



Centro de Ciências da Saúde
Programa de Pós-Graduação em Farmácia

**Indução de Apoptose e Ativação de Caspase por Chalconas em
Linhagem Celular de Leucemia: Relação Entre Estresse Oxidativo e
Morte Celular**

Evelyn Winter da Silva

Florianópolis - SC, Fevereiro 2010.

Evelyn Winter da Silva

**Indução de Apoptose e Ativação de Caspase por Chalconas
em Linhagem Celular de Leucemia: Relação Entre Estresse
Oxidativo e Morte Celular.**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Farmácia, da Universidade Federal de Santa Catarina, como requisito para obtenção do título de Mestre em Farmácia na Área de Concentração de Fármacos-medicamentos.

Orientadora: Tânia Beatriz
Creczynski Pasa, PhD

Florianópolis
2010

Catálogo na fonte pela Biblioteca Universitária da
Universidade Federal de Santa Catarina

S586i Silva, Evelyn Winter da
Indução de Apoptose e ativação de Caspase por
Chalconas em linhagem celular de leucemia [dissertação:
relação entre estresse oxidativo e morte celular / Evelyn
Winter da Silva ; orientadora, Tânia Beatriz Creczynski
Pasa. - Florianópolis, SC 2010.
145 p.: il., grafos., tabs.

Dissertação (mestrado) - Universidade Federal de
Santa Catarina, Centro de Ciências da Saúde. Programa de
Pós-Graduação em Farmácia.

Inclui referências

1. Farmácia. 2. Leucemia. 3. Chalconas. 4. Apoptose.
5. Estresse Oxidativo. 6. Adenosina trifosfato. 7.
Antitumoral. I. Pasa, Tania Beatriz Creczynski. II.
Universidade Federal de Santa Catarina. Programa de Pós-
Graduação em Farmácia. III. Título.

CDU 615.12

Evelyn Winter da Silva

**Indução de Apoptose e Ativação de Caspase por Chalconas em
Linhagem Celular de Leucemia: Relação Entre Estresse Oxidativo e
Morte Celular.**

Esta dissertação foi submetida ao processo de avaliação pela Banca
Examinadora para a obtenção do Título de:

Mestre em Farmácia

E aprovada na sua versão final em 12 de fevereiro de 2010, atendendo às
normas da legislação vigente da Universidade Federal de Santa Catarina,
Programa de Pós-Graduação em Farmácia, Área de Concentração de
Fármaco-medicamentos.

Elenara Lemos Sena
Coordenador do Programa

BANCA EXAMINADORA:

Tânia Beatriz Creczynski Pasa
Doutora em Química Biológica
Universidade Federal do Rio de Janeiro
Presidente

Andreza Fabro de Bem
Doutora em Bioquímica Toxicológica
Universidade Federal de Santa Maria
Membro

Maria Luiza Bazzo
Doutora em Ciências Biológicas
Universidade Federal de Minas Gerais
Membro

Danilo Wilhelm Filho
Doutor em Ciências Biológicas
Universidade Federal do Rio Grande do Sul
Membro

Agradecimentos

Acredito que a elaboração desta dissertação de mestrado foi um produto coletivo. Várias pessoas contribuíram para que este trabalho chegasse ao fim e a todas elas registro minha gratidão. Pudera eu retribuir individualmente às pessoas que estiveram comigo durante essa caminhada, sem as quais eu não teria alcançado o meu objetivo.

A Deus por ser o doador e o mantenedor da minha vida;

À minha família, em especial aos meus pais e a Carol, pelo incentivo desde o início desta jornada. Pai e mãe, obrigada por todo sacrifício despedido na minha educação os quais foram fundamentais na minha formação.

Ao meu marido Deiverson pelo amor, incentivo, pela valiosa ajuda em questões de informática e por tantas vezes ter entendido o porquê de muitos domingos não termos passado juntos.

À prof.^a Tânia Beatriz Creczynski Pasa pelos conselhos, pela confiança, pelo exemplo e pela orientação que resultou em relevante conhecimento;

Aos colegas do laboratório de estudos de interações entre micro e macromoléculas pelo conhecimento compartilhado. Aprendi e me diverti muito nas nossas conversas de almoço e me sinto feliz por ter compartilhado a maior parte do meu dia com vocês. A vocês: Clarissa, Vânia, Claudri, Bruno, Adny, Laura, Betina, Francisco, Maurícia, Andrea, Inês, Vivi e Iamuna, muito obrigada.

Ao Prof.^o Rosendo A. Yunes, ao Prof.^o Ricardo José Nunes e sua aluna Louise pela colaboração e síntese das chalconas utilizadas neste trabalho.

Ao Prof.^o Antônio Ferreira Pereira e os colegas da Universidade Federal do Rio de Janeiro pela colaboração e amizade durante parte desta caminhada.

Aos professores da banca examinadora, pela disponibilidade e de fazer a avaliação desta dissertação.

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

Ao CNPq, CAPES e FAPESC pelo suporte financeiro;

A todos os que de uma forma ou de outra contribuíram para que eu alcançasse este objetivo.

*“ Sei que meu trabalho é uma gota no oceano,
mas sem ele o oceano seria menor.”*

Madre Teresa de Calcutá

RESUMO

O câncer corresponde a um grupo de doenças que possuem em comum o descontrole na proliferação. Em alguns países o câncer já assumiu o papel de principal causa de morte. No Brasil, as leucemias estão entre as 10 principais causas de morte por câncer tanto em homens quanto em mulheres. A leucemia linfóide aguda é uma desordem maligna causada pela proliferação de progenitores linfóides B e T. As chalconas são compostos intermediários essenciais para a biossíntese de flavonóides em plantas. Esta classe de moléculas tem demonstrado uma grande variedade de efeitos farmacológicos entre eles antitumoral. O objetivo deste trabalho foi estudar a atividade antitumoral de chalconas derivadas quimicamente da 3,4-metilenodioxiacetofenona e da 2-naftilacetofenona, em células murinas de leucemia linfoblástica aguda (L1210). Para isto, foi analisada a viabilidade celular nas células tumorais bem como o mecanismo de morte envolvido. Observou-se que as chalconas denominadas R7, R13 e R15 induziram citotoxicidade dependente da concentração e do tempo, apresentando IC_{50} na faixa de micromolar. A fragmentação do DNA e a ativação da caspase-3 evidenciam que estas chalconas são capazes de promover morte celular por apoptose. Todas as chalconas induziram a geração de espécies reativas de oxigênio, a lipoperoxidação e um aumento na atividade das enzimas antioxidantes glutationa peroxidase, glutationa redutase e glutationa s-transferase. Todas as chalconas também induziram um aumento de glutationa total o qual corresponde principalmente a glutationa oxidada e a chalcona R15 induziu um aumento da glutationa na sua forma reduzida. Estes dados sugerem que todas as chalconas induziram um estresse oxidativo nas células sendo que as chalconas R7 e R15 apresentam um maior efeito pró-oxidante podendo ser esse o principal mecanismo de morte envolvido na citotoxicidade destas moléculas. Todas as chalconas testadas também induziram depleção de ATP nas células, no entanto a chalcona R13 causou uma maior depleção em um tempo menor de incubação. Portanto, o principal mecanismo de morte envolvido com a chalcona R13 pode estar relacionado a um dano mitocondrial e conseqüente depleção energética. Considerando a citotoxicidade das chalconas testadas, as mesmas são promissoras para a continuidade das investigações.

Palavras-chave: Leucemia. Antitumoral. Chalconas. Apoptose. Estresse Oxidativo. ATP.

ABSTRACT

Cancer is a group of several diseases that have in common the uncontrolled proliferation. In some countries the cancer already assumed the role of main cause of death. In Brazil, the leukemias are between the ten main causes of cancer death. Acute lymphoblastic leukemia is a malignant disorder caused by the proliferation of lymphoid progenitor cells. Chalcones are essential intermediate compounds in the flavonoids biosynthesis in plants. They have demonstrated a great variety of pharmacological effects including antitumoral. The objective of this study was to investigate the effect of chalcones chemically derivatives from 3,4-methylenedioxyacetofenon and from 2-naphthylacetofenon toward a lymphoblastic leukemia cell line (L1210). Thus the cellular viability of tumoral cells and the involved cell death mechanism were investigated. It was observed that chalcones called R7, R13 and R15 presented concentration and time dependent cytotoxicity with IC_{50} in the range of micromolar. The DNA fragmentation and the caspase-3 activation are evidences that these chalcones are capable to promote cellular death by apoptosis. Additionally all chalcones induced the generation of reactive oxygen species, lipid peroxidation and an increase in the activity of antioxidant enzymes such as glutathione peroxidase, glutathione reductase and glutathione s-transferase. All chalcones induced an increase of total glutathione which corresponds mainly oxidized glutathione and chalcone R15 induced an increase of glutathione in its reduced form. These data suggest that all chalcones induced an oxidative stress in the cells being the chalcones R7 and R15 more actives in this task and this can be the main mechanism of death involved in the cytotoxicity of these molecules. All chalcones tested also induced depletion of ATP content in L1210 cells, however chalcone R13 caused a higher depletion in a shorter period of incubation. Therefore the main mechanism of death involved with chalcone R13 can be related to a mitochondrial damage and consequently a bioenergetic depletion. Considering the cytotoxicity of all chalcones tested, these compounds are promising for further investigation.

Keywords: Leukemia. Antitumoral. Chalcones. Apoptosis. Oxidative Stress. ATP.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1.	Relação entre origem das leucemias e tipo celular acometido	36
Figura 2.	Mecanismo de morte celular: apoptose	41
Figura 3.	Via extrínseca e intrínseca da apoptose	43
Figura 4.	Síntese das flavanonas e diferentes flavonóides a partir das chalconas	48
Figura 5.	Reação de síntese das chalconas derivadas da 3,4-metilenodioxiacetofenona	72
Figura 6.	Reação de síntese das chalconas derivadas da 2-naftilacetofenona	72
Figura 7.	Citotoxicidade das chalconas derivadas da 3,4-metilenodioxiacetofenona em células L1210	73
Figura 8.	Citotoxicidade das chalconas derivadas da 2-naftilacetofenona em células L1210	74
Figura 9.	Análise do DNA de células L1210	75
Figura 10.	Estrutura das chalconas R7, R13 e R15	75
Figura 11.	Atividade das chalconas dependente da concentração em células L1210	76
Figura 12.	Atividade citotóxica das chalconas dependente do tempo em células L1210	77
Figura 13.	Aumento da atividade das caspases pelas chalconas R7, R13 e R15 em células L1210	79
Figura 14.	Efeito das chalconas isoladas e associadas a catalase na produção de EROs	80
Figura 15.	Efeito das chalconas no potencial de membrana mitocondrial em células L1210	83
Figura 16.	Reação em cadeia da peroxidação lipídica	84
Figura 17.	Lipoperoxidação induzida pelas chalconas R7, R13 e R15 em células L1210	85
Figura 18.	Efeito das chalconas R7, R13 e R15 na atividade da GST, catalase, GPx e GR em células L1210	86
Figura 19.	Efeito das chalconas R7, R13 e R15 na atividade da catalase isolada	88

Figura 20. Efeito das chalconas R7, R13 e R15 na 89
concentração de GSH, GSSG e GT e na atividade
da γ -GCS em células L1210

Figura 21. Efeito das chalconas R7, R13 e R15 na 91
concentração de ATP em células L1210

LISTA DE TABELAS

Tabela 1.	Atividades biológicas citadas para as chalconas	47
Tabela 2.	Valores de IC ₅₀ das chalconas R7, R13 e R15, após 24 e 48 horas de incubação, em células L1210	70
Tabela 3.	Comparação das IC ₅₀ , nos tratamentos com chalcona isolada e chalcona associada aos antioxidantes TR, CAT e SOD em células L1210	76

LISTA DE ABREVIATURAS

AIF	Fator indutor de apoptose
APAF-1	Fator ativador de proteases – 1
ATP	Adenosina trifosfato
Bcl-2	Proteína anti-apoptótica
CAT	Catalase
Cis	Cisteína
DNA	Ácido desoxirribonucléico
EROs	Espécies reativas de oxigênio
FAAD	Proteína adaptadora associada à proteína Fas
Fas	Receptor de superfície celular
Gli	Glicina
GPx	Glutathione peroxidase
GR	Glutathione reductase
GSH	Glutathione reduzida
GSSG	Glutathione forma oxidada
GST	Glutathione S-transferase
Glu	Glutamato
γ -GCS	Gama-glutamyl-cisteína-sintase
HO_2^\bullet	Radical hidroperoxil
H_2O_2	Peróxido de Hidrogênio
HL-60	Linhagem de células de leucemia promielocítica humana
IAP	Proteínas inibidoras de apoptose
IC ₅₀	Concentração que inibe 50% do crescimento celular
LLA	Leucemia linfóide aguda
LAR	Leucemias agudas raras

LMA	Leucemia mielóide aguda
LMC	Leucemia mielóide crônica
LCT	Leucemia de células T
LP	Leucemia pró-mielocítica
LLC	Leucemia linfóide crônica
LNH	Linfoma não-Hodgkin
L1210	Linagem de leucemia linfóide aguda murina
LO ₂ [•]	Radical peroxil lipídico
NF-κB	Fator de transcrição nuclear kappa B
O ₂ [•]	Radical ânion superóxido
[•] OH	Radical hidroxil
OMS	Organização Mundial da Saúde
RO ₂ [•]	Radical peroxil
SNC	Sistema Nervoso Central
Smac	Ativador secundário de caspases derivado da mitocôndria
SOD	Superóxido dismutase
TNF	Fator de necrose tumoral
TR	Trolox
UV	Ultravioleta

SUMÁRIO

1.	INTRODUÇÃO	29
2.	REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	33
2.1	Aspectos Gerais do Câncer	34
2.2	Leucemias	35
2.2.1	Leucemia Linfóide aguda	35
2.3	Tipos de Morte Celular	39
2.3.1	Apoptose	40
2.3.2	Regulação da Apoptose	41
2.4	Metabolismo Energético	44
2.5	Estresse Oxidativo	45
2.6	Defesas Antioxidantes	46
2.7	Flavonóides	47
3.	OBJETIVOS	53
3.1	Objetivo Geral	55
3.2	Objetivos Específicos	55
4.	MATERIAIS E MÉTODOS	57
4.1	Reagentes	58
4.2	Síntese das Chalconas	58
4.3	Cultura Celular	59
4.4	Tratamento Celular	59

4.5	Ensaio de Viabilidade Celular	60
4.6	Determinação da Curva de Concentração x Resposta	60
4.7	Determinação da Curva Tempo x Resposta	60
4.8	Análise da Apoptose pelo Método de Fragmentação do DNA	60
4.9	Avaliação da Atividade da Caspase-3	61
4.10	Determinação da citotoxicidade das chalconas associadas aos antioxidantes CATALASE, TROLOX®, SOD	62
4.11	Determinação de Espécies Reativas de Oxigênio	62
4.12	Preparação das Amostras para Determinação das Defesas Antioxidantes e Lipoperoxidação	62
4.13	Avaliação da Peroxidação Lipídica	63
4.14	Determinação da Atividade da Catalase Celular	63
4.15	Determinação do Efeito das Chalconas na Atividade da Catalase Isolada	64
4.16	Determinação da Atividade da Glutaciona Peroxidase	64
4.17	Determinação da Atividade da Glutaciona Redutase	65
4.18	Determinação da aAtividade da Glutaciona S-transferase	66
4.19	Determinação da Concentração de Glutaciona Total	66
4.20	Determinação da Concentração de Glutaciona Reduzida e Oxidada	67
4.21	Determinação da Atividade da γ -Glutamyl-Cisteína-Sintase	67
4.22	Determinação do Potencial de Membrana Mitocondrial	68
4.23	Determinação da concentração de ATP	69
4.24	Dosagem de Proteína	69
4.25	Análise estatística	70

5.	RESULTADOS E DISCUSSÃO	71
5.1	Síntese das Chalconas	72
5.1.1	Chalconas Derivadas da 3,4-Metilenodioxiacetofenona	72
5.1.2	Chalconas Derivadas da 2-Naftilacetofenona	72
5.2	Citotoxicidade das Chalconas e Análise do DNA	73
5.3	Atividade das Chalconas Dependente da Concentração e do Tempo	76
5.4	Atividade da Caspase-3	78
5.5	Determinação de Espécies Reativas	79
5.6	Citotoxicidade das Chalconas Frente a Antioxidantes Adicionados	81
5.7	Determinação do Potencial de Membrana Mitocondrial	82
5.8	Lipoperoxidação Celular	84
5.9	Defesas Antioxidantes	85
5.10	Concentração de Glutathione Total, Reduzida e Oxidada	88
5.11	Concentração de ATP	90
6.	CONCLUSÕES	93
7.	PERSPECTIVAS	97
	REFERÊNCIAS	99
	ANEXOS	119

1. INTRODUÇÃO

No Brasil, em 2005, o câncer matou cerca de 190000 pessoas, sendo que as leucemias estão entre as dez principais causas de morte por câncer tanto em homens quanto em mulheres (WHO, 2009).

A Leucemia Linfóide Aguda (LLA) é uma desordem maligna causada pela proliferação de progenitores de linfócitos B e T (linfoblastos) derivados da medula óssea que são transportados para o sangue periférico ainda no início do desenvolvimento (ONCIU, 2009).

A LLA atinge principalmente crianças e estas apresentam um prognóstico mais favorável. Já em adultos, a LLA, apesar de representar apenas 20% dos casos de leucemia apresenta um prognóstico pior (JEMAL et al., 2004; PUI; EVANS, 2006; HOELZER; GOKBUGET, 2000).

Os tratamentos das LLA consistem em quimioterapia de indução, seguida de terapia de consolidação e terapia de manutenção (BURKE; STARTZEKK, 2008). Apesar da taxa de cura da LLA na infância serem favoráveis, muitos pacientes desenvolvem sérias complicações em consequência dos efeitos colaterais dos fármacos. Desta forma, é necessário desenvolver novas abordagens de tratamento com o objetivo de melhorar tanto a taxa de cura principalmente em adultos como a qualidade de vida dos pacientes com LLA (PUI; JEHA, 2007).

Os diferentes tipos de câncer, incluindo as leucemias, podem exibir várias características, no entanto, todos adquiriram a propriedade de proliferação além dos limites normais e de resistência à apoptose (OKADA; MAK, 2004).

A apoptose é uma forma de morte celular considerada programada e ocorre durante toda a vida de um organismo, sendo essencial para manutenção da homeostase (AMARANTE-MENDES, 2003; OKADA; MAK, 2004). Alterações neste mecanismo de morte pode levar a inúmeras doenças incluindo o câncer (KIECHLE; ZHANG, 2002).

A mitocôndria tem um papel importante na regulação da apoptose, sendo responsável pela maior parte da produção de ATP da célula (MCBRIDE; NEUSPIEL; WASIAK, 2006). O uso de substâncias que comprometem a integridade da mitocôndria e induzem a depleção de ATP e a liberação de fatores indutores da apoptose podem induzir a célula à morte celular por apoptose (JEONG; SEOL, 2008; DIAS; BAILLY, 2005).

Os mecanismos de apoptose também podem ser influenciados por um desequilíbrio no metabolismo oxidativo (McCONKEY, 1998; ALLEN; TRESINI, 2000) em que ocorre um aumento na geração de espécies reativas e uma diminuição nos mecanismos de defesa

antioxidante (McCONKEY, 1998; ALLEN; TRESINI, 2000). Os principais antioxidantes enzimáticos envolvem a superóxido dismutase, a catalase e a glutatona peroxidase e os não-enzimáticos são a melanina, glutatona, estrogênios, ácido úrico, vitamina C, vitamina E, polifenóis, flavonóides e carotenóides (SIES, 1997; McCALL; FREI, 1999; MATÉS, 2000; NORDBERG; ARNÉR, 2001).

Com o propósito de alcançar resultados terapêuticos mais eficazes, estudos têm proposto que, devido à heterogeneidade das alterações encontradas nas leucemias, uma terapia combinada com agentes antiproliferativos e indutores da apoptose pode ser mais efetiva que os tratamentos convencionais (TSIFTSOGLU et al., 2003). Algumas perspectivas terapêuticas são: substâncias que induzam a morte celular por apoptose através da geração de espécies reativas, da depleção energética e da liberação de fatores indutores deste tipo de morte como o citocromo *c*.

O meio científico tem intensificado os estudos farmacológicos de compostos extraídos de plantas e seus análogos sintéticos. Dentre os mais estudados estão os flavonóides que pertencem a um grupo de metabólitos secundários encontrados nas plantas e diversas atividades biológicas já foram estudadas entre elas a atividade antitumoral (REN et al., 2003).

As flavanonas são as precursoras diretas da maioria dos flavonóides e são sintetizadas a partir das chalconas (FOWLER; KOFFAS, 2009), que também podem ser consideradas uma classe de flavonóide (CROZIER; JAGANATH; CLIFFORD, 2009). Muitas atividades biológicas já foram citadas para as chalconas, entre elas antileucêmica por indução da apoptose (NAKATAMI et al., 2005; NAVARINI et al., 2009; KACHADOURIAM; DAY, 2006).

Sendo assim, chalconas sintéticas serão avaliadas neste trabalho quanto ao efeito citotóxico (antitumoral) em células leucêmicas da linhagem celular L1210.

2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2.1 Aspectos Gerais do Câncer

Câncer é um termo genérico para um grupo de doenças que podem afetar uma ou mais partes do corpo. É caracterizado pelo rápido crescimento e pode invadir órgãos ou partes do corpo adjacentes ao foco inicial. É a principal causa de morte em muitos países, sendo que cerca de 7,6 milhões de pessoas morreram de câncer em 2005 e estimativas prevêem 12 milhões de mortes em 2030. Os cânceres que apresentam maiores taxas de mortalidade no mundo envolvem pulmão, estômago, col retal, fígado e mama (WHO, 2009).

Os fatores de risco para o câncer podem ser externos ou hereditários. A maioria dos casos (cerca de 80%) está relacionada ao meio ambiente, onde encontramos um grande número de fatores de risco (ALMEIDA et al, 2005). Os principais fatores externos envolvidos são: radiação ultravioleta e ionizante, produtos químicos como asbesto, aflatoxinas, arsênio, componentes do tabaco, alguns vírus, bactérias, parasitas entre outros (WHO, 2009).

De acordo com um estudo realizado por Danaei (2005) cerca de 40% dos casos de câncer poderiam ser prevenidos. Os principais fatores de risco envolvidos no desenvolvimento do câncer são: uso do tabaco (21%), álcool (5%), obesidade (2%), sedentarismo (2%), poluição do ar (1%), sexo não seguro (3%) e dieta (5%). Para os casos de leucemia em pacientes acima de 30 anos o principal fator de risco envolvido é o uso do tabaco.

Em 2005, o câncer matou cerca de 190.000 pessoas no Brasil, o que corresponde a cerca de 15% das mortes, sendo que as leucemias estão entre as dez principais causas de morte por câncer, tanto em homens quanto em mulheres (WHO, 2009). Como característica geral, nota-se que as taxas de mortalidade por todos os tipos de câncer são mais altas nas regiões Sul e Sudeste (WÜNSCH-FILHO; MONCAU, 2002).

Segundo Almeida e colaboradores (2005), o desenvolvimento do câncer envolve múltiplos estágios que levam a transformação de uma célula normal em uma célula maligna:

Estágio de iniciação - neste estágio as células normais sofrem o efeito de um agente carcinogênico que provoca uma alteração em algum de seus genes.

Estágio de promoção - as células geneticamente alteradas sofrem a ação de agentes oncopromotores que irão lentamente transformar as células normais em malignas.

Estágio de progressão - ocorre a multiplicação descontrolada das células malignas, surgindo então as primeiras manifestações clínicas da doença.

O intervalo entre a iniciação e a detecção do tumor pode ser de 10 anos ou mais (AMERICAN CANCER SOCIETY, 2008).

Segundo Hanahan e Weinberg (2000) os diferentes tipos de tumores apresentam basicamente seis alterações fisiológicas: auto-suficiência para sinais de proliferação, insensibilidade a sinais inibitórios de proliferação, evasão da morte celular programada, potencial de replicação ilimitado, angiogênese sustentada e invasão de tecidos ou metástase.

2.2 Leucemias

As leucemias são neoplasias malignas que se caracterizam por substituição difusa da medula óssea por células neoplásicas. São classificadas segundo o tipo celular envolvido e o estado de maturidade das células leucêmicas. As leucemias agudas caracterizam-se pela presença de células imaturas (blastos) e por uma evolução rápida e fatal em pacientes não tratados. As leucemias crônicas, no início, estão associadas a leucócitos bem diferenciados e com uma evolução lenta. As leucemias são também classificadas em duas principais variantes: linfóides e mielóides (COTRAN; KUMAR; ROBBINS, 1996).

2.2.1 Leucemia Linfóide Aguda

A LLA é uma desordem maligna causada pela proliferação de progenitores de linfócitos B e T (linfoblastos) derivados da medula óssea que são transportados para o sangue periférico ainda no início do desenvolvimento. Os linfoblastos substituem os elementos normais da medula óssea gerando uma diminuição da celularidade normal que pode ser manifestada em anemia, trombocitopenia e neutropenia em diferentes graus. Os linfoblastos podem também infiltrar órgãos como fígado, baço, linfonodos, timo, meninges e gônadas (ONCIU, 2009). O

sistema nervoso central (SNC) é o local extramedular mais envolvido. Pacientes com infiltração no SNC já no diagnóstico, tanto adultos como crianças, requerem direcionamento adicional do tratamento para o SNC (PLASSCHAERT et al., 2004).

A LLA tem um pico de incidência entre crianças de dois a cinco anos, representando a desordem maligna mais comum na infância e cerca de 20% dos casos de leucemia em adultos (FADERL; JEHA; KANTARJAM 2003).

Em crianças, o prognóstico é favorável, com mais de 80% de remissão completa e taxas de sobrevida de 70% a 83% (PUI; EVANS, 2006). Para adultos o prognóstico é pior, com remissão completa de 64% a 93% e taxa de sobrevida em longo prazo de 28% a 39% (HOELZER; GOKBUGET, 2000). Estas diferenças podem resultar do fato de que, na infância, a LLA acomete células progenitoras linfóides maduras, enquanto que na idade adulta acomete células-tronco hematopoiéticas multipotentes (GREAVES, 1999) (Figura 1). Os progenitores linfóides acometidos têm uma capacidade limitada de renovação, sendo mais sensíveis à indução da 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).

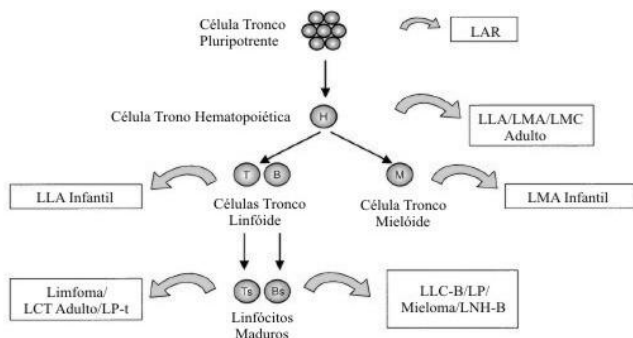


Figura 1: Relação entre origem das leucemias e tipo celular acometido. LAR, leucemias agudas raras; LLA, leucemia linfóide aguda; LMA, leucemia mielóide aguda; LMC, leucemia mielóide crônica; LCT, leucemia de célula T; LP, leucemia pró-mielocítica; LLC, leucemia linfóide crônica, LNH, linfoma não-Hodgkin.

Fonte: Adaptado de GREAVES, 1999.

As manifestações clínicas primárias não são específicas da LLA e podem ser confundidas com outras doenças. Os sinais e sintomas mais frequentes são: fadiga, febre, palidez e sangramentos constantes. A contagem do sangue total revela geralmente citopenia e a contagem dos leucócitos pode revelar tanto leucopenia, leucocitose ou contagem normal. Os pacientes podem ainda apresentar nódulos envolvendo o SNC ou testículos, e ainda hepatoesplenomegalia (BURKE; STARTZEKK, 2008).

A Organização Mundial de Saúde (OMS) em 2001, em conjunto com a Sociedade de Hematologia Americana e a Associação Européia de Hematologia, publicou uma nova classificação para neoplasias do sistema hematopoético 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) (JAFJE et al., 2001), sendo que a LLA-B é a forma mais comum de leucemia na infância (ARMSTRONG; LOOK; 2005).

A imunofenotipagem dos linfoblastos leucêmicos deve ser realizada por citometria de fluxo e é essencial para estabelecer o correto diagnóstico e definir qual é a linhagem da LLA. Outras técnicas altamente específicas também podem ser utilizadas para detectar mutações como o RT-PCR e a hibridização *in situ*, tendo grande importância para determinar o melhor tratamento (PUI; CAMPANA; EVANS, 2001, PUI; EVANS, 1998).

Aproximadamente 90% dos pacientes com LLA apresentam alterações numéricas ou estruturais nos cromossomos. As alterações numéricas podem ser classificadas em hiperdiploidia (mais de 50 cromossomos) e pseudoploidia (46 cromossomos, mas com rearranjos). A hiperploidia é encontrada em 25 a 30% de todas as LLA da infância e está associada a um bom prognóstico. Já as translocações, em geral, estão associadas a um mau prognóstico (COTRAN; KUMAR; ROBBINS, 1996).

Translocações cromossômicas, que ativam principalmente genes de fatores de transcrição, estão diretamente relacionados com a LLA. A ativação destes genes induz a célula a um descontrole na proliferação (ARMSTRONG; LOOK; 2005).

