvimento de testes in vivo estão sendo considerados, uma vez que este composto apresentou baixa toxicidade às células não tumorais e às células progenitoras de medula óssea.

Os tratamentos antineoplásicos existentes são altamente tóxicos e freqüentemente não específicos. Adicionalmente, a resistência das células tumorais aos fármacos é uma grande barreira aos tratamentos. A pesquisa e o desenvolvimento de novos compostos, que ultrapassem a barreira da resistência, sejam mais específicos para células tumorais, menos tóxicos e apresentem menos efeitos indesejáveis, pode contribuir para a efetividade dos tratamentos, para a diminuição do número de recidivas e para o aumento do potencial de cura.

8.

REFERÊNCIAS

AGULLO, G., GAMET-PAYRASTRE L., *et al.* Relationship between flavonoid structure and inhibition of phosphatidylinositol 3-kinase: a comparison with tyrosine kinase and protein kinase C inhibition. **Biochem Pharmacol**, 53(11): 1649-57, 1997.

ALLEN, R. T., HUNTER, W. J. *et al.* Morphological and biochemical characterization and analysis of apoptosis. **J Pharmacol Toxicol Methods**, 37(4): 215-28, 1997.

ANTO, R. J., SUKUMARAN, K., *et al.* Anticancer and antioxidant activity of synthetic chalcones and related compounds. **Cancer Lett**, 97(1): 33-7, 1995.

ARIYAN, Z. S. & SUSCHITZKY H. Heterocyclic compounds of the chalcone type. **Journal of the Chemical Society**, (Abstracts): 2242-2244, 1961.

BAIN, B. J. **Diagnóstico em leucemias**. Rio de Janeiro: Editora Revinter, 2003, Cap. 1, 01-56.

BALLS, M., BLAAUBEER, B. J. *et al.* Practical aspects of the validation of toxicity tests procedures. The report of Recomendatious of ECVAM workshop. **Atla**, 23: 129-147, 1995.

BARRANCO, S. C., TOWNSEND, C. M. Jr., *et al.* Changes in glutathione content and resistance to anticancer agents in human stomach cancer cells induced by treatments with melphalan in vitro. **Cancer Res**, 50(12): 3614-8, 1990.

BATT, D. G., GOODMAN, R. *et al.* 2'-substituted chalcone derivatives as inhibitors of interleukin-1 biosynthesis. **J Med Chem**, 36(10): 1434-42, 1993.

BENNETT, J. M., CATOVSKY, D. *et al.* Proposals for the classification of the acute leukaemias. French-American-British (FAB) co-operative group. **Br J Haematol**, 33(4): 451-8, 1976.

BENNETT, J. M., CATOVSKY, D. *et al.* The morphological classification of acute lymphoblastic leukaemia: concordance among observers and clinical correlations. **Br J Haematol**, 47(4): 553-61, 1981.

BOECK, P., BANDEIRA FALCAO, C. A. *et al.* Synthesis of chalcone analogues with increased antileishmanial activity. **Bioorg Med Chem**, 14(5): 1538-45, 2006.

BOECK, P., LEAL, P. C. *et al.* Antifungal activity and studies on mode of action of novel xanthoxylene-derived chalcones. **Arch Pharm** (Weinheim), 338(2-3): 87-95, 2005.

CARIATI, R., ZANCAI, P. *et al.* Inhibition of oxidative phosphorylation underlies the antiproliferative and proapoptotic effects of mofarotene (Ro 40-8757) in Burkitt's lymphoma cells. **Oncogene**, 22(6): 906-18, 2003.

Catálogo BioAgency 2004-05, Cap. 9 - Apoptose e Inflamação. Disponível em <http://www.bioagency.com.br/informacao/default.asp>. Acesso em 22 de dezembro de 2006.



CHANDRA, J., SAMALI, A. *et al.* Triggering and modulation of apoptosis by oxidative stress. **Free Radic Biol Med**, 29(3-4): 323-33, 2000.

CHIARADIA, L. D. **Obtenção de chalconas sintéticas com potencial atividade biológica**. 2006. 199f. Dissertação (Mestrado em Química) - Universidade Federal de Santa Catarina, Florianópolis, Santa Catarina, 2006.

DAVEY, F. R., CASTELLA, A. *et al.* Prognostic significance of the revised French-American-British classification for acute lymphocytic leukaemia. **Clin Lab Haematol**, 5(4): 343-51, 1983.

DAVIS, W., RONAI, Z. Jr. *et al.* Cellular thiols and reactive oxygen species in drug-induced apoptosis. **J Pharmacol Exp Ther**, 296(1): 1-6, 2001.

DELUCA, M. Firefly luciferase. **Adv Enzymol Relat Areas Mol Biol**, 44: 37-68, 1976.

DESHPANDE, A. M., ARGADE, N. P. *et al.* Synthesis and screening of a combinatorial library of naphthalene substituted chalcones: inhibitors of leukotriene B4. **Bioorg Med Chem**, 7(6): 1237-40, 1999.

DIAS, N. & BAILLY, C. Drugs targeting mitochondrial functions to control tumor cell growth. **Biochem Pharmacol**, 70(1): 1-12, 2005.

DIMMOCK, J. R., ELIAS, D. W. *et al.* Bioactivities of chalcones. **Curr Med Chem**, 6(12): 1125-49, 1999.

DIMMOCK, J. R., KANDEPU, N. M. *et al.* Cytotoxic activities of Mannich bases of chalcones and related compounds. **J Med Chem**, 41(7): 1014-26, 1998.

DOMINGUEZ, J. N., CHARRIS, J. E. *et al.* Synthesis of quinolinyl chalcones and evaluation of their antimalarial activity. **Eur J Med Chem**, 36(6): 555-60, 2001.

DOMINGUEZ, J. N., LEON, C. *et al.* Synthesis and antimalarial activity of sulfonamide chalcone derivatives. **Farmacol**, 60(4): 307-11, 2005.

DOWNING, J. R. & SHANNON, K. M. Acute leukemia: a pediatric perspective. **Cancer Cell**, 2(6): 437-45, 2002.

DUCKI, S., FORREST, R. *et al.* Potent antimitotic and cell growth inhibitory properties of substituted chalcones. **Bioorg Med Chem Lett**, 8(9): 1051-6, 1998.

DURRANT, I. J. & RICHARDS, S. M. Results of Medical Research Council trial UKALL IX in acute lymphoblastic leukaemia in adults: report from the Medical Research Council Working Party on Adult Leukaemia. **Br J Haematol**, 85(1): 84-92, 1993.

ECVAM - European Centre for the Validation of Alternative Methods. The Colony Forming Unit-Granulocyte/Macrophage (CFU-GM). Disponível em: <http://ecvam-sis.jrc.it>. Acesso em: 05 novembro de 2006.

EDWARDS, M. L., STEMERICK, D. M. *et al.* Chalcones: a new class of antimitotic agents. **J Med Chem**, 33(7): 1948-54, 1990.

ESTRELA, J. M., ORTEGA, A. *et al.* Glutathione in cancer biology and therapy. **Crit Rev Clin Lab Sci**, 43(2): 143-81, 2006.

FILOMENI, G., ROTILIO, G. *et al.* Cell signalling and the glutathione redox system. **Biochem Pharmacol**, 64(5-6): 1057-64, 2002.

FRIEDLANDER, R. M. Apoptosis and caspases in neurodegenerative diseases. **N Engl J Med**, 348(14): 1365-75, 2003.

FRESHNEY, R. **Culture of Animal Cells: A Manual of Basic Technique**. New York, Alan R. Liss, Inc., 1987, p.117.

FROMME, P., BOEKEMA, E. J. *et al.* Isolation and characterization of a supramolar complex of subunit-III of the ATP-synthase from chloroplasts. **Z. Naturforsch**, 42c(11-12): 1239-1245, 1987.

FU, Y., HSIEH, T. C. *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**, 322(1): 263-70, 2004.

GARLAND, J. M. & HALESTRAP, A. Energy metabolism during apoptosis. Bcl-2 promotes survival in hematopoietic cells induced to apoptose by growth factor withdrawal by stabilizing a form of metabolic arrest. **J Biol Chem**, 272(8): 4680-8, 1997.

GOKBUGET, N. & HOELZER, D. Recent approaches in acute lymphoblastic leukemia in adults. **Rev Clin Exp Hematol**, 6(2): 114-41; discussion 200-2, 2002.

GORES, G. J., HERMAN, B. *et al.* Plasma membrane bleb formation and rupture: a common feature of hepatocellular injury. **Hepatology**, 11(4): 690-8, 1990.

GREAVES, M. Molecular genetics, natural history and the demise of childhood leukaemia. **Eur J Cancer**, 35(2): 173-85, 1999.

GREAVES, M. F. Differentiation-linked leukemogenesis in lymphocytes. **Science**, 234(4777): 697-704, 1986.

GREAVES, M. F. Stem cell origins of leukaemia and curability. **Br J Cancer**, 67(3): 413-23, 1993.

GREEN, D. R. & EVAN, G. I. A matter of life and death. **Cancer Cell**, 1(1): 19-30, 2002.

GRIFFITH, O. W. & MEISTER, A. Origin and turnover of mitochondrial glutathione. **Proc Natl Acad Sci U S A**, 82(14): 4668-72, 1985.

GUPTA, S. Molecular signaling in death receptor and mitochondrial pathways of apoptosis (Review). **Int J Oncol**, 22(1): 15-20, 2003.

HAMMOND, C. L., LEE, T. K., *et al.* Novel roles for glutathione in gene expression, cell death, and membrane transport of organic solutes. **J Hepatol**, 34(6): 946-54, 2001.

HAN, R. **Research and Development of Anticancer Drugs and Experimental Techniques**. Beijing: Pekin Medical University Pekin Union Medical College joint Publishing House, 395-399, 1997.

HARAGUCHI, H., ISHIKAWA, H. *et al.* Antioxidative and superoxide scavenging activities of retrochalcones in *Glycyrrhiza inflata*. **Bioorg Med Chem**, 6(3): 339-47, 1998.

HASLETT, C. Resolution of acute inflammation and the role of apoptosis in the tissue fate of granulocytes. **Clin Sci (Lond)**, 83(6): 639-48, 1992.

HENGARTNER, M. O. The biochemistry of apoptosis. **Nature**, 407(6805): 770-6, 2000.

HERENCIA, F., FERRANDIZ, M. L. *et al.* Synthesis and anti-inflammatory activity of chalcone derivatives. **Bioorg Med Chem Lett**, 8(10): 1169-74, 1998.

HERENCIA, F., FERRANDIZ, M. L. *et al.* Novel anti-inflammatory chalcone derivatives inhibit the induction of nitric oxide synthase and cyclooxygenase-2 in mouse peritoneal macrophages. **FEBS Lett**, 453(1-2): 129-34, 1999.

HERENCIA, F., LOPEZ-GARCIA, M. P. *et al.* Nitric oxide-scavenging properties of some chalcone derivatives. **Nitric Oxide**, 6(2): 242-6, 2002.

HERR, I. & DEBATIN, K. M. Cellular stress response and apoptosis in cancer therapy. **Blood**, 98(9): 2603-14, 2001.

HIGUCHI, Y. Glutathione depletion-induced chromosomal DNA fragmentation associated with apoptosis and necrosis. **J Cell Mol Med**, 8(4): 455-64, 2004.

