



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

**AVALIAÇÃO DO EFEITO DE CHALCONAS SOBRE A LINHAGEM CELULAR
B16-F10 DE MELANOMA**

ANDRÉIA LILIAN FORMENTO NAVARINI

Florianópolis - SC, DEZEMBRO, 2007.

ANDRÉIA LILIAN FORMENTO NAVARINI

**AVALIAÇÃO DO EFEITO DE CHALCONAS SOBRE A LINHAGEM CELULAR
B16-F10 DE MELANOMA**

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

Orientadora: Prof.^a Dr.^a Tânia Beatriz
Creczynski Pasa

Florianópolis - SC, DEZEMBRO 2007.

Andréia Lílian Formento Navarini

**AVALIAÇÃO DO EFEITO DE CHALCONAS SOBRE A LINHAGEM CELULAR
B16-F10 DE MELANOMA**

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

Florianópolis-SC, 17 de dezembro de 2007.

Prof. Dr. Marcos Antônio Segatto Silva
Coordenador do Programa

BANCA EXAMINADORA:

Prof.^a Dr.^a Tânia B. Creczynski Pasa
Orientadora

Prof.^a Dr.^a Cidônia Lourdes Vituri
(ACL - UFSC)

Prof.^a Dr.^o Márcio Alvarez da Silva
(ACL - UFSC)

Prof.^a Dr.^a Maíke Weber Biavati
(UNIVALI)

AGRADECIMENTOS

Quando nos propomos a realizar algo, levamos em consideração uma série de elementos essenciais para a obtenção do êxito. Além da nossa disponibilidade, dedicação e determinação em atingir as metas propostas, o principal fator considerado é o universo familiar, de amigos e de colaboradores, com quem contamos estar lado a lado, até o fim da missão, numa intensa relação fraternal e de trabalho, sem a qual não sairíamos da fase embrionária, padeceríamos pelo caminho.

Palavras são palavras e nada mais. Pudera eu retribuir individualmente às pessoas que estiveram comigo durante essa caminhada, sem as quais eu não teria alcançado o meu objetivo. A vocês é que dedico os mais sinceros agradecimentos:

A Deus pela serenidade e discernimento nas horas de dúvida, que cuidou de mim, que iluminou o meu caminho;

Ao meu marido Neivo pelo amor, apoio, compreensão, paciência e colaboração na realização deste trabalho;

À minha filha Izabella, em quem me inspiro, por ter compreendido e entendido o porquê de às vezes não termos ficado mais tempo juntas;

Aos meus pais e irmãs pelo estímulo e compreensão, minha gratidão;

À prof.^a Tânia Beatriz Creczynski Pasa pela amizade sincera, companheirismo, engajamento incondicional e pela impecável orientação que resultou em relevante aprendizado, que me acompanhará e me guiará pelos tempos;

À Prof.^a Maria Cláudia por todos os ensinamentos, especialmente na fase de aprendizado de cultura celular, e por disponibilizar a estrutura de seu laboratório.

Aos laboratórios de pesquisa do Hospital Universitário (HU) e aos bioquímicos por disponibilizarem equipamentos utilizados na pesquisa, em especial à professora Maria Luíza Bazzo pela atenção e disponibilidade;

Às bioquímicas do laboratório de hematologia, Samira, Marlene e Nicéia, pelo apoio prestado;

Às colegas do laboratório de pesquisa do HU, Marley, Aline Costa, Aline Bonetti, Flávia e Fernanda, pelo apoio e companheirismo;

Aos colegas do laboratório de bioenergética e bioquímica de macromoléculas, Vânia Lima, Vânia Noldin, Márcio, Ana, Betina, Francisco, Juliana, Maurícia, Andrea, Evelyn, Clarissa, Melina e Tiago, pelo companheirismo e troca de experiências;

Ao Prof. Rosendo A. Yunes e suas alunas Louise e Alessandra pela síntese das chalconas utilizadas neste trabalho, pela constante dedicação e disponibilidade;

À Claudriana pelo apoio incondicional em todas as etapas do meu mestrado, mostrando-se companheira, amiga, estando sempre disponível em ajudar e ensinar;

À Syntia pela disposição em repassar seus conhecimentos, pela amizade e apoio;

À Mirela por ter-me dado inúmeras orientações, principalmente no início dos meus trabalhos;

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;

A CAPES e ao CNPq pelo suporte financeiro;

A todos os que de uma forma ou de outra contribuíram para que eu alcançasse este objetivo, expresso os meus mais sinceros agradecimentos.

O homem, esse curioso, não se satisfaz com o conhecimento do meio em que se agita.

Impelido por uma curiosidade instintiva, contempla, perscruta, ausculta, esvurma e punciona o abismo hiante que o insula na mesquinhez de sua pequenina morada perdida na imensidão do universo, procurando com ânimo sempre renovado conhecer a verdade incognoscível e inatingível que se oculta além, esfumando-se no éter qual miragem fugidia.

Tudo em vão! Embora aumente dia-a-dia a superfície da pequenina ilha do seu conhecimento, o homem verifica atônito que ela nada representa no oceano imensurável do desconhecido.

Nelson de Sampaio Mitke

RESUMO

Chalconas são compostos intermediários essenciais para a biossíntese dos flavonóides em plantas. Têm demonstrado uma grande variedade de efeitos farmacológicos, como: atividade antibacteriana, antiinflamatória, antiviral, antitumoral, entre outros. Em vista disso, o objetivo deste trabalho foi estudar a atividade antitumoral das chalconas derivadas quimicamente do 3,4-metilenodioxibenzaldeído e da 2,4,6-trimetoxiacetofenona e a das chalconas hidroxiladas, em células murinas de melanoma B16-F10. Foi analisada a viabilidade celular em células tumorais e em células não-tumorais (Vero), bem como o mecanismo de morte celular. Observou-se que as chalconas derivadas do 3,4-metilenodioxibenzaldeído 3-(1,3-benzodioxol-5-il)-1-fenil-2-propen-1-ona (1), 3-(3-metoxifenil-1-fenil)-2-propen-1-ona (2) e 3-(1,3-benzodioxol-5-il)-1-(3'-metoxi-4-hidroxil-fenil)-2-propen-1-ona (7) reduziram a quantidade de células viáveis em 47%, 78% e 57%, respectivamente, e mostraram menor efeito tóxico para as células Vero em 32%, 54% e 48%, respectivamente. Porém, induziram a morte celular por necrose. Dentre as chalconas derivadas da 2,4,6-trimetoxiacetofenona, os compostos 3-(3-nitro-fenil)-1-(2',4',6'-trimetoxi-fenil)-2-propen-1-ona (1), 3-(3,4-dicloro-fenil)-1-(2',4',6'-trimetoxi-fenil)-2-propen-1-ona (2) e 3-(2-cloro-fenil)-1-(2',4',6'-trimetoxi-fenil)-2-propen-1-ona (9) reduziram o número de células viáveis em 82%, 90% e 75%, respectivamente e induziram a fragmentação do DNA. Todavia, quando testadas nas células Vero, diminuíram significativamente a viabilidade celular em 72%, 77% e 64%. Enquanto que as hidroxichalconas 3-(1-naftalenil)-1-(3'-hidroxifenil)-2-propen-1-ona (1), 3-(1-naftalenil)-1-(2'-hidroxifenil)-2-propen-1-ona (3) e 2-carboxi-3'-bromo-2'-hidroxil-4',6'-dimetoxichalcona (13) reduziram a viabilidade celular da B16-F10, em 98%, 75% e 50%, e da célula Vero, em 83%, 39% e 30%, respectivamente, quando comparadas com o grupo controle. Apenas as hidroxichalconas (1) e (3) induziram a fragmentação do DNA, quando testadas nas IC_{50} , 57 μ M e 63 μ M, respectivamente, em 24h. A hidroxichalcona 1 mostrou o menor valor de IC_{50} em 24 e em 72 horas, nas concentrações de 57 μ M e 12 μ M, respectivamente. A hidroxichalcona 3 apresentou o menor valor de IC_{50} em 48h, 28 μ M. Através de ensaios com análogos metoxilados, no anel A, pode-se sugerir que os grupos hidroxilas, presentes somente neste anel, sejam responsáveis pela citotoxicidade dos compostos 1 e 3. Além disso, foi avaliado o potencial pró-oxidante, a concentração citosólica de glutatona total (GSH), a concentração mitocondrial de glutatona total, a concentração intracelular de ATP e a habilidade das chalconas hidroxiladas 1, 3 e 13 em inibir a adesão celular. A depleção de GSH citosólica mostrou-se proporcional à produção de espécies reativas de oxigênio pelos compostos 1, 3 e 13. Entretanto, a depleção da GSH mitocondrial pode ser consequência da disfunção mitocondrial, sugerindo que os compostos 1 e 3, que induzem morte celular por apoptose, podem interferir no potencial de membrana mitocondrial e na síntese do ATP. Considerando também a habilidade das hidroxichalconas 1 e 3 para inibir a adesão celular, essas chalconas hidroxiladas, potencialmente antimetastáticas, são promissoras para a continuidade de futuras investigações.