A translocação Filadélfia t(9;22) é a mais freqüente em adultos e causa uma fusão do gene ABL com o gene BCR, resultando em um receptor tirosina-quinase alterado; causando um descontrole na diferenciação, proliferação e sobrevivência celular. Na terapêutica, o mesilato de imatinibe pode ser utilizado, já que o mesmo é um inibidor de ABL quinases (DRUKER, 2004). A translocação t(4;11) foi

observada em 70% a 80% dos casos em crianças até o primeiro ano de vida (RUBNITZ et al., 1994; PUI et al., 1995). A translocação t(12;21) está presente em cerca de 25% dos casos de LLA de linhagem de célula B e é a alteração genética mais comum observada em crianças (ARMSTRONG; LOOK, 2005).

Pacientes com hiperploídia e translocação t(1;19) apresentam prognóstico mais favorável, enquanto aqueles que apresentam translocação t(9;22) e t(4;11) apresentam um pior prognóstico (BURKE; STARTZEK, 2008).

Os tratamentos das LLA consistem em quimioterapia de indução, em que a intenção é matar a maioria das células leucêmicas, seguida da terapia de consolidação para destruir células residuais e, finalmente, a terapia de manutenção (BURKE; STARTZEK, 2008).

O objetivo da fase de indução é erradicar mais de 99% das células leucêmicas e restaurar a hematopoiese normal, assim como a saúde do paciente. A terapêutica desta fase geralmente inclui a administração de um glicocorticoide, vincristina e um terceiro fármaco que pode ser asparaginase ou antraciclina. A adição de ciclofosfamida e o tratamento intensivo com asparaginase é considerada benéfica em pacientes com LLA de célula T, e a adição de mesilato de imatinibe aumenta muito as taxas de remissão em pacientes com cromossomo filadélfia (TALPAZ et al., 2006).

Com a restauração da hematopoiese, o tratamento é intensificado com a utilização de fármacos para erradicar células leucêmicas residuais e reduzir o risco de recidiva. Nesta fase são utilizadas altas doses de metotrexato, corticóides, mercaptopurina, vincristina e asparaginase (PUI; EVANS, 2006).

Após a terapia de consolidação é necessário a terapia de manutenção para evitar recidivas. Embora cerca de dois terços dos casos de LLA em crianças possam ser tratados com somente 12 meses de terapia (TOYODA, 2000), todos os pacientes recebem quimioterapia por cerca de dois anos e meio. Os fármacos mais utilizados nesta fase são a mercaptopurina e o metotrexato (PUI; EVANS, 2006).

A infiltração das células leucêmicas no SNC é o principal obstáculo para a cura (BOSTROM et al., 2003, LANGE et al., 2002), e os fatores de risco relacionados são: imunofenótipo T, hiperleucocitose, anormalidades genéticas e a presença de células leucêmicas no líquor (LOO et al., 2006, LAZARUS et al., 2006). A irradiação cranial é utilizada em somente 5 a 20% dos pacientes com alto risco de infiltração no SNC devido às complicações envolvidas com esta terapia. O melhor regime é a administração intratecal de quimioterápicos (PUI, 2003).

As taxas de recidivas são de 25% e 50% para crianças e para adultos respectivamente, sendo estas taxas diretamente relacionadas ao imunofenótipo e o subtipo genético envolvido (ONCIU, 2009). Para pacientes que respondem pouco ou não respondem à quimioterapia usual, o transplante de células tronco hematopoiéticas pode ser usado, resultando em mais de 80% de cura em crianças. Em contraste com o sucesso obtido nos pacientes pediátricos, o transplante de pacientes adultos apresenta resultados não satisfatórios (PUI; EVANS, 2006; VITALE et al., 2006).

Apesar da taxa de cura da LLA na infância ser favorável, muitos pacientes ainda desenvolvem sérias complicações agudas e tardias, em consequência dos efeitos colaterais dos tratamentos. Esses são especialmente severos naqueles pacientes que necessitam do transplante de medula óssea para a cura. Entretanto, esforços estão sendo realizados para desenvolver novas abordagens de tratamento com o objetivo de melhorar, tanto a taxa de cura como a qualidade de vida dos pacientes com LLA (PUI; JEHA, 2007).

Diversos estudos vêm sendo realizados com o objetivo de avaliar novos alvos terapêuticos para as leucemias que induzam as células tumorais a morte celular programada e que apresentem melhor eficácia e menos efeitos colaterais (ZHANG et al, 2008; NICHOLSON, 2000; DEBATIN, 2004).

2.3 Tipos de Morte Celular

Os organismos multicelulares dependem de uma interação entre as células que os constituem para o seu desenvolvimento e manutenção. No desenvolvimento embrionário, muitas células são levadas à “morte”, contribuindo assim para a formação dos órgãos e tecidos (MEIER et al., 2000).

Os processos de morte celular podem ser classificados em apoptose, autofagia, necrose, mitose catastrófica e senescência (OKADA; MAK, 2004; DIMRI, 2005; CASTEDO et al., 2004). Alterações nestes tipos de morte celular estão implicadas na carcinogênese (RICCI; ZONG, 2006).

A mitose catastrófica envolve uma mitose aberrante, resultado de uma segregação cromossômica ou fusão de células. Geralmente, não é considerada uma forma de morte, mas sim uma sinalização irreversível para a mesma (WEAVER; CLEVELAND; 2005; BROWN; ATTARDI, 2005).

A senescência é um processo essencial para o envelhecimento. Ocorre por meio de uma programação genética que envolve deterioração dos telômeros e ativação de genes supressores de tumor (MOOI; PEEPER, 2006). No início as células permanecem metabolicamente ativas e tendem a apresentar um aumento no seu tamanho, no entanto, logo estas células são induzidas à morte celular por apoptose (BROWN; ATTARDI, 2005).

A necrose acontece em situações de estresse violento. É um processo de destruição desregulada, resultado de uma catástrofe bioenergética, incompatível com a sobrevivência celular. É caracterizada pela presença de vacúolos no citoplasma, pela perda da integridade das membranas plasmáticas e das organelas, pelo aumento do volume celular e por indução de inflamação nos tecidos vizinhos em decorrência da liberação do conteúdo celular e de moléculas inflamatórias (EDINGER; THOMPSON, 2004; OKADA; MAK, 2004).

A autofagia é um processo adaptativo, controlado geneticamente e ocorre em resposta a um estresse metabólico que resulta na degradação de componentes celulares (DANIAL; KORSMEYER, 2004; LUM; DEBERARDINIS; THOMPSON, 2005). Lee e Baehrecke (2001), em um estudo com *Drosophila melagonaster*, demonstraram que a autofagia é um importante tipo de morte celular programada e utiliza alguns mecanismos comuns à apoptose, como a ativação de caspases.

2.3.1 Apoptose

Apoptose ou morte celular programada é considerada como morte “fisiológica” que ocorre durante toda a vida de um organismo. É essencial para a homeostase dos tecidos multicelulares, no sistema imunológico, no desenvolvimento embrionário, na formação das vilosidades intestinais, na renovação de células hematopoiéticas; entre outros processos (AMARANTE-MENDES, 2003; OKADA; MAK, 2004).

Alterações no mecanismo de morte celular podem levar à resistência à apoptose. Isso explica o envolvimento da desregulação da apoptose em inúmeras doenças e no câncer (KIECHLE; ZHANG, 2002).

A apoptose é caracterizada pela diminuição no volume celular e conseqüente perda da aderência com a matriz extracelular. As organelas celulares mantêm a sua morfologia, com exceção das mitocôndrias, que podem apresentar poros na sua membrana externa. A cromatina sofre

condensação. Os prolongamentos da membrana celular aumentam de número e tamanho, originando estruturas que mantêm o conteúdo celular, chamadas de corpos apoptóticos, os quais são rapidamente fagocitados por macrófagos e removidos. Este processo todo ocorre sem causar um processo inflamatório (Figura 2) (ZIEGLER; GROSCURTH, 2004). Outra característica muito marcante da apoptose é a fragmentação do DNA, a qual apresenta um padrão característico. Uma endonuclease é ativada e produz fragmentos de DNA de tamanhos variáveis, múltiplos de 200 pares de base (SARASTE; PULKKI, 2000).

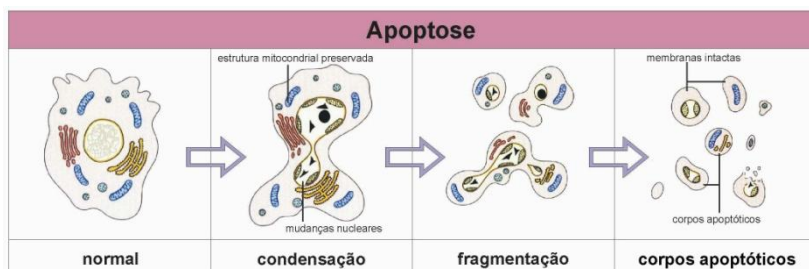


Figura 2: Mecanismo de morte celular: apoptose.

Fonte: Adaptado de ANAZETTI; MELO, 2007

2.3.2 Regulação da Apoptose

A apoptose é regulada por diversos fatores, entre eles estão as caspases, proteínas da família Bcl-2 e a proteína p-53.

Entre as várias proteases que participam dos processos de apoptose, as mais conhecidas são as caspases. As caspases são enzimas aspartato-específicas, presentes entre as membranas mitocondriais e na matriz nuclear, na forma de zimogênios. São executoras da morte por apoptose e compreendem duas classes diferentes, ou seja, as iniciadoras (caspases-2, -8, -9 e -10) e as efetoras (caspases-3, -6 e -7) que clivam substratos específicos e são responsáveis pelas características típicas deste tipo de morte (KIECHLE; ZHANG, 2002; AMARANTE-MENDES, 2003; RIEDL; SHI, 2004).

Existem duas vias principais que levam à ativação das caspases: a via extrínseca, ou via citoplasmática, e a via intrínseca, ou mitocondrial. A via extrínseca é desencadeada por um dos membros da superfamília de receptores de necrose tumoral (TNF). Tais receptores, quando estimulados, associam-se, através de proteínas adaptadoras como a

FADD, à caspase-8 e/ou à caspase-10, ativando-as e acionando as caspases executoras. A via intrínseca ou mitocondrial é iniciada por sinais provenientes do interior da célula, detectados pelas mitocôndrias. Caso isso ocorra, as mitocôndrias sofrem um desacoplamento e liberam para o citosol, o citocromo *c*, as proteínas SMAC/Diablo (segunda ativadora das caspases derivada da mitocôndria) e o AIF (fator indutor de apoptose). O citocromo *c* liberado liga-se à APAF-1 (fator ativador de proteases – 1). Esse complexo, na presença de ATP, ativa a caspase-9, que ativará a caspase-3. Por outro lado, a SMAC inativa as IAPs (proteínas inibidoras de apoptose), ativa a caspase-3 e culmina em apoptose (Figura 3) (KIECHLE; ZHANG, 2002; AMARANTE-MENDES, 2003; RIEDL; SHI, 2004).

Proteínas como a p-53 são acionadas com o objetivo de reparar os danos no DNA. Quando o dano excede os mecanismos de reparo, essa proteína induz a célula à apoptose (BROWN; ATTARDI, 2005). Existem fortes evidências da participação desta proteína na supressão da tumorigênese. Além disso, a maioria dos cânceres apresenta mutações no gene p-53, que codifica a proteína p-53, ou defeitos na sua regulação (ATTARDI, 2005).

Algumas proteínas, membros da família Bcl-2, constituem um grupo que exerce funções opostas. Algumas atuam como proteínas anti-apoptóticas e protegem a célula da morte (Bcl-2, Bcl-xL, Bcl-w, Mcl-1) enquanto outras atuam como pró-apoptóticas levando a célula à apoptose (Bax, Bak, Bad, Bid). Essas proteínas participam dos sinais de sobrevivência ou morte celular, em função da supressão ou promoção de alterações na permeabilidade da membrana mitocondrial, controlando, assim, a liberação do citocromo *c* para o citosol, sinais esses gerados nos meios intra e extracelulares (GHOBRIAL et al., 2005).

Embora o câncer exiba diferentes características, todos os tumores adquiriram a propriedade de crescer além dos limites impostos às células normais. A expansão clonal de uma célula transformada depende do descontrole da sua capacidade proliferativa e da incapacidade de morrer. A superexpressão de certas proteínas anti-apoptóticas como Bcl2, Bcl-XL, fator nuclear κ B (NF- κ B) e IAPs tem sido encontrada em muitos tipos de tumores (REED, 2003). Portanto, evidências demonstram que a resistência à apoptose é uma das características mais marcantes da maioria dos tumores malignos (OKADA; MAK, 2004).

Estudos têm proposto que, devido à heterogeneidade das alterações encontradas nas leucemias, uma terapia combinada com

agentes antiproliferativos e indutores da apoptose pode ser mais efetiva que os tratamentos convencionais (TSIFTSOGLU et al., 2003).

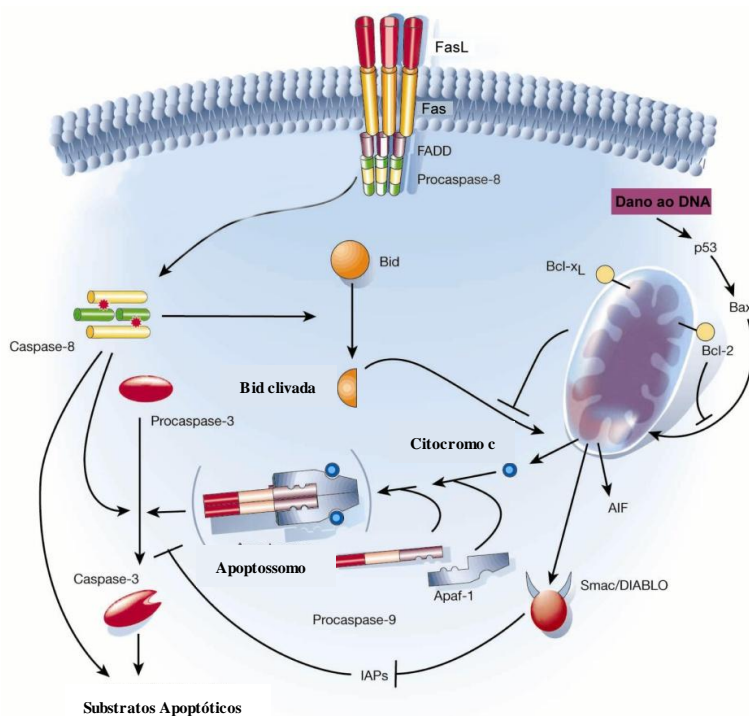


Figura 3: Via extrínseca e intrínseca da apoptose.

Fonte: Adaptado de HENGARTNER, 2000

2.4 Metabolismo Energético

As mitocôndrias são organelas essenciais para a vida e para a morte celular. São fundamentais para o metabolismo energético, por produzir, através da fosforilação oxidativa, 80% a 90% da energia necessária para a respiração e a sobrevivência celular, regulam o fluxo de cálcio e têm um importante papel no processo de morte celular (MCBRIDE; NEUSPIEL; WASIAK, 2006).

A membrana interna da mitocôndria contém enzimas do processo de fosforilação oxidativa entre outras proteínas, e é impermeável a

pequenas moléculas e íons incluindo o H^+ . No espaço intermembranar encontram-se proteínas especializadas e na matriz, encontram-se enzimas que participam de diferentes vias metabólicas (SAS et al., 2007).

Alterações na membrana mitocondrial, como a perda do potencial mitocondrial, são consideradas pontos-chave na cascata de morte. Estas alterações levam à liberação de moléculas indutoras da apoptose como o citocromo *c*. Proteínas da família Bcl-2 também estão inteiramente relacionadas ao processo de morte. Estas proteínas causam poros na membrana mais externa da mitocôndria e induzem a liberação de moléculas pró-apoptóticas para o citoplasma, como citocromo *c*, AIF, endonucleases e a proteína Smac/Diablo. A liberação destes fatores pode ativar as vias das caspases, resultando no processo de morte (JEONG; SEOL, 2008). Além disso, alterações no fluxo de Ca^{2+} podem também resultar em apoptose, já que o excesso de Ca^{2+} leva também à liberação de citocromo *c* e de proteínas pró-apoptóticas (NUTT et al., 2002).

O metabolismo energético pode ser um alvo alternativo para o tratamento de muitas neoplasias. A utilização de fármacos que comprometam a integridade estrutural e funcional da mitocôndria pode ser uma alternativa para combater a proliferação das células neoplásicas, tornando-a uma relevante estratégia terapêutica (PATHANIA; MILLARD; NEAMATI, 2009; DIAS; BAILLY, 2005).

2.5 Estresse Oxidativo

Os mecanismos de morte celular também podem ser influenciados por um desequilíbrio no metabolismo oxidativo, denominado estresse oxidativo (SIES, 1985; McCONKEY, 1998; ALLEN; TRESINI, 2000), sendo que a mitocôndria é a principal organela envolvida neste desequilíbrio já que é o principal local a consumir oxigênio na célula e o principal foco de geração de espécies reativas de oxigênio (EROs) (LASH, 2006). O desequilíbrio entre a produção de EROs e de nitrogênio (ERNs) e o sistema de defesa antioxidante endógeno pode causar uma série de mudanças fisiológicas que caracterizam o estresse oxidativo, o qual pode culminar em morte celular (McCONKEY, 1998; ALLEN; TRESINI, 2000) e estão associadas a diferentes doenças (HALLIWELL; GUTTERIDGE, 2007).

As EROs são moléculas instáveis e altamente reativas (SIES, 1997). São produzidas fisiologicamente durante a respiração celular mitocondrial, geradas pela radiação ultravioleta, por raios X e raios

gama, são produtos de reações catalisadas por metais, estão presentes em forma de poluentes na biosfera e são produzidas por neutrófilos e macrófagos nos processos inflamatórios. Apresentam assim, um duplo papel nos sistemas biológicos. Podem ser consideradas benéficas por agirem na defesa contra agentes infecciosos e na sinalização celular, e malélicas por causarem danos a lipídios de membrana (lipoperoxidação), ao DNA, às proteínas, e por promoverem a apoptose de células normais ou mesmo necrose (VALKO et al., 2006); estando também envolvidas em várias doenças e no processo de envelhecimento (HALLIWELL; GUTTERIDGE, 2007).

Evidências têm mostrado que as células tumorais apresentam maior estresse oxidativo quando comparado às células normais; associado com ativação de alguns oncogenes e aumento da atividade metabólica (HILEMAN et al., 2004).

Enquanto um elevado ou moderado nível de estresse oxidativo é potencialmente citotóxico e bloqueia a proliferação, por induzir células à apoptose e até à necrose, um baixo nível de estresse pode estimular a divisão celular e o crescimento tumoral (DREHER; JUNOD, 1996).

Sob estresse oxidativo, as células normais podem entrar num processo de adaptação, principalmente das suas defesas antioxidantes (SCHAFER; BUETTNER, 2001). No entanto, as células tumorais podem ter uma capacidade de adaptação limitada para algumas defesas e, por isso, agentes antitumorais que induzam a produção de espécies reativas podem ter potenciais implicações terapêuticas (PELICANO et al., 2004).

Outro fator importante resultante da indução de espécies reativas na célula tumoral é a oxidação de proteínas (MARSHALL; MERCHANT; STAMLER, 2000; MALLIS; BUSS; THOMAS, 2001). A inibição das proteínas da cadeia respiratória, como o citocromo *c*, pode ativar as vias das caspases e induzir a célula à apoptose. Além disso, a lipoperoxidação da membrana mitocondrial pode levar à liberação de outros fatores que podem também ativar a morte (SASTRE; PALLARDO; VINA, 2000; PELICANO et al., 2003).

O aumento nas espécies reativas também está associado à ativação da via de sinalização JNK/SAPK, a qual está envolvida na ativação de genes de proteínas necessárias para a apoptose (DAVIS; RONAI; TEW, 2001).

Sendo assim, como perspectivas terapêuticas estão: a) substâncias que inibam os antioxidantes endógenos, já que as células tumorais produzem uma grande quantidade de espécies reativas e precisam de defesas antioxidantes para evitar maiores danos (HILEMAN et al.,

2003; ZHOU et al., 2003); b) substâncias que gerem espécies reativas, principalmente alterando a permeabilidade da membrana mitocondrial (JING et al., 1999) e c) substâncias que inibam o sistema redox da célula como a butionina sulfoximina que inibe a síntese de glutathiona reduzida (GSH) e tem sido associada em diversos estudos ao aumento da apoptose em células NB4 derivada de leucemia promielocítica aguda (DAI et al., 1999; DAVISON et al., 2003).

Diversos trabalhos recentes têm associado a geração de EROs com o aumento da morte em linhagens leucêmicas (SHIN et al., 2009a; MOON et al., 2009; MAO et al., 2008).

2.6 Defesas Antioxidantes

As espécies reativas no organismo são equilibradas por mecanismos de defesa antioxidante, enzimáticos e não enzimáticos. Os mais eficientes antioxidantes enzimáticos envolvem a superóxido dismutase (SOD), a catalase (CAT), as glutatonas peroxidases (GPx) e as glutatonas S-transferases (GST). Entre os antioxidantes não-enzimáticos, encontram-se: melanina, glutathiona, estrogênios, ácido úrico, vitamina C, vitamina E, carotenóides, flavonóides naturais, entre outros (SIES, 1997; McCALL; FREI, 1999; MATÉS, 2000; NORDBERG; ARNÉR, 2001).

A SOD é uma das mais efetivas enzimas antioxidantes, a qual catalisa a dismutação de $O_2^{\cdot -}$ gerando uma espécie menos reativa, o H_2O_2 (McCORD; FRIDOVICH, 1969).

As catalases são enzimas antioxidantes que estão localizadas na maioria das células de organismos aeróbios, em uma organela chamada de peroxissoma, onde o peróxido de hidrogênio é convertido em água e oxigênio molecular. As catalases possuem uma das taxas mais altas de “*turnover*” (rotatividade ou renovação): uma molécula de CAT pode converter seis milhões de moléculas de H_2O_2 em água e oxigênio a cada minuto (VALKO et al., 2006).

A família das glutatonas peroxidases (GPx) reduz H_2O_2 e outros peróxidos à água ou álcool (RAYMAN, 2000). A família de GPx integra o grupo de selenoproteínas, que têm, em seu sítio ativo o selênio (Se), obtido da dieta ligado à metionina, em alimentos de origem vegetal (selenometionina) e, ligado à cisteína, em alimentos de origem animal (selenocisteína) (FARFANI; DOMENE; PADOVANI, 2001).

A GR é a enzima responsável por reduzir a glutathiona oxidada (GSSG) em glutathiona reduzida (GSH) mantendo assim, elevada a razão

GSH:GSSG (PASTORI; FOYER; MULLINEAUX, 2000; NOCTOR et al., 2002).

As GSTs fazem parte da família das enzimas de fase II da detoxificação de xenobióticos. As GSTs catalisam a conjugação dos xenobióticos com a GSH, o qual posteriormente será eliminado (FIGURA) (TOWNSEND; TEW, 2003).

A GSH é a primeira e a mais importante defesa antioxidante não-enzimática intracelular contra produtos tóxicos de oxigênio, especialmente na mitocôndria, local onde, com alta intensidade, ocorre a síntese de intermediários reativos de oxigênio. Sua forma oxidada é a GSSG, glutatona dissulfeto. A característica antioxidante da GSH é determinada pelo grupamento -SH (sulfidril), presente no resíduo cisteína (MASELLA et al., 2005). A GSH é sintetizada intracelularmente pela ação de duas enzimas citosólicas. A gama-glutamilcisteína sintetase (γ -GCS), que utiliza o glutamato (Glu) e cisteína (Cis) como substratos, forma o dipeptídeo γ -GluCis, que passa a ser combinado à glicina (Gli), numa reação catalisada pela glutatona sintetase (GSH sintetase), para gerar GSH (BALLATORI et al., 2005).

Os fatores pelos quais a GSH age contra o estresse oxidativo são: é co-fator de diversas enzimas de detoxificação como GPx e GST, é *scavenger* do radical hidroxil e do oxigênio singlete, detoxifica o H_2O_2 e lipoperóxidos pela ação catalítica da GPx, participa da regeneração de importantes antioxidantes como vitamina C e E para suas formas ativas (JONES et al., 2000).

Todos os organismos aeróbios estão propensos ao estresse oxidativo, como consequência do metabolismo, ao passo que distúrbios no seu estado redox estão envolvidos na origem e na progressão de inúmeras doenças (PASTORE et al., 2003).

2.7 Flavonóides

Os flavonóides fazem parte de um grupo diverso de metabólitos secundários encontrados nas plantas e contribuem para as propriedades antioxidantes dos vegetais, frutas, óleos, vinho, chocolates e chás (REN et al., 2003).

Mais de 8.000 compostos com estrutura de flavonóides já foram identificados (HODEK; TREFIL; STIBOROVÁ, 2002), sendo que os mesmos podem ser subdivididos em 6 categorias de acordo com sua

estrutura química: flavanonas, flavonas, flavonóis, catequinas, antocianidinas e isoflavonas (FORKMANN; MARTENS, 2001).

As flavanonas são as precursoras diretas da maioria dos flavonóides e são sintetizadas a partir das chalconas (Figura 4). Após a geração das flavanonas, varias enzimas podem agir para alterar a conformação das mesmas, resultando nas diferentes classes de flavonóides com diferentes propriedades biológicas (FOWLER; KOFFAS, 2009). Algumas das atividades biológicas já estudadas são: antialérgica, anti-inflamatória, antiviral, antiproliferativa, antitumoral (REN et al., 2003), anti-úlceras, anti-gastrites, antiviral, antibacteriana entre outras (ZAND; JENKINS, 2002). Os flavonóides podem também modular as vias de sinalização celular como as proteínas quinases (WILLIAMS; SPENCER; RICE-EVANS, 2004) e também modular o fator de transcrição nuclear κ B (NK- κ B) (GOYARZU et al., 2004), vias estas que podem estar relacionadas ao câncer.

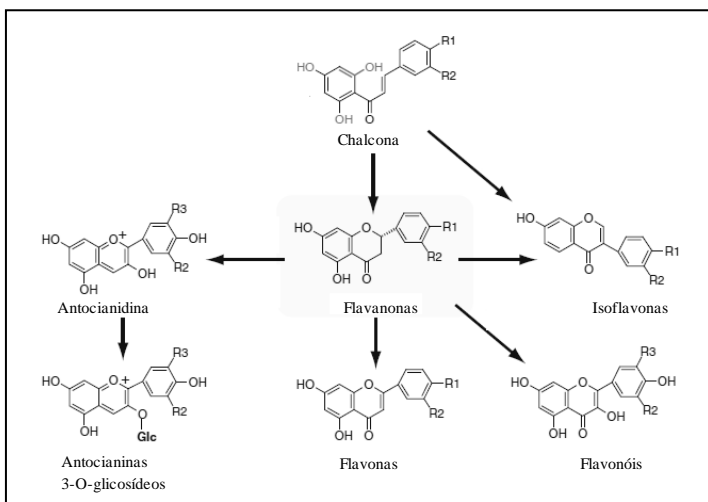


Figura 4: Síntese das flavanonas e diferentes flavonóides a partir das chalconas.

Fonte: Adaptado de FOWLER; KOFFAS, 2009.

Trabalhos recentes têm mostrado que flavonóides, como a quercetina, apresentam efeito antiproliferativo e podem induzir a morte celular por apoptose em alguns tipos de câncer como leucemia (SHEN et al., 2003; CHEN et al., 2005; MERTENS-TALCOTT; PERCIVAL, 2005), câncer de mama (HAKIMUDDIN et al., 2004), câncer de ovário

(CHAN et al., 2003), câncer de pulmão (NGUYEN et al., 2004), entre outros. Nakagawa e colaboradores (2004) mostraram o potencial de um flavonóide presente no chá verde em inibir uma linhagem de células de LLA (Jurkat), com concomitante aumento da atividade da caspase-2 e inibição de proteínas anti-apoptóticas, como a Bcl-2 e a Bcl-xL (LEONE et al., 2003).

As chalconas são precursoras das flavanonas (FOWLER; KOFFAS, 2009) mas também podem ser consideradas uma classe específica de flavonóides (CROZIER; JAGANATH; CLIFFORD, 2009). Quimicamente, formam um grupo de flavonóides de cadeia aberta, em que dois anéis aromáticos são ligados por três carbonos, sendo uma carbonila e dois carbonos α,β -insaturados (Figura). As chalconas são classificadas de acordo com as substituições no anel A e B, por grupos OH e OCH₃. A presença de ligação α,β -insaturada e a ausência de um anel-C são duas características específicas das chalconas que fazem esses compostos serem quimicamente diferentes de outros flavonóides (KOZLOWSKI et al., 2007).

Muitas atividades biológicas já foram citadas para as chalconas. Nakatani e colaboradores (2005) mostraram uma atividade antileucêmica de dihidrochalconas via ativação de caspases, assim como Kachadourian e Day (2006) também demonstraram atividade antileucêmica de hiroxichalconas via depleção de GSH, liberação de citocromo *c* e perda do potencial de membrana mitocondrial. Cabrera e colaboradores (2007) sintetizaram uma grande quantidade de chalconas que se mostraram mais tóxicas que flavononas e flavonas, quanto à sua capacidade antitumoral contra o carcinoma renal humano TK-10, o adenocarcinoma mamário humano MCF-7 e adenocarcinoma de cólon HT-29. Na tabela 1 estão citadas outras atividades já descritas.

Tabela 1: Atividades biológicas citadas para as chalconas.