ICHIMARU, M., NAKATANI, N. *et al.* Cytotoxic C-benzylated dihydrochalcones from *Uvaria acuminata*. **Chem Pharm Bull (Tokyo)**, 52(1): 138-41, 2004.

ISHITSUKA, H., NINOMIYA, Y. T. *et al.* Direct and specific inactivation of rhinovirus by chalcone Ro 09-0410. **Antimicrob Agents Chemother**, 22(4): 617-21, 1982.

JAFFE, E. F., HARRIS, N. L. *et al.* World Healthy Organization Classification of Tumours: Pathology and Genetics of Tumours of Haematopoietic and Lymphoid Tissues. Lyon: IARC Press, 2001.

KAMPS, W. A., VEERMAN, A. J. *et al.* Long-term follow-up of Dutch Childhood Leukemia Study Group (DCLSG) protocols for children with acute lymphoblastic leukemia, 1984-1991. **Leukemia**, 14(12): 2240-6, 2000.

KANERVA, J., SAARINEN-PIHKALA, U. M. *et al.* Reemphasis on lymphoblast L2 morphology as a poor prognostic factor in childhood acute lymphoblastic leukemia. **Med Pediatr Oncol**, 33(4): 388-94, 1999.

KANG, T. B. & LIANG, N. C. Studies on the inhibitory effects of quercetin on the growth of HL-60 leukemia cells. **Biochem Pharmacol**, 54(9): 1013-8, 1997.

KAUFMANN, S. H. & EARNSHAW, W. C. Induction of apoptosis by cancer chemotherapy. **Exp Cell Res**, 256(1): 42-9, 2000.

KAYSER, O. & KIDERLEN, A. F. In vitro leishmanicidal activity of naturally occurring chalcones. **Phytother Res**, 15(2): 148-52, 2001.

KERR, J. F., Wyllie, A. H. *et al.* Apoptosis: a basic biological phenomenon with wide-ranging implications in tissue kinetics. **Br J Cancer**, 26(4): 239-57, 1972.

KLUCK, R. M., BOSSY-WETZEL, E. *et al.* The release of cytochrome c from mitochondria: a primary site for Bcl-2 regulation of apoptosis. **Science**, 275(5303): 1132-6, 1997.

KO, H. H., TSAO, L. T. *et al.* Structure-activity relationship studies on chalcone derivatives. The potent inhibition of chemical mediators release. **Bioorg Med Chem**, 11(1): 105-11, 2003.

KOBORI, M., IWASHITA, K. *et al.* Phloretin-induced apoptosis in B16 melanoma 4A5 cells and HL-60 human leukemia cells. **Biosci Biotechnol Biochem**, 63(4): 719-25, 1999.

KRAMER, R. A., GREENE, K. *et al.* Chemosensitization of L-phenylalanine mustard by the thiol-modulating agent buthionine sulfoximine. **Cancer Res**, 47(6): 1593-7, 1987.

KROEMER, G. & REED, J. C. Mitochondrial control of cell death. **Nat Med**, 6(5): 513-9, 2000.

KUNTZ, S., WENZEL, U. *et al.* Comparative analysis of the effects of flavonoids on proliferation, cytotoxicity, and apoptosis in human colon cancer cell lines. **Eur J Nutr**, 38(3): 133-42, 1999.

LAKIN, N. D. & JACKSON, S. P. Regulation of p53 in response to DNA damage. **Oncogene**, 18(53): 7644-55, 1999.

LAKS, D., LONGHI, F. *et al.* Survival evaluation of children with acute lymphoblastic leukemia treated with Berlin-Frankfurt-Munich trial. **J Pediatr (Rio J)**, 79(2): 149-58, 2003.

LASH, L. H. Mitochondrial glutathione transport: physiological, pathological and toxicological implications. **Chem Biol Interact**, 163(1-2): 54-67, 2006.

LAWRENCE, N. J., MCGOWN, A. T. *et al.* The interaction of chalcones with tubulin. **Anticancer Drug Des**, 15(2): 135-41, 2000.

LEBEAU, J., FURMAN, C. *et al.* Antioxidant properties of di-tert-butylhydroxylated flavonoids. **Free Radic Biol Med**, 29(9): 900-12, 2000.

LEBLANC, R., DICKSON, J. *et al.* Synthesis and cytotoxicity of epoxide and pyrazole analogs of the combretastatins. **Bioorg Med Chem**, 13(21): 6025-34, 2005.

LEE, Y. J., ERDOS, G. *et al.* Mechanism of quercetin-induced suppression and delay of heat shock gene expression and thermotolerance development in HT-29 cells. **Mol Cell Biochem**, 137(2): 141-54, 1994.

LEITE, M., QUINTA-COSTA, M. *et al.* Critical evaluation of techniques to detect and measure cell death-study in a model of UV radiation of the leukaemic cell line HL-60. **Anal Cell Pathol**, 19(3-4): 139-51, 1999.

LEPLEY, D. M., LI, B. *et al.* The chemopreventive flavonoid apigenin induces G2/M arrest in keratinocytes. **Carcinogenesis**, 17(11): 2367-75, 1996.

LEPLEY, D. M. & PELLING, J. C. Induction of p21/WAF1 and G1 cell-cycle arrest by the chemopreventive agent apigenin. **Mol Carcinog**, 19(2): 74-82, 1997.

LESZCZYNIĘCKA, M., ROBERTS, T. *et al.* Differentiation therapy of human cancer: basic science and clinical applications. **Pharmacol Ther**, 90(2-3): 105-56, 2001.

LI, J. T., YANG, W. Z. *et al.* Improved synthesis of chalcones under ultrasound irradiation. **Ultrason Sonochem**, 9(5): 237-9, 2002.

LI, R., KENYON, G. L. *et al.* In vitro antimalarial activity of chalcones and their derivatives. **J Med Chem**, 38(26): 5031-7, 1995.

LILLEYMAN, J. S., HANN, I. M. *et al.* Cytomorphology of childhood lymphoblastic leukaemia: a prospective study of 2000 patients. United Kingdom Medical Research Council's Working Party on Childhood Leukaemia. **Br J Haematol**, 81(1): 52-7, 1992.

LIU, M., WILAIRAT, P. *et al.* Antimalarial alkoxyated and hydroxylated chalcones [corrected]: structure-activity relationship analysis. **J Med Chem**, 44(25): 4443-52, 2001.

LOPEZ, S. N., CASTELLI, M. V. *et al.* In vitro antifungal evaluation and structure-activity relationships of a new series of chalcone derivatives and synthetic analogues, with inhibitory properties against polymers of the fungal cell wall. **Bioorg Med Chem**, 9(8): 1999-2013, 2001.

LOUIE, K. G., BEHRENS, B. C. *et al.* Radiation survival parameters of antineoplastic drug-sensitive and -resistant human ovarian cancer cell lines and their modification by buthionine sulfoximine. **Cancer Res**, 45(5): 2110-5, 1985.

MAHMUD, T., RAFI, S. S. *et al.* Nonsteroidal antiinflammatory drugs and uncoupling of mitochondrial oxidative phosphorylation. **Arthritis Rheum**, 39(12): 1998-2003, 1996.

MANDELLI, F., ANNINO, L. *et al.* The GIMEMA ALL 0183 trial: analysis of 10-year follow-up. GIMEMA Cooperative Group, Italy. **Br J Haematol**, 92(3): 665-72, 1996.

MARCHETTI, P., DECAUDIN, D. *et al.* Redox regulation of apoptosis: impact of thiol oxidation status on mitochondrial function. **Eur J Immunol**, 27(1): 289-96, 1997.

MARTIN, S. J. & GREEN, D. R. Protease activation during apoptosis: death by a thousand cuts? **Cell**, 82(3): 349-52, 1995.

MARTIN, S. J., REUTELINGSPERGER, C. P. *et al.* Early redistribution of plasma membrane phosphatidylserine is a general feature of apoptosis regardless of the initiating stimulus: inhibition by overexpression of Bcl-2 and Abl. **J Exp Med**, 182(5): 1545-56, 1995.

MARTINO, J. C. & GREEN, D. R. Breaking the mitochondrial barrier. **Nat Rev Mol Cell Biol**, 2(1): 63-7, 2001.

MCKERNAN, T. B., WOODS, E. B. *et al.* Uptake of glutathione by renal cortical mitochondria. **Arch Biochem Biophys**, 288(2): 653-63, 1991.

MEDH, R. D., GUPTA, V. *et al.* Reversal of melphalan resistance in vivo and in vitro by modulation of glutathione metabolism. **Biochem Pharmacol**, 42(2): 439-41, 1991.

MENG, C. Q., ZHENG, X. S. *et al.* Discovery of novel heteroaryl-substituted chalcones as inhibitors of TNF- $\alpha$ -induced VCAM-1 expression. **Bioorg Med Chem Lett**, 14(6): 1513-7, 2004.

MILLER, D. R., LEIKIN, S. *et al.* Prognostic importance of morphology (FAB classification) in childhood acute lymphoblastic leukaemia (ALL). **Br J Haematol**, 48(2): 199-206, 1981.

MIRANDA, C. L., STEVENS, J. F. *et al.* Antioxidant and prooxidant actions of prenylated and nonprenylated chalcones and flavanones in vitro. **J Agric Food Chem**, 48(9): 3876-84, 2000.

MORENO-SANCHEZ, R., BRAVO, C. *et al.* Inhibition and uncoupling of oxidative phosphorylation by nonsteroidal anti-inflammatory drugs: study in mitochondria, submitochondrial particles, cells, and whole heart. **Biochem Pharmacol**, 57(7): 743-52, 1999.

MUKHERJEE, S., KUMAR, V. *et al.* Synthetic and biological activity evaluation studies on novel 1,3-diarylpropenones. **Bioorg Med Chem**, 9(2): 337-45, 2001.

NAKATANI, N., ICHIMARU, M. *et al.* Induction of apoptosis in human promyelocytic leukemia cell line HL-60 by C-benzylated dihydrochalcones, uvaretin, isouvaretin and diuvaretin. **Biol Pharm Bull**, 28(1): 83-6, 2005.

NAM, N. H., KIM, Y. *et al.* Cytotoxic 2',5'-dihydroxychalcones with unexpected antiangiogenic activity. **Eur J Med Chem**, 38(2): 179-87, 2003.

NI, L., MENG, C. Q. *et al.* Recent advances in therapeutic chalcones. **Expert Opin Ther Patents**, 14(12): 1669-1691, 2004.

NICHOLSON, D. W. & THORNBERRY, N. A. Caspases: killer proteases. **Trends Biochem Sci**, 22(8): 299-306, 1997.

NIELSEN, S. F., BOESEN, T. *et al.* Antibacterial chalcones--bioisosteric replacement of the 4'-hydroxy group. **Bioorg Med Chem**, 12(11): 3047-54, 2004.

NIELSEN, S. F., CHRISTENSEN, S. B. *et al.* Antileishmanial chalcones: statistical design, synthesis, and three-dimensional quantitative structure-activity relationship analysis. **J Med Chem**, 41(24): 4819-32, 1998.

NINOMIYA, Y., SHIMMA, N. *et al.* Comparative studies on the antirhinovirus activity and the mode of action of the rhinovirus capsid binding agents, chalcone amides. **Antiviral Res**, 13(2): 61-74, 1990.

NORDBERG, J. & ARNER, E. S. Reactive oxygen species, antioxidants, and the mammalian thioredoxin system. **Free Radic Biol Med**, 31(11): 1287-312, 2001.