ABSTRACT

Chalcones are essential intermediate compounds in the flavonoid biosynthesis. They display a wide variety of pharmacological effects, including antibacterial, anti-inflammatory, antiviral, antitumor, besides others. The objective of this work was study the antitumoral activity of chalcones chemically derived from 3,4-methylenedioxybenzaldehyde, from 2,4,6-trimethoxyacetophenone and of hydroxychalcones in murine B16-F10 melanoma cells. It was analyzed the cellular viability in tumoral and non tumoral cells (Vero) as well as the mechanism of cell death. We observed that the chalcones derivative of 3,4-methylenedioxybenzaldehyde: 3-(1,3-benzodioxol-5-yl)-1-phenyl-2-propen-1-one (1); 3-(3-methoxyphenyl)-1-phenyl-2-propen-1-one (2) and 3-(1,3-benzodioxol-5-yl)-1-(3'-methoxy-4-hydroxy-phenyl)-2-propen-1-one (7) reduced the number of viable cells in 48%, 78% and 57%, respectively and showed smaller toxicity to Vero cells 33%, 54% and 48% respectively, when compared with the control. However, they induced cell death by necrosis. Among the chalcones derivative of 2,4,6-trimethoxyacetophenone the compounds 3-(3-nitro-phenyl)-1-(2',4',6'-trimethoxy-phenyl)-2-propen-1-one (1); 3-(3,4-dicloro-phenyl)-1-(2',4',6'-trimethoxy-phenyl)-2-propen-1-one (2) and 3-(2-cloro-phenyl)-1-(2',4',6'-trimethoxy-phenyl)-2-propen-1-one (9) decreased the number of viable cells in 82%, 90% and 75%, respectively, when compared with the control and induced DNA fragmentation. However, when tested in Vero cells they reduced significantly the cell viability in 72 %, 77% e 64%. While the hydroxychalcones -3-(1-naphtalenyl)-1-(3'-hydroxy-phenyl)-2-propen-1-one (1); -3-(1-naphtalenyl)-1-(2'-hydroxy-phenyl)-2-propen-1-one were analyzed (3) and 2-carboxy-3'-bromo-2'-hydroxy-4',6'-dimethoxychalcone (13) reduced the cell viability B16-F10 line in 98%, 75% and 50% and of Vero cells in 82%, 39% and 30%, respectively, when compared with the control. Only the hydroxychalcones (1) and (3) induced the DNA fragmentation in IC_{50} 57 μ M and 63 μ M, respectively, in 24h. The compound 1 showed smaller IC_{50} value in 24h e 72h, 57 μ M and 12 μ M respectively. The hydroxychalcone 3 showed the smallest IC_{50} value in 48h, 28 μ M. We suggest that the hydroxyl groups, present only in the A-ring, increased the cytotoxicity of compounds 1 and 3, while the presence of others substituents on the A-ring decreased the cytotoxic effect of compound 13. Besides, it was evaluated the pro-oxidant potential, cytosolic glutathione cellular concentration; mitochondrial glutathione concentration, intracellular ATP concentration and the ability of hidroxichalcones 1, 3 e 13 inhibiting the cell adhesion. Cytosolic GSH depletion was proportional to the production of reactive oxygen species induced by compounds 1, 3 e 13. However, mitochondrial GSH depletion can be a consequence of mitochondrial dysfunction, suggesting that the compounds 1 e 3 that induced apoptosis in B16-F10 may be interfering on mitochondrial membrane potential and consequently on ATP synthesis. Considering these properties and the ability of hydroxychalcones 1 e 3 inhibiting cell adhesion, these hydroxychalcones antimetastatic potentially, are prominence compound for further investigation.

SUMÁRIO

LISTA DE FIGURAS	8
LISTA DE TABELAS	10
LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS	11
1. INTRODUÇÃO	14
2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	19
2.1 Câncer de pele não-melanoma	20
2.2 Câncer de pele melanoma	21
2.3 Moléculas de adesão celular	25
2.4 Apoptose e necrose	27
2.5 Estresse oxidativo e glutationala	31
2.6 Metabolismo energético de células tumorais	35
2.7 Flavonóides e chalconas	37
3. OBJETIVOS	41
3.1 Objetivo geral	42
3.2 Objetivos específicos	42
4. MATERIAIS E MÉTODOS	44
4.1 Reagentes	45
4.2 Síntese das chalconas	45
4.3 Cultura de células	45
4.3.1 Tratamento das células	46
4.4 Ensaio de viabilidade celular (teste do MTT)	46
4.5 Análise de apoptose pelo método de fragmentação nuclear	47
4.6 Determinação da curva dependente de concentração	48
4.7 Determinação da citotoxicidade dos compostos na presença dos antioxidantes SOD e TROLOX®	48
4.8 Avaliação da produção de espécies reativas de oxigênio através de microscopia de fluorescência	49

4.9	Determinação da concentração de glutathiona total citosólica	49
4.10	Determinação da concentração de glutathiona total mitocondrial	50
4.11	Determinação da concentração de ATP, método luciferin-luciferase	50
4.12	Análise da inibição de adesão celular pelo método do cristal violeta	51
4.13	Análise estatística	51
4.14	Desenho experimental	52
5.	RESULTADOS E DISCUSSÃO	54
5.1	Síntese das chalconas	55
5.1.1	Chalconas derivadas do 3,4-metilenodioxibenzaldeído	55
5.1.2	Chalconas derivadas da 2,4,6-trimetoxiacetofenona	55
5.1.3	Chalconas hidroxiladas	56
5.2	Citototoxicidade das chalconas em células tumorais, células não-tumorais e análise do DNA	56
5.3	Atividade das hidroxichalconas dependente de concentração	67
5.4	Citotoxicidade das hidroxichalconas na presença de antioxidantes	69
5.5	Produção de espécies reativas de oxigênio pelas hidroxichalconas	73
5.6	Concentração de glutathiona total citosólica	75
5.7	Concentração de glutathiona total mitocondrial	77
5.8	Concentração de ATP	79
5.9	Adesão celular	82
6.	CONCLUSÕES	84
7.	PERSPECTIVAS	87
8.	REFERÊNCIAS	89
9.	ANEXOS	104
9.1	Trabalhos apresentados em congressos	105
9.2	Artigo a ser submetido na revista "European Journal of Medicinal Chemistry"	107