Antimicobacteriana	KONIECZNY et al., 2007; SIVAKUMAR et al., 2007
Antibacteriana	ROJAS et al., 2002; SELVAKUMAR et al., 2006; KONIECZNY et al., 2007; NOWAKOWSKA, et al., 2008.
Antioxidante	ZHAN; YANG, 2006; COTELLE et al., 2005; CHIN et al., 2007; CHOI et al., 2007;

	KOZLOWSKI et al., 2007
Antifúngica	BOECK et al., 2005; KONIECZNY et al., 2007; BATOVSKA et al., 2007; LAHTCHEV et al., 2008; SIVAKUMAR; KUMAR; DOBLE, 2009.
Antileishmaniose	CHEN et al., 2001; LIU et al., 2003; BOECK et al., 2006
Antimalárica	LIU et al., 2003; DOMINGUEZ et al., 2005
Anti-hipertensiva	OGAWA et al., 2007
Antiparasitária	MONTES-AVILA et al., 2009
Vasodilatadora	DONG et al., 2009
Pró-oxidante	MAO et al., 2008; LEE et al., 2001
Anti-inflamatória	HERÊNCIA et al., 1999; ROJAS et al., 2002; MENG et al., 2004; RANI et al., 2004; WON et al., 2005; LIU et al., 2007
Antitumoral	NAKATAMI et al., 2005; WON et al., 2005; FOREJTNÍKOVÁ et al., 2005; BHAT et al., 2005; HSU; KUO; LIN, 2005; LIU; GO, 2006; HSU et al., 2006; MODZELEWSKA et al., 2006; CABRERA et al., 2007; ECHEVERRIA et al., 2009; BOUMENDJEL et al., 2008; SAXENA et al., 2007; HENMY, ET AL., 2009; BOUMENDJEL et al., 2008, LORENZO et al., 2008; NAVARINI et al., 2009; FANG et al., 2008.

Com base nestes estudos demonstrados, nosso grupo iniciou o estudo da atividade antitumoral de chalconas sintéticas, já que a pesquisa de novos fármacos faz-se necessária para o desenvolvimento

de melhores quimioterápicos para o tratamento da LLA que aumentem as taxas de cura e sobrevida dos pacientes e apresentem menores efeitos colaterais.

3. OBJETIVOS

3.1 Objetivo Geral:

- Avaliar os potenciais efeitos antitumorais de chalconas sintéticas na linhagem celular de leucemia linfoblástica aguda murina (L1210).

3.2 Objetivos específicos:

- Avaliar o efeito citotóxico das chalconas sobre a linhagem celular L1210;
- Verificar o tipo de morte induzida pelas chalconas;
- Caracterizar o estresse oxidativo em decorrência do efeito das chalconas;
- Avaliar a lipoperoxidação induzida pelas chalconas;
- Avaliar se as chalconas interferem na atividade das enzimas GR, GST, GPx, γ -GCS catalase celular e na atividade da catalase isolada;
- Verificar o efeito das chalconas nas concentrações de GSH, GSSG e GT;
- Verificar o efeito citotóxico das chalconas em associação com agentes antioxidantes;
- Avaliar o efeito das chalconas no potencial de membrana mitocondrial e no teor energético celular.

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, EUA); o dimetil sulfoxido (DMSO), o álcool etílico, o sulfato de cobre (CuSO_4) foram adquiridos da Nuclear; o tris (hidroximetil) aminometano, o peróxido de hidrogênio, o tartarato de sódio e o cloreto de magnésio (MgCl_2) foram adquiridos da Merck® (Darmstadt, Alemanha); o ácido etilenodiaminotetraacético (EDTA), o cloreto de potássio (KCl), o cloreto de sódio (NaCl), o bicarbonato de sódio (NaHCO_3) e o carbonato de sódio (Na_2CO_3), foram adquiridos da Reagen (Rio de Janeiro, Brasil); o hidróxido de sódio (NaOH) foi adquirido da Vetek (Rio de Janeiro, Brasil); a proteinase K e o iodeto de 5,5',6,6'-tetracloro-1,1',3,3'-tetraetilbenzimidazolocarbo-cianina (JC-1) foram adquiridos da Invitrogen® (Alemanha); a RNase foi adquirida da Promega (Wincosin, Madison, EUA); o brometo de dimetiazol difeniltetrazólio (MTT), a superóxido dismutase (SOD), o ácido N-[2-Hidroxietil]piperazina-N'-[2-etanosulfônico] (HEPES), a albumina bovina, a pepstatina, a leupeptina, a aprotitina, o fluoreto de fenilmetilsulfonil (PMSF), a acetato de diclorofluoresceína (DCFH-DA), o ácido tiobarbitúrico (TBA), o ácido dietilenotriaminopentaacético (DPTA), o triton-X100, o dithiothreitol (DTT), o sulfonato de 3-[(3-cloroamidopropil)-dimetilamônio]-1-propano (CHAPS), a glutationa reduzida (GSH), a glutationa redutase (GR), a glutationa oxidada (GSSG), o cloro-dinitro-benzeno (CDNB), a catalase, o Trolox, o fosfato de nicotinamida adenina dinucleotídeo (NADPH), o ácido 5,5'-ditio-bis-2-nitrobenzóico (DTNB), o carbonil cianeto p-trifluorometoxifenil-hidrazona (FCCP) e o acetil-Asp-Glu-Val-Asp-amino metil cumarina (Ac-DEVD-AMC), foram adquiridos da Sigma® (St. Louis, MO, EUA); o Kit luciferina/luciferase foi adquirido da Biorbit (Tuku, Finlândia).

4.2 Síntese das Chalconas

A síntese das chalconas derivadas da 3,4-metilenodioxiacetofenona foi realizada pelo grupo de pesquisa do Prof.º Rosendo Augusto Yunes, do Departamento de Química da Universidade Federal de Santa Catarina. Em um balão de reação de 100 mL e de uma boca, adicionou-se a 3,4-metilenodioxiacetofenona (0,33 g; 2 mmol), o

aldeído (2 mmol) e metanol (15 mL). Dissolveram-se os reagentes sob agitação magnética e, em seguida, adicionou-se lentamente KOH 50% v/v (60 gotas). Deixou-se a reação sob agitação magnética, à temperatura ambiente, por 24 horas. Após este período, adicionou-se água destilada à reação, o que provocou a precipitação dos compostos, e acidificou-se a mesma com ácido clorídrico 10%, para neutralização do meio. Filtrou-se em funil de Büchner, verificou-se a pureza por CCD e, quando necessário, as chalconas foram recristalizadas em diclorometano e precipitadas em hexano.

A síntese das chalconas derivadas da 2-naftilacetofenona também foi realizada pelo mesmo grupo e pelo mesmo método citado anteriormente, no entanto se adicionou ao balão de reação a 2-naftilacetofenona (0,34g; 2 mmol), o aldeído (2 mmol) e metanol (20 mL).

4.3 Cultura Celular

Foi utilizada uma linhagem de célula leucêmica linfoblástica de origem murina (L1210) obtida da American Type Culture Cell (ATCC). 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 µg/mL de estreptomicina, 10 mM HEPES, pH 7.4, em estufa umidificada, a 37°C e com 5% CO₂. 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.

4.4 Tratamento Celular

Os compostos foram dissolvidos em uma solução de DMSO e armazenados a 4°C. Essas soluções estoques foram diluídas em meio de cultura para atingir as concentrações desejadas nos experimentos. As células L1210 foram incubadas com as chalconas em placas de 6, 12, 24 ou 96 poços, dependendo do procedimento experimental e por diferentes tempos. 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. A concentração máxima de DMSO adicionada as células foi de 0,4%.

4.5 Ensaio de Viabilidade Celular

A viabilidade celular foi analisada pelo método do MTT (MOSMANN, 1983). O MTT é um sal de tetrazólio de cor amarela, que é reduzido a formazan, de cor azulada, pela atividade oxidativa das células, funcionando pois, como um indicador de viabilidade celular. Foram incubadas 1×10^5 células por 24 horas e 5×10^4 por 48 horas, em triplicata, com os compostos, em placas de 96 poços. Decorrido o tempo de incubação, o meio de cultura foi retirado e acrescentado um novo meio contendo o MTT ($0,25 \mu\text{g}/\mu\text{L}$) seguido de incubação por 2 horas, a 37°C . Este meio foi retirado e o precipitado formazan foi dissolvido com DMSO. O formazan formado foi medido em 540nm, com o uso de um leitor de microplacas. A densidade óptica, obtida do grupo controle, células sem tratamento, foi considerado como 100% de células viáveis.

4.6 Determinação da Curva de Concentração x Resposta

Para determinar a dependência de concentração x efeito, 1×10^5 células foram incubadas por 24 horas e 5×10^4 por 48 horas com as chalconas em concentrações crescentes (0-100 μM). Todas as incubações foram feitas em estufa umidificada, a 37°C , com 5% CO_2 , seguido do ensaio do MTT. A IC_{50} , concentração que inibe 50% do crescimento celular, foi calculada em 24 e 48 horas, através das curvas obtidas.

4.7 Determinação da Curva Tempo x Resposta

Para determinar a dependência tempo x efeito, 1×10^5 células foram incubadas por 2, 4, 6, 15, 20 e 24 horas, nas concentrações de IC_{50} . Todas as incubações foram feitas em estufa umidificada, a 37°C , com 5% CO_2 , seguido do ensaio do MTT.

4.8 Análise da Apoptose pelo Método de Fragmentação do DNA

O isolamento de fragmentos apoptóticos do DNA foi realizado seguindo o método de Han (1997). As células (3×10^6) foram tratadas com as chalconas nas concentrações das IC_{50} para cada substância, em placas de 6 poços e mantidas por 24 horas a 37°C , com 5% de CO_2 . As células foram lavadas com PBS e posteriormente lisadas com tampão de

lise (10mM EDTA, 50mM Tris-HCl pH 8.0; 0,25% NP-40, 0,5 mg/mL proteinase K) a 50 °C, por 2 horas. O DNA foi precipitado com 2,5 vol de etanol-NaCl overnight, a -20°C. As amostras foram, então, centrifugadas a 11000 g por 30 minutos. O material decantado foi lavado com etanol a 70%, seco à temperatura ambiente, dissolvido em tampão (10mM Tris-HCl pH 8.0; 0,1mM EDTA, 0,6 g/mL de RNase A) e incubado a 37°C, por 1 hora. A concentração do DNA extraído de cada amostra foi determinada espectrofotometricamente (SAMBROOK; RUSSELL, 2001). As amostras foram diluídas 1:100 em água destilada; a absorbância foi medida em 260nm.

A fragmentação do DNA foi analisada por eletroforese, em gel de agarose a 1%, e corado com brometo de etídio. A corrida foi realizada a 150 V e 200 mA, por 40 minutos, em tampão TAE (Tris - ácido acético - EDTA). Foram aplicados 2µg de DNA de cada amostra. Os géis foram fotografados sob iluminação ultravioleta de 320nm (Hoefer-MacroVue UV-20), utilizando-se um sistema de fotodocumentação de géis (Doc-Print®).

4.9 Avaliação da Atividade da Caspase-3

Para avaliação da atividade da caspase-3, 3×10^6 células foram tratadas com as chalconas nas concentrações das IC₅₀ de cada substância por 2 e 4 horas. Após os tratamentos, as células foram lavadas 2 vezes com PBS e lisadas com tampão de lise contendo HEPES 10 mM (pH 7.4), KCl 42 mM, MgCl₂ 5 mM, PMSF 1 mM, EDTA 100 µM, EGTA 100 µM, pepstatina A 1 µg/mL, leupeptina 1 µg/mL, aprotinina 5 µg/mL, CHAPS 0,5% e DTT 1 mM por 5 minutos entre 4 e 8°C. Posteriormente, 25 µl deste lisado celular foram adicionados a 75 µL do meio de reação contendo HEPES 25 mM (pH 7.4), CHAPS 1%, EDTA 1 mM, sacarose 10% e DTT 3 mM. A esta mistura foram adicionados 10 µM do substrato fluorogênico para caspase-3 acetil-Asp-Glu-Val-Asp-amino metil cumarina (Ac-DEVD-AMC) e incubados por 120 minutos a 37°C. A atividade da caspase-3 foi avaliada através da produção do AMC fluorescente monitorada em fluorímetro, utilizando o comprimento de onda de 380 nm para excitação e emissão em 465 nm. Os valores obtidos nas amostras foram subtraídos da fluorescência dos brancos correspondentes sem lisado celular. Os resultados foram expressos como alterações na unidade de fluorescência por hora por micrograma de proteína (ZUSE et al., 2007).

4.10 Determinação da citotoxicidade das chalconas associadas aos antioxidantes CATALASE, TROLOX®, SOD

Neste experimento verificou-se a possível toxicidade das chalconas através da produção de EROs. Para isto, três antioxidantes foram associados às chalconas: superóxido dismutase (SOD), Trolox®: um análogo hidrossolúvel da vitamina E (TR) e CAT. As células (1×10^5) foram incubadas com as chalconas em concentrações crescentes (0-100 μ M) juntamente com 250U/mL de SOD, 200 μ M de Trolox® e 5000U/mL de CAT, por 24 horas a 37 °C com 5% de CO₂, seguido do ensaio do MTT. Como controle foram utilizadas células L1210 tratadas apenas com o antioxidante na concentração testada e a densidade ótica deste foi considerada como 100% de viabilidade celular.

4.11 Determinação de Espécies Reativas de Oxigênio

Este método consiste em avaliar a presença de EROs no interior da célula, através da adição de acetato de diclorofluoresceína (DCFH-DA) à célula. Esse composto é transformado, no citoplasma, em diclorofluoresceína reduzida (DCFH) pelas esterases que, por sua vez, na presença de EROs, é oxidada em diclorofluoresceína (DCF), emitindo fluorescência (SAUER et al., 2003).

As células, 5×10^5 , foram tratadas com as chalconas nas concentrações das IC₅₀ de cada substância, isoladas e associadas a 5000U/mL de CAT em placas de 24 poços e mantidas por 4 horas, a 37°C, com 5% de CO₂. Adicionou-se então, a DCFH-DA, 10 μ M, às células, e estas foram mantidas por 30 minutos nas mesmas condições. As células foram lavadas três vezes com PBS e a fluorescência foi medida em espectrofluorímetro (Perkin Elmer LS55). Os resultados foram obtidos como unidades de fluorescência e foram expressos em porcentagem de EROs em relação ao controle de células sem tratamento considerado como 0%.

4.12 Preparação das Amostras para Determinação das Defesas Antioxidantes e Lipoperoxidação

As células, 6×10^6 para as enzimas antioxidantes, 3×10^6 para GT e GSH e 4×10^6 para TBARS foram tratadas com as chalconas nas concentrações das IC₅₀ para cada substância por 24 horas. Em seguida,

foram lavadas com PBS, ressuspensas em 200 μ L de tampão homogenato (tampão fosfato 20mM pH 7,4, NaCl 150mM, Triton X-100 1%) contendo pepstatina A 7 μ g/mL, leupeptina 5 μ g/mL, aprotinina 2 μ g/mL e SBTI 5 μ g/mL ultra-sonicadas por 10 segundos e centrifugadas a 6000g por 10 minutos. Os sobrenadantes (homogenatos) obtidos foram mantidos a -20°C até a sua utilização para análise de CAT, GPx, GR, GST, GSH, GT, TBARS e para a dosagem de proteína utilizada para corrigir os valores em relação ao controle.

4.13 Avaliação da Peroxidação Lipídica

O malondialdeído (MDA) é um produto secundário e majoritário da peroxidação lipídica e pode ser medido livre pelo fato de reagir com o ácido tiobarbitúrico (VASCONCELOS et al., 2007).

Sendo assim, a peroxidação lipídica foi avaliada através da análise das substâncias que reagem com o ácido tiobarbitúrico (TBARS), destacando-se o MDA, produzindo uma base de Schiff de coloração rosa (BIRD; DRAPER, 1984).

Para o teste foram adicionados em tubos de ensaio: 160 μ L de homogenato, 340 μ L de tampão tris-HCl (60 mM, pH 7,4, 0,1 mM DPTA), 500 μ L de TCA 12% e 500 μ L de TBA 0,73% agitando a cada adição. Os tubos foram mantidos a 100 °C por 2 horas. Posteriormente, o material foi resfriado e centrifugado (5 min a 10000g). A absorbância do sobrenadante foi medida em 535 nm, sendo os valores expressos em nmol TBARS/ μ g proteína.

4.14 Determinação da Atividade da Catalase Celular

Para análise da atividade desta enzima, foi utilizado o método descrito por Aebi (1984), que quantifica a velocidade de decomposição do peróxido de hidrogênio, em 240 nm, pela enzima presente na amostra. Utiliza-se a solução de peróxido de hidrogênio 10mM em tampão fosfato 50mM pH 7,0 preparada e titulada no dia da análise.

Para o ensaio da CAT utilizou-se 20 μ L de homogenato em 980 μ L de solução de peróxido de hidrogênio. Foi realizada uma cinética de 10 minutos sendo as absorbâncias monitoradas a cada 5 segundos. Para o cálculo da atividade da catalase foi utilizada a seguinte fórmula:

$CAT \text{ (mmol}\cdot\text{min}^{-1}\cdot\mu\text{g}^{-1}) = [(K/\varepsilon) \times 60 \times \text{diluição}]/\text{PTN}) \times 1000$,
sendo:

K= coeficiente angular da equação de reta obtida de cada amostra

$\varepsilon=40 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$

Diluição = 50x

PTN = proteína em $\mu\text{g}/\mu\text{L}$

Os valores foram expressos em porcentagem de atividade enzimática em relação ao controle considerado como 100% de atividade.

4.15 Determinação do Efeito das Chalconas na Atividade da Catalase Isolada

Para análise da atividade enzimática da CAT, foi utilizada uma enzima isolada de fígado bovino (EC 232-577-1) adquirida da Sigma®. O método utilizado foi o descrito por Aebi (1984). Para obtenção da atividade da CAT utilizou-se 15U desta enzima em 995 μL de solução de peróxido de hidrogênio 10 mM. Para avaliar o efeito das chalconas na atividade enzimática utilizou-se a mesma quantidade de catalase e as chalconas nas suas respectivas IC_{50} . Foi realizada uma cinética de 40 segundos sendo as absorbâncias monitoradas a cada 2 segundos. Para o cálculo foi utilizada a seguinte equação:

$CAT \text{ (mmol}\cdot\text{min}^{-1}\cdot\text{U}^{-1}) = [(K/\varepsilon) \times 60]/\text{U}) \times 1000$, sendo:

K= coeficiente angular da equação de reta obtida de cada amostra

$\varepsilon=40 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$

U= número de unidades de catalase adicionadas.

Os valores foram expressos em porcentagem de atividade enzimática em relação ao controle considerado como 100% de atividade que corresponde à atividade da catalase sem adição de nenhuma das chalconas.

4.16 Determinação da Atividade da Glutathiona Peroxidase

Este ensaio baseia-se na medida do decréscimo de absorbância (340 nm), promovido durante a redução da GSSG, catalisada pela GR,

em presença de NADPH. A velocidade de oxidação de NADPH é proporcional à velocidade de produção de GSSG a partir de GSH, em presença de t-BuOOH, catalisada pela GPx (Flohé; Gunzler, 1984).

Para este ensaio utilizou-se 50 μL de homogenato e 50 μL de t-BuOOH 0,04% colocados em 900 μL de um meio de reação (tampão fosfato 0,1 M pH 7,0, NADPH 0,2mM, DPTA 0,5 mM pH 7,0, GSH 1,6mM e 15U de GR colocada momentos antes do ensaio). As amostras foram analisadas durante 10 minutos a cada 5 segundos. Para o cálculo de GPx presente na amostra foi utilizada a seguinte equação:

$$\text{GPx (mmol}\cdot\text{min}^{-1}\cdot\mu\text{g}^{-1}) = [(K/\varepsilon) \times \text{diluição} \times 1000 \times 60]/\text{PTN},$$

sendo

K= coeficiente angular da equação de reta obtida de cada amostra

$$\varepsilon = 6220 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$$

Diluição: 20x

PTN: proteína em $\mu\text{g}/\mu\text{L}$

Os valores foram expressos em porcentagem de atividade enzimática em relação ao controle considerado como 100% de atividade.

4.17 Determinação da Atividade da Glutathiona Redutase

O método utilizado para a análise da atividade desta enzima foi o proposto por Carlberg e Mannervick (1975), em que se verifica em 340 nm, a taxa de oxidação do NADPH devido à redução da GSSG pela GR presente na amostra.

Para este ensaio utilizou-se 50 μL de homogenato em 950 μL de um meio de reação (tampão fosfato 0,1 M pH 7,0; NADPH 0,2mM, GSSG 1mM e DPTA 0,5mM). As amostras foram analisadas durante 5 minutos a cada 3 segundos. Para o cálculo de GR presente na amostra foi utilizada a seguinte equação:

$$\text{GR (mmol}\cdot\text{min}^{-1}\cdot\mu\text{g}^{-1}) = [(K/\varepsilon) \times \text{diluição} \times 1000 \times 60]/\text{PTN} ,$$

sendo

K= coeficiente angular da equação de reta obtida de cada amostra

$$\varepsilon = 6220 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$$

Diluição: 20x

PTN: ($\mu\text{g}/\mu\text{L}$)

Os valores foram expressos em porcentagem de atividade enzimática em relação ao controle considerado como 100% de atividade.

4.18 Determinação da Atividade da Glutathione S-transferase

As GST constituem um grupo de enzimas que catalisam a formação de tioésteres pela adição de GSH a um grande número de compostos que contém um carbono eletrofílico. A atividade da GST foi medida espectrofotometricamente em 340 nm (KEEN et al., 1974). Para o ensaio, 20 µL do homogenato foi adicionado em um meio contendo 10 µL CDNB 0,1 M, 10 µL de GSH 0,1 M e 960 µL de tampão fosfato 0,1 M pH 7,0. Para a cubeta de referência não foi adicionado o homogenato e aumentou-se o volume de tampão fosfato para 980 µL. As amostras foram analisadas durante 3 minutos a cada 3 segundos. Para o cálculo de GST presente na amostra foi utilizado a seguinte equação:

$$\text{GST } (\mu\text{mol}\cdot\text{min}^{-1}\cdot\mu\text{g}^{-1}) = [(K/\varepsilon) \times \text{diluição} \times 1000 \times 60]/\text{PTN} ,$$

sendo

K= coeficiente angular da equação de reta obtida de cada amostra

$\varepsilon = 9600 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$

Diluição: 50x

PTN: (µg/µL)

Os valores foram expressos em porcentagem de atividade enzimática em relação ao controle considerado como 100% de atividade.

4.19 Determinação da Concentração de Glutathione Total

A glutathione total (GSH + GSS) foi quantificada empregando-se o método da glutathione 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 glutathione redutase e de NADPH, é reduzida novamente em GSH. Concomitantemente à formação de GSTNB e GSH, há a 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 glutatona redutase sobre a GSTNB e GSH intracelular.

Para o ensaio 20µL de homogenato foi transferido para placas de 96 poços, seguida da adição de 140 µL de tampão fosfato 0,2M (pH 8,0), 10µL de GR (4U/mL), 10µL de NADPH (3mM) e 20µL de DTNB (2,5mM). A absorbância foi medida em 405nm, com um leitor de microplacas.

Para obtenção da concentração de GT, a absorbância de cada amostra foi extrapolada em uma curva-padrão. Os valores obtidos foram ainda corrigidos através da dosagem de proteína de cada uma das amostras seguindo o método de Lowry.

4.20 Determinação da Concentração de Glutaciona Reduzida e Oxidada

Para determinação da concentração de GSH das amostras foi empregado o mesmo método citado anteriormente (TIETZE, 1969). No entanto, não foi adicionada a GR ao meio de reação.

Para determinação de glutaciona oxidada foi utilizada a seguinte equação:

$$\text{GSSG} = (\text{GT}-\text{GSH})/2$$

4.21 Determinação da Atividade da γ -Glutamyl-cisteína-sintase

O método utilizado para a análise da atividade desta enzima foi proposto por Seeling e Meister (1985) com algumas modificações. Inicialmente, 1×10^7 células foram incubadas com as chalconas nas concentrações das IC₅₀ para cada substância por 24 horas. Em seguida, as células foram lavadas com PBS e ressuspensas em 200µL de tampão de lise (Tris-HCl 0,1M (pH 8,0), MgCl₂ 5mM, DTT 2mM, pepstatina A 7 µg/mL, leupeptina 5 µg/mL, aprotinina 2 µg/mL e SBTI 5 µg/mL), ultra-sonicadas por 30 segundos e centrifugadas a 10000g por 30 minutos. Os sobrenadantes obtidos foram mantidos em gelo e utilizados para dosagem de proteína (LOWRY et al., 1951). Para determinar a atividade da γ -glutamyl-cisteína-sintase (γ -GCS) um volume do sobrenadante correspondente a 40 µg de proteína foi adicionado à 170 µL de meio de reação (Tris-HCl 0,1M (pH 8,0), KCl 150 mM, Na₂-ATP 5mM, fosfoenolpiruvato 2mM, L-glutamato 10mM, L- α -aminobutirato

10mM, MgCl₂ 20mM e Na₂-EDTA 2mM), a 1 µL de uma mistura de PK (6µL) e LDH (11 µL) e a 10 µL de NADH 0,2mM. A absorbância foi monitorada durante 10 minutos a cada 5 segundos. Para o cálculo foi utilizada a seguinte fórmula:

$$\gamma\text{-GCS } (\mu\text{mol}\cdot\text{min}^{-1}\cdot\mu\text{g}^{-1}) = [(K/\varepsilon) \times 10^6 \times 60]/40, \text{ sendo}$$

K= coeficiente angular da equação de reta obtida de cada amostra
 $\varepsilon = 6220 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$

Os valores foram expressos em porcentagem de atividade enzimática em relação ao controle considerado como 100% de atividade.

4.22 Determinação do Potencial de Membrana Mitocondrial

Para avaliar o efeito das chalconas no potencial de membrana mitocondrial foi utilizada uma sonda fluorescente (JC-1). Esta substância catiônica, penetra na membrana negativa da mitocôndria quando o potencial está estabelecido e apresenta-se na forma de agregados que emitem fluorescência vermelha. Quando há perda do potencial de membrana mitocondrial, como no caso das células apoptóticas, ocorre a liberação desta sonda para o citoplasma e a mesma passa à forma de monômeros que emitem fluorescência verde.

Para o ensaio, 5×10^5 células L1210 foram incubadas, em placas de 24 poços, com as chalconas nas concentrações das IC₅₀ para cada substância por 4 horas. Adicionou-se o JC-1 (10µg/mL) às células e estas foram mantidas por 20 minutos a 37°C e 5% de CO₂. As células foram lavadas três vezes, ressuspensas em 500 µL de PBS e 100 µL foi utilizado para leitura da fluorescência vermelha e verde em espectrofluorímetro (Perkin Elmer LS55). As duas fluorescências foram excitadas em 488nm, a fluorescência vermelha foi detectada em 590 nm e a verde em 527 nm de emissão. O potencial mitocondrial foi calculado como uma taxa (vermelha/verde) para cada chalcona e para as células sem tratamento e foi expresso em porcentagem, sendo as células sem tratamento consideradas como 100%. Como controle positivo foi utilizado o FCCP um conhecido desacoplador do potencial de membrana mitocondrial.

4.23 Determinação da concentração de ATP

O método luciferina/luciferase é muito utilizado na determinação da concentração de ATP em amostras biológicas. 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 luciferina e ao pirofosfato (PPi). Esse complexo reage subsequentemente com O_2 , resultando na emissão de um feixe de luz ($h\nu$), na liberação de AMP, CO_2 e oxiluciferina (DELUCA, 1976). A quantidade de luz emitida é naturalmente proporcional à quantidade inicial de ATP existente no meio de reação

Para determinar a concentração de ATP presente nas amostras, 1×10^6 células foram incubadas com as chalconas nas concentrações das IC_{50} para cada substância por diferentes tempos (1, 2, 4, 6, 15, 20 e 24 horas). Após o tempo de incubação as células foram lavadas três vezes com PBS. O pellet foi ressuspenso em 40 μL de TCA 1,25% e mantido em gelo por 30 minutos. Decorrido este tempo, o pH foi neutralizado adicionando-se 20 μL de tampão tris-acetato 1M pH7,5, as amostras foram centrifugadas e o sobrenadante utilizado para dosagem da concentração de ATP.

Em uma cubeta de plástico, adicionou-se o tampão luciferina/luciferase; em seguida, adicionou-se, ao tampão, a solução contendo luciferina/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 sido 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 de fundo e registrado; a terceira adição foi a 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 não comercial LUMI. Os valores obtidos para as chalconas foram corrigidos em relação ao controle, levando-se em conta a morte causada pelas mesmas em cada um dos tempos, e os valores foram expressos em porcentagem em relação ao controle.

4.24 Dosagem de Proteína

A determinação da concentração de proteína foi realizada em triplicata em placa de 96 poços pelo método de Lowry (LOWRY et al., 1951). As amostras foram adicionadas juntamente com água destilada

para volume final de 20 μ L. Após, foi adicionado 160 μ L de uma solução cupro-alcálica (Na₂CO₃ 2% , NaOH 0,4%, tartarato de sódio 2% e CuSO₄ 1%) e incubado 10 minutos em temperatura ambiente. Foram então adicionados 16 μ L do reagente de Folin diluído 5 vezes e incubado por mais 30 minutos. A leitura foi realizada em um leitor de microplaca em 750 nm e as concentrações foram obtidas através de uma curva-padrão utilizando albumina sérica bovina (BSA).

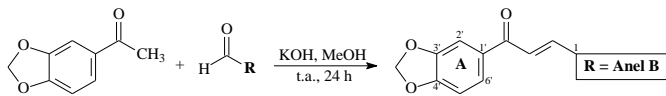
4.25 Análise estatística

Os resultados foram expressos como a média \pm erro-padrão da média (EPM); cada experimento foi repetido pelo menos três vezes, em triplicata; para a avaliação estatística, foi utilizada a análise de variância de uma via (ANOVA), seguida do teste de Bonferroni; um valor de $p < 0,05$ foi considerado estatisticamente significativo.

5. RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.1 Síntese das Chalconas

5.1.1 Chalconas Derivadas da 3,4-metilenodioxiacetofenona



L1 R: 4-Cl-fenil

^aL2 R: 3-Cl-fenil

^aL4 R: 3,4-diCl₂-fenil

L5 R: 4-NO₂-fenil

L6 R: 3-NO₂-fenil

L7 R: 4-Br-fenil

L8 R: 4-OCH₃-fenil

L13 R: 4-CH₃-fenil

L14 R: 4-N(CH₃)₂-fenil

L19 R: 4-F-fenil

L21 R: fenil

L23 R: 2-Cl-fenil

^aL3 R: 2,6-diCl₂-fenil

L9 R: 2,4,5-triOCH₃-fenil

L10 R: 2,4,6-triOCH₃-fenil

L11 R: 3,4,5-triOCH₃-fenil

L12 R: 3,4-OCH₂O-fenil

^aL15 R: 2-naftil

^aL16 R: 1-naftil

^aL17 R: 2,6-diOCH₃-fenil

^aL18 R: 4-O(CH₂)₃CH₃-fenil

^aL20 R: 2-F-fenil

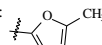
L25 R: 3-OCH₃-fenil

L28 R: (3-OCH₃-4-OCH₂fenil)-fenil

L29 R: 2,5-diOCH₃-fenil

L38 R: 3,4-diOCH₃-fenil

^aL24 R:

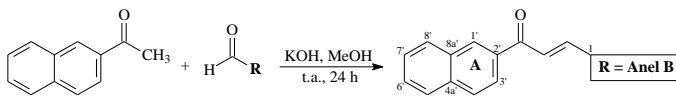


^aL27 R:



Figura 5: Reação de síntese das chalconas derivadas da 3,4-metilenodioxiacetofenona (^a compostos novos)

5.1.2 Chalconas Derivadas da 2-naftilacetofenona



R7 R: 3-NO₂-fenil

R8 R: 4-NO₂-fenil

R10 R: 4-Cl-fenil

^aR11 R: 3,4-Cl₂

R13 R: 3-Cl-fenil

R15 R: fenil

R16 R: 4-CH₃-fenil

R17 R: 4-OCH₃-fenil

R21 R: 4-N(CH₃)₂-fenil

R24 R: 4-F-fenil

R26 R: 4-Br-fenil

R12 R: 2,6-diCl₂-fenil

^aR19 R: 2,6-diOCH₃-fenil

R20 R: 2,4,5-triOCH₃-fenil

^aR23 R: 4-O(CH₂)₃CH₃-fenil

^aR25 R: 2-F-fenil

R27 R: 3,4-OCH₂O-fenil

R32 R: 4-COOH

R28 R: 2-naftil

R29 R: 1-naftil

^aR44 R: 2,4,6-triOCH₃-fenil

^aR45 R: (3-OCH₃-4-OCH₂fenil)-fenil

R30 R:



^aR36 R:

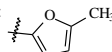


Figura 6: Reação de síntese das chalconas derivadas da 2-naftilacetofenona (^a compostos novos)

5.2 Citotoxicidade das Chalconas e Análise do DNA

Considerando o potencial citotóxico de muitos produtos naturais, a síntese de compostos derivados da estrutura básica das chalconas pode ser uma estratégia no desenvolvimento de novos fármacos antitumorais. Em busca de novas chalconas com atividade antileucêmica, realizou-se uma triagem com duas séries de chalconas com a linhagem celular L1210: as derivadas da 3,4-metilenodioxiacetofenona (série L) e as derivadas da 2-naftilacetofenona (série R). Para esta triagem, foram realizados ensaios com quatro concentrações (25, 50, 75 e 100 μM) em um tempo de incubação de 24 horas. As chalconas: R7, R13, R14, R15, R25, R30, L2, L3, L16, L20, L21, L23, L25 e L29 foram selecionadas para análise do tipo de morte envolvida, pois apresentaram maior citotoxicidade (Figura 7 e 8).

Dentre as chalconas da série L (grupo 3,4-metilenodioxifenil no anel A) e da série L (grupo 2-naftil no anel A) (Figuras 5 e 6), os compostos que apresentaram menores valores de IC_{50} ($< 40 \mu\text{M}$) na avaliação de citotoxicidade, foram estruturas com substituintes que diminuem a densidade eletrônica do anel aromático (retiradores de elétrons) nas posições 2 ou 3 do anel B. A presença destes grupos pode, portanto, ser essencial para a atividade citotóxica destes compostos, tema discutido mais adiante.

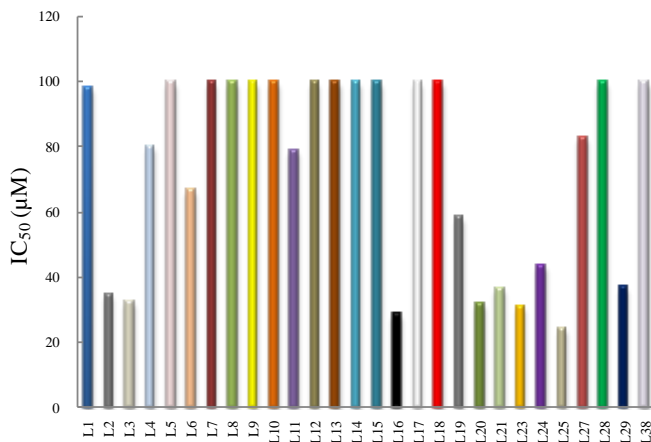


Figura 7. Citotoxicidade das chalconas derivadas da 3,4-metilenodioxiacetofenona em células L1210. As células (1×10^5) foram incubadas por 24 horas em concentrações crescentes e a viabilidade celular foi avaliada pelo método do MTT.

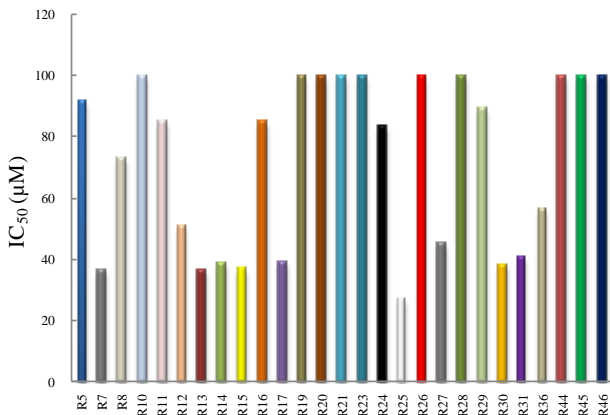


Figura 8. Citotoxicidade das chalconas derivadas da 2-naftilacetofenona em células L1210. As células (1×10^5) foram incubadas por 24 horas em concentrações crescentes e a viabilidade celular foi avaliada pelo método do MTT.

Após a seleção das melhores chalconas, foi realizada a análise do tipo de morte celular envolvida, já que é desejável que os fármacos antitumorais sejam capazes de induzir a morte celular por apoptose (JUN et al., 2007). O processo apoptótico culmina na desintegração nuclear, degradação do DNA e formação dos corpos apoptóticos, os quais são eliminados por fagocitose (ARENDS et al., 1990). A apoptose acontece sem causar reação inflamatória, diferente da necrose em que ocorre a ruptura da membrana plasmática, extravasamento do conteúdo intracelular e a indução de uma resposta inflamatória que podem resultar em danos para as células adjacentes (OKADA; MAK, 2004)

As chalconas R7, R13 e R15 induziram a fragmentação do DNA, característica da morte celular por apoptose, enquanto que as chalconas R14, R25, R30, L2, L3, L16, L20, L21, L23, L25 e L29 não fragmentaram o DNA (Figura 9).

Analisando a relação da estrutura das chalconas selecionadas com o tipo de morte celular induzida podemos concluir que a presença do grupo 2-naftil no anel A (série R) é essencial para a indução da morte por apoptose já que todas as chalconas da série L induziram à necrose. Além disso, analisando a estrutura das três chalconas pertencentes à série R que induziram a apoptose podemos notar que a chalcona R15 não possui nenhum substituinte no anel B e que as chalconas R7 e R13

possuem grupos retiradores de elétrons na posição 2 do anel B (Figura 10). Sendo assim, podemos concluir que a ausência de substituintes ou a presença de substituintes retiradores de elétrons na posição 2 do anel B são essenciais para a indução da morte celular por apoptose. Outras chalconas da série R com os mesmos grupos retiradores de elétrons em outras posições do anel B (R8, R10, R11, R12 e R14) induziram a morte celular por necrose.

Estes resultados estão de acordo com Nam e colaboradores (2003) que observaram que chalconas com grupos retiradores de elétrons no anel B, especialmente na posição 2, conferem forte inibição da angiogênese e marcante atividade antitumoral em células de melanoma murino (B16), de câncer de cólon (HCT116) e de carcinoma epidermóide humano (A431).

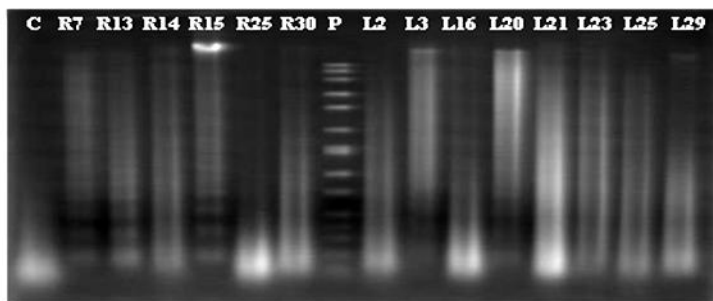


Figura 9. Análise do DNA de células L1210. As células (3×10^6) foram incubadas com as chalconas R7, R13, R14, R15, R25, R30, L2, L3, L16, L20, L21, L23, L25 e L29 por 24 horas, nas respectivas concentrações das IC_{50} , sendo representadas na figura pelos respectivos códigos. C representa o controle de células sem tratamento e P o padrão de peso molecular de DNA. Os extratos nucleares foram obtidos e a fragmentação do DNA foi analisada por eletroforese em gel de agarose 1%, corado com brometo de etídio.

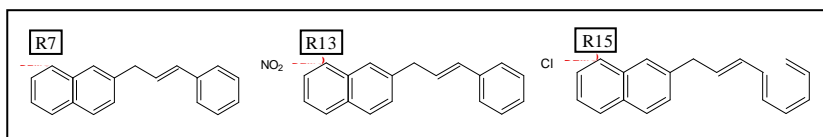


Figura 10. Estrutura das chalconas R7, R13 e R15.

O desenvolvimento de novos compostos para o tratamento de tumores malignos é baseado na capacidade destes compostos de inibirem a proliferação celular e induzirem a apoptose (HERR & DEBATIN, 2001). Da mesma forma, diversos estudos vêm sendo realizados para buscar novos agentes que induzam as células leucêmicas a apoptose (ZHANG et al., 2008; NICHOLSON, 2000; DEBATIN, 2004).

5.3 Atividade das Chalconas Dependente da Concentração e do Tempo

Após a demonstração de que as chalconas R7, R13 e R15 apresentaram uma boa atividade citotóxica frente às células L1210 e induziram a fragmentação do DNA, foi avaliada a influência do tempo e da concentração na atividade citotóxica destas substâncias.

As chalconas R7, R13 e R15 apresentaram uma atividade citotóxica dependente da concentração em 24 e 48 horas (Figura 11). As IC_{50} obtidas nestes tempos estão expressas na tabela 2.

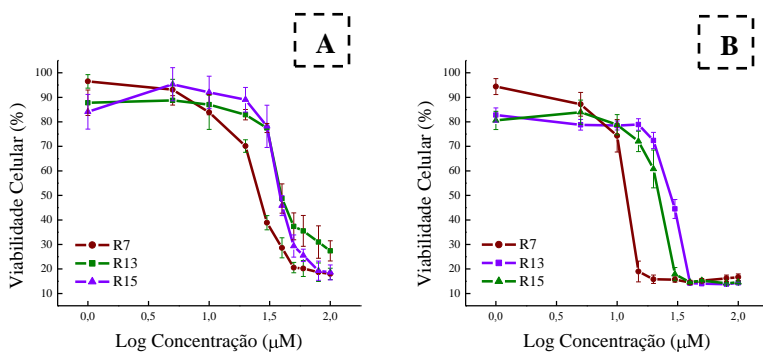


Figura 11. Atividade das chalconas dependente da concentração em células L1210. 1×10^5 células foram incubadas com as chalconas (0-100 µM) por 24 (A) e 48 horas (B). A viabilidade celular foi avaliada pelo método do MTT e a densidade óptica do grupo controle sem tratamento foi considerada 100% de viabilidade. Cada ponto representa a Média \pm EPM (n=3).

Tabela 2: Valores de IC₅₀ das chalconas R7, R13 e R15, após 24 e 48 horas de incubação, em células L1210.

Chalconas	IC ₅₀ (μM) 24 horas	IC ₅₀ (μM) 48 horas
R7	24 ± 0,6	13 ± 1,2
R13	38 ± 1,2	24 ± 0,1
R15	37 ± 1,1	20 ± 0,2

As chalconas também apresentaram uma atividade citotóxica dependente do tempo de incubação (Figura 12). Estes resultados são importantes, já que outros ensaios foram realizados em tempos de incubação menores do que 24 horas e assim, fez-se necessário conhecer a viabilidade celular nestes tempos.

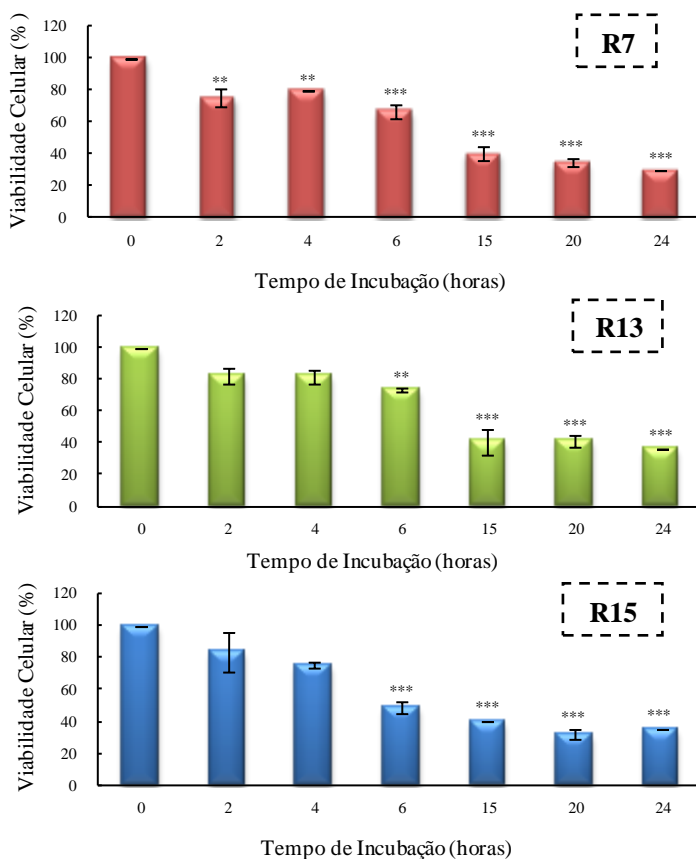


Figura 12. Atividade citotóxica das chalconas dependente do tempo em células L1210. 1×10^5 células foram incubadas com as chalconas R7, R13 e R15 por 2, 4, 6, 14, 20 e 24 horas. O tempo 0 corresponde a 100% de viabilidade celular (controle realizado para cada tempo de incubação). A viabilidade celular foi avaliada pelo método do MTT. Cada barra representa a Média \pm EPM (n=3). Os valores de * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$ e *** $p < 0,001$ foram considerados estatisticamente significativos quando comparados com o controle, usando ANOVA, seguido de teste de Bonferroni.

5.4 Atividade da Caspase-3

As caspases são as principais proteases reguladoras da apoptose e estão diretamente envolvidas, tanto com a via extrínseca quanto com a via intrínseca deste tipo de morte celular (RIEDL; SHI, 2004) sendo que a caspase-3 é a principal caspase efetora que induz diretamente a célula ao processo de apoptose (ÖZÖREN; EL-DEIRY, 2003). Desta forma, é importante a detecção da atividade desta caspase nos tratamentos com as chalconas para melhor caracterizar o fenômeno de morte celular.

Todas as chalconas aumentaram significativamente a atividade da caspase-3 tanto em duas como em quatro horas (Figura 13), sendo que no tempo de quatro horas esse aumento foi mais significativo e pode ser verificado através do aumento da clivagem do substrato da caspase-3 (Ac-DEVD-AMC).

Os resultados obtidos coincidem com a fragmentação do DNA apresentada anteriormente e confirmam que a morte celular induzida pelas chalconas é apoptose. Nakatani e colaboradores (2005) também mostraram uma atividade antileucêmica de dihidrochalconas via ativação de caspases.

O processo de apoptose pode ser deflagrado por estímulos externos ou pelo estresse intracelular caracterizando a via extrínseca ou mitocondrial da apoptose, respectivamente. Sendo assim, buscou-se avaliar se as chalconas poderiam induzir um estresse intracelular através da dosagem de EROs, do potencial mitocondrial, da lipoperoxidação, de GSH, GSSG e GT, da atividade de enzimas antioxidantes e do perfil energético da célula.

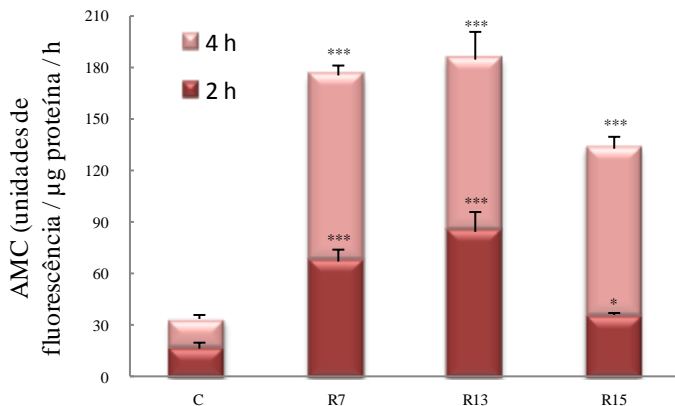


Figura 13. Aumento da atividade das caspases pelas chalconas R7, R13 e R15 em células L1210. 3×10^6 células foram incubadas com as chalconas por 2 e 4 horas. A atividade da caspase-3 foi obtida através do monitoramento da clivagem do Ac-DEVD-AMC, um substrato fluorogênico para caspase-3, após 2 horas de incubação. C representa o controle de células sem tratamento. Cada barra representa a Média \pm EPM (n=4). Os dados foram expressos em unidades de fluorescência (u.f.) / μg de proteína / hora de AMC clivado. Valores de * $p < 0,05$ e *** $p < 0,001$ foram considerados estatisticamente significativos quando comparados com o controle sem tratamento, usando ANOVA, seguido de teste de Bonferroni.

5.5 Determinação de Espécies Reativas de Oxigênio

A produção intracelular de EROs pelas chalconas R7, R13 e R15 foi avaliada pelo método da acetato de diclorofluoresceína (DCFH-DA), que é transformada em diclorofluoresceína reduzida (DCFH) no citoplasma e é oxidada pelas EROs à diclorofluoresceína (DCF) a qual emite fluorescência.

Todas as chalconas apresentaram um efeito pró-oxidante por aumentarem as concentrações de EROs nas células L1210. As chalconas R7, R13 e R15 apresentaram, respectivamente, um aumento significativo de 212 ± 20 ; 156 ± 11 e $240 \pm 12\%$ na produção de EROs em relação ao controle de células sem tratamento (Figura 14). Após a observação de que as chalconas induziam a produção de EROs, a

enzima antioxidante catalase (CAT) foi associada às chalconas. Observou-se que a associação diminuiu significativamente a produção de EROs causada pelas chalconas quando incubadas isoladamente (Figura 14)

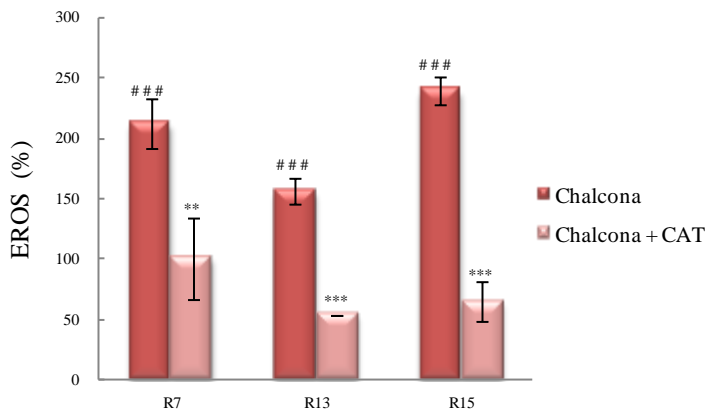


Figura 14: Efeito das chalconas isoladas e associadas à catalase na produção de EROs. 5×10^5 células foram incubadas com as chalconas isoladas e associadas a 5000U/mL de catalase. Cada barra representa a Média \pm EPM (n=5). Os dados foram obtidos em fluorescência celular e foram expressos em porcentagem de EROs em relação ao controle sem tratamento considerado 0%. Um valor de [#]p<0,05, ^{##}p<0,01 e ^{###}p<0,001 foi considerado estatisticamente significativo, quando comparado às células tratadas com as chalconas isoladas e as células controle sem tratamento. Os valores de *p<0,05, **p<0,01 e ***p<0,001 foram considerados estatisticamente significativos, quando comparadas as células tratadas com as chalconas isoladas e as células tratadas com as chalconas + catalase, usando ANOVA, seguido de teste de Bonferroni. Utilizou-se como controle, células tratadas com a mesma concentração de catalase.

Como pode ser observado nos resultados mostrados, as chalconas apresentam uma atividade pró-oxidante para esta linhagem celular, sendo que a principal espécie reativa envolvida, parece ser o peróxido de hidrogênio, já que o tratamento com catalase inibiu a produção de EROs induzida pelas chalconas e esta enzima é a responsável por converter o

peróxido de hidrogênio em água e oxigênio molecular, prevenindo assim os efeitos deletérios do mesmo.

Vários compostos naturais podem induzir a morte celular por apoptose, em células tumorais, por aumentar a produção de EROs, seguida pela formação de poros na mitocôndria, tornando-a permeável, ocasionando assim a liberação de citocromo *c* (LEE et al., 2001).

Verrax e Calderon (2009) avaliaram a atividade antitumoral do ácido ascórbico, um conhecido antioxidante, via endovenosa em altas concentrações, através da produção de H_2O_2 por um mecanismo ainda não esclarecido. As chalconas são precursoras dos flavonóides, os quais também são conhecidos antioxidantes e poderiam ter um mecanismo de ação semelhante.

Li e colaboradores (2003) relacionaram a produção mitocondrial de EROs à liberação de citocromo *c* e à ativação da caspase-3, pela linhagem de leucemia promielocítica humana HL-60, com a morte celular por apoptose, após o tratamento dessas células com o composto rotenona. Shin et al. (2009a) demonstraram que o aumento de EROs induziu células de leucemia K562 à apoptose por ativação da via JNK e inativação da via Akt. Outro estudo avaliou o uso do shikonin ($C_{16}H_{16}O_5$), um componente da erva medicinal chinesa *Lithospermum erythrorhizon* na linhagem de leucemia K562, e concluiu que esta substância induziu a apoptose destas células via geração de EROs com consequente ativação das vias das map quinases JNK e p38, liberação de proteínas mitocondriais como citocromo *c* e Smac/DIABLO e ativação de caspase-3 (MAO et al, 2008).

As EROs podem ainda inibir proteínas através da oxidação destas. A inibição de proteínas da cadeia respiratória como citocromo *c* pode ativar as vias das caspases e induzir a célula à apoptose. Além disso, a lipoperoxidação da membrana mitocondrial induzida pelas EROs pode levar à liberação de outros fatores que podem também ativar a morte (SASTRE; PALLARDO; VINA, 2000; PELICANO et al., 2003).

5.6 Citotoxicidade das chalconas frente a antioxidantes adicionados

Após a detecção do aumento da produção de EROs, associou-se três antioxidantes às chalconas para avaliar se estes eram capazes de inibir a morte celular causada pelas moléculas. Os antioxidantes trolox® (TR), catalase (CAT) e superóxido dismutase (SOD) foram testados individualmente nas células L1210 para determinar a melhor

concentração a ser utilizada nos ensaios. Concentrações de 200 μ M de TR, 250U/mL de SOD e 5000U/mL de CAT não apresentaram toxicidade significativa para as células L1210, portanto foram associados às chalconas.

As chalconas R7, R13 e R15, quando associadas à CAT, apresentaram menor toxicidade às células L1210, pois as IC₅₀ obtidas com as associações foram significativamente maiores do que as IC₅₀ das chalconas isoladamente. No entanto, quando as mesmas substâncias foram associadas com os antioxidantes TR e SOD não houve diferença estatisticamente significativa na citotoxicidade induzida (Tabela 3).

Tabela 3: Comparação das IC₅₀, nos tratamentos com chalcona isolada e chalcona associada aos antioxidantes TR, CAT e SOD em células L1210.

Tratamentos	IC₅₀ (μM)
R7	24 \pm 0,6
R7 + CAT	45 \pm 1,8***
R7 + SOD	20 \pm 0,5
R7+ TR	20 \pm 1,0
R13	38 \pm 1,2
R13 + CAT	51 \pm 2,4**
R13 + SOD	30 \pm 0,3
R13 + TR	34 \pm 1,9
R15	37 \pm 1,1
R15 + CAT	58 \pm 2,8***
R15 + SOD	31 \pm 0,7
R15 + TR	39 \pm 0,5

** p<0,01; *** p<0,001

Tais resultados confirmam a atividade pró-oxidante das chalconas testadas e podem sugerir que ocorre majoritariamente a formação de peróxido de hidrogênio (H₂O₂).

5.7 Determinação do Potencial de Membrana Mitocondrial

Após a constatação da indução de formação de EROs frente à incubação com as chalconas, buscou-se entender melhor os mecanismos envolvidos neste processo. Neste sentido, o potencial de membrana

mitocondrial foi avaliado, já que a mitocôndria é o principal local da célula a consumir oxigênio e o principal foco de geração de EROs (LASH, 2006).

As chalconas R7 e R13 induziram uma diminuição no potencial de membrana mitocondrial, semelhante ao efeito causado pelo FCCP, um desacoplador da cadeia de elétrons na fosforilação oxidativa. A chalcona R15 também induziu uma diminuição no potencial de membrana; no entanto, o efeito não foi estatisticamente significativo (Figura 15).

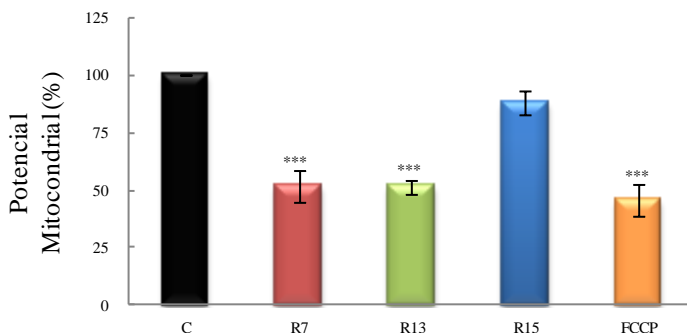


Figura 15: Efeito das chalconas no potencial de membrana mitocondrial em células L1210. 5×10^5 células foram incubadas com as chalconas R7, R13, R15 e com o FCCP por 4 horas. O potencial de membrana foi avaliado através da sonda fluorescente JC-1 (emissão em 488nm e excitação em 590 e 527nm). A taxa (590/527) foi calculada para cada tratamento e para as células controle (C) sendo os resultados expressos em porcentagem de potencial mitocondrial e o C considerado como 100%. Cada barra representa a Média \pm EPM (n=3). Um valor de *** $p < 0,001$ foi considerado estatisticamente significativo quando comparado com o controle, usando ANOVA, seguido de teste de Bonferroni.

Alterações na membrana mitocondrial, como a perda do potencial mitocondrial, são consideradas pontos-chave na cascata de morte. Estas alterações levam à liberação de moléculas indutoras da apoptose como o citocromo *c* (JEONG; SEOL, 2008).

Jing et al (1999) e Shin et al (2009b) demonstraram a atividade antileucêmica de diferentes substâncias por indução da apoptose via EROs em decorrência da perda do potencial de membrana mitocondrial.

O aumento da geração de EROs induzido pelas chalconas R7 e R13 pode estar diretamente relacionada a um dano mitocondrial causado por estas moléculas.

5.8 Lipoperoxidação Celular

A lipoperoxidação é uma reação em cadeia em que ocorre um dano aos lípidios de membrana em decorrência da presença de EROs. A reação inicia com o seqüestro de um hidrogênio de um ácido graxo poli-insaturado (LH) da membrana celular que pode ser realizado pelo $\cdot\text{OH}$ ou pelo $\text{LO}\cdot$ (radical alcóxila) com conseqüente formação de um radical lipídico ($\text{L}\cdot$). O radical lipídico reage rapidamente com o O_2 , resultando num radical peróxila ($\text{LOO}\cdot$) que por sua vez, seqüestra outro hidrogênio formando outro radical lipídico ($\text{L}\cdot$). Esta reação se propaga até que os radicais lipídicos e peróxila produzidos se propagem e destruam a si próprios (FERREIRA; MATSUBARA, 1997) (Figura 16).

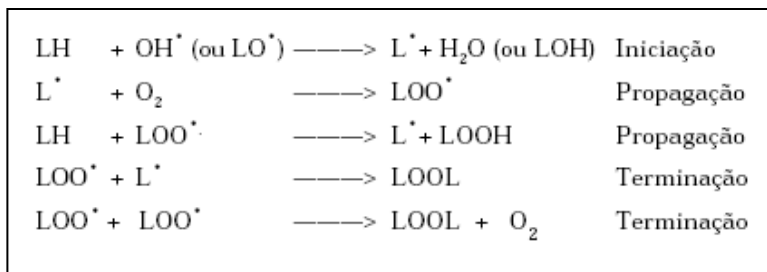


Figura 16. Reação em cadeia da peroxidação lipídica.