O'BRIEN, M. L. & TEW, K. D. Glutathione and related enzymes in multidrug resistance. **Eur J Cancer**, 32A(6): 967-78, 1996.

O'BRIEN, M. L., VULEVIC, B. *et al.* Glutathione peptidomimetic drug modulator of multidrug resistance-associated protein. **J Pharmacol Exp Ther**, 291(3): 1348-55, 1999.

OBERHAMMER, F., WILSON, J. W. *et al.* Apoptotic death in epithelial cells: cleavage of DNA to 300 and/or 50 kb fragments prior to or in the absence of internucleosomal fragmentation. **Embo J**, 12(9): 3679-84, 1993.

OPLETALOVA, V. & SEDIVY, D. Chalcones and their heterocyclic analogs as potential antifungal chemotherapeutic agents. **Ceska Slov Farm**, 48(6): 252-5, 1999.

PAPPANO, N. B., PUIG DE CENTORBI, O. *et al.* Kinetics of the bacteriostatic activity of natural and synthetic chalcones on a strain of *Staphylococcus aureus*. **Rev Argent Microbiol**, 17(1): 27-32, 1985.

PATHAK, V. N., OZA, C. K. *et al.* Synthesis and Spectral Studies of Some New bis(1,4-Diketonato)palladium (II) Complexes. **Synthesis and Reactivity in Inorganic and Metal-Organic Chemistry**, 33(4): 607-624, 2003.

PETRESCU, I. & TARBA, C. Uncoupling effects of diclofenac and aspirin in the perfused liver and isolated hepatic mitochondria of rat. **Biochim Biophys Acta**, 1318(3): 385-94, 1997.

PLASSCHAERT, S. L., KAMPS, W. A. *et al.* Prognosis in childhood and adult acute lymphoblastic leukaemia: a question of maturation? **Cancer Treat Rev**, 30(1): 37-51, 2004.

POPAT, U., CARRUM, G. *et al.* Haemopoietic stem cell transplantation for acute lymphoblastic leukaemia. **Cancer Treat Rev**, 29(1): 3-10, 2003.

POTTER, G. A. & BUTLER, P. C. 3,4-methylenedioxy-substituted chalcones as therapeutic agents. UK **WO 03/028713**, 2003, 100 p.

PUI, C. H. Childhood leukemias. **N Engl J Med**, 332(24): 1618-30, 1995.

PUI, C. H. & EVANS, W. E. Acute lymphoblastic leukemia. **N Engl J Med**, 339(9): 605-15, 1998.

PUI, C. H., KANE, J. R. *et al.* Biology and treatment of infant leukemias. **Leukemia**, 9(5): 762-9, 1995.

RAM, V. J., SAXENA, A. S. *et al.* Oxygenated chalcones and bischalcones as potential antimalarial agents. **Bioorg Med Chem Lett**, 10(19): 2159-61, 2000.

RANI, P., SRIVASTAVA, V. K. *et al.* Synthesis and antiinflammatory activity of heterocyclic indole derivatives. **Eur J Med Chem**, 39(5): 449-52, 2004.

RAO, Y. K., FANG, S. H. *et al.* Differential effects of synthesized 2'-oxygenated chalcone derivatives: modulation of human cell cycle phase distribution. **Bioorg Med Chem**, 12(10): 2679-86, 2004.

REED, J. C. Mechanisms of apoptosis avoidance in cancer. **Curr Opin Oncol**, 11(1): 68-75, 1999.

REGULA, K. M., ENS, K. *et al.* Mitochondria-assisted cell suicide: a license to kill. **J Mol Cell Cardiol**, 35(6): 559-67, 2003.

RICHTER, C., SCHWEIZER, M. *et al.* Control of apoptosis by the cellular ATP level. **FEBS Lett**, 378(2): 107-10, 1996.

ROJAS, J., DOMINGUEZ, J. N. *et al.* Synthesis and inhibitory activity of dimethylamino-chalcone derivatives on the induction of nitric oxide synthase. **Eur J Med Chem**, 37(8): 699-705, 2002.

RUBNITZ, J. E., DOWNING, J. R. *et al.* TEL gene rearrangement in acute lymphoblastic leukemia: a new genetic marker with prognostic significance. **J Clin Oncol**, 15(3): 1150-7, 1997.

RUBNITZ, J. E., LINK, M. P. *et al.* Frequency and prognostic significance of HRX rearrangements in infant acute lymphoblastic leukemia: a Pediatric Oncology Group study. **Blood**, 84(2): 570-3, 1994.



SABZEVARI, O., GALATI, G. *et al.* Molecular cytotoxic mechanisms of anticancer hydroxychalcones. **Chem Biol Interact**, 148(1-2): 57-67, 2004.

SACKMANN-MURIEL, F., FELICE, M. S. *et al.* Treatment results in childhood acute lymphoblastic leukemia with a modified ALL-BFM'90 protocol: lack of improvement in high-risk group. **Leuk Res**, 23(4): 331-40, 1999.

SALE, S., TUNSTALL, R. G. *et al.* Effects of the potential chemopreventive agent DMU-135 on adenoma development in the ApcMin+ mouse. **Invest New Drugs**, 24(6): 459-64, 2006.

SAMBROOK, J & RUSSELL D. W. *Molecular Cloning: a laboratory manual*. 3 ed. New York: Cold Spring Harbor, 2001, Appendix 8 - Quantitation of nucleic acids, p. A8.19-21.

SANTOS-SILVA, M. C., FREITAS, M. S. *et al.* Involvement of NF-kappaB and glutathione in cytotoxic effects of nitric oxide and taxol on human leukemia cells. **Leuk Res**, 30(2): 145-52, 2006.

SANTOS, R. I. dos. Metabolismo básico e origem dos metabólitos secundários. In: SIMÕES, C. M. O.; *et al.* (orgs). **Farmacognosia: da planta ao medicamento**. 3 ed. Florianópolis: Editora Editora da UFSC, Porto Alegre: Editora da UFRGS, 2000. Cap 16. p. 323-54.

SAYDAM, G., AYDIN, H. H. *et al.* Cytotoxic and inhibitory effects of 4,4'-dihydroxy chalcone (RVC-588) on proliferation of human leukemic HL-60 cells. **Leuk Res**, 27(1): 57-64, 2003.

SCAMBIA, G., RANELLETTI, F. O. *et al.* Quercetin induces type-II estrogen-binding sites in estrogen-receptor-negative (MDA-MB231) and estrogen-receptor-positive (MCF-7) human breast-cancer cell lines. **Int J Cancer**, 54(3): 462-6, 1993.

SCHMITT, C. A., ROSENTHAL, C. T. *et al.* Genetic analysis of chemoresistance in primary murine lymphomas. **Nat Med**, 6(9): 1029-35, 2000.

SCHRAPPE, M., CAMITTA, B. *et al.* Long-term results of large prospective trials in childhood acute lymphoblastic leukemia. **Leukemia**, 14(12): 2193-4, 2000.

SCHWARTZ, M. A., ROSE, B. F. *et al.* Intramolecular Oxidative Coupling of Diphenolic, Monophenolic, and Nonphenolic Substrates. **Journal of the American Chemical Society**, 99(8): 2571-2578, 1977.

SECKER-WALKER, L. M., CRAIG, J. M. *et al.* Philadelphia positive acute lymphoblastic leukemia in adults: age distribution, BCR breakpoint and prognostic significance. **Leukemia**, 5(3): 196-9, 1991.

SEEGER, K., ADAMS, H. P. *et al.* TEL-AML1 fusion transcript in relapsed childhood acute lymphoblastic leukemia. The Berlin-Frankfurt-Munster Study Group. **Blood**, 91(5): 1716-22, 1998.

- SHIBATA, S. Anti-tumorigenic chalcones. **Stem Cells**, 12(1): 44-52, 1994.
- SIES, H. Oxidative stress: oxidants and antioxidants. **Experimental Physiology**, 82: 291-5, 1997.
- SIES, H. Glutathione and its role in cellular functions. **Free Radic Biol Med**, 27(9-10): 916-21, 1999.
- SOGAWA, S., NIHRO, Y. *et al.* 3,4-Dihydroxychalcones as potent 5-lipoxygenase and cyclooxygenase inhibitors. **J Med Chem**, 36(24): 3904-9, 1993.
- STREHLER, B. L. & TOTTER, J. R. Determination of ATP and related compounds: firefly luminescence and other methods. **Methods Biochem Anal**, 1: 341-56, 1954.
- SZCZEPANSKI, T., VAN DER VELDEN, V. H. *et al.* Classification systems for acute and chronic leukaemias. **Best Pract Res Clin Haematol**, 16(4): 561-82, 2003.
- TAKAHASHI, T., TAKASUKA, N. *et al.* Isoliquiritigenin, a flavonoid from licorice, reduces prostaglandin E2 and nitric oxide, causes apoptosis, and suppresses aberrant crypt foci development. **Cancer Sci**, 95(5): 448-53, 2004.
- TESTA, M. G. & MOLINEUX, G. **Haemopoiesis: a practical approach**. New York: Oxford University Press inc. 1993, 293p.
- TIETZE, F. Enzymic method for quantitative determination of nanogram amounts of total and oxidized glutathione: applications to mammalian blood and other tissues. **Anal Biochem**, 27(3): 502-22, 1969.
- VAN DE LOOSDRECHT, A. A., NENNIE, E. *et al.* Cell mediated cytotoxicity against U 937 cells by human monocytes and macrophages in a modified colorimetric MTT assay. A methodological study. **J Immunol Methods**, 141(1): 15-22, 1991.
- VIANA, M. B., MURAO, M. *et al.* Malnutrition as a prognostic factor in lymphoblastic leukaemia: a multivariate analysis. **Arch Dis Child**, 71(4): 304-10, 1994.
- VIELE, C. S. Diagnosis, Treatment, and Nursing Care of Acute Leukemia. **Seminars in Oncology Nursing**, 19(2): 98-108, 2003.
- VOUSDEN, K. H. p53: death star. **Cell**, 103(5): 691-4, 2000.
- WALKER, P. R., LEBLANC, J. *et al.* Detection of DNA fragmentation and endonucleases in apoptosis. **Methods**, 17(4): 329-38, 1999.
- WALLACE, K. B. & STARKOV, A. A. Mitochondrial targets of drug toxicity. **Annu Rev Pharmacol Toxicol**, 40: 353-88, 2000.
- WANG, I. K., LIN-SHIAU, S. Y. *et al.* Induction of apoptosis by apigenin and related flavonoids through cytochrome c release and activation of caspase-9 and caspase-3 in leukaemia HL-60 cells. **Eur J Cancer**, 35(10): 1517-25, 1999.

WATTANASIN, S. & MURPHY, W. S. An improved procedure for the preparation of chalcones and related enones. **Synthesis**, 8: 647-650, 1980.

WON, S. J., LIU, C. T. *et al.* Synthetic chalcones as potential anti-inflammatory and cancer chemopreventive agents. **Eur J Med Chem**, 40(1): 103-12, 2005.

XIA, Y., YANG, Z. Y. *et al.* Antitumor agents. Part 202: novel 2'-amino chalcones: design, synthesis and biological evaluation. **Bioorg Med Chem Lett**, 10(8): 699-701, 2000.