LISTA DE FIGURAS

Figura 1.	A - Carcinoma basocelular, B - Carcinoma epidermóide	20
Figura 2.	Melanoma maligno	21
Figura 3.	Mecanismos de morte celular: necrose e apoptose	27
Figura 4.	As duas principais vias apoptóticas	29
Figura 5.	Estrutura da glutatona	33
Figura 6.	Núcleo fundamental das chalconas	38
Figura 7.	Desenho experimental	53
Figura 8.	Reação da síntese das chalconas derivadas do 3,4-metilenodioxibenzaldeído	55
Figura 9.	Reação da síntese das chalconas derivadas da 2,4,6-trimetoxiacetofenona	55
Figura 10.	Reação da síntese das hidroxichalconas	56
Figura 11.	Efeito citotóxico das chalconas derivadas do 3,4-metilenodioxibenzaldeído em células B16-F10	57
Figura 12.	Efeito citotóxico das chalconas derivadas do 3,4-metilenodioxibenzaldeído em células Vero (não-tumorais)	58
Figura 13.	Necrose induzida por chalconas derivadas do 3,4-metilenodioxibenzaldeído em células B16-F10	60
Figura 14.	Efeito citotóxico das chalconas derivadas da 2,4,6-trimetoxiacetofenona em células B16-F10	60
Figura 15.	Fragmentação do DNA induzida por chalconas derivadas da 2,4,6-trimetoxiacetofenona em células B16-F10	61
Figura 16.	Efeito citotóxico das chalconas derivadas da 2,4,6-trimetoxiacetofenona em células Vero (não-tumorais)	62
Figura 17.	Efeito citotóxico das hidroxichalconas em células B16-F10	63
Figura 18.	Efeito citotóxico das hidroxichalconas em células Vero (não-tumorais)	64
Figura 19.	Fragmentação do DNA induzida por hidroxichalconas em células B16-F10	65
Figura 20.	Atividade das hidroxichalconas dependente de concentração em células B16-F10, em 24h	67

Figura 21.	Atividade das hidroxichalconas dependente de concentração em células B16-F10, em 48h	68
Figura 22.	Atividade das hidroxichalconas dependente de concentração em células B16-F10, em 72h	69
Figura 23.	A – Atividade da SOD dependente de concentração em células B16-F10 e B – Atividade das hidroxichalconas 1, 3 e 13 dependente de concentração, associadas à SOD em células B16-F10	70
Figura 24.	A - Atividade do TROLOX® dependente de concentração em células B16-F10 e B - Atividade das hidroxichalconas 1, 3 e 13 dependente de concentração, associadas ao TROLOX® em células B16-F10	72
Figura 25.	Avaliação da produção de espécies reativas de oxigênio pelas hidroxichalconas 1, 3 e 13, por microscopia de fluorescência	74
Figura 26.	A – Atividade das hidroxichalconas dependente de concentração em células B16-F10 e B – Efeito das hidroxichalconas na concentração de glutaciona total em células B16-F10	76
Figura 27.	A – Efeito das hidroxichalconas na concentração de glutaciona total em células B16-F10 e B – Efeito das hidroxichalconas na concentração de glutaciona total mitocondrial em células B16-F10	78
Figura 28.	A – Efeito das hidroxichalconas na concentração de ATP em células B16-F10 e B – Efeito das hidroxichalconas na concentração de glutaciona total mitocondrial em células B16-F10	80
Figura 29.	Viabilidade e adesão celular dependentes de concentração das hidroxichalconas nas células B16-F10	82

LISTA DE TABELAS

Tabela 1	Comparação da viabilidade das células B16-F10 e células Vero tratadas com chalconas derivadas do 3,4-metilenodioxibenzaldeído	58
Tabela 2	Comparação da viabilidade das células B16-F10 e células Vero tratadas com chalconas derivadas da 2,4,6-trimetoxiacetofenona	62
Tabela 3	Comparação da viabilidade das células B16-F10 e células VERO tratadas com hidroxichalconas	65
Tabela 4	Valores de IC ₅₀ das hidroxichalconas 1, 3 e 13, em 24, 48 e 72 horas de incubação, nas células de melanoma B16-F10	68
Tabela 5	Comparação das IC ₅₀ (hidroxichalconas e hidroxichalconas + SOD) em células B16-F10	71
Tabela 6	Comparação das IC ₅₀ (hidroxichalconas e hidroxichalconas + TROLOX®) em células B16-F10	73
Tabela 7	Comparação das concentrações de glutatona total citosólica (GSH) e glutatona total mitocondrial (GSHm), em células B16-F10	79

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

AIF	Fator indutor de apoptose
AMP	Adenosina monofosfato
APAF-1	Fator ativador de proteases – 1
ATP	Adenosina trifosfato
A431	Linhagem de células de carcinoma epidermóide humana
A549	Linhagem de células epiteliais pulmonares humanas
B16-F10	Linhagem de células de melanoma murino
B16-F4A5	Linhagem de células de melanoma murino
Bcl-2	Proteína anti-apoptótica
CAMs	Moléculas de adesão celular
CAT	Catalase
DMEM	Meio de cultura Eagle modificado por Dulbecco
DMSO	Dimetil sulfóxido
DNA	Ácido desoxirribonucléico
DQ	Dopaquinona
DTIC	Dacarbazina
DTNB	Ácido 5,5'-ditio-bis-2-nitrobenzóico
DCF	Diclorofluoresceína
DCFH-DA	Acetato de diclorofluoresceína
EDTA	Ácido etilenodiaminotetracético
EROs	Espécies Reativas de oxigênio
ERNs	Espécies Reativas de nitrogênio
FAAD	Proteína adaptadora associada à proteína Fas
Faz	Receptor de superfície celular
GPx	Glutathione Peroxidase
GR	Glutathione Redutase
GSH	Glutathione reduzida
GSHm	Glutathione mitocondrial
GSSG	Glutathione forma oxidada
GST	Glutathione S-transferase
HO ₂ [•]	Radical hidroperoxil

H ₂ O ₂	Peróxido de Hidrogênio
HCT-116	Linhagem de celular de câncer de cólon
HeLa	Linhagem de células de adenocarcinoma cervical
HEPES	Ácido N-[2-Hidroxietil]piperazina-N'-[2-etanosulfônico]
HL-60	Linhagem de células de leucemia humana
HT-29	Linhagem de células de adenocarcinoma de cólon
HUVEC	Linhagem de células endoteliais de cordão umbilical humano
IAP	Proteínas inibidoras de apoptose
IC ₅₀	Concentração que inibe 50% do crescimento celular
ICAM-1	Molécula de adesão intercelular-1
IFN- α	Interferon- α
IL-2	Interleucina-2
IL-3n	Interleucina-3
INCA	Instituto Nacional do cancer
K562	Linhagem de células de leucemia humana
LO ₂ [•]	Radical peroxil lipídico
MCF-7	Linhagem de células de adenocarcinoma mamário humano
MDR	Resistência a múltiplos fármacos
MRP	Proteína de resistência a múltiplos fármacos
DNAmt	DNA mitocondrial
NADPH	Nicotinamida adenina dinucleotídeo
O ₂ [•]	Radical ânion superóxido
[•] OH	Radical hidroxil
MTT	Brometo de dimetilazol difeniltetrazólio
OMS	Organização Mundial da Saúde
PBS	Salina tamponada com fosfatos
Ppi	Pirofosfato
RO ₂ [•]	Radical peroxil
SFB	Soro fetal bovino
Smac	Ativador secundário de caspases derivado da mitocôndria
SOD	Superóxido dismutase
TAE	Solução de tris e ácido acético
TK	Linhagem de células de carcinoma renal humano

TNB	Ácido 5-tio-2-nitrobenzóico
TNF	Fator de necrose tumoral
U/mL	Unidades internacionais por mililitro
UV	Ultravioleta
VCAM-1	Molécula de adesão vascular-1
Vero	Linhagem de células epiteliais de rim de macaco

1. INTRODUÇÃO

Câncer é o nome dado a um conjunto de mais de 100 doenças, que têm em comum o crescimento desordenado de células, que invadem os tecidos e órgãos, podendo espalhar-se para outras regiões do corpo (INCA, 2007).