Fonte: FERREIRA; MATSUBARA, 1997

Todas estas modificações oxidativas podem causar mudanças nas propriedades físicas e químicas das membranas, alterando sua permeabilidade, podendo levar a célula à morte (VASCONCELOS et al, 2007).

Os níveis de lipoperoxidação, avaliados através da concentração de TBARS, em células L1210 expostas às chalconas R7, R13 e R15, aumentaram significativamente após 24 horas de incubação (Figura 17). Este aumento da lipoperoxidação pode estar relacionado ao aumento da produção de EROs induzido pelas chalconas.

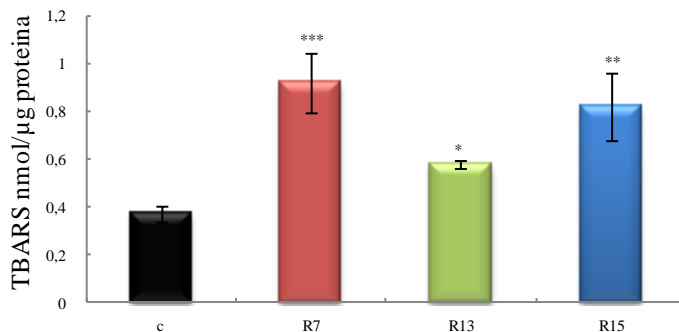


Figura 17: Liperoxidação induzida pelas chalconas R7, R13 e R15 em células L1210. 4×10^6 células foram incubadas com as chalconas por 24 horas. Cada barra representa a Média \pm EPM (n=5). Os dados foram expressos em nmol de TBARS/ μ g de proteína. Os valores de * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$ e *** $p < 0,001$ foram considerados estatisticamente significativos quando comparados com o controle, usando ANOVA, seguido de teste de Bonferroni.

5.9 Defesas Antioxidantes

Para minimizar os efeitos deletérios associados à formação de EROs, oriundas da utilização do oxigênio nas células e nos tecidos, os organismos aeróbicos foram dotados de distintas defesas antioxidantes enzimáticas e não enzimáticas. Dentre as defesas enzimáticas destacam-se as enzimas catalase, GR, GPx e o conjunto das GSTs (NORDBERG; ARNÉR, 2001). As GSTs, embora não atuem diretamente contra as EROs, são importantes na defesa celular, pois estão associadas à biotransformação de xenobióticos, como herbicidas, inseticidas e agentes carcinogênicos. Estas enzimas catalisam a reação de conjugação da GSH com estas substâncias, aumentando a solubilidade e facilitando a excreção (TOWNSEND; TEW, 2003).

As chalconas R7, R13 e R15 aumentaram significativamente as atividades enzimáticas da GPx, da GST, da GR, e nenhuma delas alterou a atividade enzimática da catalase medida no extrato celular (Figura 18).

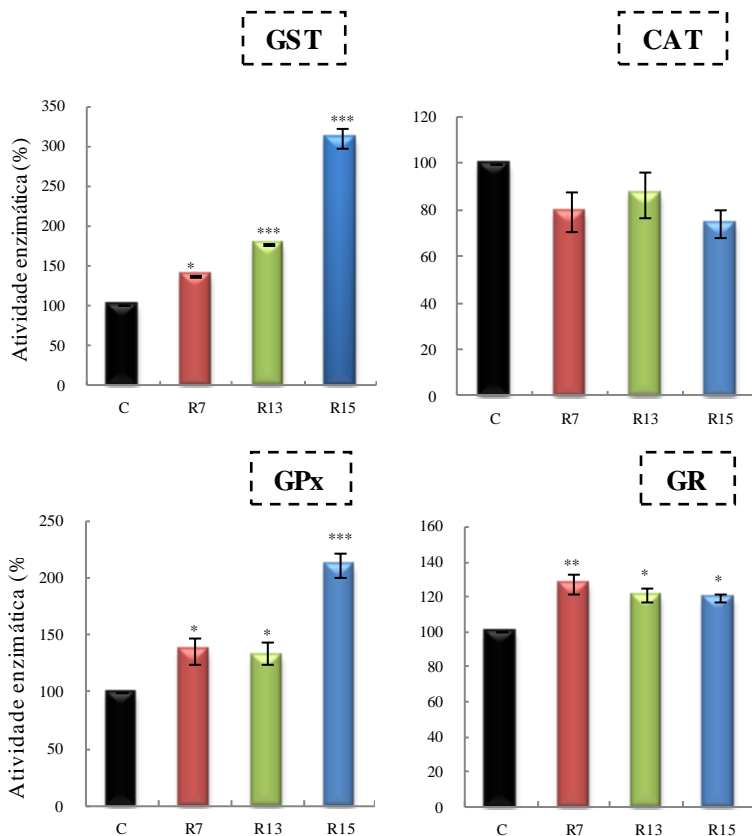


Figura 18: Efeito das chalconas R7, R13 e R15 na atividade da GST, catalase, GPx e GR em células L1210. 6×10^6 células foram incubadas com as chalconas por 24 horas. As células foram lisadas e as atividades enzimáticas foram avaliadas espectrofotometricamente. Cada barra representa a Média \pm EPM (n=5). Os dados foram expressos em porcentagem em relação ao controle de células sem tratamento (C). Valores de * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$ e *** $p < 0,001$ foram considerados estatisticamente significativos quando comparados com o controle, usando ANOVA, seguido de teste de Bonferroni.

O aumento da atividade da GST causado pelas chalconas pode ser resultado da função biotransformadora da GST. Possivelmente estas chalconas devem sofrer o processo de eliminação via conjugação com GSH e, como a enzima GST é responsável por esta conjugação, um

aumento da concentração das chalconas poderia gerar um aumento da atividade desta enzima.

O aumento da atividade da GPx pode ser explicado pelo efeito das chalconas em aumentar a produção de EROs e a lipoperoxidação, aumentando assim, os lipoperóxidos. Sendo a GPx responsável por reduzir peróxidos à água e álcool (RAYMAN, 2000), inativando assim seus efeitos, um aumento na produção de peróxidos pode levar a um aumento da atividade desta enzima.

O aumento da atividade da GR poderia ser resultado da atividade citotóxica das chalconas, já que, após a exposição da célula a um agente tóxico, a GR é a responsável por manter e recuperar os níveis de GSH a partir da GSSG formada (PASTORI; FOYER; MULLINEAUX, 2000; NOCTOR et al., 2002). Como veremos adiante, as chalconas induziram uma oxidação da GSH em GSSG.

O fato de nenhuma das chalconas ter aumentado a atividade enzimática da catalase, e ainda haver uma tendência a diminuição da atividade da mesma, pode parecer estranho, principalmente pelo fato das chalconas provavelmente aumentarem a produção de H_2O_2 e a catalase ser a principal detoxificadora desta espécie reativa. Sendo assim, foi avaliada a atividade das chalconas na atividade de uma catalase isolada e verificou-se que estas substâncias são capazes de inibir a atividade da catalase isolada (Figura 19). Assim, embora com evidências indiretas, pois o ensaio medindo a inibição da enzima foi realizado com uma proteína de outra fonte, pode-se sugerir que a inibição da catalase faz parte do processo citotóxico promovido por estas moléculas. Além disso, segundo Pelicano e colaboradores (2004) as células tumorais podem ter uma capacidade de adaptação limitada para algumas defesas. Desta forma, um esperado aumento da atividade destas enzimas pode não ocorrer devido a uma incapacidade da célula leucêmica de se adaptar ao estresse gerado. Esta incapacidade, no caso da catalase, pode ser a razão da citotoxicidade das chalconas estar principalmente relacionada à maior geração de H_2O_2 .

A indução de espécies reativas na célula tumoral e a oxidação de proteínas como citocromo *c*, catalases, entre outras, têm sido considerado um fator importante na citotoxicidade de novos fármacos. A inibição das catalases pode levar a uma redução da capacidade da célula tumoral em eliminar o H_2O_2 e aumentar o estresse oxidativo e o dano celular (MARSHALL; MERCHANT; STAMLER, 2000; MALLIS; BUSS; THOMAS, 2001).

A ativação das enzimas antioxidantes em associação à geração de EROs induzida, indicam que as chalconas estão induzindo um estresse oxidativo nas células.

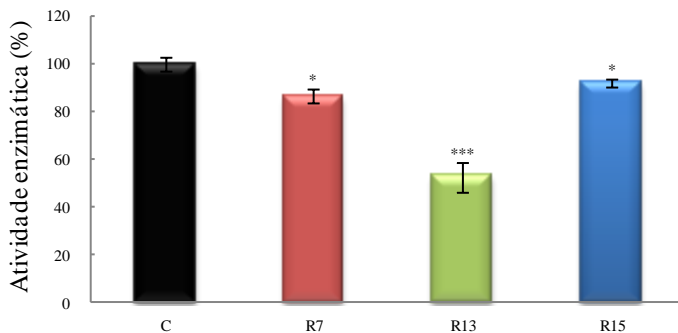


Figura 19: Efeito das chalconas R7, R13 e R15 na atividade da catalase isolada. Para análise das atividades enzimáticas foram utilizadas 15U de catalase e as chalconas nas concentrações de IC₅₀. A avaliação foi realizada espectrofotometricamente. Cada barra representa a Média ± EPM (n=5). Os dados foram expressos em porcentagem em relação ao controle (C) equivalente a atividade da catalase sem adição de chalcona. Valores de *p<0,05, e ***p<0,001 foram considerados estatisticamente significativos quando comparados com o controle, usando ANOVA, seguido de teste de Bonferroni.

5.10 Concentração de Glutathiona Total, Reduzida e Oxidada

A GSH é o mais abundante antioxidante celular dos mamíferos e outros vertebrados. Trata-se de um nucleófilo celular que tem como função reagir com eletrófilos gerados em consequência do processo metabólico, que envolve compostos endógenos e xenobióticos (HALLIWELL; GUTTERIDGE, 2007). Em situações fisiológicas, a maior parte da glutathiona é mantida no estado reduzido pela GR. No entanto, em situações de estresse oxidativo acontece uma desregulação no teor normal de GSH, aumentando o teor de GSSG (WANG; BALLATORI, 1998).

Como os resultados anteriores demonstraram que as chalconas testadas induzem um estresse oxidativo nas células, foram analisados os teores de GSH, GSSG e de GT. Todas as chalconas apresentaram um

aumento nos teores de GT e de GSSG quando comparados aos controles (Figura 20). O aumento de GT pode tanto ser resultado do aumento de GSSG, como da síntese “de novo” de GSH, na tentativa de minimizar os efeitos deletérios do estresse oxidativo. O aumento de GSSG pode ser consequência do estresse oxidativo gerado pelas chalconas, onde ocorre uma oxidação de GSH em GSSG.

As chalconas R7 e R13 não alteraram as concentrações de GSH (Figura 20) enquanto que a chalcona R15 induziu um aumento das concentrações da mesma. Este fato pode ser explicado pelo aumento da atividade da GR em todos os tratamentos. A GR tem como função a manutenção dos níveis normais de GSH a partir de GSSG. Outro fator envolvido poderia ser o aumento da atividade da γ -GCS, responsável pela síntese de GSH (Figura 20).

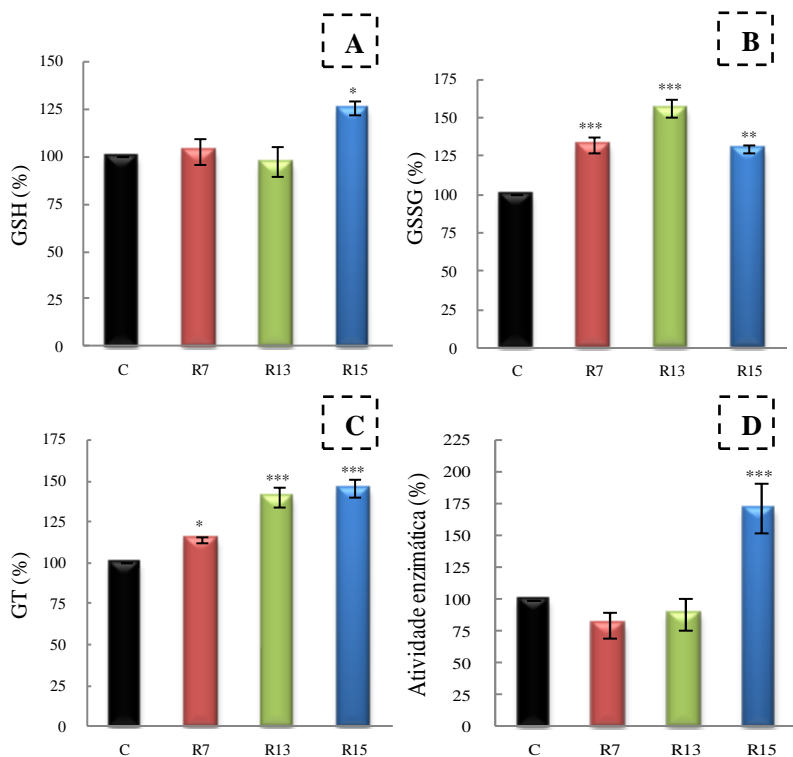


Figura 20: Efeito das chalconas R7, R13 e R15 na concentração de GSH, GSSG e GT e na atividade da γ -GCS em células L1210. As dosagens de GT (C) e GSH (A) foram realizadas pelo método de Tietze

(1969). Para o cálculo da GSSG foi utilizada a seguinte fórmula: $GSSG = (GT - GSH)/2$ (B). A atividade da γ -GCS (D) foi avaliada espectrofotometricamente. Cada barra representa a Média \pm EPM (n=4). Os dados foram expressos em porcentagem em relação ao controle de células sem tratamento (C). Os valores de * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$ e *** $p < 0,001$ foram considerados estatisticamente significativos quando comparados com o controle, usando ANOVA, seguido de teste de Bonferroni.

5.11 Concentração de ATP

A mitocôndria é a organela celular responsável pela produção de 80 a 90% do ATP necessário para a sobrevivência celular e está intimamente relacionada aos estímulos pró e anti-apoptóticos (DIAS; BAILLY, 2005). O objetivo de avaliar a concentração de ATP está baseado na busca de potenciais agentes antitumorais que possuam a capacidade de promover a morte celular por apoptose, através da depleção energética (MORENO-SÁNCHEZ et al., 2007).

As chalconas R7, R13 e R15 induziram inicialmente uma queda no conteúdo de ATP seguida de um aumento e, finalmente, uma forte depleção do conteúdo de ATP (Figura 21).

Esta depleção final causada em todos os tratamentos poderia estar diretamente relacionada à morte celular por apoptose, já que a mesma pode geralmente, ser consequência da perda gradativa de energia celular.

Sabzevari e colaboradores (2004) sugeriram que a citotoxicidade de dez chalconas hidroxiladas, testadas em uma linhagem de leucemia K562, foi consequência da disfunção mitocondrial induzida por estas substâncias. Skulachev (2006) avaliou a inter-relação entre processos bioenergéticos e apoptose, mostrando que o mau funcionamento da mitocôndria normalmente resulta em depleção de ATP e apoptose, podendo ocorrer um aumento inicial de ATP. Este fato, poderia explicar o aumento na concentração de ATP que ocorreu com as chalconas seguido da depleção do nucleotídeo.

A depleção de ATP também poderia estar relacionada ao efeito pró-oxidante destas chalconas. Cao e colaboradores (2006) demonstraram que a curcumina induziu um dano ao DNA mitocondrial (DNAm) em resposta ao estresse oxidativo causado por esta substância. O dano ao DNAm reduz a fosforilação oxidativa, diminuindo assim, a síntese de ATP.

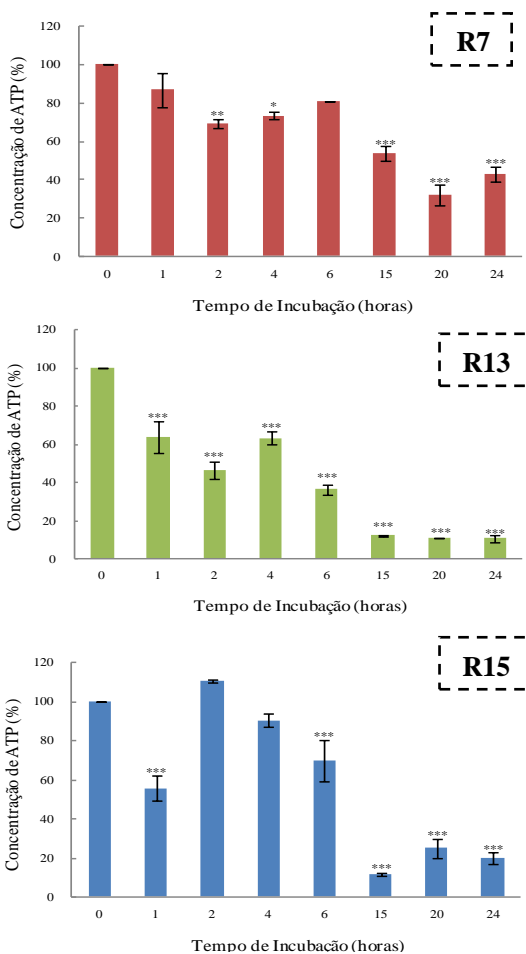


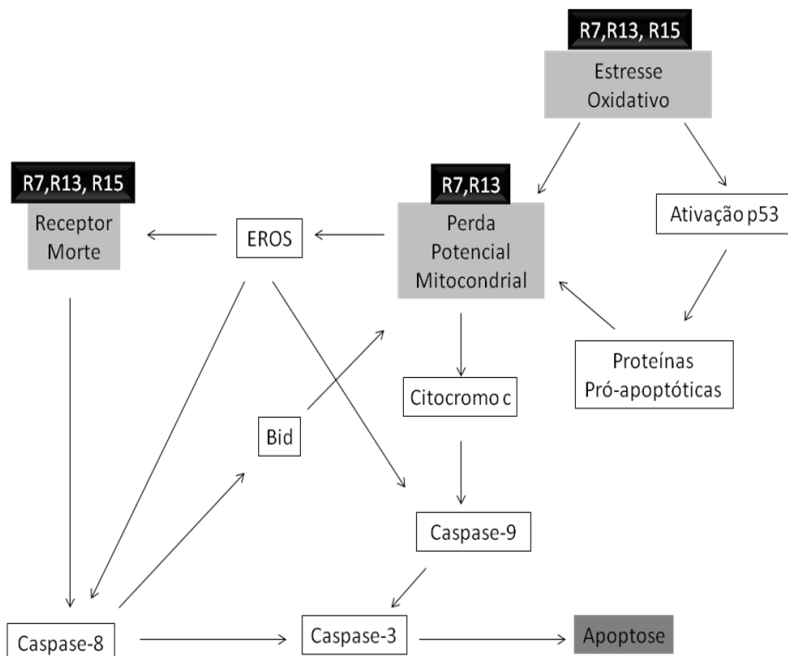
Figura 21: Efeito das chalconas R7, R13 e R15 na concentração de ATP em células L1210. 1×10^6 células foram incubadas com a chalcona R7, R13 e R15 por diferentes tempos. Os níveis de ATP foram quantificados pelo método luciferina-luciferase. Cada barra representa a Média \pm EPM ($n=5$). Os dados foram expressos em porcentagem em relação ao controle de células sem tratamento (0). Os valores de * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$ e *** $p < 0,001$ foram considerados estatisticamente significativos quando comparados com o controle, usando ANOVA, seguido de teste de Bonferroni.

6. CONCLUSÕES

O presente trabalho permite as seguintes conclusões:

- Das chalconas testadas, as que apresentaram melhor efeito citotóxico, que induziram a fragmentação do DNA e, por isso, foram escolhidas para dar continuidade aos experimentos, foram a R7, R13 e a R15.
- As chalconas R7, R13 e R15 apresentaram toxicidade para células L1210 dependente do tempo e da concentração, sendo que o tipo de morte induzida foi a apoptose, fato observado através da fragmentação do DNA e da ativação da caspase-3.
- Todas as chalconas induziram um estresse oxidativo nas células, evidenciado pela indução de EROs, lipoperoxidação, indução das enzimas antioxidantes GR, GPx e GST e aparente inibição da catalase.
- A principal espécie reativa envolvida no estresse oxidativo gerado pode ser o peróxido de hidrogênio, isto porque, a adição de catalase diminuiu a citotoxicidade das chalconas e a geração de espécies reativas induzidas por estas substâncias.
- O aumento do conteúdo de GT e GSSG fornece mais uma evidência do estresse oxidativo gerado em decorrência do tratamento das células com as chalconas. O aumento de GSH observado com a chalcona R15 seria consequência tanto da indução da GR como principalmente, da síntese “de novo” de GSH em resposta à indução da γ -GCS.
- Todas as chalconas induziram uma depleção do conteúdo de ATP celular.

Os mecanismos que podem estar envolvidos na indução da morte celular estão relacionados abaixo:



Sendo assim, o mecanismo de ação das chalconas pode estar relacionado com a indução da morte celular por diversas vias, tanto pela via extrínseca, ativando o receptor de morte, como pela via intrínseca, causando um dano direto à mitocôndria ou através da indução do estresse oxidativo.

Desta forma, os resultados apresentados sugerem que estas chalconas são promissoras para a continuidade das investigações de novos fármacos antitumorais.

7. PERSPECTIVAS

A fim de elucidar melhor o mecanismo de morte envolvido existem como perspectivas:

- Avaliar outros fatores que podem estar envolvidos na apoptose pela via intrínseca como a liberação de citocromo *c* ou a presença de proteínas pró-apoptóticas como Bax ou a inibição de proteínas anti-apoptóticas como Bcl-2;
- Avaliar a possível indução da via extrínseca da apoptose através da determinação da ativação do receptor de morte celular Fas;
- Realizar estudos de toxicidade em um modelo *in vivo*.

REFERÊNCIAS

AEBI, H. Catalase *in vitro*. **Methods in Enzymology**, v.105, p.121-6, 1984.

ALLEN, R. G.; TRESINI, M. Oxidative stress and gene regulation. **Free Radical Biology**, v. 28, n. 3, p. 463-499, 2000.

ALMEIDA, V.L., et al. Câncer e agentes antineoplásicos ciclo-celular específicos e ciclo-celular não específicos que integram com o DNA: uma introdução. **Quim Nova**, v. 28, n. 1, p. 118-129, 2005.

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

AMERICAN CANCER SOCIETY. **Cancer Facts & Figures 2008**. Atlanta: American Cancer Society, 2008.

ANAZETTI, M.C.; MELO, P.S. Morte celular por apoptose: uma visão bioquímica e molecular. **Metrocamp Pesquisa**, v. 1, n. 1, p. 37-58, 2007.

ARENDS, M.J. et al. Apoptosis: the role of the endonuclease. **American Journal of Pathology**, v. 136, p. 593-608, 1990.

ARMSTRONG, S.A.; LOOK, A.T. Molecular genetics of acute lymphoblastic leukemia. **Journal of Clinical Oncology**, v.23, p. 6306-15, 2005.

ATTARDI, L. D. The role of p53-mediated apoptosis as a crucial anti-tumor response to genomic instability: lessons from mouse models. **Mutat Res**, v. 569, p. 145-157, 2005.

BALLATORI, N., et al. Molecular mechanisms of reduced glutathione transport: role of the MRP/CFTR/ABCC and OATP/SLC21A families of membrane proteins. **Toxicol Appl Pharmacol.**, v. 204, p. 238-255, 2005.

BATOVSKA, D., et al. Study on the substituents' effects of a series of synthetic chalcones against the yeast *Candida Albicans*. **European Journal of Medicinal Chemistry**, v. 42, p. 87-92, 2007.

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

BIRD, R.D.; DRAPER, A.H. Comparative studies on different methods of malondyaldehyde determination. **Methods in Enzymology**, v.90, p.105-10, 1984.

BOECK, P., et al. Antifungal activity and studies on mode of action of novel xanthoxyline-derived chalcones. **Archive der Pharmazie**, v. 338, n. 2-3, p. P. 87-95, 2005.

BOECK, P., et al. Synthesis of chalcone analogues with increased antileishmanial activity. **Bioorganic and Medicinal Chemistry**, v. 14, n. 5, p. 1538-1545, 2006.

BOSTROM, B.C., et al. Dexamethasone versus prednisone and daily oral versus weekly intravenous mercaptopurine for patients with standard-risk acute lymphoblastic leukemia: a report from the Children's Cancer Group. **Blood**, v. 101, p. 3809-17, 2003.

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

BROWN, J.M.; ATTARDI, L.D. The role of apoptosis in cancer development and treatment response, **Nature Reviews**, v. 5, p. 231-237, 2005.

BURKE, V.P.; STARTZEK, J.M. The Leukemias, **Oral and Maxillofacial Surgery Clinics of North America**, v. 20, p. 597-608, 2008.

CABRERA, M., et al. Synthetic chalcones, flavanones, and flavones as antitumoral agents: Biological evaluation and structure-activity relationships. **Bioorganic & Medicinal Chemistry**, v. 15, n. 10, p. 3356-3367, 2007.

CARLBERG, I. & MANNERVIK, B. Purification and characterization of flavoenzyme glutathione reductase from rat liver. **Journal of Biological Chemistry**, v.250, p.5475-5480, 1975.

CAO, J., et al. Mitochondrial and nuclear DNA damage induced by curcumin in human hepatoma G2 cells. **Toxicological Sciences**, v. 91, p. 476-483, 2006.

CASTEDO, M., et al. Cell death by mitotic catastrophe: a molecular definition. *Oncogene*, v. 23, p. 2825-837, 2004.

CHAN, M., et al. Inhibition of growth and sensitization to cisplatin-mediated killing of ovarian cancer cells by polyphenolic chemopreventive agents. **Journal of Cellular Physiology**, v. 194, p. 63-70, 2003.

CHEN, D., et al. Dietary flavonoids as proteasome inhibitors and apoptosis inducers in human leukemia cells. **Biochemical Pharmacology**, v. 69, p.1421-1432, 2005.

CHEN, M., *et al.* Inhibition of fumarate reductase in *Leishmania major* and *Leishmania donovani* by chalcones. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy.**, v. 45, n. 7, p. 2023-2029, 2001.

CHIN, Y. W., et al. Antioxidant constituents of the roots and stolons on licorice (*Glycyrrhiza glabra*). **Journal of Agriculture and Food Chemistry**, v. 55, n. 12, p.4691-4697, 2007.

CHOI, J. M., et al. Antioxidant properties of neohesperidin dihydrochalcone: inhibition of hypochlorous acid-induced DNA strand breakage, protein degradation, and cell death. **Biological and Pharmaceutical Bulletin**, v. 30, n. 2, p. 324-330, 2007.

COTELLE, N., et al. Polyphenols deriving from chalcones: investigations of redox activities. **Journal of Physical Chemistry**, v. 109, p. 23720-23729, 2005.

COTRAN, R. S.; KUMAR, V.; ROBBINS, S. L. **Robbins: Patologia Estrutural e Funcional**. 5.ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 1996.

CROZIER, A.; JAGANATH, INDU; CLIFFORD, M.N. Dietary phenolics: chemistry, bioavailability and effects on healthv. **Natural Product Reports**, v. 26, n. 8, p. 965-1096, 2009.

DAI, J., et al. Malignant cells can be sensitized to undergo growth inhibition and apoptosis by arsenic trioxide through modulation of the glutathione redox system. **Blood**, v. 93, p. 268–277, 1999.

DANAIEI, G., et al. Causes of cancer in the world: comparative risk assessment of nine behavioural and environmental risk factors. **Lancet**, v. 366, p. 1784-93, 2005.

DANIAL, N.N.; KORSMEYER, S.J. Cell death: critical control points. **Cell**, v. 116, p. 205-19, 2004.

DAVIS, Jr.W.; RONAI, Z.; TEW, K.D. Cellular thiols and reactive oxygen species in drug-induced apoptosis. **The Journal of Pharmacological and Experimental Therapeutics**, v.296, p. 1-6, 2001.

DAVISON, K., et al. Glutathione depletion overcomes resistance to arsenic trioxide in arsenic-resistant cell lines. **Leukemia**, v. 17, p. 931–940, 2003.

DEBATIN, K.M. Apoptosis pathways in cancer and cancer therapy. **Cancer Immunol Immunother**, v. 53, p. 153-59, 2004.

DELUCA, M. Firefly luciferase. **Advances in Enzymology and Related Areas of Molecular Biology**, v. 44, p. 37-68, 1976.

DIAS, N.; BAILLY, C. Drugs targeting mitochondrial functions to control tumor cell growth. **Biochemical Pharmacology**, v. 70, p. 1-12, 2005.

DIMRI, G.P. What has senescence got to do with cancer? **Cancer Cell**, v. 7, p. 505-12, 2005.

DOMINGUEZ, J. N., et al. Synthesis and antimalarial activity of sulfonamide chalcone derivatives. **Farmaco**, v. 60, n. 4, p. 307-11, 2005.

DONG, X., et al. Design, Synthesis, and Biological Evaluation of Prenylated Chalcones as Vasorelaxant Agents. **Arch Pharm Chem Life Sci**, v. 342, p. 428 – 432, 2009.

DREHER, D.; JUNOD, A. F. Role of oxygen free radicals in cancer development. **European Journal of Cancer**, v. 32 (A), p. 30-38, 1996.

DRUKER, B.J. Imatinib as a paradigm of targeted therapies. **Advances in Cancer Research**, v. 91, p. 1-30, 2004.

ECHEVERRIA, C., et al. Structural Antitumoral Activity Relationships of Synthetic Chalcones. **Int. J. Mol. Sci**, v.10, p. 221-31, 2009.

EDINGER, A. L.; THOMPSON, C. B. Death by design: apoptosis, necrosis, and autophagy. **Current Opinion in Cell Biology**, v. 16, p. 663-669, 2004.