YAMAMOTO, S., AIZU, E. *et al.* The potent anti-tumor-promoting agent isoliquiritigenin. **Carcinogenesis**, 12(2): 317-23, 1991.

YANG, J., LIU, X. *et al.* Prevention of apoptosis by Bcl-2: release of cytochrome c from mitochondria blocked. **Science**, 275(5303): 1129-32, 1997.

ZAMZAMI, N., SUSIN, S. A. *et al.* Mitochondrial control of nuclear apoptosis. **J Exp Med**, 183(4): 1533-44, 1996.

ZHANG, L., YU, J. *et al.* Role of BAX in the apoptotic response to anticancer agents. **Science**, 290(5493): 989-92, 2000.

ZIMMERMANN, K. C., BONZON, C. *et al.* The machinery of programmed cell death. **Pharmacol Ther**, 92(1): 57-70, 2001.

ZUANAZZI, J. A. S. Flavonóides. In: SIMÕES, C. M. O.; *et al.* (orgs). **Farmacognosia: da planta ao medicamento**. 3 ed. Florianópolis: Editora Editora da UFSC, Porto Alegre: Editora da UFRGS, 2000. Cap 23. p. 489-516.

9.

ANEXOS

### 9.1 Trabalhos apresentados em congressos

SORGATO, Syntia; BONETTI, Aline N; CHIARADIA, Louise D; YUNES, Rosendo A.; NUNES, Ricardo José; SILVA, Maria Cláudia Santos; CRECZYNSKI-PASA, T. B. Citotoxic effect of synthetic chalcones on lymphoblastic leukemia cells L-1210. In: IV São Paulo Research Conference Cancer Today from Molecular Biology to Treatment, 2005, São Paulo. Applied Cancer Research, 2005. v. 1. p. 100-101.

SORGATO, Syntia; CHIARADIA, Louise Domeneguini; YUNES, Rosendo Augusto; NUNES, Ricardo José; SILVA, Maria Cláudia Santos da ; CRECZYNSKI-PASA, T. B. Different mechanisms of apoptosis induced by synthetic chalcones on lymphoblastic leukemia cells L1210. In: 58a. Reunião Anual da SBPC, 2006, Florianópolis. Anais da 58a. Reunião Anual da SBPC, 2006. v. 1. p. 52-52.

## 9.2 Artigo submetido

### Antitumoral activity of synthetic chalcones on L1210 leukemia cells

Louise Domeneghini Chiaradia<sup>a</sup>, Syntia Sorgato<sup>b</sup>, Paulo César Leal<sup>a</sup>, Maria Cláudia Santos Silva<sup>c</sup>, Ricardo José Nunes<sup>a</sup>, Tânia Beatriz Creczinsky Pasa<sup>b</sup> and Rosendo Augusto Yunes<sup>a</sup>

*Universidade Federal de Santa Catarina, <sup>a</sup>Departamento de Química e <sup>b</sup>Departamento de Ciências Farmacêuticas, Campus Trindade, CEP: 88040-900, Florianópolis, SC, Brasil.*

*Keywords:* chalcones, leukemia, antitumoral

Corresponding Author:

Prof. Dr. Rosendo Augusto Yunes

Universidade Federal de Santa Catarina

Centro de Ciências Físicas e Matemáticas

Departamento de Química

Campus Trindade

CEP: 88040-900, Florianópolis – SC, Brasil

Tel.: +55 48 3331-9759

Fax: +55 48 3331-6844

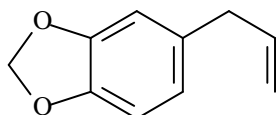
E-mail: ryunes@qmc.ufsc.br

#### ***1. Introduction***

Chalcones are essential intermediate compounds in the flavonoids biosynthesis, and they are easily found in arboreal or smaller plants. Many works have been demonstrated anti-inflammatory,<sup>1-12</sup> antinociceptive,<sup>13</sup> antioxidant<sup>1,14,15</sup> and antitumoral<sup>1,2,15-20</sup> activities for several chalcones, besides others pharmacological effects. Changes in chalcones molecules can result in different biological activities; rings bounded-group alterations can affect the pharmacological activities.

Nakatami *et al.* (2005) showed *C*-benzylated dihydrochalcones isolated from roots of *Uvaria acuminata* induced apoptosis in HL-60 cells.<sup>21</sup> Kobori *et al.* (1999) described that dihydrochalcone phloretin induced apoptosis of B16 mouse melanoma 4A5 and HL-60 human leukemia cell lines.<sup>22</sup> LeBlanc *et al.* (2005) synthesized twenty-six epoxide and corresponding pyrazole derivatives structurally related chalcones and tested for in vitro cytotoxicity against two murine cancer cell lines, B16 melanoma and L1210 leukemia, due to their planar conformations the pyrazoles were typically less active than the corresponding chalcones, which adopt angular conformations.<sup>23</sup>

The 3,4-methylenedioxybenzaldehyde (piperonal or 1,3-benzodioxol-5-carboxaldehyde) is an aldehyde derivative from safrole (Figure 1)<sup>24,25,26</sup> a recent example of natural active substance used as raw-material of hits for leads of new drugs. The safrole is one of the most abundant chemical components of Brazilian volatile oils, being 80% of the *Ocotea sp.* oil composition;<sup>25,26</sup> other natural sources include the Amazonian plants *Piper hispidenervium* e *P. callosum*, have in their composition 98% and 64% of safrole, respectively,<sup>27</sup> and also the Panamanian specie *P. auritum*, whose oils are composed of 70% safrole.<sup>28</sup> In Medicinal Chemistry, the presence of the 1,3-benzodioxolic subunit uphold to the compound as a double hydrogen acceptor, useful in the interaction with bioreceptors, promoting the natural product as a sinton of new hits of drugs.<sup>25</sup>



**Figure 1:** Safrole structure.

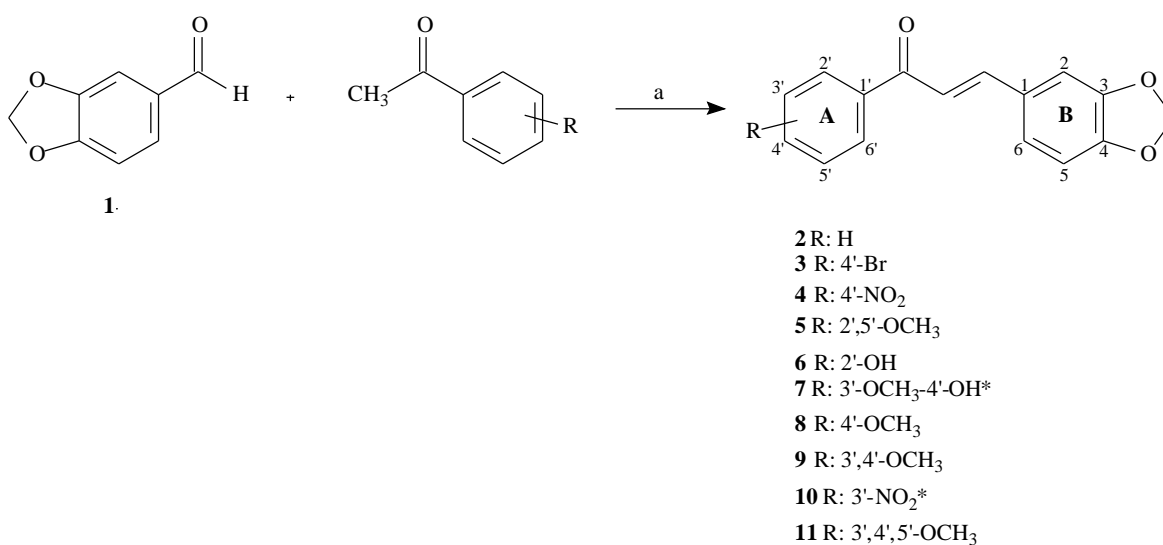
Chalcones derived from 3,4-methylenedioxybenzaldehyde, showed high cytotoxicity in cells MDA-468 (advanced breast cancer cell line) in comparison with low toxicity in MCF-10A (normal breast cell line).<sup>29</sup>

Thus, the objective of this work was to study the toxicity of ten synthetic chalcones chemically derived from 3,4- (metilenodioxibenzaldeide) in murine lymphoblastic leukemia cells L1210. The objective is based on the fact that tumor cells develop resistance to antineoplastic drugs, and multidrug resistance is one the major causes of chemotherapy failures by human malignances.<sup>30,31</sup> New drugs with increased efficacy and less adverse effects are necessary.

## 2. Results and discussion

### 2.1. Synthesis

Ten synthetic chalcones derived from 3,4-methylenedioxybenzaldehyde (**1**) was prepared as presented in Figure 2. This method provided the attainment of compounds substituted in the ring A.



**Figure 2:** Synthesis of chalcones derived from 3,4-methylenedioxybenzaldehyde (**1**). a) KOH 50% v/v, methanol, r.t., 24h (\* new compound).

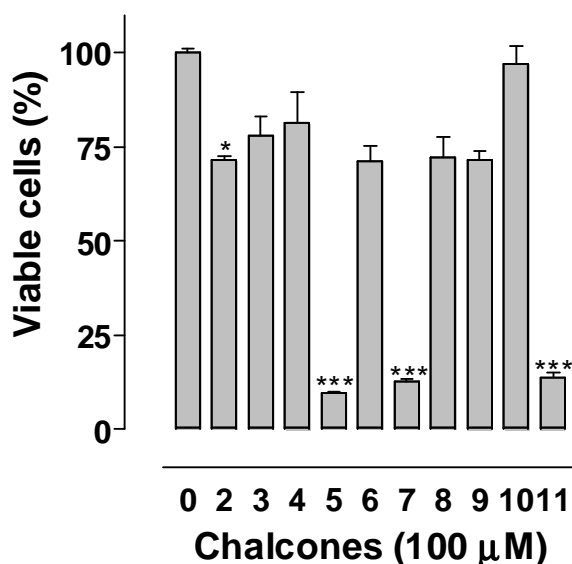
The compounds **3** and **9** presented experimental melting points different of those related in the literature, however, all the spectroscopic data, including the elementary analysis, confirmed the proposed structures for these two chalcones. The compounds **7** and **10** were not published yet, and their structures showed in this work were confirmed by chemical identification data. <sup>1</sup>H NMR spectra revealed that all the structures were geometrically pure and configured E ( $J_{\text{H}\alpha\text{-H}\beta} = 15,2\text{-}16$  Hz).

### 2.2. Biological Assays

The Figure 3 shows the toxicity of chalcones for L1210 cells. In this figure is possible to observe that 100  $\mu\text{M}$  of the compounds **5**, **7** e **11** strongly reduced the cells viability in  $90.5 \pm 1.2\%$ ,  $87.1 \pm 1.1\%$  and  $86.3 \pm 2.2\%$ , respectively, when compared with the control (non treated cells).



The chalcone **2** reduced the viable cells only in  $28.6 \pm 2.7\%$  when compared with the control, however, this compound was used to compare with others synthetic chalcones since it has a simple structure, and presents any group bound at A-ring. Chalcones **3**, **4**, **6**, **8** and **9** did not show effective cytotoxicity as well, they reduced the viable cells similarly to chalcone **2**, while chalcone **10** was not cytotoxicity et all (Figure 3).