Segundo dados da Organização Mundial de Saúde (OMS), a cada ano o câncer é diagnosticado em mais de onze milhões de pessoas e provoca a morte de cerca de sete milhões em todo o mundo. As estimativas para 2008 apontam para 470.000 novos casos de câncer no Brasil (INCA, 2007). As causas que contribuem para o desenvolvimento do câncer envolvem fatores externos ou ambientais: tabagismo, produtos químicos, radiação e agentes infecciosos; envolvem também fatores endógenos: mutações hereditárias, hormônios, condições imunológicas e mutações decorrentes do metabolismo (GUIMARÃES, 2004).

O câncer de pele é uma das três malignidades humanas mais comuns (GRAY-SCHOPFER *et al.*, 2007). Está dividido em duas categorias: câncer de pele melanoma e câncer de pele não-melanoma. Dos tipos não-melanoma, o carcinoma basocelular e o carcinoma epidermóide são os cânceres de pele mais freqüentes, com 75% e 20% dos casos, respectivamente (BAGHERI & SAFAI, 2001). Embora o melanoma só represente 5% dos cânceres de pele, é considerado o mais grave, devido à elevada possibilidade de produzir metástase. Para o ano de 2008, estão previstos 5.920 novos casos de melanoma no Brasil, dentre os quais 510 novos casos apenas no estado de Santa Catarina (INCA, 2007).

O melanoma tem origem nos melanócitos, que são células responsáveis pela pigmentação da pele, dos olhos e dos cabelos (CARVALHO *et al.*, 2004; GRAY-SCHOPFER *et al.*, 2007). Essa pigmentação ocorre através da síntese de melanina, que é resultado de sucessivas reações oxidativas do aminoácido tirosina e, durante este processo, há uma grande geração de peróxido de hidrogênio e de dopaquinona (DQ). Essas substâncias são altamente reativas, geram peroxidação lipídica, causam alteração no DNA e desencadeiam a carcinogênese (FRANK *et al.*, 2001). Portanto, a glutathione (GSH) está envolvida na síntese de melanina, pois se conjuga com DQ, através da ação da enzima glutathione-S-transferase (GST), e reduz o peróxido de hidrogênio por intermédio da ação da glutathione peroxidase. Desse modo, a GSH protege o melanócito do efeito tóxico do peróxido de hidrogênio, durante a síntese de melanina (PROTA, 1992). Elevados níveis de GSH são

importantes na manutenção da viabilidade dos melanócitos e das células de melanoma. Não obstante, elevados níveis de GSH nas células de melanoma metastático também estão envolvidos no mecanismo de resistência à ação de agentes quimioterápicos, uma vez que a conjugação da GSH com esses compostos diminui sua ação terapêutica (FRANK *et al.*, 2001; BENLLOCH *et al.*, 2005).

A cura do melanoma está diretamente relacionada com o diagnóstico e a terapia no início do seu desenvolvimento. Os sinais que induzem a suspeita de uma lesão maligna são associados à denominada regra ABCD: assimetria, bordas irregulares, cor variável e diâmetro. Porém, o exame clínico baseado nesses sinais fornece apenas 65% de precisão no diagnóstico (RIKER *et al.*, 2005). A utilização da microscopia de superfície, também conhecida como dermoscopia, aperfeiçoou o diagnóstico do melanoma e aumentou a sensibilidade e a especificidade do diagnóstico clínico para 90%, sem a necessidade de realização de biópsia para confirmação. Contudo, o exame histopatológico do tumor primário é fundamental para estimar a possibilidade de doença metastática (RHODES, 2006).

A progressão tumoral de muitos cânceres, incluindo melanoma maligno, com conseqüente formação de metástase, pode ser causada pela desorganização da atividade das moléculas de adesão (JOHNSON, 1999). Enquanto melanócitos normais expressam poucas moléculas receptoras de adesão celular do gene da superfamília imunoglobulina (CAMs), células de melanoma apresentam elevação significativa na expressão destas moléculas, de forma que o conhecimento das possíveis modificações na interação das células que estão associadas com o desenvolvimento e a progressão do melanoma pode ajudar, futuramente, no desenvolvimento de novas terapias para essa doença (HAASS *et al.*, 2005).

Atualmente, o regime padrão de tratamento para o melanoma inclui a retirada do tumor por cirurgia, seguida de quimioterapia, de imunoterapia e/ou de radioterapia. Entretanto, nem todos respondem à terapia, e muitos pacientes têm recaída ou progressão da doença (SOMASUNDAR *et al.*, 2005). Apesar de ser uma doença com grande capacidade para produzir metástase, o melanoma é potencialmente curável, se detectado em estágio precoce. A ocorrência de metástases normalmente leva à sobrevida média de apenas seis a nove meses, tornando-o o terceiro tumor metastático mais comum, depois dos cânceres de pulmão e de mama (EWEND *et al.*, 1996; JOHNSON & YOUNG, 1996; TARHINI & AGARWALA, 2004).

Na atualidade, ainda não há um agente terapêutico conhecido que proporcione o prolongamento da vida dos pacientes com melanoma metastático. As estratégias quimioterápicas têm sido baseadas no uso de dacarbazina, na forma de monoterapia, que é o fármaco mais ativo para a doença, com resposta de 10% a 20% (TARHINI & AGARWALA, 2006). A temozolomida é o fármaco selecionado para os pacientes com melanoma metastático que precisam de tratamento sistêmico (MIDDLETON *et al.*, 2000). A poliquimioterapia e a imunoterapia são alternativas para o tratamento do melanoma. Não obstante, a combinação da dacarbazina com outros quimioterápicos não demonstra vantagens significativas em relação ao tratamento efetuado apenas com dacarbazina. Da mesma forma, a imunoquimioterapia não proporciona aumento significativo da sobrevida de pacientes com melanoma metastático, e tem como conseqüência a alta toxicidade (SASSE *et al.*, 2007; LUI *et al.*, 2007).

A maioria dos fármacos utilizada no tratamento de células malignas tem a indução de apoptose como mecanismo principal. O melanoma apresenta baixo nível de apoptose espontânea *in vivo*, comparado com outros tipos de células tumorais, e este fator está relacionado com a resistência à quimioterapia, à radioterapia e à imunoterapia (SOENGAS & LOWE, 2003). A autodestruição celular é desencadeada por mecanismos complexos, que consistem na ativação de inúmeras sinalizações, os quais fazem parte de vários sistemas paralelos ou inter-relacionados, regulando, desta forma, a apoptose. O desenvolvimento e a persistência do câncer são favorecidos quando esses mecanismos são alterados pela desregulação gênica em favor da sobrevivência e da proliferação celular (REED, 2000).