FADERL, S. JEHA, S.; KANTARJIAN, H.M. The biology and therapy of adult acute lymphoblastic leukemia. *Cancer*, v. 98, n. 7, p. 1337-54, 2003.

FANG, S.C., et al. Cytotoxic Effects of New Geranyl Chalcone Derivatives Isolated from the Leaves of *Artocarpus communis* in SW 872 Human Liposarcoma Cells. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 56, p. 8859-68, 2008.

FARFANI, J.A.; DOMENE, S.M.A.; PADOVANI, R.M. DRI: Síntese comentada das novas propostas sore recomendações nutricionais para antioxidantes. **Rev Nutr Campinas**, v.14, n. 1, p. 71-78, 2001.

FERREIRA, A.L.A.; MATSUBARA, L.S. Radicais livres: conceitos, doenças relacionadas, sistema de defesa e estresse oxidativo. **Rev Ass Med Brasil**, v. 43, n. 1, p. 61-8, 1997.

FLOHÉ, L.; GUNZLER, W. A. Assays of glutathione peroxidase. **Methods in Enzymology**, v.105, p.114-121, 1984.

FOREJTŇÍKOVÁ, H., et al. Chemoprotective and toxic potentials of synthetic and natural chalcones and dihydrochalcones in vitro. **Toxicology**, v. 208, n. 1, p. 81-93, 2005.

FORKMANN, G.; MARTENS, S. Metabolic engineering and applications of flavonoids. **Curr Opin Biotechnol**, v. 12, p. 155-160, 2001.

FOWLER, Z.L.; KOFFAS, M.A.G. Biosynthesis and biotechnological production of flavanones: current state and perspectives. **Appl Microbiol Biotechnol**, v. 83, p. 799–808, 2009.

FRESHNEY, R. **Culture of animals cells: A manual of basic technique**. New York, Alan R. Liss. Inc., p.117, 1987.

GHOBRIAL, I. M., et al. Targeting apoptosis pathways in cancer therapy. **Cancer Journal for Clinicians**, v. 55, p. 178-194, 2005.

GOYARZU, F., et al. Blueberry supplemented diet: effects on object recognition memory and nuclear factor-kappa B levels in aged rats. **Nutritional Neuroscience**, v. 7, p. 75–83, 2004.

GREAVES, M. F. Stem cell origins of leukaemia and curability. **British Journal of Cancer**, v. 67, n. 3, p. 413-23, 1993.

GREAVES, M. Molecular genetics, natural history and the demise of childhood leukaemia. **European Journal of Cancer**, v. 35, n. 2, p. 173-85, 1999.

HALLIWELL, B.; GUTTERIDGE, J.M.C. **Free Radicals in Biology and Medicine**. 4 ed. USA: Oxford United Press, 2007.

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

HAKIMUDDIN, F., *et al.* Selective cytotoxicity of a red grape wine flavonoid fraction against MCF-7 cells. **Breast Cancer Research and Treatment**, v. 85, p. 65-79, 2004.

HANAHAN, D.; WEINBERG, R.A. The hallmarks of cancer review. **Cell**, v. 100, p. 57-70, 2000.

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

HENMI, K., et al. Methoxy- and Fluoro-chalcone Derivatives Arrest Cell Cycle Progression and Induce Apoptosis in Human Melanoma Cell A375. **Biol Pharm Bull**, v. 32, n. 6, p. 1109-13, 2009.

HERÊNCIA, F., et al. Novel anti-inflammatory chalcone derivatives inhibit the induction of nitric oxide synthase and cyclooxygenase-2 in mouse peritoneal macrophages. **FEBS Letters**, v. 453, n. 1-2, p. 129-134, 1999.

HERR, I.; DEBATIN, K.M. Cellular stress response and apoptosis in cancer therapy. **Blood**, v. 98, n. 9, p. 2603-14, 2001.

HILEMAN, E.O., et al. Intrinsic oxidative stress in cancer cells: a biochemical basis for therapeutic selectivity. **Cancer Chemother. Pharmacol**, v. 53, p.209-219, 2004.

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

HOELZER, D.; GOKBUGET, N. Recent approaches in acute lymphoblastic leukemia in adults. **Review Clinical in Oncology/Hematology**, v. 36, p. 49-58, 2000.

HSU, Y. L., et al. Chalcone inhibits the proliferation of human breast cancer cell by blocking cell cycle progression and inducing apoptosis. **Food and Chemical Toxicology**, v. 44, n. 5, p. 704-713, 2006.

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

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.

JEMAL, A., et al. Cancer statistics, 2004. **CA Cancer J Clin**, v.54, n. 1, p. 8-29, 2004.

JEONG, S.Y; SEOL, D.W. The role of mitochondria in apoptosis. **BMB Reports**, v. 41, n. 1, p.11-22, 2008.

JING, Y., et al. Arsenic trioxide selectively induces acute promyelocytic leukemia cell apoptosis via a hydrogen peroxide-dependent pathway. **Blood**, v. 94, p. 2102–2111, 1999.

JONES, D.P., et al. Redox state of glutathione in human plasma, **Free Radical Biology & Medicine**, v. 28, p. 625–635, 2000.

JUN, H.S., et al. Capsaicin induced apoptosis of B16-F10 melanoma cells through down-regulation of bcl-2. **Food and Chemical Toxicology**, v. 45, p. 708-715, 2007.

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

KEEN, J. B.; HABIG, W. H. & JAKOBY, W. B. Mechanism for several activities from glutathione S-transferase. **Journal of Biological Chemistry**. v.251, p.6183-6188, 1976.

KIECHLE, F. L.; ZHANG, X. Apoptosis: biochemical aspects and clinical implications. **Clinica Chimica Acta**, v. 326, p. 27-45, 2002.

KONIECZNY, M. T., et al. Synthesis of isomeric, oxathiolone fused chalcones, and comparison of their activity toward various microorganisms and human cancer cells line. **Chemical and Pharmaceutical Bulletin**, v. 55, n. 5, p. 817- 820, 2007.

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

LAHTCHEV, K.L., et al. Antifungal activity of chalcones: A mechanistic study using various yeast strains. **European Journal of Medicinal Chemistry**, v. 43, p. 2220-28, 2008.

LANGE, B.J., et al. Double-delayed intensification improves event-free survival for children with intermediate-risk acute lymphoblastic leukemia: a report from the Children's Cancer Group. **Blood**, v. 99, p. 825–33, 2002.

LASH, L.H. Mitochondrial glutathione transport: Physiological, pathological and toxicological implications, **Chemico Biological Interactions**, v. 163, p. 54-67, 2006.

LAZARUS, H.M., et al. Central nervous system involvement in adult acute lymphoblastic leukemia at diagnosis: results from the international ALL trial MRC UKALL XII/ECOG E2993. **Blood**, v. 108, p. 465-72, 2006.

LEE, C., BAEHRECKE, E.H. Steroid regulation of autophagic programmed cell death during development. **Development** v. 128, p. 1443-1445, 2001.

LEE, M. G., et al. Costunolide induces apoptosis by ROS-mediated mitochondrial permeability transition and citochrome c release. **Biological and Pharmaceutical Bulletin**, v. 24, p. 3003-306, 2001.

LEONE, M., et al. Cancer prevention by tea polyphenols is linked to their direct inhibition of antiapoptotic Bcl-2 family proteins. **Cancer Research**, v. 63, p. 8118-21, 2003.

LI, N., et al. Mitochondrial complex I inhibitor rotenone induces apoptosis through enhancing mitochondrial reactive oxygen species production. **The Journal of Biological Chemistry**, v. 278, n. 10, p. 8516-8525, 2003.

LIU, M., *et al.* Structure-activity relationships of antileishmanial and antimalarial chalcones. **Biorganic and Medicinal Chemistry**, v. 11, n. 13, p. 2729-2738, 2003.

LIU, X.; GO, M. L. Antiproliferative properties of piperidinylochalcones. **Biorganic & Medicinal Chemistry**, v. 14, p. 153-163, 2006.

LIU, Y. C., et al. Chalcone inhibits the activation of NF- κ B and STAT3 in endothelial cells via endogenous electrophile. **Life Sciences**, v. 1-11, 2007.

LOO, D.M., et al. Prognostic significance of blasts in the cerebrospinal fluid without pleiocytosis or a traumatic lumbar puncture in children with acute lymphoblastic leukemia: the experience of the Dutch

Childhood Oncology Group. **Journal of Clinical Oncology**, v. 24, p. 2332–36, 2004.

LORENZO, P., et al. Inhibition of IKB Kinase_ and Anticancer Activities of Novel Chalcone Adamantyl Arotinoids. **Journal of Medicinal Chemistry**, v. 51, p. 5431-40, 2008.

LOWRY, O.H., et al. Protein measurement with the Folin phenol reagent. **Journal of Biological Chemistry**, v. 193, p. 265-75, 1951.

LUM, J.J.; DEBERARDINIS, R.J.; THOMPSON, C.B. Autophagy in metazoans: cell survival in the land of plenty. **Nat Rev Mol Cell Biol**, v. 6, p. 439-48, 2005.

MALLIS, R.J.; BUSS, J.E.; THOMAS, J.A. Oxidative modification of H-ras: S-thiolation and S-nitrosylation of reactive cysteines. **Biochem. J.**, v. 355, p. 145–153, 2001.

MAO, X., et al. Induction of apoptosis by shikonin through a ROS/JNKmediated process in Bcr/Abl-positive chronic myelogenous leukemia (CML) cells. **Cell Research**, v. 18, p. 879-88, 2008.

MARSHALL, H.E.; MERCHANT, K.; STAMLER, J.S. Nitrosation and oxidation in the regulation of gene expression. **FASEB J.**, v. 14, p. 1889– 1900, 2000.

MASELLA, R., et al. Novel mechanisms of natural antioxidant compounds in biological systems: involvement of glutathione and glutathione-related enzymes, **J. Nutr. Biochem.**, v. 16, p. 577–586, 2005.

MATÉS, N. Effects antioxidant enzymes in the molecular control of reactive oxygen species toxicology. **Toxicology.**, v. 153, p. 83-104, 2000.

McBRIDE, H.M.; NEUSPIEL, M.; WASIAK, S. Mitochondria: more than just a powerhouse. **Curr. Biol.**, v. 16, p. 551-560, 2006.

McCALL, M. R.; FREI, B. Can antioxidant vitamins materially reduce oxidative damage in humans? **Free Radical Biology and Medicine**, v. 26, p. 1034-1053, 1999.

McCONKEY, D. J. Biochemical determinants of apoptosis and necrosis. **Toxicology Letters**, v. 99, p. 157-168, 1998.

McCORD, J. M.; FRIDOVICH, I. Superoxide dismutase an enzymic function for erythrocyte hemoglobin (hemocyanin). **The Journal of Biological Chemistry**, v. 244, p. 60409-60455, 1969.

MEIER, P.; FINCH, A.; EVAN, G. Apoptosis in development. **Nature**, v. 407, p. 796-801, 2000.

MENG, C. Q., et al. Discovery of novel heteroaryl-substituted chalcones as inhibitors of TNF- α -induced VCAM-1 expression. **Bioorganic and Medicinal Chemistry Letters**, v. 14, n. 6, p. 1513-1517, 2004.

MERTENS-TALCOTT, S.; PERCIVAL, S. Ellagic acid and quercetin interact synergistically with resveratrol in the induction of apoptosis and cause transient cell cycle arrest in human leukemia cells. **Cancer Letters**, v. 218, p. 141-151, 2005.

MODZELEWSKA, A., et al. Anticancer activities of novel chalcone and bis-chalcone derivatives. **Bioorganic & Medicinal Chemistry**, v. 14, p. 3491-3495, 2006.

MONTES-AVILA, J., et al. Solution-phase parallel synthesis of substituted chalcones and their antiparasitary activity against *Giardia lamblia*. **Bioorganic & Medicinal Chemistry**, v. 17, p. 6780-6785, 2009.

MOOI, W.J.; PEEPER, D.S. Oncogene-induced cell senescence-halting on the road to cancer. **New England Journal of Medicine**, v.355, p. 1037-1046, 2006.

MOON, D.O., et al. Rosmarinic acid sensitizes cell death through suppression of TNF- α -induced NF- κ B activation and ROS generation in human leukemia U937 cells. **Cancer Letters**. (2009), doi:10.1016/j.canlet.2009.06.033

MORENO-SÁNCHEZ, R.; et al. Energy metabolism in tumor cells. **FEBS Journal**, v. 274, p. 1393-1418, 2007.

MOSMANN, T. Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: application to proliferation and cytotoxicity assays. **J Immunol Methods**, v. 65, n. 1-2, p. 55-63, 1983.

NAKATANI, N., et al. Induction of Apoptosis in Human Promyelocytic Leukemia Cell Line HL-60 by C-Benzylated Dihydrochalcones, Uvaretin, Isouvaretin and Diuvaretin. **Biol. Pharm. Bull.**, v. 28, n. 1, p. 83—86, 2005.

NAM, N.H., et al. Cytotoxic 2'5'-dihydrochalcones with unexpected antiangiogenic activity. **European Journal of Medicinal Chemistry**, v. 38, p. 179-187, 2003.

NAVARINI, A.L.F., et al. Hydroxychalcones induce apoptosis in B16-F10 melanoma cells via GSH and ATP depletion. **European Journal of Medicinal Chemistry**, v. 44, p. 1630-37, 2008.

NGUYEN, T., *et al.* The role of activated MEK-ERK pathway in quercetin-induced growth inhibition and apoptosis in A549 lung cancer cells. **Carcinogenesis**, v. 25, n. 5, p. 647-659, 2004.

NICHOLSON, D.W. From bench to clinic with apoptosis-based therapeutic agents. **Nature**, v. 407, p. 810-16, 2000.

NOCTOR, G., et al. Interactions between biosynthesis, compartmentation and transport in the control of glutathione homeostasis and signalling. **Journal of Experimental Botany**, v. 53, p. 1283-304, 2002.

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

NOWAKOWSKA, Z.; KEDZIA, B.; SCHROEDER, G. Synthesis, physicochemical properties and antimicrobial evaluation of new (E)-chalcones. **European Journal of Medicinal Chemistry**, v. 43, p. 707-713, 2008.

NUTT, L.K.; et al. Bax and bak promote apoptosis by modulating endoplasmic reticular and mitochondrial Ca²⁺ stores. **Journal of Biological Chemistry**, v. 277, p. 9219-9225, 2002.

OGAWA, H., et al. Beneficial effect of xanthoangelol, a chalcone compound from angelica keiskei, on lipid metabolism in stroke-prone spontaneously hypertensive rats. **Clinical and Experimental Pharmacology Physiology**, v. 34, p. 238-243, 2007.

OKADA, H.; MAK, T.W. Pathways of apoptotic and nonapoptotic death in tumour cells. **Nat Rev Cancer**, v. 4, p. 592-603, 2004.

ONCIU, M. Acute Lymphoblastic Leukemia. **Hematol Oncol Clin N Am**, v. 23, p. 655-674, 2009.

OZÖREN, N. EL-DEIRY, W.S. Cell surface death receptor signaling in normal and cancer cells. **Semin Cancer Biol**, v. 13, n. 2, 2003.

PASTORE, A., et al. Analysis of glutathione: implication in redox and detoxification. **Clinica Chimica Acta**, v. 333, p. 19-39, 2003.

PASTORI, G.; FOYER, C.H.; MULLINEAUX, P. Low temperature-induced changes in the distribution of H₂O₂ and antioxidants between the bundle sheath and mesophyll cells of maize leaves. **Journal of Experimental Botany**, v. 51, p. 107-113, 2000.

PATHANIA, D.; MILLARD, M.; NEAMATI, N. Opportunities in discovery and delivery of anticancer drugs targeting mitochondria and cancer cell metabolism. **Advanced Drug Delivery Reviews**, 2009, doi:10.1016/j.addr.2009.05.010.

PELICANO, H., et al. Inhibition of mitochondrial respiration: a novel strategy to enhance drug-induced apoptosis in human leukemia cells by a reactive oxygen species-mediated mechanism. **J. Biol. Chem.**, v. 278, p. 37832-37839, 2003.

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

- PLASSCHAERT, S. L., KAMPS, W. A. et al. Prognosis in childhood and adult acute lymphoblastic leukaemia: a question of maturation? **Cancer Treat Rev**, v. 30, n. 1, p. 37-51, 2004.
- PUI, C. H. Childhood leukemias. **The New England Journal of Medicine**, v. 332, n. 24, p. 1618-30, 1995.
- PUI, C.H. Toward optimal central nervous system-directed treatment in childhood acute lymphoblastic leukemia. **Journal of Clinical Oncology**, v. 21, n. 2, p. 179-181, 2003.
- PUI, C.H.; CAMPANA, D.; EVANS, W.E. Childhood acute lymphoblastic leukaemia: current status and future perspectives. **Lancet Oncology**, v. 2, n. 10, p. 597-607, 2001.
- PUI, C.H.; EVANS, W.E. Acute lymphoblastic leukemia. **The New England Journal of Medicine**, v.339, n. 9, p. 605-15, 1998.
- PUI, C.H.; EVANS, W.E. Drug therapy - Treatment of acute lymphoblastic leukemia. **The New England Journal of Medicine**, v. 354, n. 2, p. 166-178, 2006.
- PUI, C.H.; JEHA, S. New therapeutic strategies for the treatment of acute lymphoblastic leukaemia. *Nature reviews*, v.6, n. 2, p. 149-65, 2007.
- RANI, P., et al. Synthesis and antiinflammatory activity of heterocyclic indole derivatives. **European Journal of Medicinal Chemistry**, v. 39, n. 5, p. 449-52, 2004.
- RAYMAN, M.P. The importance of selenium to human health. **Lancet**, v. 356, p.233-241, 2000.
- REED, J.C. Apoptosis-targeted therapies for cancer. *Cancer Cell*, v. 3, p. 17-22, 2003.
- REN, W., et al., Flavonoids: Promising anticancer agents. **Medicinal Res Rev**, v. 23, n. 4, p. 519-534, 2003.
- RICCI, M.S.; ZONG, W.X. Chemotherapeutic approaches for targeting cell death pathways. **Oncologist**. v. 11, p. 342-57, 2006.

RIEDL, S. J; SHI, Y. Molecular mechanisms of caspase regulation during apoptosis. **Nature**, v. 5, p. 897-906, 2004.

ROJAS, J., et al. Synthesis and inhibitory activity of dimethylamino-chalcone derivatives on the induction of nitric oxide synthase. **European Journal of Medicinal Chemistry**, v. 37, n. 8, p. 699-705, 2002.

RUBNITZ, J. E. et al. Frequency and prognostic significance of HRX rearrangements in infant acute lymphoblastic leukemia: a Pediatric Oncology Group study. **Blood**, v. 84, n. 2, p. 570-573, 1994.

SABZEVARI, O., et al. Molecular cytotoxic mechanisms of anticancer hydroxychalcones. **Chemico-Biological Interactions**, v. 148, p.57-67, 2004.

SAMBROOK, J.; RUSSELL, D. W. **Molecular Cloning: a laboratory manual**. 3. ed. New York: Cold Spring Harbor, Appendix 8 - Quantitation of nucleic acids, 101, p. 19-21, 2001.

SARASTE, A.; PULKKI, K. Morphologic and biochemical hallmarks of apoptosis. **Cardiovascular Research**, v. 45, p. 528-37, 2000.

SAS, K.; et al. Mitochondria, metabolic disturbances, oxidative stress and the kynurenine system, with focus on neurodegenerative disorders. **Journal of the Neurological Sciences**, v. 257, p. 221-39, 2007.

SASTRE, J.; PALLARDO, F.V.; VINA, J. Mitochondrial oxidative stress plays a key role in aging and apoptosis. **IUBMB Life** , v. 49, p. 427-435, 2000.

SAXENA, H.O., et al. Synthesis of chalcone derivatives on steroidal framework and their anticancer activities. **Steroids**, v. 72, p. 892-900, 2007.

SAUER, H.; WEFER, K., et al. Regulation of intrinsic prion protein by growth factors and TNF- α : the role of intracellular reactive oxygen species, **Free Radical Biology Medicine**, v. 35, p. 586- 594, 2003.

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

SCHRAPPE, M., et al. Long-term results of large prospective trials in childhood acute lymphoblastic leukemia. **Leukemia**, v. 14, n. 12, p. 2193-4, 2000.

SEELING, G.F.; MEISTER, A. Gamma-Glutamylcysteine synthetase from erythrocytes. **Methods in Enzymology**, v. 113, n. 2, p. 379-390, 1985.

SELVAKUMAR, N., et al. Synthesis, SAR and antibacterial studies on novel chalcone oxazolidinone hybrids. **European Journal of Medicinal Chemistry**, p. 1-6, 2006.

SHEN, S., et al. Differential apoptosis-inducing effect of quercetin and its glycosides in human promyeloleukemic HL-60 cells by alternative activation of the caspase 3 cascade. **Journal of Cellular and Biochemistry**, v. 89, p. 1044-1055, 2003.

SHIN, S.W., et al. d-PGJ2 Induces Apoptosis by Reactive Oxygen Species-mediated Inactivation of Akt in Leukemia and Colorectal Cancer Cells and shows In vivo Antitumor Activity. **Clinical Cancer Research**, v. 15, n. 17, p. 5414-5425, 2009a.

SHIN, D.Y., ET AL. Implication of intracellular ROS formation, caspase-3 activation and Egr-1 induction in platycodon D-induced apoptosis of U937 human leukemia cells. **Biomedicine & Pharmacotherapy**, v. 63, p. 86-94, 2009b.

SIES, H. Oxidative stress: oxidants and antioxidants. **Experimental Physiology**, v. 82, p. 291-295, 1997.

SIES, H. **Oxidative stress: introductory remarks**. Academic Press, 1985

SIVAKUMAR, P. M.; SEENIVASAN, S. P. et al. Synthesis, antimycobacterial activity evaluation, and QSAR studies of chalcone derivatives. **Bioorganic and Medicinal Chemistry Letters**, v. 17, n. 6, p. 1695-1700, 2007.

SIVAKUMAR, P.M.; KUMAR, T.M.; DOBLE, M. Antifungal Activity, Mechanism and QSAR Studies on Chalcones. **Chem Biol Drug Des**, v. 74, p. 68-73, 2009.

SKULACHEV, V. P. Bioenergetic aspects of apoptosis, necrosis and mitoptosis. **Apoptosis**, v. 11, p. 473-485, 2006.

TALPAZ, M., et al. Dasatinib in imatinib-resistant Philadelphia chromosome-positive leukemias. **The New England Journal of Medicine**, v. 354, p. 2531-41, 2006.

TIETZE, F. Enzymatic method for quantitative determination of nanogram amounts of total and oxidized glutathione: applications to mammalian blood and other tissues. **Analytical Biochemistry**, v.27, p.502-22, 1969.

TOWNSEND, D.M.; TEW, K.D. The role of glutathione-S- transferase in anti-cancer drug resistance. **Oncogene**, v. 22, p. 7369-75, 2003.

TOYODA, Y., et al., Six months of maintenance chemotherapy after intensifi ed treatment for acute lymphoblastic leukemia of childhood. **Journal of Clinical Oncology**, v. 18, n. 1508–16, 2000.

TSIFTSOGLU, A. S., PAPPAS, I. S.; VIZIRIANAKIS, I. S. Mechanisms involved in the induced differentiation of leukemia cells. **Pharmacol Ther**, v. 100, n. 3, p. 257–290, 2003.

VALKO, M., et al Free radicals, metals and antioxidants in oxidative stress-induced cancer. **Chem Biol Interact**, v. 160, p. 1–40, 2006.

VASCONCELOS, S.M.L., et al. Espécies reativas de oxigênio e de nitrogênio, antioxidantes e marcadores de dano oxidativo em sangue humano: principais métodos analíticos para sua determinação. **Química Nova**, v. 30, n. 5, p. 1323-38, 2007.

VERRAX, J.; CALDERON, P.B. Pharmacologic Concentration of ascorbate are achieved by parenteral administration and exhibit antitumoral effects. **Free Radicals Biology and Medicine**, v. 47, p. 32-40, 2009.

- VITALE, A. The changing scene of adult acute lymphoblastic leukemia. **Current Opinion in Oncology**, v. 18, n. 6, p. 652-659, 2006.
- WANG, W.; BALLATORI, N. Endogenous glutathione conjugates: occurrence and biological functions. **Pharmacological Reviews**, v. 50, n. 3, p. 335-55, 1998.
- WEAVER, B.A.; CLEVELAND, D.W. Decoding the links between mitosis, cancer, and chemotherapy: the mitotic checkpoint, adaptation, and cell death. **Cancer Cell**, v. 8, p. 7-12, 2005.
- WHO - World Health Organization. Disponível em: <<http://www.who.int/cancer>>, Acesso em 5 out. 2009.
- WILLIAMS, R.J.; SPENCER, J.P.E.; RICE-EVANS, C. Flavonoids: antioxidants or signalling molecules? **Free Radic Biol Med**, v. 36, p. 838-849, 2004
- WON, S. J., et al. Synthetic chalcones as potential anti-inflammatory and cancer chemopreventive agents. **European Journal of Medicinal Chemistry**, v. 40, n. 1, p. 103-12, 2005.
- WÜNSCH-FILHO, V., MONCAU, J.E. Mortalidade por câncer no Brasil 1980-1995: padrões regionais e tendências temporais. **Rev Assoc Med Bras**, v. 48, n. 3, p. 250-257, 2002.
- ZAND, R.S.R.; JENKINS, D.J.A.; Diamandis, E.P. Flavonoids and steroid hormone-dependent cancers. **J Chromatogr B**, v. 777, p. 219-232, 2002.
- ZHAN, C.; YANG, J. Protective effects of isoliquiritigenin in transient middle cerebral artery occlusion-induced focal cerebral ischemia in rats. **Pharmacological Research**, v. 53, n. 3, p. 303-309, 2006.
- ZHANG, G., et al. Effect of dimethyl sulfides on the induction of apoptosis in human leukemia Jurkat cells and HL-60 cells. **Bioscience Biothecnology Biochemistry**, v. 72, n. 11, p. 2966-2972, 2008.
- ZHOU, Y., et al. Free radical stress in chronic lymphocytic leukemia cells and its role in cellular sensitivity to ROS-generating anticancer agents. **Blood**, v. 101, p. 4098-4104, 2003.

ZIEGLER, U.; GROSCURTH, P. Morphological features of cell death. **News Physiol Sci**, v. 19, p. 124-28, 2004.

ZUSE, A., et al. 9-Benzylidene-naphtho[2,3-b]thiophen-4-ones and benzylidene-9(10H)-anthracenones as novel tubulin interacting agents with high apoptosis-inducing activity. **European Journal of Pharmacology**, v. 575, p. 34-45, 2007.

NAPHTHYLCHALCONES INDUCE APOPTOSIS AND CASPASE ACTIVATION IN LEUKEMIA CELL LINE: RELATIONSHIP BETWEEN MITOCHONDRIAL DAMAGE, OXIDATIVE STRESS AND CELL DEATH

Evelyn Winter^a, Louise Domeneghini Chiaradia^b, Ricardo José Nunes^b, Rosendo Augusto Yunes^b and Tânia Beatriz Crezczynski-Pasa^{a*}

^a*Departamento de Ciências Farmacêuticas*, ^b*Departamento de Química, Universidade Federal de Santa Catarina, 88040-900, Florianópolis, SC, Brazil*

* Corresponding author. Tel: + 55 48 3721 8057; fax: + 55 48 37219542; e-mail: taniabcp@gmail.com; taniac@mbox1.ufsc.br

Abstract

Acute lymphoblastic leukemia is a malignant disorder caused by the proliferation of lymphoid progenitor cells. In this study we investigated the effect of twenty-four chalcones derivate from 2-naphthylacetophenone toward a lymphoblastic leukemia cell line (L1210). Three compounds called **R7**, **R13** and **R15** presented concentration and time dependent cytotoxicity and induced cellular death by apoptosis as a consequence of mitochondrial injury and oxidative stress. Although, their effects seems to be by different mechanisms since **R13** and **R7** induced a grater disturbance on the mitochondrial potential and all of them induced disturbance on cellular ATP content and increased the caspase-3 activity before the cell death. These compounds also interfered in different way on the antioxidant enzymes activities and GSH content.

Keywords: Leukemia, L1210 cells, chalcones, apoptosis, oxidative stress

1. Introduction

Acute lymphoblastic leukemia (ALL) is a malignant disorder of lymphoid progenitor cells that affects both children and adults, with peak prevalence between the ages of 2 and 5 years.¹ Although contemporary treatments cure more than 80% of children with ALL,² some patients require intensive treatment and many patients still develop

serious acute and late complications due to the side effects of the drugs. Furthermore, the survival rate for adults with ALL remains below 40%³ and the multidrug resistance is frequently reported.² Therefore, new drugs and treatment strategies are needed to improve not only the cure rate but also the life quality of the patients.⁴ Studies have considered that due the heterogeneity of the alterations found in leukemias a combined therapy with antiproliferatives and apoptosis inductive agents can be more effective than the conventional treatments.⁵

Cell death through apoptosis can result from several cellular events, occasioned frequently by mitochondrial alterations and consequently alteration in the oxidative metabolism and cellular content of ATP.⁶ The process of apoptosis leads to cells characteristically changes such as DNA fragmentation, chromatin condensation, cell shrinkage, and membrane blabbing.⁷

Several recent studies have shown that the use of drugs that compromise the structural and functional integrity of the mitochondria can be an alternative to fight toward the proliferation of neoplastic cells.⁸ When a death signal is detected by the mitochondria a collapse of the mitochondrial potential is triggered and apoptotic factors as cytochrome *c* are released to the cytosol. These factors activate caspases culminating in apoptosis.⁹ Alterations in the mitochondria can also lead to bioenergetics unbalance since this organelle is responsible for the production of 80 to 90% of the ATP necessary for the cells.⁸

The mechanisms of cellular death also can be influenced by an unbalance in the oxidative metabolism called oxidative stress, being the mitochondria the main organelle involved in this phenomenon since it is the main place of cell oxygen consumption and the center of reactive oxygen species (ROS) generation.⁶ Under oxidative stress, the normal cells can enter in an adaptation process, mainly by its antioxidant defenses,¹⁰ however, the tumor cells can have a limited capacity of adaptation for some defenses and therefore antitumoral agents who induce the production of ROS acquire potential therapeutic implications.¹¹ Studies have related the increase of ROS with the increase of cellular death.¹²

Chalcones are essential intermediate compounds in the flavonoids biosynthesis in plants. Many studies have demonstrated antitumoral, antiinflammatory, anti-infective and hypotensive activities for chalcones, besides others pharmacological effects (for review, see references 13-15). Kachadouriam and Day¹⁶ demonstrated antileukemic activity of hydroxychalcones by depletion of reduced glutathione (GSH), release of citocromo *c* and loss of the mitochondrial membrane potential. Navarini

*et al.*¹⁷ also demonstrated antileukemic activity of hydroxychalcones by depletion of GSH and ATP.