**Figure 3: Toxicity of synthetic chalcones for murine L1210 lymphoblastic leukemia cells.** The compounds were incubated with the cells for 24h. The cell viability was monitored through MTT assay. Optical density of control groups (0) was taken as 100% of cell viability. The cell viability was checked in the beginning of experiment by Trypan Blue exclusion. Each point represents the mean  $\pm$  S.E.M. of three identical experiments. \* $P < 0.05$  and \*\*\* $P < 0.001$  compared to control groups, using ANOVA followed by Bonferroni's *t* test.

The groups  $\text{NO}_2$  and Br that decrease the electronic density of ring-A did not improve the toxicity for L1210 cells, these groups are present in chalcones **3**, **4** and **10**. The methoxy groups that increase the electronic density of the A-ring, present in the compounds **5**, **7**, **9** and **11**, seem to increase the cytotoxicity. However, chalcone **9**, which have two methoxy groups didn't present effectiveness in induce cell death. Chalcones **5** and **9** contain two methoxy groups at A-ring; nevertheless, in chalcone **5** the methoxy groups are in position *para* and chalcone **9** in position *orto* between its selves. Chalcone **7** have one methoxy and one hydroxyl groups in A-ring position *orto* between its selves and chalcone **11** contain three methoxy groups in position 3', 4' and 5'.

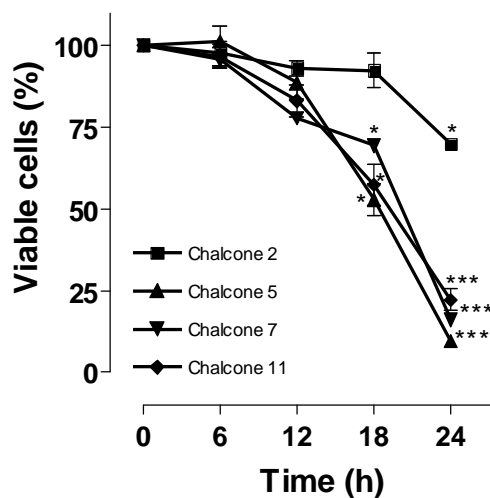
LeBlanc *et al.* (2005) compared the effect of a substitution in the A-ring of the structures related chalcones and showed that the compounds containing three methoxy groups were generally more active against B16 e L1210 cell lines than those containing only two

methoxy groups in the A-ring.<sup>23</sup> Comparing with our results, except chalcone **9**, the compounds with two or three methoxy groups in the A-ring (chalcones **5** and **11**) showed similar cytotoxicity.

Nakatami *et al.* (2005) showed that the toxicity of uvareitin and diuvaretin was stronger than that of isovauretin, the authors suggested that the 5'-substitution of the 2-hydroxybenzyl group increased the cytotoxicity.<sup>21</sup> Our results suggest that the substitution in the same position by methoxy group increased the cytotoxicity. The methoxy group in position 5' in the A-ring on chalcone **5**, and in position 3' in chalcones **7** and **11** are sterically in the same position (Figure 4). This fact suggests that the substitution at position 5' is important for activity, independent which group is binding. These two associated effects, density electronic increases and 5'-substitution seems to be the important to assure the cytotoxicity. Besides, chalcones with *log P* between 2.6 and 2.85 showed higher cytotoxic effects, with the exception of chalcone **9**.

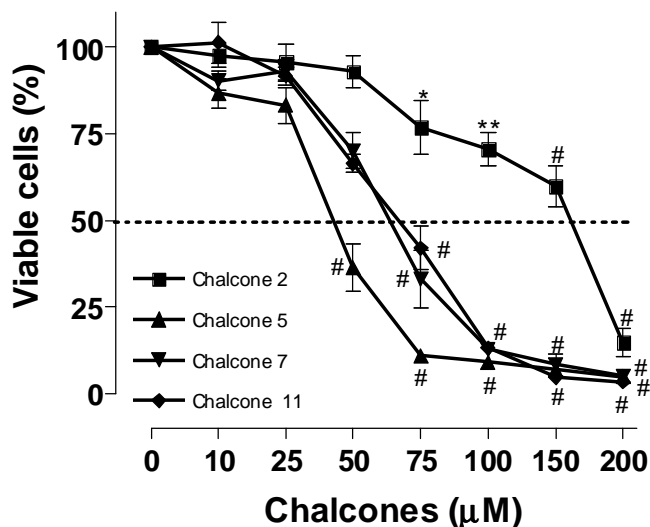
Compound **11**, called by Sale, S. *et al.* (2006) DMU-135 (3,4-methylenedioxy-3'-4'-5'-trimethoxy chalcone), was also tested by them, adding 0,2% in the diet mice. In this condition no systemic side-effects were observed, on the contrary, the modified diet reduced the mouse gastrointestinal adenoma multiplicity by  $46 \pm 18,3\%$  compared to controls.<sup>32</sup>

We investigated the cytotoxic effect of the compounds **5**, **7** and **11** in the time-response curve from 6 to 24 hours, comparing with compound **2** that was not effective killing tumor cells (Figure 3). In 18 hours of incubation at concentration of 100  $\mu\text{M}$  chalcones **2**, **5**, **7** and **11** began to induce significant cell death, however, as expected chalcone **2** did not (Figure 4).

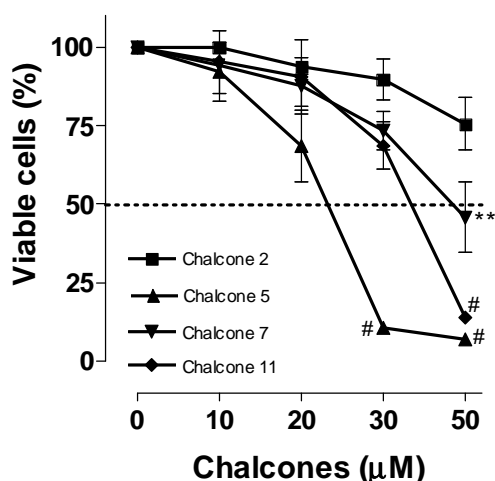


**Figure 4: Time-response of the activity of chalcones on murine L1210 lymphoblastic leukemia cells.** Cells were incubated with the compounds (100  $\mu$ M) for 6h, 12h, 18h and 24h and processed for MTT assay. Optical density of control groups (0) was taken as 100% of cell viability. Cell viability was checked in the beginning of experiment by Trypan Blue exclusion. Each point represents the mean  $\pm$  S.E.M. of three identical experiments. \* $P < 0.05$  and \*\*\* $P < 0.001$  compared to control groups, using ANOVA followed by Bonferroni's  $t$  test.

We also investigated the cytotoxic effect of the compounds **5**, **7** and **11** in the concentration-response curve in 24 and 48 hours. In 24 hours of incubation the concentration-response was analyzed and the  $IC_{50}$  value, which reduced the viable cell number by 50%, was determined from the eight-point concentration-response curve. The compounds **2**, **5**, **7** and **11** showed a concentration-dependent cell death in 24 hours (Figure 5). The  $IC_{50}$  value of the compounds **2**, **5**, **7** and **11** were 164, 45, 63 e 64  $\mu$ M, respectively. Compound **5** showed lower  $IC_{50}$  value in 24 hours, and compound **2** showed the higher  $IC_{50}$  value. In 48 hours, the concentration-response was analyzed and the  $IC_{50}$  value was determined from the five-point concentration-response curve, considering that the cell exposition time to the compounds was higher, smaller concentrations were used. The chalcones **5**, **7** and **11** showed the  $IC_{50}$  value 22, 38 and 37  $\mu$ M, respectively. The  $IC_{50}$  of chalcone **2** in 48 hours was not possible to determined, because this compound presented very low cytotoxicity and the maximum concentration tested in this condition was 50  $\mu$ M. Chalcones **5**, **7** and **11** decreased approximately the half of  $IC_{50}$  value when tested in 48 hours (Figure 6).



**Figure 5: Concentration-response in 24 hours of chalcones 2, 5, 7 and 11 on murine lymphoblastic leukemia L1210 cell line.** Cells,  $3 \times 10^6$ , were incubated with the compounds (10 - 200  $\mu\text{M}$ ) in triplicate for 24h, after that the cells were washed and processed for MTT assay. Optical density of control groups (0) was taken as 100% cell viability. Each bar represents the mean  $\pm$  S.E.M. of three identical experiments. \* $P < 0.05$ , \*\* $P < 0.01$  and # $P < 0.001$  compared to control groups, using ANOVA followed by Bonferroni's  $t$  test.



**Figure 6: Concentration-response in 48 hours of synthetic chalcones 2, 5, 7 and 11 on murine lymphoblastic leukemia L1210 cell line.** Cells,  $1.5 \times 10^5$ , were incubated with the compounds (10 - 50  $\mu\text{M}$ ) in triplicate for 48h, after that they were washed and processed for MTT assay. Optical density of control groups (0) was taken as 100% cell viability. Each bar represents the mean  $\pm$  S.E.M. of three identical experiments. \*\* $P < 0.01$  and # $P < 0.001$  compared to control groups, using ANOVA followed by Bonferroni's  $t$  test.

In the Figure 7 it is possible to observe the toxicity of the compounds **2**, **5**, **7** and **11** for VERO cells (normal cell line). The amount of cell death was  $25.1 \pm 4.0\%$ ,  $35.5 \pm 2.1\%$ ,  $41.7 \pm 1.7\%$  and  $47.8 \pm 2.5\%$  respectively, when compared with the control (100% of viable

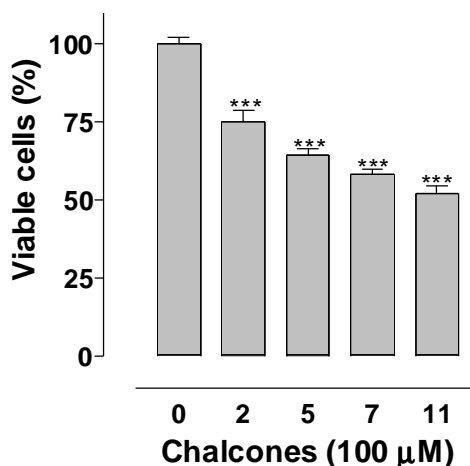
cells). Comparing the Figures 1 and 7 it is possible to observe that the cell viability for VERO cells was higher than that for L1210 cells. In table 1 we compared the cell viability of the chalcones **5**, **7** and **11** across both cell lines. Data showed that the compounds were much more toxic for the tumor cell line, with P value extremely significant.

**Table 1: Comparison of the cellular viability across L1210 (leukemia cell) and VERO (normal cell line) cells.**

Chalcone	L1210 (Viable cells, % of control)	VERO (Viable cells, % of control)	P value
<b>5</b>	9.5 ± 1.2	64.5 ± 2.1	< 0.0001
<b>7</b>	12.9 ± 1.1	58.3 ± 1.7	< 0.0001
<b>11</b>	13.7 ± 2.2	52.2 ± 2.5	= 0.0002

\* Cells were incubated with compounds (100 µM) in triplicate for 24 h, after that the cells were washed and processed for MTT assay. Control group was taken as 100% of cell viability for L1210 and VERO cell line. P value was determinate using Student *t* test.

In summary, we have synthesized ten chalcones derived from 3,4-methylenedioxybenzaldehyde and showed compounds **5**, **7** and **11** were cytotoxic for L1210 cells. Compound **5** showed the lower IC<sub>50</sub> value in 24 hours and 48 hours, 45 and 22 µM, respectively. In addition the chalcones **7** and **10** didn't publish until this moment.