A mitocôndria também tem um papel importante nos estímulos pró e antiapoptóticos, sendo responsável por 80% a 90% do ATP necessário para a respiração e a sobrevivência celular (DIAS & BAILLY, 2005). A depleção intracelular de ATP, pelo desacoplamento mitocondrial, provoca a fragmentação do DNA e demonstra que a deficiência energética induz a célula à apoptose. Isso sugere que a proliferação de células tumorais pode ser impedida por substâncias que comprometam a integridade estrutural e funcional da mitocôndria e, conseqüentemente, o metabolismo energético celular (GARLAND & HALESTRAP, 1997). Estudos realizados por Sabzevari e colaboradores (2004) sugerem que a citotoxicidade das chalconas, para os hepatócitos e células tumorais, deve-se à

habilidade desses compostos em formar radicais pró-oxidantes e desacoplamento mitocondrial.

Com o propósito de alcançar resultados mais eficazes, o meio científico aumentou os estudos farmacológicos com compostos extraídos de plantas medicinais e com seus análogos sintéticos. Dentre os mesmos, destacam-se os flavonóides, os quais estão comumente presentes em várias plantas e são conhecidos por apresentarem efeitos benéficos pela ampla atividade antioxidante, pelo efeito inibitório da atividade de crescimento do tumor e pela atividade indutora de apoptose, em várias linhagens de células tumorais. Em plantas, os flavonóides e isoflavonóides são sintetizados a partir de hidroxichalconas que estruturalmente possuem dois anéis aromáticos e uma insaturação na cadeia. As hidroxichalconas são abundantemente distribuídas nas plantas e chamam atenção por sua efetividade como agentes antitumorais (antimitóticos e inibidores do crescimento celular) em culturas de células tumorais. Sabzevari e colaboradores (2004) avaliaram a efetividade citotóxica das chalconas e concluíram que aquelas contêm fenol em ambos os anéis, A e B, são mais tóxicas do que outras possuidoras de um anel benzênico B e um polifenol. Como exemplo de maior citotoxicidade, citam a 2',2-dihidroxichalcona. Demonstraram também que a citotoxicidade da chalcona 2',4',6',4-tetrahidroxidihidrochalcona (Floretilina) diminuiu pelo aumento da quantidade de hidroxilas no anel A. Iwashita e colaboradores (2000) demonstraram que os flavonóides isoliquiritigenina e buteina inibiram a proliferação celular e induziram apoptose em células do melanoma B16-F10. Nas células tratadas com esses compostos, ocorreu a condensação do núcleo e a fragmentação do DNA nuclear.

Chalconas, derivadas do 3,4-metilenodioxibenzaldeído e da 2,4,6-trimetoxiacetofenona, e hidroxichalconas, todas sintetizadas pelo grupo do prof. Rosendo A. Yunes, serão avaliadas quanto ao seu efeito citotóxico (atividade antitumoral) nas células da linhagem celular B16-F10.

2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2.1 Câncer de pele não-melanoma

O câncer de pele é uma das três malignidades humanas mais comuns, e a sua incidência em âmbito global está aumentando em proporções alarmantes, ocorrendo nas formas de câncer de pele não-melanoma ou melanoma (GRAY-SCHOPFER *et al.*, 2007).

Os cânceres de pele não-melanoma compreendem o carcinoma basocelular, ou de células basais, e o carcinoma epidermóide, ou carcinoma de células escamosas. Sua frequência entre os cânceres de pele é de 70% e 25%, respectivamente. Aparecem mais frequentemente em partes do corpo expostas ao sol, tais como: orelhas, face, pescoço e antebraço. Isso implica que a exposição repetida à radiação ultravioleta é o maior fator causal da doença (INCA, 2007).

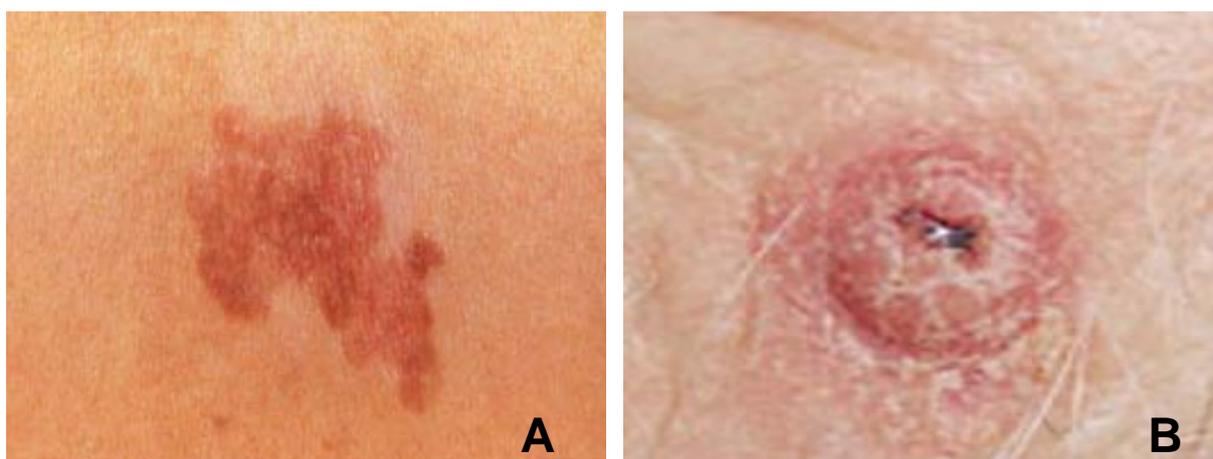


Figura 1: A - Carcinoma basocelular e B – Carcinoma epidermóide.

Fonte: WHO - World Health Organization. Disponível em: http://www.who.int/uv/health/uv_health2/en/index1.html. Acesso em 18 de novembro de 2007.

O carcinoma basocelular se origina da epiderme e dos apêndices cutâneos localizados acima da camada basal, como pelos (Figura 1 – A). Já o carcinoma epidermóide tem origem no queratinócito da epiderme, também podendo surgir no epitélio escamoso das mucosas (Figura 1 – B). O carcinoma basocelular é diagnosticado através de uma lesão com evolução lenta, ao passo que o carcinoma epidermóide surge por meio de uma ferida, que evolui rapidamente, e vem acompanhada de secreção e de prurido. Neste, a maior gravidade está relacionada

à ocorrência de metástases, embora raramente sejam letais. Nesses casos, a cirurgia é o tratamento mais indicado. O tratamento cirúrgico geralmente é curativo, apesar de ser muito dolorido e, às vezes, até desfigurante. Porém, dependendo da extensão, o carcinoma basocelular pode ser tratado também através de medicamento tópico ou radioterapia (WHO, 2007).

A exposição excessiva ao sol é o principal fator de risco do câncer de pele. Os países tropicais possuem também os maiores índices de câncer de pele, e as pessoas que habitam os mesmos estão mais expostas a essa doença. Por isso, a melhor maneira de evitar sua manifestação é a prevenção através de proteção adequada à exposição solar (INCA, 2007).

2.2 Câncer de pele melanoma

A principal causa de morte de pessoas acometidas por doenças de pele está intimamente relacionada ao melanoma, que é uma neoplasia maligna (Figura 2). Em estágio avançado é letal, pois atualmente há poucos tratamentos eficazes que resultam em melhora efetiva do paciente vítima dessa moléstia.



Figura 2: Melanoma maligno.

Fonte: WHO - World Health Organization. Disponível em: http://www.who.int/uv/health/uv_health2/en/index1.html. Acesso em 18 de novembro de 2007.

A incidência do melanoma vem aumentando de 3% a 7% anualmente, no mundo inteiro (LENS & DAWES, 2004; INCA, 2007; LUI *et al.*, 2007). O mesmo origina-se a partir dos melanócitos, que são células pigmentadas especializadas, responsáveis pela pigmentação, encontradas predominantemente na pele, nos cabelos e nos olhos, locais onde produzem melanina (CARVALHO *et al.*, 2004; SCHOPFER-GRAY *et al.*, 2007).