In this study was investigated the effect of chalcones derivatives from 2-naphthylacetophenone toward a lymphoblastic leukemia cell line characterizing the cell death, monitoring the oxidative stress induced, and the influence in the energetic metabolism.

2. Results and Discussion

2.1. Chalcone synthesis

Twenty-four chalcones were prepared by aldolic condensation between 2-naphthylacetophenone and corresponding aldehydes, in methanol, under basic conditions (Fig. 1),¹⁸ providing substituted compounds at B-ring. The obtained yields varied between 29% and 97%. All reagents used were obtained commercially (Sigma-Aldrich), except the benzylated vanillin [3-methoxy-4-(phenylmethoxy)-benzaldehyde], which was prepared as previously described,¹⁹ with yield of 88%. All the structures, including those not yet published (**R11**, **R23**, **R25**, **R44** and **R45**), were confirmed by melting points and by chemical identification data: infrared spectroscopy (IR), ¹H and ¹³C nuclear magnetic resonance spectroscopy (NMR) and elementary analysis. ¹H NMR specters revealed that all structures were estructurelly pure and configured *E* ($J_{\text{H}\square\text{-H}\square} = 16.0$ Hz).

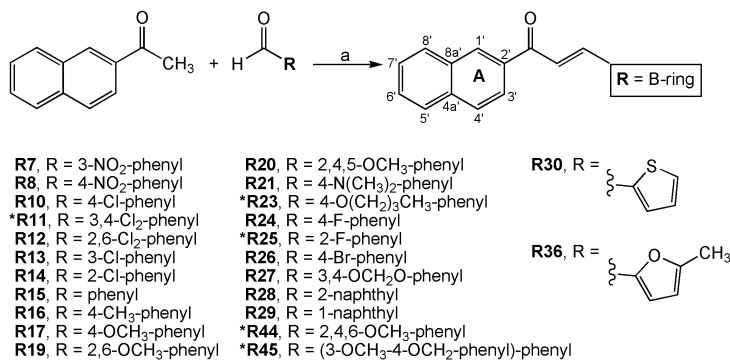


Figure 1: Preparation of chalcones. a) KOH 50% m/v, methanol, r.t., 24h. *New compounds.

2.2. Biological

In order to screen and compare the cytotoxicity induced by the naphthylchalcones, all compounds were incubated with L1210 cell line at 25, 50, 75 e 100 μM for 24 h and the IC_{50} values were estimated. Chalcones **R7**, **R13**, **R14**, **R15**, **R25** and **R30** were the compounds that had presented the best cytotoxic effect with IC_{50} values below 40 μM (Fig. 2).

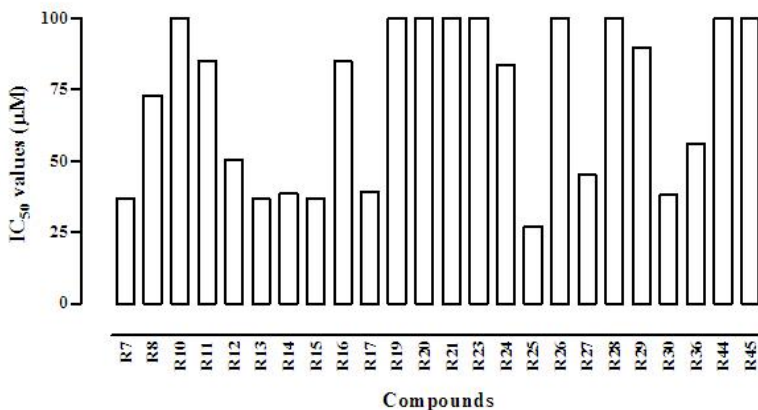


Figure 2: Cytotoxicity of naphthylchalcones in L1210 cells. The cells were incubated with the compounds at concentrations of 25, 50, 75 and 100 μM at 24 h and the cell viability was assayed by MTT. Optical density of zero time was taken as 100% of cell viability.

It is important to observe that these compounds are structures without substituents at B-ring (**R15**), with substituents that reduce the electron density of the aromatic ring in positions 2 or 3 at B-ring (**R7**, **R13**, **R14** and **R25**) or with a sulfur heterocyclic as B-ring (**R30**). Substituted chalcones in position 3, accompanied by other substitution in position 4 at B-ring, showed moderated activity (**R11** and **R27**), as well as **R12** (2,6-dichlorated), **R29** (with a 1-naphthyl group as B-ring) and **R36** (with a oxygenated heterocyclic ring). Mono-substituted compounds in position 4, or substituted in position 4 and other more, presented moderated (**R8**, **R16**, **R17** and **R24**) or none activity (**R10**, **R20**, **R21**, **R23**, **R26**, **R44** and **R45**). These results indicate that the substitutions in the position 4 at B-ring decrease the cytotoxic potential of chalcones toward L1210 leukemia cells, when the A-ring is the 2-

naphthyl group. These observations are consistent with Nam *et al.*,²⁰ which observed that chalcones with electron-withdrawing groups at B-ring, mainly at 2-position, confer strong angiogenesis inhibitory and marked antitumor activity in murine melanoma cells (B16), human colon cancer cells (HCT116) and human epidermoid carcinoma cells (A431).²⁰ In addition, it was showed that the compounds **R28** (with a 2-naphthyl group as B-ring) and **R19** (dimethoxylated in positions 2 and 6 of B-ring) presented no cytotoxic activity.

Chalcones **R7**, **R13**, **R14**, **R15**, **R25** and **R30** were selected and the kind of cell death induced by them was analyzed. Compounds **R7**, **R13** and **R15** induced cell death by apoptosis, characterized by internucleosomal breakdown of DNA (Fig. 3), and the other chalcones induced the necrosis process (data not shown). **R7**, **R13** and **R15** demonstrated cytotoxicity with IC₅₀ values of 23, 37 and 36 μM , respectively, after 24 h of incubation, and 13, 23 and 20 μM , respectively, after 48 h of incubation. These compounds demonstrated cytotoxicity in a time dependent manner (data not shown).

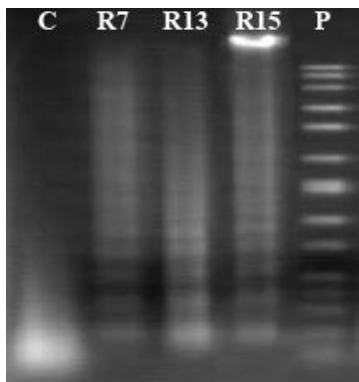


Figure 3: Cytotoxicity of chalcones **R7**, **R13** and **R15** by DNA fragmentation in L1210 cells. The cells were treated for 24 h. The DNA analysis was performed through agarose gel electrophoresis. C represents the control cells and P represents the DNA sizing standart.

Several studies have been done to search new drugs able to induce apoptosis in leukemic cells.^{4,21} In order to confirm whether or not the cell death was induced by apoptosis, the cells were incubated with the chalconas **R7**, **R13** and **R15** at the concentration of IC₅₀ for 2 and 4 h to determine the caspases-3 activity. The compounds increased

the caspases-3 activity (Fig. 4), confirming that chalcones **R7**, **R13** and **R15** induced the cells death by apoptosis. In a previous study with HL-60 cell line, Nakatani *et al.*²² showed an antileukemic activity of dihydrochalcones, which has not the double bond, by caspases activation.

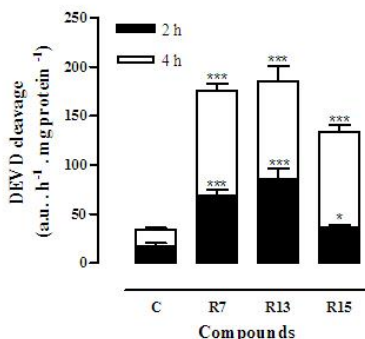


Figure 4: Activation of caspase-3 activity by chalcones **R7**, **R13** and **R15** in L1210 cells. The cells were incubated with the compounds for 2 and 4 h. The caspase-3 activity was measured by monitoring the cleavage of Ac-DEVD-AMC, a fluorogenic substrate for caspases-3, for 2 h. The activity is given in arbitrary fluorescence units (a.u.) per hour per μg protein. * $p < 0,05$ and *** $p < 0,001$.

To determine whether or not an oxidative stress was involved in chalcones induced cell death, the generation of ROS was evaluated by the lipid peroxidation extent after a concomitant incubation of chalcones and antioxidant enzymes. The cell viability was evaluated in parallel. As shown in Figure 5A, all compounds significantly induced ROS production and this production was blocked when catalase (CAT) was present. The association of the compounds with catalase also increased the cell viability in 24 h of incubation when compared with compounds alone. These differences were not observed when the compounds were associated with superoxide dismutase (SOD) and trolox[®] (TR). These results are summarized in Table 1, where the IC_{50} values obtained with the treatments are indicated. Additionally, all chalcones induced lipid peroxidation of cell membranes (Fig. 5B). Therefore, these findings indicate that the compounds tested induced an oxidative stress and suggest that the hydrogen peroxide (H_2O_2) can be the main ROS involved in the process, since the treatment of the cells with catalase, decreased the production of ROS and the cytotoxicity induced by them.

Table 1: Comparison between the IC₅₀ values for cytotoxicity of the chalcones **R7**, **R13** and **R15** incubated alone and associated to catalase, trolox[®] and superoxide dismutase with L1210 cell line.

Treatments	IC ₅₀ (μM)
R7	24 ± 0,6
R7 + CAT	45 ± 1,8***
R7 + SOD	20 ± 0,5
R7+ TR	20 ± 1,0
R13	38 ± 1,2
R13 + CAT	51 ± 2,4**
R13 + SOD	30 ± 0,3
R13 + TR	34 ± 1,9
R15	37 ± 1,1
R15 + CAT	58 ± 2,8***
R15 + SOD	31 ± 0,7
R15 + TR	39 ± 0,5

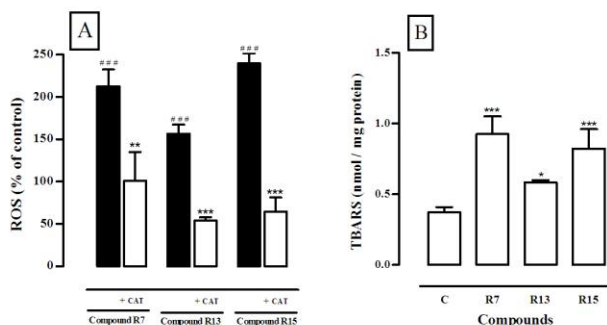


Figure 5: Effects of chalcones **R7**, **R13** and **R15** on ROS generation and lipid peroxidation in L1210 cells. **A)** ROS formation was followed using DCFH-DA. The results are expressed as the percentage of cellular fluorescence in comparison to control samples (zero % of fluorescence). ^{###} $p < 0.001$ when the control samples and the cells treated with chalcones alone were compared and ^{**} $p < 0.01$; ^{***} $p < 0.001$ when the cells treated with chalcones alone and the cells treated with chalcones plus catalase were compared. **B)** Lipid peroxidation was measured using the TBARS method. The results are expressed as nmol of TBARS per μg of protein. ^{*} $p < 0.05$ and ^{***} $p < 0.001$.

Many natural compounds can induce cell death by apoptosis in cancer cells by increase of ROS content promoting the formation of pores in mitochondria.⁸ The relation between ROS mitochondrial production, cytochrome *c* release and caspases-3 activation in a leukemic cell line was also reported.²³ Jing *et al.*²⁴ and Shin *et al.*²⁵ demonstrated the antileukemic activity of different compounds by induction of apoptosis by ROS generation in decurrence of mitochondrial membrane potential decrease. Thus, the effect of chalcones on mitochondrial membrane potential was evaluated and we observed that the compounds **R7** and **R13** decreased the mitochondrial membrane potential (Fig. 6D) in the same intensity of carbonyl cyanide p-trifluoromethoxyphenylhydrazone (FCCP). These findings can be related with ROS generation caused by the compounds and consequently with the oxidative stress. Sastre *et al.*²⁶ related that ROS can cause oxidative damage to protein, lipids and respiratory chain proteins activating the caspase and other apoptogenic factors. The chalcone **R15** did not change significantly the mitochondrial membrane potential (Fig. 6D) although it was the compound that induced ROS generation in a higher intensity. This increase can be related with its potential to induce ROS generation directly and not via mitochondria.

The mitochondria are the central organelles involved in apoptosis and are responsible for ATP production of the cell. Therefore, the determination of the intracellular ATP amount is important in research of drugs that induce apoptosis and energy depletion.²⁷ The chalcones **R7**, **R13** and **R15** induced an initial ATP depletion, after an increase and finally an strong ATP content depletion (Fig.6A,B,C). It is important to mention that the ATP measured was from the live remaining cells. Sabzevari *et al.*²⁸ showed that the cytotoxicity of ten hydroxychalcones, in a cell line of leukemia, resulted from mitochondrial disturbance. In this research the same can be occurred resulting in a respiratory chain deregulation and consequently depletion of ATP content and ROS increase. The increase of ROS can activate JNK and p38 and induce the cell death. Skulachev²⁹ evaluated the relation between apoptosis and ATP content and showed that mitochondrial damages can result in a decrease of ATP content and apoptosis or an initial increase of ATP content followed by a decrease and cell death. This may explain the increase of ATP content that occurred in cells treated with chalcones. As showed (Fig. 6A,B) the chalcones **R7** and **R13** caused a mitochondrial membrane potential decrease and consequently damages in the respiratory chain and depletion of ATP content. The other way can also happen as for

chalcone **R15** (Fig. 6C). The direct depletion of ATP can be related with the strong pro-oxidant effects of this chalcone, as can be seen in Fig. 5A and GPX and GST activities in Figure 7. Cao *et al.*³⁰ for example, reported that high doses of curcumin induced damages on mitochondrial DNA due to the increase of ROS. The mtDNA damage decreases the function of respiratory chain and consequently decreases strongly the ATP synthesis.

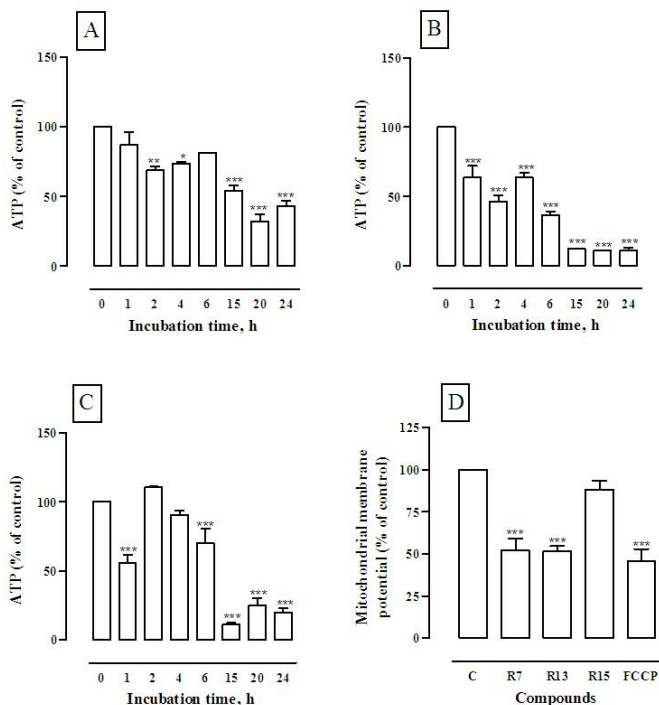


Figure 6: Effect of chalcones **R7**, **R13** and **R15** on mitochondrial membrane potential and intracellular ATP content in L1210 cells. ATP concentration was monitored by luciferin-luciferase after different times with chalcones: **A)** R7, **B)** R13 and **C)** R15. **D)** The membrane potential was determined using JC-1 after 4h of incubation. The decrease of red/green ratio indicates the decrease of mitochondrial membrane potential. The results are expressed as percentage and the values of control cells were considered 100%. * ** p < 0.01; ** p < 0.01; *** p < 0.001.

In order to minimize the damage of ROS, the aerobics organisms were endowed with enzymatic and not-enzymatic antioxidant defenses. The principal enzymatic defenses are catalase (CAT), glutathione peroxidase (GPx), glutathione reductase (GR) and glutathion S-transferase (GSTs).³¹ GSTs do not act directly against ROS but are important to cell defense because are part of the phase II detoxification enzymes which are responsible for the protection of cellular macromolecules from the attack of reactive electrophiles by conjugation with GSH.³² Among the non-enzymatic antioxidants are mainly: melanin, glutathione, uric acid, vitamins C and E, lipoic acid and others.³¹ Chalcones **R7**, **R13** and **R15** increased significantly the activity of GPx (Fig. 7A), GST (Fig. 7B) and GR (Fig. 7C) and none of them change the activity of CAT (Fig. 7D). All chalcones increased the glutathione oxidized (GSSG) (Fig. 8A) and total glutathione (TG) (Fig. 8B) contents. The chalcones **R7** and **R13** did not change the GSH content and **R15** increased the GSH content (Fig. 8C).

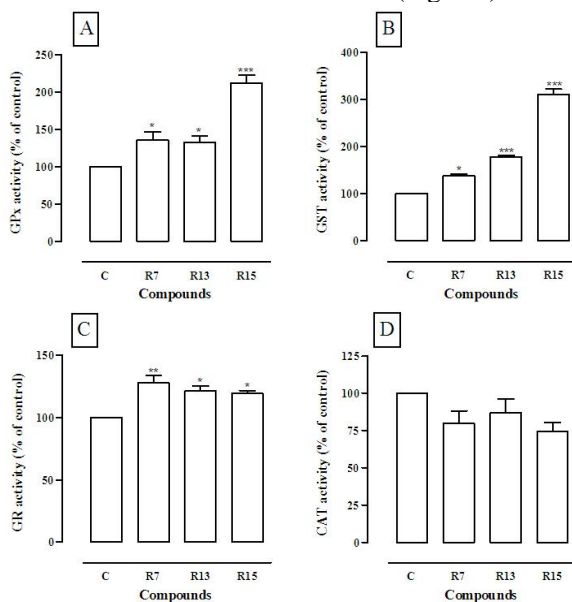


Figure 7. Effect of chalcones **R7**, **R13** and **R15** on antioxidant defenses. Activities of GPx (A), GST (B), GR (C) and CAT (D) were measured as described in Experimental section and presented as percentage of the control. * $p < 0.05$; ** $p < 0.01$; *** $p < 0.001$. The incubation time was 24 h.

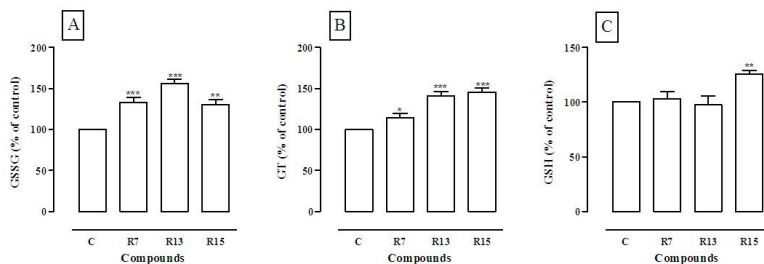


Figure 8. Effect of chalcones **R7**, **R13** and **R15** on GSH, GSSG and TG content. Content of GSSG (A), TG (B) and GSH (C), were measured as described in Experimental section and presented as percentage of the control. * $p < 0.05$; ** $p < 0.01$; *** $p < 0.001$. The incubation time was 24 h.

The increase of GPx activity can be explained by the increase of ROS production and the lipid peroxidation increase induced by the chalcones. Being GPx responsible by reduction of peroxides, an increase in peroxides formation can result in an increase of GPx activity. The increase of GST occurred perhaps, because these chalcones possibly are eliminated by conjugation with GSH by GST, thus, an increase in chalcones concentration can result in GST activity enhance. Surprisingly the chalcones augmented the GPx activity and did not increase the CAT activity because CAT is the principal enzyme responsible by reducing H_2O_2 . On the contrary, they seem to inhibit the enzyme activity. We tried to check this hypothesis evaluating the effect of the chalcones on the activity of isolated enzyme. Although the test has been done with an enzyme from a different source, the chalcones inhibited significantly the CAT activity, principally **R13** (data not shown). Pelicano, Carney and Huang¹¹ described that the cancer cells can have a limited capacity of adaptation in some antioxidant defenses in response to oxidative stress. The inability of the cell to increase the CAT activity, in this case, can be the reason of the cytotoxicity of chalcones since it is related mainly to generation of H_2O_2 . Other important fact resulting from the action of ROS in cancer cells is the oxidation of proteins as cytochrome *c*, CAT and others. The CAT inhibition can reduce the capacity of cells to eliminate the H_2O_2 increasing the cell damages induced by ROS.³³

The GSH is the most important non-enzymatic antioxidant. Normally, the greater part of GSH is maintained reduced by GR. However, in oxidative stress conditions a decrease in GSH content

occurs and consequently an increase in GSSG content.³⁴ Chalcones **R7**, **R13** and **R15** induced an increase on GSSG content, one evidence more that these compounds induce oxidative stress. The increase of GR can be a result of oxidative stress in progress during the cells incubation with chalcones in a tentative to sustain the GSH content. This result also explains the reason why a decrease in GSH content was not observed when the cells were incubated with chalcones **R7** and **R13** and an increase with chalcone **R15**. Moreover, the increase of GSH content observed can be a result of the increase of γ -Glutamyl-cysteine-synthetase (γ -GCS) activity promoted by chalcone **R15** (data not shown).

3. Conclusions

The development of new drugs for the treatment of cancer is based on the potential of the compounds to block the cell proliferation and to induce apoptosis.³⁵ Our findings showed, for the first time, that the naphthylchalcones **R7**, **R13** and **R15** induced the apoptosis in leukemia cell line L1210 by distinct targets. In general these compounds induced an oxidative stress, however for chalcone **R7** and **R13** the stress is a consequence of mitochondrial damages that can be related with respiratory chain damages and deregulation of ROS generation and depletion of ATP content. To the chalcone **R15** the main mechanism of cell death induction can be due its strong pro-oxidant effect that was induced mainly by ROS generation and interference on the antioxidant defenses. These results indicate these compounds as promissory to research of new drugs to cancer treatment.

4. Experimental

4.1. Chemicals. The cell culture media was purchased from Cultilab (São Paulo, Brazil), the serum and antibiotics were purchased from GIBCO (Grand Island, NY), the luciferin-luciferase kit from Biorbit (Tuku, Finland), the JC-1 from Invitrogen and the all other reagents were purchades from Sigma Chemical Co. (St. Louis, MO).

4.2. Preparation of Compounds. Reagents used were obtained commercially (Sigma-Aldrich[®]), except the benzylated vanillin [3-methoxy-4-(phenylmethoxy)-benzaldehyde], which was prepared as previously described.¹⁹ All chalcones were prepared by aldolic condensation between 2-naphthylacetophenone and corresponding

aldehydes, in methanol, KOH (50% v/v), at room temperature and magnetic agitation for 24 h.¹⁸ Distilled water and 10% hydrochloric acid were added to the reaction for total precipitation of the compounds, which were then obtained by vacuum filtration and later recrystallized in dichloromethane and hexane. The chalcones are soluble in dimethylsulfoxide, acetone, chloroform and dichloromethane. Chalcones **R7**, **R8**, **R10**, **R12**, **R13**, **R14**, **R15**, **R16**, **R17**, **R20**, **R21**, **R24**, **R26**, **R27**, **R28**, **R29** and **R30** were previously cited in the literature (see references 36-42). **R19** and **R36** were recently published by us⁴³ and **R11**, **R23**, **R25**, **R44** and **R45** are new compounds.

4.3. Physico-chemical data of the compounds. The structures were confirmed by melting points (m.p.), infrared spectroscopy (IR), ¹H and ¹³C nuclear magnetic resonance spectroscopy (NMR), and, for the undescribed ones, also elementary analysis. Melting points were determined with a Microquímica MGAPF-301 apparatus and are uncorrected. IR spectra were recorded with an Abb Bomen FTLA 2000 spectrometer on KBr disks. NMR (¹H and ¹³C) spectra were recorded on a Varian Oxford AS-400 (400 MHz) instrument, using tetramethylsilane as an internal standard. Elementary analysis was carried out using a CHNS EA 1110; percentages of C and H were in agreement with the product formula (within ±0.4% of theoretical values for C).

R7 - (2E)-1-(2'-naphthyl)-3-(3-nitrophenyl)-2-propen-1-one.³⁶ Light yellow solid, m.p. 139-141°C; ¹H NMR (CDCl₃) □ 7.60 (m, 1H, H7'), 7.65 (m, 1H, H6'), 7.83 (d, 1H, *J* = 16.0 Hz, H□), 7.87 (d, 1H, *J* = 16.0 Hz, H□), 7.90 (d, 1H, *J* = 8.0 Hz, H5), 7.92 (d, 1H, *J* = 8.0 Hz, H8'), 7.97 (d, 2H, *J* = 8.0 Hz, H6, H3'), 8.05 (d, 1H, *J* = 8.0 Hz, H4'), 8.13 (dd, 1H, *J* = 8.0/0.9 Hz, H5'), 8.28 (d, 1H, *J* = 8.0 Hz, H4), 8.58 (s, 1H, H2), 8.59 (s, 1H, H1'). ¹³C NMR (CDCl₃) □ 122.55 (C2), 124.52 (C4), 124.78 (C3'), 124.90 (C□), 127.23 (C7'), 128.12 (C5'), 128.99 (C4'), 129.08 (C6'), 129.85 (C1'), 130.30 (C5), 130.52 (C8'), 132.76 (C4a'), 134.73 (C2'), 135.15 (C6), 135.92 (C1), 136.95 (C8a'), 141.81 (C□), 148.97 (C3), 189.59 (C=O). IR □_{max}/cm⁻¹ 1662 (C=O), 1603 (C=C), 1522, 1353, 843 (NO₂), 3054, 1468, 1276, 1187, 1122, 1095, 1019, 978, 801, 751, 666, 471 (Ar) (KBr). Yield: 97%.

R11 - (2E)-1-(2'-naphthyl)-3-(3,4-dichlorophenyl)-2-propen-1-one. Light yellow solid, m.p. 172-174°C; ¹H NMR (CDCl₃) □ 7.52 (m, 2H, H5, H6), 7.59 (m, 1H, H7'), 7.64 (m, 1H, H6'), 7.68 (d, 1H, *J* = 16.0 Hz, H□), 7.77 (d, 1H, *J* = 16.0 Hz, H□), 7.79 (s, 1H, H2), 7.92 (d, 1H, *J*

= 8.0 Hz, H8'), 7.96 (d, 1H, $J = 8.0$ Hz, H3'), 8.02 (d, 1H, $J = 8.0$ Hz, H4'), 8.11 (dd, 1H, $J = 8.0/1.0$ Hz, H5'), 8.55 (s, 1H, H1'). ^{13}C NMR (CDCl_3) \square 123.47 (C3'), 124.34 (C \square), 126.93 (C6), 127.62 (C7'), 127.88 (C5'), 128.63 (C2), 128.75 (C4'), 129.57 (C6'), 129.77 (C1'), 130.12 (C8'), 130.98 (C5), 132.53 (C4a'), 133.34 (C4), 134.40 (C3), 135.12 (C2'), 135.62 (C1, C8a'), 141.83 (C \square), 189.57 (C=O). IR $\square_{\text{max}}/\text{cm}^{-1}$ 1659 (C=O), 1599 (C=C), 1045 (C-Cl), 3055, 1466, 1382, 1307, 1254, 1175, 1024, 979, 861, 812, 751, 689, 569, 484 (Ar) (KBr). Anal. Calcd for $\text{C}_{19}\text{H}_{12}\text{Cl}_2\text{O}$: C 69.74, H 3.70. Found: C 69.41, H 3.82. Yield: 96%.

R13 - (2E)-1-(2'-naphthyl)-3-(3-chlorophenyl)-2-propen-1-one.³⁶

Ligh yellow solid, m.p. 120-121°C; ^1H NMR (CDCl_3) \square 7.40 (s, 1H, H2), 7.40 (d, 1H, $J = 8.0$ Hz, H5), 7.56 (m, 1H, H7'), 7.59 (m, 1H, H6), 7.64 (m, 1H, H6'), 7.69 (d, 1H, $J = 8.0$ Hz, H4), 7.70 (d, 1H, $J = 16.0$ Hz, H \square), 7.82 (d, 1H, $J = 16.0$ Hz, H \square), 7.92 (d, 1H, $J = 8.0$ Hz, H8'), 7.96 (d, 1H, $J = 8.0$ Hz, H3'), 8.02 (d, 1H, $J = 8.0$ Hz, H4'), 8.11 (dd, 1H, $J = 8.0/0.9$ Hz, H5'), 8.56 (s, 1H, H1'). ^{13}C NMR (CDCl_3) \square 123.42 (C3'), 124.62 (C \square), 127.12 (C7'), 127.15 (C6), 128.09 (C5'), 128.14 (C2), 128.80 (C4), 128.94 (C4'), 129.80 (C6'), 130.33 (C1'), 130.48 (C8'), 130.59 (C5), 132.77 (C4a'), 135.22 (C3), 135.47 (C2'), 135.82 (C8a'), 137.03 (C1), 143.24 (C \square), 190.06 (C=O). IR $\square_{\text{max}}/\text{cm}^{-1}$ 1661 (C=O), 1602 (C=C), 1046 (C-Cl), 3055, 1562, 1412, 1305, 1177, 979, 865, 818, 792, 752, 681, 481 (Ar) (KBr). Yield: 93%.