**Figure 7: Citotoxic effect of synthetic chalcones on VERO cells (normal cell line).** Compounds were added to cells, left for 24 h, washed and cells were processed for MTT assay. Optical density of control groups (0) was taken as 100% cell viability. Cell viability was checked in the beginning of experiment by Trypan Blue exclusion. Each point represents the mean ± S.E.M. of three identical experiments. \*\*\* P < 0,001 compared to control groups, using ANOVA followed by Bonferroni's *t* test.

### 3. Experimental

#### 3.1. Synthesis

The compounds were synthesized as presented in Figure 2. All reagents used were obtained commercially (Merck, Sigma-Aldrich). The substituted chalcones (**2-11**) were prepared by magnetic agitation of 3,4-methylenedioxybenzaldehyde (**1**) (1.50 g; 10 mmol), methanol (30 mL), KOH 50% v/v (5 mL) and the corresponding acetophenone (10 mmol), at room temperature for 24 hours. Was added distilled water and chloride acid 10% in the reaction to the total precipitation of the compounds that were obtained by vacuum filtration and later recrystallized in dichloromethano and hexane. The chalcones **2**, **3**, **4**, **6**, **8** and **9** were previously cited, respectively, for Li and col.,<sup>33</sup> Pathak and col.,<sup>34</sup> Ariyan and Suschitzky,<sup>35</sup> Casanova,<sup>36</sup> Schwartz and col.<sup>37</sup> and for Wattanasin e Murphy.<sup>38</sup> The compounds **5** and **11** were described for Potter and Butler,<sup>29</sup> and the structures **7** and **10** were not published yet.

#### 3.2. Physico-chemical data of synthesized compounds

The purified chalcones were obtained in yields between 40% and 88%. The structures were identified using melting points (m.p.), infrared spectroscopy (IR), <sup>1</sup>H and <sup>13</sup>C nuclear magnetic resonance spectroscopy (NMR), and to the unpublished, also elementary analyses. Melting points were determined with a Microquímica MGAPF-301 apparatus and are uncorrected. IR spectra were recorded with a Abb Bomen FTLA 2000 spectrometer on KBr disks. NMR (<sup>1</sup>H and <sup>13</sup>C NMR) were recorded on Bruker Ac-200F (200 MHz) or Varian Oxford AS-400 (400 MHz), using tetramethylsilane as an internal standard. Elementary analyses were obtained on a CHNS EA 1110. Percentages of C and H were in agreement with the product formula (within  $\pm 0.4\%$  of theoretical values to C). The purity of the synthesized chalcones was analyzed by thin-layer chromatography (TLC) using Merck silica pre-coated aluminum plates 200  $\mu\text{m}$  in thickness with several solvent systems of different polarities. Compounds were visualized with ultraviolet light ( $\lambda = 254$  e  $360$  nm) and using sulfuric anisaldehyde solution followed by heat as developing agent and purified by recrystallization from hexane and dichloromethane. <sup>1</sup>H NMR spectra revealed that all the structures were geometrically pure and configured E ( $J_{\text{H}\alpha\text{-H}\beta} = 15,2\text{-}16$  Hz). The  $\log P$  of the chalcones were obtained by HyperChem<sup>TM</sup> program, Release 6.01 for Windows, Copyright © 2000 Hypercube, Inc.

**Compound 2: (2E)-3-(1,3-BENZODIOXOL-5-YL)-1-PHENIL-2-PROPEN-1-ONE.**

$C_{16}H_{12}O_3$ , yellow light solid, m.p.: 115-117 °C (lit. m.p.: 117 °C)<sup>24</sup>; IV  $\nu_{\max}/\text{cm}^{-1}$  1658, 1215 (C=O), 1589 (C=C), 1254, 1020 (C-O), 3070, 2940, 1603, 1501, 1488, 1448, 1105, 919, 776, 699 (Ar) (KBr).  $^1\text{H}$  NMR ( $\text{CDCl}_3$ )  $\delta$  6.03 (s, 2H,  $-\text{OCH}_2\text{O}-$ ), 6.85 (d, 1H,  $J = 8.00$  Hz, H5), 7.13 (d, 1H,  $J = 8.00$  Hz, H6), 7.17 (s, 1H, H2), 7.37 (d, 1H,  $J = 15.6$  Hz, H $\alpha$ ), 7.48-7.58 (m, 3H, H3', H4', H5'), 7.74 (d, 1H,  $J = 15.6$  Hz, H $\beta$ ), 8.00 (d, 2H,  $J = 6.8$  Hz, H2', H6').  $^{13}\text{C}$  NMR ( $\text{CDCl}_3$ )  $\delta$  101.88 ( $-\text{OCH}_2\text{O}-$ ), 106.89 (C2), 108.91 (C5), 120.33 (C6), 125.49 (C $\alpha$ ), 128.65-128.83 (C2', C3', C5', C6'), 129.59 (C1), 132.88 (C4'), 138.63 (C1'), 144.92 (C $\beta$ ), 148.65-150.16 (C3, C4), 190.63 (C=O).  $\log P$ : 3.36. Yield = 66%.

**Compound 3: (2E)-3-(1,3-BENZODIOXOL-5-YL)-1-(4'-BROMO-PHENIL)-2-PROPEN-1-ONE.**

$C_{16}H_{11}BrO_3$ , yellow light solid, m.p.: 137-139 °C (lit. m.p.: 111-113 °C)<sup>144</sup>; IV  $\nu_{\max}/\text{cm}^{-1}$  1657, 1215 (C=O), 1593 (C=C), 1251, 1028 (C-O), 2881, 2750, 1517, 1494, 1447, 1396, 1098, 985, 938, 799 (Ar) (KBr).  $^1\text{H}$  NMR ( $\text{CDCl}_3$ )  $\delta$  6.05 (s, 2H,  $-\text{OCH}_2\text{O}-$ ), 6.85 (d, 1H,  $J = 8.00$  Hz, H5), 7.12 (d, 1H,  $J = 8.00$  Hz, H6), 7.16 (s, 1H, H2), 7.30 (d, 1H,  $J = 15.6$  Hz, H $\alpha$ ), 7.63 (d, 2H,  $J = 6.8$  Hz, H3', H5'), 7.74 (d, 1H,  $J = 15.6$  Hz, H $\beta$ ), 7.87 (d, 2H,  $J = 6.8$  Hz, H2', H6').  $^{13}\text{C}$  NMR ( $\text{CDCl}_3$ )  $\delta$  101.94 ( $-\text{OCH}_2\text{O}-$ ), 106.88 (C2), 108.94 (C5), 119.65 (C6), 125.69 (C $\alpha$ ), 127.95 (C1), 129.38 (C4'), 130.77 (C2', C6'), 132.11 (C3', C5'), 137.33 (C1'), 145.48 (C $\beta$ ), 148.69-150.35 (C3, C4), 189.40 (C=O). Anal. Calcd for  $C_{17}H_{14}O_5$ : C, 58.03; H, 3.35; found: C, 57.94; H, 3.66.  $\log P$ : 4.15. Yield = 76%.

**Compound 4: (2E)-3-(1,3-BENZODIOXOL-5-YL)-1-(4'-NITRO-PHENIL)-2-PROPEN-1-ONE.**

$C_{16}H_{11}NO_5$ , yellow solid, (1,498 g); m.p.: 200-202 °C (lit. m.p.: 206 °C)<sup>145</sup>; IV  $\nu_{\max}/\text{cm}^{-1}$  1656, 1212 (C=O), 1579 (C=C), 1250, 1035 (C-O), 1522, 1343, 847 (N=O), 3115, 2913, 1600, 1496, 1451, 1107, 1010, 928, 806 (Ar) (KBr).  $^1\text{H}$  NMR ( $\text{CDCl}_3$ )  $\delta$  6.05 (s, 2H,  $-\text{OCH}_2\text{O}-$ ), 6.87 (d, 1H,  $J = 8.00$  Hz, H5), 7.15 (d, 1H,  $J = 8.00$  Hz, H6), 7.18 (s, 1H, H2), 7.31 (d, 1H,  $J = 15.6$  Hz, H $\alpha$ ), 7.77 (d, 1H,  $J = 15.6$  Hz, H $\beta$ ), 8.13 (d, 2H,  $J = 8.0$  Hz, H2', H6'), 8.35 (d, 2H,  $J = 8.0$  Hz, H3', H5').  $^{13}\text{C}$  NMR ( $\text{CDCl}_3$ )  $\delta$  102.06 ( $-\text{OCH}_2\text{O}-$ ), 106.91 (C2), 109.05 (C5), 119.47 (C6), 124.07 (C3', C5'), 126.21 (C $\alpha$ ), 129.02 (C1), 129.54 (C2', C6'), 143.54 (C4'), 146.91 (C1', C $\beta$ ), 148.82-150.52 (C3, C4), 189.06 (C=O).  $\log P$ : 3.31. Yield = 85%.

**Compound 5: (2E)-3-(1,3-BENZODIOXOL-5-YL)-1-(2',5'-DIMETHOXY-PHENIL)-2-PROPEN-1-ONE.**

$C_{18}H_{16}O_5$ , yellow light solid, m.p.: 96-98 °C (lit. m.p.: 101 °C)<sup>62</sup>; IV  $\nu_{\max}/\text{cm}^{-1}$  1652 (C=O), 1581 (C=C), 1246, 1223, 1042, 1027 (C-O), 2992, 2834, 1602, 1491, 1445, 1412, 1100, 975, 834, 726 (Ar) (KBr).  $^1\text{H}$  NMR ( $\text{CDCl}_3$ )  $\delta$  3.80 (s, 3H,  $o\text{-OCH}_3$ ), 3.85 (s, 3H,  $m\text{-OCH}_3$ ), 6.00 (s, 2H,  $-\text{OCH}_2\text{O}-$ ), 6.81 (d, 1H,  $J = 8.00$  Hz, H5), 6.93 (d, 1H,  $J = 8.00$  Hz, H6), 7.01-7.03 (d, 1H,  $J = 8.00$  Hz, H3'), 7.05-7.07 (d, 1H,  $J = 8.00$  Hz, H4'), 7.10 (s, 1H, H6'), 7.17 (s, 1H, H2), 7.24 (d, 1H,  $J = 16.0$  Hz, H $\alpha$ ), 7.56 (d, 1H,  $J = 16.0$  Hz, H $\beta$ ).  $^{13}\text{C}$  NMR ( $\text{CDCl}_3$ )  $\delta$  56.08 ( $o\text{-OCH}_3$ ), 56.74 ( $m\text{-OCH}_3$ ), 101.79 ( $-\text{OCH}_2\text{O}-$ ), 106.91 (C2), 108.84 (C5), 113.61 (C6'), 114.64 (C3'), 119.20 (C6), 125.29-125.32 (C1', C4'), 129.83 (C $\alpha$ ), 130.08 (C1), 143.48 (C $\beta$ ), 148.55-149.92 (C3, C4), 152.70-153.84 (C2', C5'), 192.55 (C=O).  $\log P$ : 2.85. Yield = 74%.