Na pele encontramos melanócitos localizados na camada basal da epiderme e nos folículos capilares, os quais são estimulados pelos queratinócitos epidermais a produzirem melanina, em resposta à radiação ultravioleta (UV). Os queratinócitos secretam fatores que regulam a sobrevivência, a diferenciação, a proliferação e a motilidade dos melanócitos, que, como resposta, resulta no bronzeamento da pele. Assim, os melanócitos têm papel fundamental na proteção da pele aos efeitos prejudiciais da radiação UV e na prevenção do câncer de pele. Conseqüentemente, pessoas sem melanócitos funcionais e com distúrbios pigmentares, como vitiligo e albinismo, são hipersensíveis à radiação UV (GRAY-SCHOPFER *et al.*, 2007).

A pigmentação da pele ocorre através da síntese de melanina, que resulta de sucessivas reações oxidativas do aminoácido tirosina. Durante esse processo, há uma grande geração de substâncias altamente reativas, podendo levar à peroxidação lipídica e à alteração no DNA, as quais desencadeiam o processo de carcinogênese (FRANK *et al.*, 2001).

O fator de risco mais importante para o desenvolvimento do melanoma é o número de nevos melanocíticos na pele, enquanto que o segundo fator de risco mais importante é a presença de nevos melanocíticos atípicos. Alguns aspectos destas lesões, como: bordas não-definidas, bordas irregulares, lesão com coloração variada, diâmetro igual ou superior a 5 mm e a presença do componente macular aumentam o risco de desenvolvimento do melanoma.

Os nevos melanocíticos desenvolvem-se principalmente durante a infância e a adolescência, sendo que a quantidade desses nevos aumenta com o avanço da idade. O desenvolvimento dos nevos melanocíticos, na infância, deve-se principalmente à exposição solar, que causa queimadura da pele. Entretanto, não são necessárias queimaduras para o desenvolvimento de nevos melanocíticos, pois a simples incidência de sol moderado já é suficiente para causar tais lesões. O tipo de pele, a reação após a exposição solar e a herança genética também são fatores

de risco associados ao desenvolvimento de nevos melanocíticos em crianças (GARBE & EIGENTLER, 2007).

A ocorrência de mutações somáticas em genes melanocíticos regulatórios tem como consequência a origem e a progressão do melanoma. O primeiro gene encontrado alterado especificamente no melanoma foi o NRAS, responsável por 15% a 25% das mutações em células de melanoma. Já mutações no gene BRAF são encontradas em 50% a 70% dos casos. Genes como KIT e CDK4 também se encontram alterados no melanoma, porém em menor frequência (DAHL & GULDBERG, 2007).

O melanoma cutâneo é uma neoplasia potencialmente letal, mas que tem grande possibilidade de cura, se diagnosticado precocemente. No estágio inicial, o melanoma pode ser extirpado por incisão da lesão primária, e a cirurgia também pode remover as metástases em linfonodos regionais. Porém, pacientes com melanoma metastático, em locais distantes do tumor primário, têm um prognóstico desfavorável, com sobrevida somente de seis a dez meses, em média (LEE *et al.*, 2000).

Um significativo progresso no diagnóstico precoce do melanoma cutâneo ocorreu com o desenvolvimento da dermoscopia, ou seja, a microscopia de superfície. É um método utilizado para auxiliar o exame de lesões de pele a olho nu, que aumenta a sensibilidade e a especificidade do diagnóstico clínico do melanoma cutâneo, de 60% para mais de 90%. Não necessita de biópsia para confirmação, apesar de que o exame histopatológico do tumor primário é o procedimento inicial mais utilizado para estimar a existência de doença metastática, mesmo não havendo atualmente marcador molecular que possa prever com precisão o potencial metastático para o melanoma. O auto-exame periódico da pele e a detecção da doença na fase inicial otimizam o prognóstico e reduzem significativamente a mortalidade por melanoma cutâneo (RHODES, 2006).

O regime padrão de tratamento para o melanoma inclui a retirada do tumor por cirurgia, seguido de quimioterapia, de imunoterapia, de bioquimioterapia (associação das duas) e de radioterapia. A cirurgia raramente tem potencial curativo, e a radioterapia é apenas paliativa. Além disso, poucos pacientes respondem à quimioterapia (10% a 20%), e muitos têm recaída ou progressão da doença (EWEND *et al.* 1996; SOMASUNDAR *et al.*, 2005).

Atualmente não há agente terapêutico conhecido no mercado que proporcione um prolongamento da vida dos pacientes com melanoma metastático. As estratégias quimioterápicas baseiam-se no uso de dacarbazina (agente alquilante), também conhecida como DTIC, na forma de monoterapia. A dacarbazina é o único quimioterápico aprovado pelo USA-FDA, e é o mais ativo no tratamento do melanoma metastático, com resposta entre 10% a 20%. No entanto, fármacos como a carmustina, o paclitaxel, o temozolomida e a cisplatina também têm apresentado atividade no melanoma metastático, quando utilizados sozinhos (TARHINI & AGARWALA, 2006). A temozolomida é o fármaco selecionado para os pacientes com melanoma metastático que precisam de tratamento sistêmico, sendo que possui a mesma eficácia da dacarbazina, e tem a capacidade de atravessar a barreira hematoencefálica e facilitar o efeito no tratamento de metástases no SNC. É um agente citotóxico análogo à dacarbazina, e seu metabólito ativo é o monometil triazenoimidazole carboxamide (MTIC) (MIDDLETON *et al.*, 2000).

A poliquimioterapia, combinação de dois a quatro fármacos, pode resultar em aumento da resposta, que varia entre 30% a 50%. Porém, vários estudos randomizados não demonstraram vantagem significativa da mesma em relação à monoterapia (CHAKRABARTY & GEISSE, 2004; LUI *et al.*, 2007).

A imunoterapia também é uma alternativa para o tratamento do melanoma. Recentemente, trabalhos mostraram que agentes sintéticos que modificam a resposta imune, bem como os próprios agentes imunológicos testados em pacientes com melanoma, apresentaram uma resposta de 15% a 20% melhor do que a quimioterapia (RIKER *et al.*, 2006). O interferon- α (IFN- α) e a interleucina-2 (IL-2) são imunomoduladores freqüentemente utilizados como adjuvantes na terapia do melanoma em estágio avançado, mesmo com baixas taxas de resposta, alto custo e elevada toxicidade (TARHINI *et al.*, 2006).

O melanoma é uma doença extremamente agressiva, com grande potencial metastático e alta resistência a agentes quimioterápicos. Possui baixo índice de apoptose espontânea *in vivo*, comparado aos outros tipos de células tumorais. Essa resistência à apoptose é, possivelmente, a razão da resistência do melanoma à quimioterapia, à radioterapia e à imunoterapia, sendo o maior obstáculo para o insucesso do tratamento desta neoplasia (SOENGAS & LOWE, 2003; GRAY-SCHOPFER *et al.*, 2007). Uma alternativa promissora no tratamento do melanoma maligno pode ser a manipulação da via apoptótica como tentativa de impedir

desenvolvimento de metástases, através do desenvolvimento de novas terapias antitumorais que tenham este mecanismo como alvo terapêutico.

2.3 Moléculas de adesão celular

O melanoma cutâneo é um dos tumores humanos mais analisados, em termos de expressão de moléculas de adesão celular (HART *et al.*, 1991; NESBIT & HERLIN, 1994). Isso se justifica pelo fácil acesso às lesões melanocíticas e ao estudo histopatológico, o qual define os estágios do melanoma e a progressão tumoral (CLARK *et al.*, 1984; CLARK *et al.*, 1989; GUERRY *et al.*, 1993).