R15 - (2E)-1-(2'-naphthyl)-3-phenyl-2-propen-1-one.³⁸

Ligh yellow solid, m.p. 93-95°C; ^1H NMR (CDCl_3) \square 7.45 (m, 3H, H3, H4, H5), 7.58 (ddd, 1H, $J = 8.0/0.9/0.9$ Hz, H7'), 7.62 (ddd, 1H, $J = 8.0/0.9/0.9$ Hz, H6'), 7.70 (m, 2H, H2, H6), 7.71 (d, 1H, $J = 16.0$ Hz, H \square), 7.89 (d, 1H, $J = 16.0$ Hz, H \square), 7.91 (d, 1H, $J = 8.0$ Hz, H8'), 7.95 (d, 1H, $J = 8.0$ Hz, H3'), 8.01 (d, 1H, $J = 8.0$ Hz, H4'), 8.11 (dd, 1H, $J = 8.0/1.0$ Hz, H5'), 8.55 (s, 1H, H1'). ^{13}C NMR (CDCl_3) \square 122.32 (C3'), 124.73 (C \square), 127.03 (C7'), 128.07 (C5'), 128.73 (C2, C6), 128.83 (C4), 129.22 (C3, C5), 129.63 (C4'), 129.76 (C6'), 130.17 (C1'), 130.79 (C8'), 132.80 (C4a'), 135.19 (C2'), 135.72 (C1), 135.78 (C8a'), 145.04 (C \square), 190.56 (C=O). IR $\square_{\text{max}}/\text{cm}^{-1}$ 1660 (C=O), 1600 (C=C), 3049, 1440, 1282, 1177, 1047, 984, 818, 756, 705, 683, 486 (Ar) (KBr). Yield: 88%.

R23 - (2E)-1-(2'-naphthyl)-3-(4-butoxyphenyl)-2-propen-1-one.

Light yellow solid, m.p. 85-86°C; ^1H NMR (CDCl_3) \square 1.00 (t, 3H, CH_3), 1.51 (m, 2H, $-\text{CH}_2-\text{CH}_3$), 1.80 (m, 2H, $-\text{CH}_2-\text{CH}_2-\text{CH}_3$), 4.03 (t,

2H, -O-CH₂-CH₂-CH₂-CH₃), 6.95 (d, 2H, $J = 8.0$ Hz, H3, H5), 7.57 (m, 1H, H7'), 7.58 (d, 1H, $J = 16.0$ Hz, H□), 7.61 (m, 1H, H6'), 7.65 (d, 2H, $J = 8.0$ Hz, H2, H6), 7.86 (d, 1H, $J = 16.0$ Hz, H□), 7.90 (d, 1H, $J = 8.0$ Hz, H8'), 7.94 (d, 1H, $J = 8.0$ Hz, H3'), 8.00 (d, 1H, $J = 8.0$ Hz, H4'), 8.10 (dd, 1H, $J = 8.0/0.9$ Hz, H5'), 8.54 (s, 1H, H1'). ¹³C NMR (CDCl₃) □ 14.07 (CH₃), 19.46 (-CH₂-CH₃), 31.44 (-CH₂-CH₂-CH₃), 68.12 (-O-CH₂-CH₂-CH₂-CH₃), 115.16 (C3, C5), 119.82 (C3'), 124.80 (C□), 126.94 (C7'), 127.67 (C1), 128.04 (C5'), 128.47 (C4'), 128.71 (C6'), 129.72 (C1'), 129.93 (C8'), 130.52 (C2, C6), 132.82 (C4a'), 135.62 (C2'), 136.11 (C8a'), 145.03 (C□), 161.58 (C4), 190.62 (C=O). IR □_{max}/cm⁻¹ 1653 (C=O), 1592 (C=C), 1249, 1018 (C-O), 3053, 2933, 2869, 1564, 1505, 1464, 1357, 1288, 1170, 1120, 970, 811, 753, 572, 518, 473 (Ar) (KBr). Anal. Calcd for C₂₃H₂₂O₂: C 83.60, H 6.71. Found: C 82.91, H 6.88. Yield: 95%.

R25 - (2E)-1-(2'-naphthyl)-3-(2-fluorophenyl)-2-propen-1-one.

Yellow solid, m.p. 69-70°C; ¹H NMR (CDCl₃) □ 7.16 (m, 1H, H5), 7.23 (t, 1H, $J = 8.0$ Hz, H3), 7.40 (m, 1H, H4), 7.58 (m, 1H, H7'), 7.63 (m, 1H, H6'), 7.71 (t, 1H, $J = 8.0$ Hz, H6), 7.82 (d, 1H, $J = 16.0$ Hz, H□), 7.91 (d, 1H, $J = 8.0$ Hz, H8'), 7.95 (d, 1H, $J = 8.0$ Hz, H3'), 7.98 (d, 1H, $J = 16.0$ Hz, H□), 8.01 (d, 1H, $J = 8.0$ Hz, H4'), 8.12 (dd, 1H, $J = 8.0/1.0$ Hz, H5'), 8.55 (s, 1H, H1'). ¹³C NMR (CDCl₃) □ 116.46 (C3), 124.71 (C3', C□), 124.82 (C1), 124.89 (C5), 127.05 (C7'), 128.07 (C5'), 128.71 (C6), 128.86 (C4'), 129.82 (C6'), 130.11 (C1'), 130.34 (C8'), 132.04 (C4), 132.78 (C4a'), 135.58 (C2'), 135.78 (C8a'), 137.71 (C□), 163.28 (C2), 190.49 (C=O). IR □_{max}/cm⁻¹ 1664 (C=O), 1608 (C=C), 1101 (C-F), 3064, 1576, 1483, 1455, 1367, 1323, 1286, 1230, 1182, 1133, 1049, 989, 820, 759, 574, 470 (Ar) (KBr). Anal. Calcd for C₁₉H₁₃FO: C 82.59, H 4.74. Found: C 83.01, H 4.55. Yield: 92%.

R44 - (2E)-1-(2'-naphthyl)-3-(2,4,6-trimethoxyphenyl)-2-propen-1-one.

Yellow solid, m.p. 153-154°C; ¹H NMR (CDCl₃) □ 3.88 (s, 3H, 4-OCH₃), 3.93 (s, 6H, 2,6-OCH₃), 6.17 (s, 2H, H3, H5), 7.54 (m, 1H, H7'), 7.59 (m, 1H, H6'), 7.89 (d, 1H, $J = 8.0$ Hz, H8'), 7.92 (d, 1H, $J = 8.0$ Hz, H3'), 7.99 (d, 1H, $J = 8.0$ Hz, H4'), 8.02 (d, 1H, $J = 16.0$ Hz, H□), 8.10 (dd, 1H, $J = 8.0/0.9$ Hz, H5'), 8.32 (d, 1H, $J = 16.0$ Hz, H□), 8.52 (s, 1H, H1'). ¹³C NMR (CDCl₃) □ 55.65 (4-OCH₃), 56.09 (2,6-OCH₃), 90.78 (C3, C5), 106.87 (C1), 122.47 (C3'), 125.14 (C□), 126.67 (C7'), 127.98 (C5'), 128.07 (C4'), 128.38 (C6'), 129.70 (C1'), 129.79 (C8'), 132.89 (C4a'), 135.42 (C2'), 136.32 (C□), 136.90 (C8a'), 161.97 (C2, C6), 163.36 (C4), 192.37 (C=O). IR □_{max}/cm⁻¹ 1640 (C=O), 1562

(C=C), 1212, 1017 (C-O), 2933, 2833, 1459, 1318, 1114, 940, 811, 748, 512, 464 (Ar) (KBr). Anal. Calcd for C₂₂H₂₀O₄: C 75.84, H 5.79. Found: C 75.02, H 6.02. Yield: 93%.

R45 - (2E)-1-(2'-naphthyl)-3-(3-methoxy-4-benzyoxyphenyl)-2-propen-1-one. Light yellow solid, m.p. 80-81°C; ¹H NMR (CDCl₃) δ 3.99 (s, 3H, OCH₃), 5.24 (s, 2H, CH₂), 6.94 (d, 1H, *J* = 8.0 Hz, H₅), 7.24 (s, 1H, H₂), 7.34 (d, 1H, *J* = 8.0 Hz, H₆), 7.40 (m, 3H, H_{3''}, H_{4''}, H_{5''}), 7.46 (m, 2H, H_{2''}, H_{6''}), 7.55 (d, 1H, *J* = 16.0 Hz, H \square), 7.58 (m, 1H, H_{7'}), 7.62 (m, 1H, H_{6'}), 7.82 (d, 1H, *J* = 16.0 Hz, H \square), 7.91 (d, 1H, *J* = 8.0 Hz, H_{8'}), 7.95 (d, 1H, *J* = 8.0 Hz, H_{3'}), 8.01 (d, 1H, *J* = 8.0 Hz, H_{4'}), 8.10 (dd, 1H, *J* = 8.0/1.0 Hz, H_{5'}), 8.54 (s, 1H, H_{1'}). ¹³C NMR (CDCl₃) δ 56.38 (OCH₃), 71.10 (-OCH₂-), 111.08 (C₂), 113.72 (C₅), 120.46 (C₆), 123.14 (C_{3'}), 124.79 (C \square), 126.98 (C_{7'}), 127.38 (C₁), 127.45 (C_{2''}, C_{6''}), 128.06 (C_{5'}), 128.29 (C_{4''}), 128.51 (C_{4'}), 128.75 (C_{6'}), 128.90 (C_{3''}, C_{5''}), 129.70 (C_{1'}), 129.96 (C_{8'}), 135.63 (C_{4a'}), 136.04 (C_{2'}), 136.75 (C_{8a'}), 145.22 (C \square), 150.03 (C_{1''}), 150.81 (C₃, C₄), 190.67 (C=O). IR $\delta_{\text{max}}/\text{cm}^{-1}$ 1656 (C=O), 1597 (C=C), 1260, 1020 (C-O), 3056, 2936, 1506, 1461, 1418, 1350, 1306, 1182, 1140, 993, 808, 746, 695, 552, 466 (Ar) (KBr). Anal. Calcd for C₂₇H₂₂O₃: C 82.21, H 5.62. Found: C 82.54, H 5.78. Yield: 63%.

4.4. Cell Culture. Murine L1210 lymphoblastic leukemia cells were obtained from American Type Culture Cell (ATCC). The cells were cultured in DMEM supplemented with 10% heat-inactivated fetal bovine serum, penicillin 100 U/mL, streptomycin 100 $\mu\text{g}/\text{mL}$ and HEPES 10 mM. The cell culture was maintained at 37°C in a 5% CO₂ humidified atmosphere and pH 7.4. Every 2-3 days, cells were passaged by removing 90% of the supernatant and replacing it with fresh medium. In all experiments, viable cells were checked in the beginning of experiment by Trypan Blue exclusion.

4.5. Cytotoxicity. The cytotoxicity of the chalconas was evaluated by MTT assay.⁴⁴ To evaluate the influence of concentration in cytotoxicity, 1 x 10⁵ and 5 x 10⁴ cells/well were incubated respectively for 24 and 48 h in triplicate with the compounds (solubilized in DMSO no more than 1%), and at different concentrations (1 - 100 μM) in microplates 96-well. To evaluate the time incubation influence in the cytotoxicity, 1 x 10⁵ cells/well were incubated with chalcones (at concentration of the IC₅₀ for each compound) by 2, 4, 6, 15, 20 and 24 h. To evaluate the cytotoxicity of chalcones associated to catalase, 1 x

10^5 cells/well were incubated for 24 h with different concentrations (1 - 100 μM) of the compounds and plus CAT (5000 U/mL), SOD (250U/mL) and TR (200 μM) a water-soluble vitamin E derivative. A control with the same additions without the chalcones run in parallel; the cell viability remained without alterations. After the incubation time at 37°C, the cells were washed with new culture medium and 10 μL of MTT (5mg/mL) were added followed by 2h of incubation at 37°C. The precipitated formazan was dissolved in 100 μL of DMSO and the absorbance was measured at 540 nm using microwell system reader. The IC_{50} value (a concentration that produces 50% reduction in of the viable cell number) was calculated through Hill concentration-response curve. The cell viability was checked in the beginning of the experiment by Trypan Blue exclusion. The chalcones were dissolved in DMSO and in all experiments a control curve without chalcones and in the presence of the cells and the solvent were carried out in parallel. The controls with solvent did not show statistical differences from the control cells alone.

4.6. Analysis of DNA Fragmentation. The isolation of apoptotic DNA fragments was based on the method of Han.⁴⁵ For that, 3×10^6 L1210 cells were treated with the compounds for 24 h (at concentration of the IC_{50} for each compound). The cells were then washed with cold PBS and incubated with lyses buffer (10 mM EDTA, 50 mM Tris-HCl pH 8.0, 0.25% NP-40, 0.5 g/L proteinase K) at 50 °C for 2 h. The DNA was then precipitated with 2.5 vol of ethanol at 25 °C overnight and dried in air. After washing with ice-cold 70% ethanol, the pellets were dissolved in TE buffer containing 10 mM Tris-HCl pH 8.0, 1 mM EDTA, and 0.6 g/mL RNase A and further incubated at 37 °C for 1hour. Horizontal electrophoresis was performed at 150V in 1.0% agarose gel with TAE (Tris-acetic acid and EDTA) as the running buffer. The gel was stained with ethidium bromide and visualized by 2UV Transilluminator (MacroVue UV-20 Hoefer) for ladder formation.

4.7. Determination of Caspase-3 Activity. To determine the activity of caspase-3, 3×10^6 cells L1210 were incubated with the compounds for 2 and 4 h (at concentration of the IC_{50} for each compound), at 37°C. The cells were then washed with PBS and lysed in 75 μL of lyses buffer containing 10 mM HEPES pH 7.4, 42 mM KCl, 5 mM MgCl_2 , 1 mM phenylmethylsulfonyl fluoride (PMSF), 0.1 mM EDTA, 0.1 mM EGTA, 1 $\mu\text{g/mL}$ pepstatin A, 1 $\mu\text{g/mL}$ leupeptin, 5 $\mu\text{g/mL}$ aprotinin, 0.5% 3-[(3- cholamidopropyl)-dimethyl-ammonio]-1-

propanesulfonate (CHAPS), and 1 mM dithiothreitol (DTT) at 4-8 °C for 5 min. The extract (50 µg of protein) was then added to a buffer containing 25 mM HEPES pH 7.4, 0.1% CHAPS, 1 mM EDTA, 10% sucrose, and 3 mM DTT. The reaction medium was supplemented with 10 µM Ac-DEVD-AMC caspase-3 substrate (Acetyl-Asp-Glu-Val-Asp-amino-methylcoumarin), a fluorogenic substrate for caspase-3. After incubation at 37 °C for 2 h, caspase activity (production of fluorescent AMC) was monitored using a spectrofluorimeter (Perkin Elmes LS55) measuring the extinction at 380 nm and emission at 465 nm. The fluorescence of blanks containing no cellular extracts was subtracted from the fluorescence sample values.⁴⁶ Protein content was determined by Lowry's method⁴⁷ and caspase-3 activity was expressed as a change in fluorescent units per hour per µg of protein.

4.8. Free Radical Determination. Intracellular free radical formation was determined using 2',7'- dichlorofluorescein diacetate (DCFH-DA), which is oxidized to dichlorofluorescein (DCF) in the presence of ROS.⁴⁸ 5×10^5 L1210 cells were incubated with the compounds (at concentration of the IC₅₀ for each compound) in the absence or presence of 5000 U/mL of catalase for 4 h at 37 °C. The cells were then incubated with 10 µM DCFH-DA for 30 min at 37 °C, and then washed four times with PBS. The DCF fluorescence signal was measured using a Perkin-Elmer LS55 spectrofluorimeter. The results were normalized by cell death percentage that occurs in this incubation time.

4.9. Preparation of Homogenates. Cell homogenates were done to carry out the lipid peroxidation, glutathione and enzyme assays. For enzyme assays 6×10^6 cells were used, for glutathione and lipid peroxidation measurements 3×10^6 cells and 4×10^6 cells were used respectively. These cells were treated with the compounds at concentration which corresponds to IC₅₀ for each one for 24 h. The samples were washed twice with PBS and lysed with 20 mM phosphate buffer at pH 7.4, 150 mM NaCl and 1% Triton X-100, sonified for 20 seconds and then centrifuged at 10000 rpm for 10 min. The supernatants (homogenates) of each sample were maintained at -20 °C.

4.10. Lipid Peroxidation Measurements. Changes in lipid peroxide levels were determined through the substances that react with tiobarbituric acid (TBARS), mainly malondialdehyde (MDA), producing a Schiff base pink colored.⁴⁹ For that, the homogenate (400 µg

of protein) was incubated in a buffer containing 60 mM Tris-HCl (pH 7.4) and 0.1 mM of DPTA, 500 μ L of 12% TCA and 0.73% TBA under agitation. The mixture were boiled for 2 h, cooled on ice and centrifuged at 10000 rpm for 5 min. The absorbance of the supernatant was measured at 535 nm. The results were calculated using the molar extinction coefficient for malondialdehyde and expressed in nanomols of TBARS per microgram of protein. Protein content was determined by Lowry's method.⁴⁷

4.11. Mitochondrial Potential Measurement. To explore the effect of chalcones on the mitochondrial membrane potential the lipophilic cationic probe fluorochole 5,58,6,68-tetraethylbenzimidazolcarbocyanine iodide (JC-1) were used. JC-1 is a green fluorescent monomer at depolarized membrane potential or a red fluorescent J-aggregate at hyperpolarized membrane potential. Cells were plated at 5×10^5 cells/well in 24-well dishes and treated with the chalcones for 4h. After that, JC-1 (10 μ g/mL) was added and incubated for 20 min at 37°C (5% CO₂), the cells were then washed twice with PBS, resuspended in 500 μ L of PBS and 100 μ L was used to measure the fluorescence using a spectrofluorimeter (Perkin Elmes LS55). JC-1 was excited at 488 nm, the red emission fluorescence was detected at 590 nm and the green fluorescence was detected at 527 nm. The mitochondrial potential was presented as a ratio of 590/527 and compared with the control cells that were considered 100%. An electron transport chain uncoupler (FCCP 1 μ M) was used as a positive control.

4.12. Enzyme Assays. Glutathione Peroxidase (GPx) was assayed according to Flohé and Gunzler⁵⁰ using of the cell homogenate and the NADPH oxidation was determined by its absorbance decrease at 340 nm ($\epsilon = 6220 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$). Catalase was determined according to Aebi⁵¹ using 60 μ g of protein. In this assay the disappearance of H₂O₂ was evaluated measuring the decrease in absorbance at 240 nm (molar extinction coefficient: $\epsilon = 40 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$). Glutathione reductase was assayed according Carlberg and Mannervick⁵² and the NADPH oxidation, result of GSSG reduction by GR, was determined by its absorbance decrease at 340 nm ($\epsilon = 6220 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$) using 150 μ g of protein. Glutathione S-transferase was assayed according to Keen *et al.*⁵³ using 60 μ g of protein. In this assay, the GST induces the conjugation of GSH with CDNB. The conjugate was detected spectrophotometrically at 340 nm. The results were normalized by protein concentration and expressed in percentage of enzyme activity.

4.13. Glutathione Measurement. Total glutathione (GSH + GSSG) was measured using the glutathione reductase method.⁵⁴ In this assay, homogenate (50 μg of protein) was transferred to a 96-well plate subsequently followed by the addition of a solution containing 75 μM 5,5'-dithio-bis-2-nitrobenzoic acid (DTNB), 120 μM NADPH, 4U/mL glutathione reductase (GR) and 10 mM EDTA in 200 mM phosphate buffer at pH 8.0. The absorbance was measured at 405 nm using a microwell systems reader. The concentrations of total glutathione (TG) and GSH were calculated using GSH as a standard and were normalized by protein concentration. The content of GSSG was calculated as follow: $\text{GSSG} = (\text{TG} - \text{GSH})/2$. GSSG is equivalent to 2 GSH according to the following reaction: $\text{GSSG} + \text{NADPH} + \text{H}^+ \rightarrow 2 \text{GSH} + \text{NADP}^+$ in the presence of GR. The results were expressed in percentage.

4.14. ATP Measurement. The content of intracellular ATP present in the cells was determined by a bioluminescence assay measuring the light output from the luciferin-luciferase reaction. To begin, 1×10^6 L1210 cells were treated with of the compounds for 24 h. The cell extracts were obtained by homogenization with 1.25% trichloroacetic acid, then kept on ice for 30 min and neutralized with 1 M Tris-acetate at pH 7.5. After centrifugation, the supernatants were used for ATP quantification following the manufacturer's protocol. The results were normalized by cell death percentage that occurs in this incubation time.

4.15. Statistical Analysis. The results were presented as means \pm SD of triplicates from three-independent experiments. Statistical significance was assessed by ANOVA followed by Bonferroni's test, and $p < 0.05$ was taken as statistically significant.

Acknowledgements

This study was supported by grants from CNPq (Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico), CAPES (Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior) and FAPESC (Fundação de Amparo à Pesquisa de Santa Catarina). This paper forms part of the doctoral studies of Louise D. Chiaradia who synthesize the compounds and master studies of Evelyn Winter on the Chemistry and Pharmacy post-graduation courses, respectively. The group wishes to thank the Hospital Universitário (HU) for the use of

their facilities and for Central de Análises (Departamento de Química, UFSC) for chemical analyses.

References and notes

1. Onciu, M. *Hematol Oncol Clin N Am.* **2009**, *23*, 655.
2. Pui, C. H.; Evans, W. E. *New Engl J Med.* **2006**, *354*, 166.
3. Hoelzer, D.; Gokbuget, N. *Rev Clin Oncol Hematol.* **2000**, *36*, 49.
4. Nicholson, D. W. *Nature.* **2000**, *407*, 810.
5. Tsiftoglou, A. S.; Pappas, I. S.; Vizirianakis, I. S. *Pharmacol Ther.* **2003**, *100*, 257.
6. Lash, L. H. *Chem Biol Interact.* **2006**, *163*, 54.
7. Saraste, A.; Pulkki, K. *Cardiovasc Res.* **2000**, *45*, 528.
8. Dias, N.; Bailly, C. *Biochem Pharmacol.* **2005**, *70*, 1-12.
9. Riedl, S. J.; Shi, Y. *Nature.* **2004**, *5*, 897.
10. Schafer, F. Q.; Buettner, G. R. *Free Radic Biol Med.* **2001**, *30*, 1191.
11. Pelicano, H.; Carney, D.; Huang, P. *Drug Resist Updat.* **2004**, *7*, 97.
12. a) Shin, S.W.; Seo, C.Y.; Han, H.; Han, J.Y.; Jeong, J.S.; Kwak, J.Y.; Park, J.I. *Clin Cancer Res.* **2009**, *15*, 5414. b) Moon, D. O.; Kim, M. O.; Lee, J. D.; Choi, Y. H.; Kim, G. Y. *Cancer Lett.* **2010**, *288*, 183.
13. Dimmock, J. R.; Elias, D. W.; Beazely, M. A.; Kandepu, N. M. *Curr Med Chem.* **1999**, *6*(12), 1125.
14. Ni, L.; Meng, C. Q.; Sikorski, J. A. *Exp Opin Ther Patents.* **2004**, *14*(12), 1669.
15. Nowakowska, Z. *Eur J Med Chem.* **2007**, *42*, 125.
16. Kachadourian, R.; Day, B.J. *Free Radic Biol Med.* **2006**, *41*, 65.
17. Navarini, A. L. F.; Chiaradia, L. D.; Mascarello, A.; Fritzen, M.; Nunes, R. J.; Yunes, R. A.; Creczynski-Pasa, T.B. *Eur J Med Chem.* **2008**, *44*, 1630.
18. Chiaradia, L. D.; dos Santos, R.; Vitor, C. E.; Vieira, A. A.; Leal, P. C.; Nunes, R. J.; Calixto, J. B.; Yunes, R. A. *Bioorg Med Chem.* **2008**, *16*, 658.
19. Tsai, S.; Klinmam, J. P. *Bioorg Chem.* **2003**, *31*, 172.
20. Nam, N. H.; Kim, Y.; You, Y. J.; Hong, D. H.; Kim, H. M.; Ahn, B. Z. *Eur J Med Chem.* **2003**, *38*, 179.
21. Zhang, G.; Wu, H.; Zhu, B.; Shimoishi, Y.; Nakamura, Y.; Murata, Y. *Biosci Biotechnol Biochem.* **2008**, *72*, 2966.
22. Nakatani, N.; Ichimaru, M.; Moriyasu, M.; Kato, A. *Biol Pharm Bull.* **2005**, *28*, 83.

23. Li, N.; Ragheb, K.; Lawler, G.; Sturgir, J.; Rajwa, B.; Melendez, J.A.; Robinson, J.P. *J Biol Chem.* **2003**, 278, 8516.
24. Jing, Y.; Dai, J.; Chalmers-Redman, R. M.; Tatton, W. G.; Waxman, S. *Blood* **1999**, 94, 2102.
25. Shin, S. W.; Seo, C. Y.; Han, H.; Han, J. Y.; Jeong, J. S.; Kwak, J. Y.; Park, J. I. *Clin Cancer Res.* **2009**, 15, 5414.
26. Sastre, J.; Pallardo, F. V.; Vina, J. *IUBMB Life.* **2000**, 49, 427.
27. Moreno-Sánchez, R.; Rodríguez-Enríquez, S.; Marín-Hernández, A.; Saavedra, E. *FEBS J.* **2007**, 274, 1393.
28. Sabzevari, O.; Galati, G.; Moridani, M. Y.; Siraki, A.; O'Brien, P. J. *Chem Biol Interact.* **2004**, 148, 57.
29. Skulachev, V. P. *Apoptosis.* **2006**, 11, 473.
30. Cao, J.; Jia, L.; Zhou, H. M.; Liu, Y.; Zhong, L. F. *Toxicol Sci* **2006**, 91, 476.
31. Nordberg, J.; Arnér, E. S. J. *Free Radic Biol Med.* **2001**, 31, 1287.
32. Townsend, D. M.; Tew, K. D. *Oncogene.* **2003**, 22, 7369.
33. Mallis, R. J.; Buss, J. E.; Thomas, J. A. *Biochem J.* **2001**, 355, 145.
34. Wang, W.; Ballatori, N. *Pharmacol Rev.* **1998**, 50, 335.
35. Herr, I.; Debatin, K. M. *Blood.* **2001**, 98, 2603.
36. Misra, S. S.; Dinkar. *J Ind Chem Soc.* **1975**, 52(6), 556.
37. Rateb, N. M.; Zohdi, H. F. *Synthetic Comm.* **2009**, 39(15), 2789.
38. a) Bowen, P. J.; Robinson, T. P.; Ehlers, T.; Goldsmith, D.; Arbiser, J. U. S. Patent *WO 2001046110*, **2001**. 90 p. b) Robinson, T. P.; Hubbard, R. B.; Ehlers, T. J.; Arbiser, J. L.; Goldsmith, D. J.; Bowen, J. P. *Bioorg Med Chem.* **2005**, 13(12), 4007.
39. Deshpande, A. M.; Argade, N. P.; Natu, A. A.; Eckman, J. *Bioorg Med Chem.* **1999**, 7(6), 1237.
40. Thirunarayanan, G. *Acta Ciencia Indica Chem.* **2003**, 29(3), 147.
41. Sanchez-Viesca, F. *Ciencia.* **1973**, 27(2-3), 75.
42. Patel, H. S.; Patel, V. K.; Dixit, B. C. *Org J Chem*, **2001**, 17(3), 411.
43. Borchhardt, D. M.; Mascarello, A.; Chiaradia, L. D.; Nunes, R. J.; Oliva, G.; Yunes, R. A.; Andricopulo, A. D. *J Braz Chem Soc.* **2010**, 1, 142.
44. Mosmann, T. *J Immunol Methods.* **1983**, 65, 55.
45. Han, R. In: Research and Development of Anticancer Drugs and Experimental Techniques. Pekin Medical University, Pekin Union Medical College Joint Publishing House: Beijing, **1997**; pp. 395.

46. Zuse, A.; Prinz, H.; Müller, K.; Schmidt, P.; Günther, E.G.; Schweizer, F.; Prehn, J.H.M.; Los, M. *Euro J Med Chem.* **2007**, 575, 34.
47. Lowry, O. H.; Rosebrough, N. J.; Farr, A. L.; Randall, R. J. *J Biol Chem.* **1951**, 193, 265.
48. Sauer, H.; Wefer, K.; Vetrugno, V.; Pocchiari, M.; Gissel, C.; Sachinidis, A.; Hescheler, J.; Wartenberg, M. *Free Radic Biol Med.* **2003**, 35, 586.
49. Bird, R. D.; Draper, A. H. *Methods Enzymol.* **1984**, 90, 105.
50. Flohé, L.; Gunzler, W. A. *Methods Enzymol.* **1984**, 105, 114.
51. Aebi, H. *Methods Enzymol.* **1984**, 105, 121.
52. Carlberg, I.; Mannervik, B. *J Biol Chem.* **1975**, 250, 5475.
53. Keen, J. B.; Habig, W. H.; Jakoby, W. B. *J Biol Chem.* **1976**, 251, 6183.
54. Tietze, F. *Anal Biochem.* **1969**, 27, 502.