**Compound 6: (2E)-3-(1,3-BENZODIOXOL-5-YL)-1-(2'-HIDROXY-PHENIL)-2-PROPEN-1-ONE.**

$C_{16}H_{12}O_4$ , yellow solid, m.p.: 135-137 °C (lit. m.p.: 140 °C)<sup>146</sup>; IV  $\nu_{\max}/\text{cm}^{-1}$  3440 (OH), 1640, 1203 (C=O), 1570 (C=C), 1242, 1038 (C-O), 3076, 2925, 1619, 1502, 1491, 1440, 1098, 977, 826, 760 (Ar) (KBr).  $^1\text{H}$  NMR ( $\text{CDCl}_3$ )  $\delta$  6.04 (s, 2H,  $-\text{OCH}_2\text{O}-$

), 6.85-7.03 (m, 4H, H5, H6, H5', H6'), 7.18 (s, 1H, H2), 7.49 (d, 2H,  $J = 15.2$  Hz, H $\alpha$ , H4'), 7.85 (d, 1H,  $J = 15.2$  Hz, H $\beta$ ), 7.91 (d, 1H, H3'), 12.87 (s, 1H, OH).  $^{13}\text{C}$  NMR ( $\text{CDCl}_3$ )  $\delta$  101.99 (-OCH<sub>2</sub>O-), 106.98 (C2), 109.00 (C5), 118.24 (C3'), 118.85 (C6), 119.03 (C1'), 120.31 (C5'), 125.99 (C6'), 129.32 (C1), 129.76 (C $\alpha$ ), 136.47 (C4'), 145.58 (C $\beta$ ), 148.75-150.54 (C3, C4), 163.79 (C2'), 193.79 (C=O).  $\log P$ : 3.08. Yield = 62%.

**Compound 7: (2E)-3-(1,3-BENZODIOXOL-5-YL)-1-(3'-METHOXY-4-HIDROXY-PHENIL)-2-PROPEN-1-ONE.** C<sub>17</sub>H<sub>14</sub>O<sub>5</sub>, yellow solid, m.p.: 134-136 °C; IV  $\nu_{\text{max}}/\text{cm}^{-1}$  3216 (OH), 1643, 1215 (C=O), 1568 (C=C), 1254, 1032 (C-O), 3088, 2900, 1602, 1500, 1447, 1427, 1102, 975, 931, 801 (Ar) (KBr).  $^1\text{H}$  NMR ( $\text{CDCl}_3$ )  $\delta$  3.97 (s, 3H, OCH<sub>3</sub>), 6.02 (s, 2H, -OCH<sub>2</sub>O-), 6.26 (s, 1 H, OH), 6.84 (d, 1H,  $J = 8.00$  Hz, H5), 6.99 (d, 1H,  $J = 8.00$  Hz, H6), 7.12 (d, 1H,  $J = 8.00$  Hz, H6'), 7.17 (s, 1H, H2), 7.39 (d, 1H,  $J = 15.6$  Hz, H $\alpha$ ), 7.62 (s, 1H, H2'), 7.63 (d, 1H,  $J = 8.00$  Hz, H5'), 7.73 (d, 1H,  $J = 15.6$  Hz, H $\beta$ ).  $^{13}\text{C}$  NMR ( $\text{CDCl}_3$ )  $\delta$  56.37 (OCH<sub>3</sub>), 101.85 (-OCH<sub>2</sub>O-), 106.84 (C2), 108.89 (C5), 110.67 (C2'), 114.03 (C5'), 119.82 (C6), 123.77 (C6'), 125.32 (C $\alpha$ ), 129.74 (C1), 131.37 (C1'), 144.08 (C $\beta$ ), 147.09-148.59 (C3, C4), 149.97 (C4'), 150.52 (C3'), 188.66 (C=O). Anal. Calcd for C<sub>17</sub>H<sub>14</sub>O<sub>5</sub>: C, 68.45; H, 4.73; found: C, 68.18; H, 5.23.  $\log P$ : 2.82. Yield = 47%.

**Compound 8: (2E)-3-(1,3-BENZODIOXOL-5-YL)-1-(4'-METHOXY-PHENIL)-2-PROPEN-1-ONE.** C<sub>17</sub>H<sub>14</sub>O<sub>4</sub>, yellow light solid, m.p.: 131-132 °C (lit. m.p.: 134-135 °C)<sup>147</sup>; IV  $\nu_{\text{max}}/\text{cm}^{-1}$  1652, 1219 (C=O), 1582 (C=C), 1243, 1219, 1036, 1021 (C-O), 2945, 2903, 1600, 1499, 1442, 1419, 1098, 993, 929, 812 (Ar) (KBr).  $^1\text{H}$  NMR ( $\text{CDCl}_3$ )  $\delta$  3.87 (s, 3H, OCH<sub>3</sub>), 6.01 (s, 2H, -OCH<sub>2</sub>O-), 6.84 (d, 1H, H5), 6.97 (d, 2H,  $J = 7.6$  Hz, H3', H5'), 7.01 (d, 1H, H6), 7.16 (s, 1H, H2), 7.40 (d, 1H,  $J = 16.0$  Hz, H $\alpha$ ), 7.70 (d, 1H,  $J = 16.0$  Hz, H $\beta$ ), 8.02 (d, 2H,  $J = 7.6$  Hz, H2', H6').  $^{13}\text{C}$  NMR ( $\text{CDCl}_3$ )  $\delta$  55.73 (OCH<sub>3</sub>), 101.84 (-OCH<sub>2</sub>O-), 106.83 (C2), 108.87 (C5), 114.03 (C3', C5'), 120.04 (C6), 125.30 (C $\alpha$ ), 129.74 (C1'), 130.95 (C2', C6'), 131.44 (C1), 144.04 (C $\beta$ ), 148.59-149.96 (C3, C4), 163.54 (C4'), 188.78 (C=O).  $\log P$ : 3.11. Yield = 77%.

**Compound 9: (2E)-3-(1,3-BENZODIOXOL-5-YL)-1-(3',4'-DIMETHOXY-PHENIL)-2-PROPEN-1-ONE.** C<sub>18</sub>H<sub>16</sub>O<sub>5</sub>, yellow light solid, m.p.: 126-128 °C (lit. m.p.: 143-144 °C)<sup>148</sup>; IV  $\nu_{\text{max}}/\text{cm}^{-1}$  1656 (C=O), 1581 (C=C), 1261, 1248, 1040, 1025 (C-O), 3015, 2886, 1595, 1499, 1464, 1413, 1096, 992, 932, 791 (Ar) (KBr).  $^1\text{H}$  NMR ( $\text{CDCl}_3$ )  $\delta$  3.96 (s, 3H, OCH<sub>3</sub>), 3.97 (s, 3H, OCH<sub>3</sub>), 6.02 (s, 2H, -OCH<sub>2</sub>O-), 6.84 (d, 1H,  $J = 8.4$  Hz, H5), 6.92 (d, 1H,  $J = 8.4$  Hz, H6), 7.12 (d, 1H,  $J = 7.6$  Hz, H6'), 7.17 (s, 1H, H2), 7.39 (d, 1H,  $J = 15.6$  Hz, H $\alpha$ ), 7.61 (s, 1H, H2'), 7.66 (d, 1H,  $J = 7.6$  Hz, H5'), 7.73 (d, 1H,  $J = 15.6$  Hz, H $\beta$ ).  $^{13}\text{C}$  NMR ( $\text{CDCl}_3$ )  $\delta$  56.28 (OCH<sub>3</sub>), 101.85 (-OCH<sub>2</sub>O-), 106.81 (C2), 108.88 (C5), 110.15 (C5'), 110.90 (C2'), 119.81 (C6), 123.11 (C6'), 125.34 (C $\alpha$ ), 129.71 (C1), 131.64 (C1'), 144.08 (C $\beta$ ), 148.58-149.97 (C3, C4), 149.39 (C3'), 153.35 (C4'), 188.69 (C=O). Anal. Calcd for C<sub>18</sub>H<sub>16</sub>O<sub>5</sub>: C, 69.22; H, 5.16; found: C, 69.29; H, 5.56.  $\log P$ : 2.85. Yield = 72%.

**Compound 10: (2E)-3-(1,3-BENZODIOXOL-5-YL)-1-(3'-NITRO-PHENIL)-2-PROPEN-1-ONE.** C<sub>16</sub>H<sub>11</sub>NO<sub>5</sub>, brown solid, m.p.: 144-146 °C; IV  $\nu_{\text{max}}/\text{cm}^{-1}$  1661, 1211 (C=O), 1588 (C=C), 1248, 1036 (C-O), 1527, 1347, 850 (N=O), 3040, 2900, 1609, 1503, 1489, 1446, 1102, 927, 808, 700 (Ar) (KBr).  $^1\text{H}$  NMR ( $\text{CDCl}_3$ )  $\delta$  6.05 (s, 2H, -OCH<sub>2</sub>O-), 6.86 (d, 1H,  $J = 8.0$  Hz, H5), 7.15 (d, 1H,  $J = 8.0$  Hz, H6), 7.19 (s, 1H, H2), 7.36 (d, 1H,  $J = 15.2$  Hz, H $\alpha$ ), 7.70 (m, 1H, H5'), 7.81 (d, 1H,  $J = 15.2$  Hz, H $\beta$ ), 8.33 (d, 1H,  $J = 8.0$  Hz, H6'), 8.43 (d, 1H,  $J = 8.0$  Hz, H4'), 8.81 (s, 1H, H2').  $^{13}\text{C}$  NMR ( $\text{CDCl}_3$ )  $\delta$  102.06 (-OCH<sub>2</sub>O-), 107.00 (C2), 109.02 (C5), 118.80 (C6), 123.40 (C $\alpha$ ), 126.18 (C6'), 127.15 (C1), 129.02 (C4'), 130.09



(C5'), 134.26 (C2'), 139.93 (C1'), 146.85 (C $\beta$ ), 148.62 (C3'), 148.79-150.77 (C3, C4), 188.06 (C=O). Anal. Calcd for C<sub>16</sub>H<sub>11</sub>NO<sub>5</sub>: C, 64.65; H, 3.73; N, 4.71; found: C, 65.02; H, 4.35; N, 4.99.  $\log P$ : 3.31. Yield = 40%.

**Compound 11:** (2*E*)-3-(1,3-BENZODIOXOL-5-YL)-1-(3',4',5'-TRIMETHOXY-PHENIL)-2-PROPEN-1-ONE. C<sub>19</sub>H<sub>18</sub>O<sub>6</sub>, yellow light solid, m.p.: 133-134°C (lit. m.p.: 135 °C)<sup>62</sup>; IV  $\nu_{\max}/\text{cm}^{-1}$  1651, 1227 (C=O), 1572 (C=C), 1261, 1244, 1067, 1039 (C-O), 2900, 2960, 1501, 1447, 1410, 992, 933, 834, 804 (Ar) (KBr). <sup>1</sup>H NMR (CDCl<sub>3</sub>)  $\delta$  3.91 (s, 3H, OCH<sub>3</sub>), 3.92 (s, 3H, OCH<sub>3</sub>), 3.93 (s, 3H, OCH<sub>3</sub>), 6.00 (s, 2H, -OCH<sub>2</sub>O-), 6.82 (d, 1H, *J* = 8.0 Hz, H5), 7.10 (d, 1H, *J* = 8.0 Hz, H6), 7.15 (s, 1H, H2), 7.24 (s, 2H, H2', H6'), 7.30 (d, 1H, *J* = 15.6 Hz, H $\alpha$ ), 7.72 (d, 1H, *J* = 15.6 Hz, H $\beta$ ). <sup>13</sup>C NMR (CDCl<sub>3</sub>)  $\delta$  56.58 (*m*-OCH<sub>3</sub>), 61.21 (*p*-OCH<sub>3</sub>), 101.91 (-OCH<sub>2</sub>O-), 106.11 (C2), 106.11-106.84 (C2', C6'), 108.91 (C5), 119.86 (C6), 125.53 (C $\alpha$ ), 129.54 (C1), 133.91 (C1'), 142.49 (C4'), 144.83 (C $\beta$ ), 148.62-150.15 (C3, C4), 153.33 (C3', C5'), 189.26 (C=O).  $\log P$ : 2.60. Yield = 88%.