A progressão tumoral de muitos cânceres, incluindo melanoma maligno, com conseqüente formação de metástases, pode ser causada pela desorganização da atividade das moléculas de adesão (JOHNSON, 1999). As moléculas de adesão celular (CAMs) são moléculas de superfície que intermedeiam a adesão entre duas células de um mesmo tipo e entre células de origens teciduais diferentes. Muitos tipos de moléculas podem mediar a adesão celular, mas a maioria faz parte da família das integrinas, das caderinas e da superfamília das imunoglobulinas (CHOTIA & JONES, 1997).

As integrinas formam uma classe de moléculas de adesão estruturalmente similares. São heterodímeros constituídos de subunidades α e β . As subunidades individuais α podem formar receptores funcionais com várias subunidades β diferentes entre si, e vice-versa, permitindo uma grande variedade de ligações célula-célula e célula-matriz (HYNES, 1992; HAASS *et al.*, 2005). Na maioria dos melanomas, a subunidade α_v forma, com a subunidade β_3 , um complexo ($\alpha_v\beta_3$). Este complexo tem um papel fundamental na progressão do melanoma, pois, quando o mesmo está expresso, o tumor passa da fase de crescimento radial para a fase de crescimento vertical, metastática. Isso indica as integrinas como as prováveis moléculas promotoras de metástase de células de melanoma. (JOHNSON, 1999; MCGARY *et al.*, 2002).

As caderinas constituem uma família de moléculas de adesão dependentes de cálcio. São classificadas em caderinas E (epitelial), P (placentar) e N (neural). Estão expressas nas células que formam tecidos sólidos (JOHNSON, 1999). Na pele, as caderinas são responsáveis pela manutenção da homeostase, por

regulem as interações entre melanócitos e queratinócitos epidermais, e também interações entre fibroblastos dermais e células endoteliais. O contato entre os melanócitos e queratinócitos não é apenas estrutural, mas também funcional, pois controla a proliferação, a diferenciação e a expressão de moléculas de superfície celular, nos melanócitos. Na ausência do contato entre melanócitos e queratinócitos, os melanócitos proliferam rapidamente e podem ocorrer falhas na divisão celular. Os melanócitos expressam moléculas na superfície, como as MCAM/MUC18, que são moléculas de adesão celular, as quais conferem potencial metastático e aumentam a carcinogenicidade em células de melanoma. A perda da adesão, mediada pela E-caderina entre células de melanoma e queratinócitos, deixa as células de melanoma livres da regulação estrutural e funcional dos queratinócitos e resulta em aumento da motilidade, aumento da proliferação e do potencial invasivo das células de melanoma (MCGARY *et al.*, 2002).

Enquanto melanócitos normais expressam poucas moléculas receptoras de adesão celular do gene da superfamília imunoglobulina (CAMs), células de melanoma apresentam um aumento na expressão de: MCAM, Mel-CAM, MUC18 e CD146; molécula de adesão celular L1 (L1-CAM, CD171); molécula de adesão celular ativadora de leucócito (ALCAM, CD166); molécula de adesão celular vascular 1 (VCAM-1, CD106); molécula de adesão celular intercelular 1 (ICAM-1, CD54); molécula de adesão celular 1, relacionada com o antígeno embriogênico (CEACAM1, CD66a), (HAASS *et al.*, 2005).

A molécula de adesão intercelular 1 (ICAM-1) e a molécula de adesão vascular 1 (VCAM-1) fazem parte da superfamília das imunoglobulinas. Estas têm participação significativa no prognóstico do melanoma, considerando a maior expressão da ICAM-1 em lesões malignas do que em lesões benignas. Isso se deve ao aumento da espessura vertical dos tumores primários. A expressão de ICAM-1 em melanomas primários tem relevância clínica, pois pacientes em estágio 1, com tumores e ICAM positivo, possuem prognóstico desfavorável e curto período de vida (NATALI *et al.*, 1997; JOHNSON, 1999). A VCAM-1 é uma molécula de adesão celular vascular, que também está expressa no endotélio de peles normais em mínimas quantidades e em maior quantidade em melanoma maligno. É uma receptora para algumas integrinas, como a ($\alpha_4\beta_1$), e facilita a adesão do melanoma ao endotélio vascular (HOLZMANN *et al.*, 1998).

As moléculas de adesão celular não agem isoladamente. Pelo contrário, a função de adesão de uma molécula é modulada pela atividade de outra molécula de adesão. Assim, a modulação dessas moléculas é uma alternativa relevante no tratamento de tumores malignos, como o melanoma metastático.

2.4 Apoptose e necrose

A morte celular é um fator essencial no funcionamento normal dos organismos multicelulares (BRÁS *et al.*, 2005). Durante muitos anos, esse fato foi menosprezado cientificamente em favor de outros processos biológicos, como a ativação, a proliferação e a diferenciação celular. Keer *et al.* (1972) propuseram uma classificação morfológica e bioquímica, que ajudou a esclarecer e a definir o papel fisiológico para a morte celular.

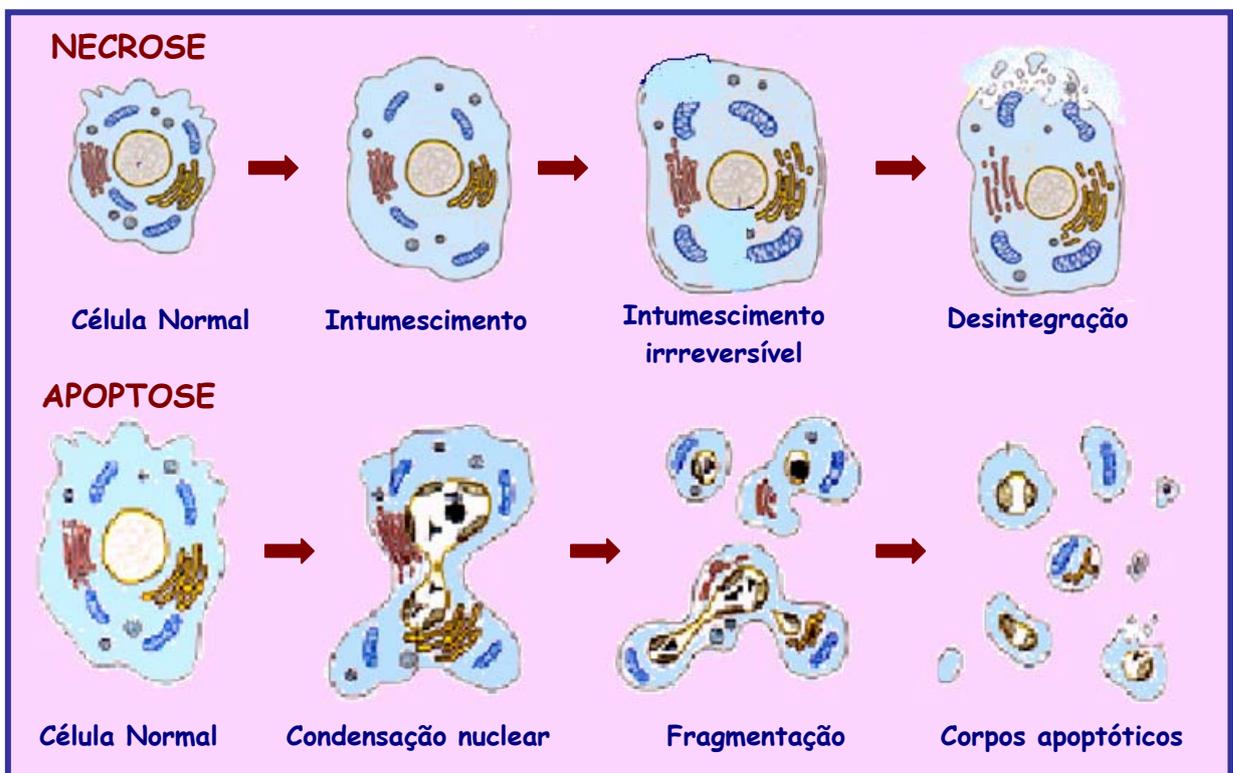


Figura 3: Mecanismos de morte celular: necrose e apoptose.