### 3. Biological Assays

#### 3.3.2. Reagents

Tissue culture media and fetal bovine serum were purchased from CULTILAB (São Paulo, Brazil), penicillin/streptomycin were purchased from GIBCO (Grand Island, NY), isopropanol were purchased from Merck (Darmstadt, Germany), 3-[4,5-Dimethylthiazol-2-yl]-2,5-diphenyltetrazolium bromide (MTT) and N-[2-Hydroxyethyl]piperazine-N'-2-ethanesulfonic acid (HEPES) were purchased from Sigma (St. Louis, MO, USA).

#### 3.3.3. Cell lines, Cell Culture

Murine L1210 lymphoblastic leukemia cells were obtained from American Type Culture Cell (ATCC) and VERO cells were obtained from Associação Técnico Científica Paul Ehrlich (APABCAM, Rio de Janeiro, Brazil). The cells were cultured in DMEM supplemented with 10% heat-inactivated fetal bovine serum, 100 U/mL penicillin, 100  $\mu\text{g/mL}$  streptomycin and 10 mM HEPES. The cell cultures were maintained at 37°C in a 5% CO<sub>2</sub> humidified atmosphere and pH 7.4. In all experiments, viable cells were checked in the beginning of experiment by Trypan Blue exclusion.

#### 3.3.4. Citotoxicity

The citotoxic effect of synthetic chalconas was evaluated using a MTT assay.<sup>39</sup> Briefly, 3 x 10<sup>5</sup> cells/well were incubated in triplicate with compounds dissolved in DMSO and diluted with medium culture to their final concentrations (10 - 200  $\mu\text{M}$ ) in microplates 96-well. After the incubation time at 37°C, the cells were washed with new medium culture and 10  $\mu\text{l}$  MTT (5mg/mL) was added followed by 3 h incubation at 37°C. The precipitated formazan was dissolved in 100  $\mu\text{l}$  acid

isopropanol solution (isopropanol containing HCL 0.04 N) and the absorbance was measured at 540 nm using microwell system reader (Organon Teknika, Belgium).

For time-response curve,  $3 \times 10^5$  cells were incubated with synthetic chalcones at concentration 100  $\mu$ M for 6, 12, 18 and 24 hours following with MTT assay.

For concentration-response curves, the cells,  $3 \times 10^5$ , were incubated with synthetic chalcones at concentration range of 10 to 200  $\mu$ M for 24h and  $1.5 \times 10^5$  cells were incubated for 48h at concentration 10 to 50  $\mu$ M following with MTT assay. The IC<sub>50</sub> value (a concentration produces 50% reduction in the viable cell number) was calculated from the concentration-response curves.

### 3.3.5. Statistical analysis

The results are presented as mean  $\pm$  S.E.M. of triplicates from three independent experiments. Statistical significance was assessed by ANOVA followed by Bonferroni's *t*-test, and  $P < 0.05$  was taken as statistically significant.

## 4. References

1. Dimmock, J. R.; Elias, D. W.; Beazely, M. A.; Kandepu, N. M. *Curr Med Chem.* **1999**, *6*, 1125-1149.
2. Won, S. J.; Liu, C. T.; Tsao, L. T.; Weng, J. R.; Ko, H. H.; Wang, J. P.; Lin, C. N. *Eur J Med Chem.* **2005**, *40* (1), 103-112.
3. Ko, H. H.; Tsao, L. Y.; Yu, K. L.; Liu, C. T.; Wang, J. P.; Lin, C. N. *Bioorg Med Chem.* **2003**, *11*, 105-111.
4. Herencia, F.; Ferrandiz, M. L.; Ubeda, A.; Dominguez, J. N.; Charris, J. E.; Lobo, G. M.; Alcaraz, M. J. *Bioorg Med Chem Lett.* **1998**, *8* (10), 1169-1174.
5. Meng, C. Q.; Zheng, X. S.; Ni, L.; Ye, Z.; Simpson, J. E.; Worsencroft, K. J.; Hotema, M. R.; Weingarten, M. D.; Skudlarek, J. W.; Gilmore, J. M.; Hoong, L. K.; Hill, R. R.; Marino, E. M.; Suen, K. L.; Kunsch, C.; Wasserman, M. A.; Sikorski, J. A. *Bioorg Med Chem Lett.* **2004**, *14* (6), 1513-1517.
6. Deshpande, A. M.; Argade, N. P.; Natu, A. A.; Eckman, J. *Bioorg Med Chem.* **1999**, *7* (6), 1237-1240.
7. Rani, P.; Srivastava, V. K.; Kumar, A. *Eur J Med Chem.* **2004**, *39* (5), 449-452.
8. Sogawa, S.; Nihro, Y.; Ueda, H.; Izumi, A.; Miki, T.; Matsumoto, H.; Satoh, T. *J Med Chem.* **1993**, *36* (24), 3904-3909.
9. Batt, D. G.; Goodman, R.; Jones, D. G.; Kerr, J. S.; Mantegna, L. R.; McAllister, C.; Newton, R. C.; Nurnberg, S.; Welch, P. K.; Covington, M. B. *J Med Chem.* **1993**, *36* (10), 1434-1442.
10. Herencia, F.; Ferrandiz, M. L.; Ubeda, A.; Guillen, I.; Dominguez, J. N.; Charris, J. E.; Lobo, G. M.; Alcaraz, M. J. *FEBS Lett.* **1999**, *453* (1-2), 129-134.

11. Herencia, F.; Lopez-Garcia, M. P.; Ubeda, A.; Ferrandiz, M. L. Nitric Oxide. **2002**, *6* (2), 242-246.
12. Rojas, J.; Dominguez, J. N.; Charris, J. E.; Lobo, G.; Paya, M.; Ferrandiz, M. L. *Eur J Med Chem.* **2002**, *37* (8), 699-705.
13. Correa, R.; Pereira, M. A.; Buffon, D.; dos Santos, L.; Cechinel Filho, V.; Santos, A. R.; Nunes, R. J. *Arch Pharm.* **2001**, *334* (10), 332-334.
14. Anto, R. J.; Sukumaran, K.; Kuttan, G.; Rao, M. N.; Subbaraju, V.; Kuttan, R. *Cancer Lett.* **1995**, *97* (1), 33-37.
15. Mukherjee, S.; Kumar, V.; Prasad, A. K.; Raj, H. G.; Bracke, M. E.; Olsen, C. E.; Jain, S. C.; Parmar, V. S. *Bioorg Med Chem.* **2001**, *9* (2), 337-345.
16. Nam, N. H.; Kim, Y.; You, Y. J.; Hong, D. H.; Kim, H. M.; Ahn, B. Z. *Eur J Med Chem.* **2003**, *38* (2), 179-187.
17. Rao, Y. K.; Fang, S. H.; Tzeng, Y. M. *Bioorg Med Chem.* **2004**, *12* (10), 2679-2686.
18. Xia, Y.; Yang, Z. Y.; Xia, P.; Bastow, K. F.; Nakanishi, Y.; Lee, K. H. *Bioorg Med Chem Lett.* **2000**, *10* (8), 699-701.
19. Shibata, S. *Stem Cells.* **1994**, *12* (1), 44-52.
20. Yamamoto, S.; Aizu, E.; Jiang, H.; Nakadate, T.; Kiyoto, I.; Wang, J. C.; Kato, R. *Carcinogenesis.* **1991**, *12* (2), 317-23.
21. Nakatani, N.; Ichimaru, M.; Moriyasu, M.; Kato A. *Biol Pharm Bull.* **2005**, *28* (1), 83-86.
22. Kobori, M.; Iwashita, K.; Shinmoto, H.; Tsushida, T. *Biosci Biotechnol Biochem.* **1999**, *63* (4), 719-725.
23. LeBlanc, R.; Dickson, J.; Brown, T.; Stewart, M.; Pati, H. N.; VanDerveer, D.; Arman, H.; Harris, J.; Pennington, W.; Holt, H. L.; Lee, M. *Bioorg Med Chem.* **2005**, *13* (21), 6025-6034.
24. Lima, P. C.; Lima, L. M.; da Silva, K. C.; Leda, P. H.; de Miranda, A. L.; Fraga, C. A.; Barreiro, E. J. *Eur J Med Chem.* **2000**, *35* (2), 187-203.
25. Barreiro, E. J. In *Plantas Mediciniais: sob a ótica da Química Medicinal Moderna*; Yunes, R. A.; Calixto, J. B.; Ed.; Argos: Chapecó, 2001. pp. 238-260.
26. Barreiro, E. J.; Fraga, C. A. M.; Araújo Jr.; J. X. de. In: *Farmacognosia: da planta ao medicamento*; Simões, C. M. O.; et al.; Ed; Editora da UFSC: Florianópolis, Editora da UFRGS: Porto Alegre, 2001. pp 127-138.
27. Maia, J. G. S.; da Silva, M. L.; Luz, A. I. R.; Zoghbi, M. G. B.; Ramos, L. S. *Quim Nova.* **1987**, *10* (3), 200-204.
28. Gupta, M. P.; Arias, T. D.; Williams, N. H.; Bos, R.; Tattje, D. H. E. *J Nat Prod.* **1985**, *48* (2), 330.
29. Potter, G. A.; Butler, P. C. UK *WO 03/028713.* **2003.** 100p.
30. Stavrovskaya, A. A. *Biochemistry.* **2000**, *65* (1), 95-106.
31. Ozben T. *FEBS Lett.* **2006**, *580* (12), 2903-2909.
32. Sale, S.; Tunstall, R. G.; Ruparella, K. C.; Butler, P. C.; Potter, G. A.; Steward, W. P.; Gescher, A. J. *Invest New Drugs.* **2006**, *24* (6), 459-464.
33. Li, J. T.; Yang, W. Z.; Wang, S. X.; Li, S. H.; Li, T. S. *Ultrason Sonochem.* **2002**, *9* (5), 237-239.

34. Pathak, V. N.; Oza, C. K.; Gupta, R.; Tiwari, R.; Chaudhary, S. *Synthesis and Reactivity in Inorganic and Metal-Organic Chemistry*. **2003**, *33* (4), 607-624.
35. Ariyan, Z. S.; Suschitzky, H. *J Chem Soc*. **1961**, Abstracts, 2242-2244.
36. Casanova, J. France *N° 73 43938*. **1973**. 21 p.
37. Schwartz, M. A.; Rose, B. F.; Holton, R. A.; Scott, S. W. *J Am Chem Soc*. **1977**, *99* (8), 2571-2578.
38. Wattanasin, S.; Murphy, W. S. *Synthesis*. **1980**, *8*, 647-650.
39. van de Loosdrecht, A. A.; Nennie, E.; Ossenkoppele, G. J.; Beelen, R. H.; Langenhuijsen, M. M. *J Immunol Methods*. **1991**, *141* (1), 15-22.