Fonte: Adaptado do Catálogo BioAgency 2004-05, Cap. 9 - Apoptose e Inflamação. Disponível em: <http://www.bioagency.com.br/informacao/default.asp>. Acesso em 15 de novembro de 2007.

Dois diferentes tipos de morte celular, necrose e apoptose, foram responsabilizados por remover as células injuriadas ou indesejadas (Figura 3). A necrose acontece em situações de estresse violento, geralmente em situações patológicas, fenômeno este impossível de ser controlado genética ou farmacologicamente. É um processo de destruição dramático e desregulado, resultado de uma catástrofe bioenergética, incompatível com a sobrevivência celular (EDINGER & THOMPSON, 2004; OKADA & MAK, 2004).

Morfologicamente, a necrose 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 ao redor da célula, em consequência da liberação do conteúdo celular e de moléculas inflamatórias. As células que morrem por necrose freqüentemente exibem mudanças na morfologia nuclear, mas não na organização da cromatina e na fragmentação do DNA (EDINGER & THOMPSON, 2004; OKADA & MAK, 2004). Por outro lado, quando o estresse é leve, o sinal gerado será analisado pelo conjunto de mitocôndrias que irão decidir se a célula viverá ou se será eliminada por mecanismos apoptóticos (AMARANTE-MENDES, 2003).

Apoptose ou morte celular programada é uma morte “fisiológica” que ocorre durante toda a vida de um organismo. É essencial para a homeostase dos tecidos em organismos multicelulares; no sistema imunológico; no desenvolvimento embrionário, com a perda das membranas interdigitais; na formação das vilosidades intestinais; na renovação de células hematopoiéticas e outros (AMARANTE-MENDES, 2003; OKADA & MAK, 2004).

Alguns defeitos no mecanismo de morte celular podem levar à carcinogênese, através da resistência à apoptose, e podem ainda induzir a morte celular por mecanismos não apoptóticos. Isso explica o envolvimento da desregulação da apoptose em inúmeras patologias neurodegenerativas, doenças auto-imunes, desordens hematopoiéticas, infertilidade e câncer (KIECHLE & ZHANG, 2002).

A morte celular programada é definida pela aparência morfológica da célula apoptótica que apresenta fragmentação do DNA genômico em fragmentos oligonucleossomais, condensação da cromatina e perda do volume celular, sem a perda da integridade da membrana. São mantidas as estruturas das organelas, ocorre formação de “pregas” na membrana plasmática e a consequente

fragmentação nuclear em corpos apoptóticos (ZIMMERMANN *et al.*, 2001). Esses corpos apoptóticos são reconhecidos e removidos rapidamente por células fagocíticas, não causando inflamação nas imediações da célula morta. Se não houver fagocitose dos corpos apoptóticos, os mesmos devem morrer por necrose secundária (EDINGER & THOMPSON, 2004).

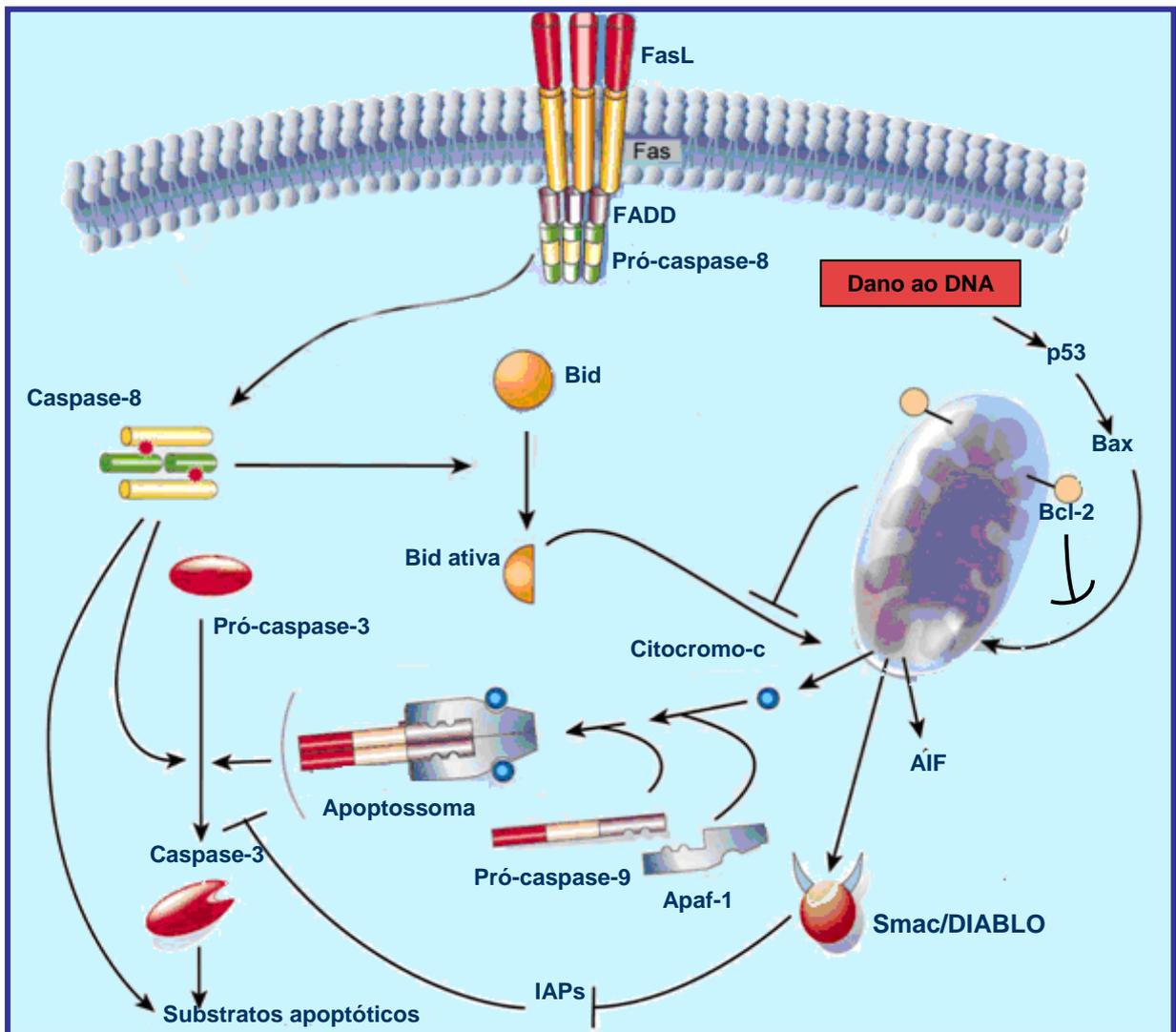


Figura 4: As duas principais vias apoptóticas: via mitocondrial ou intrínseca e via extrínseca.
Fonte: Adaptado de HENGARTNER, 2000.

Várias proteases participam dos processos de indução da morte celular, em que as mais conhecidas são as caspases. As caspases são proteases aspartato específicas, que contêm cisteínas, as quais estão 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) (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 (Figura 4). 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, desta forma, as caspases executoras ou gerando sinais para a via intrínseca (KIECHLE & ZHANG, 2002; AMARANTE-MENDES, 2003; RIEDL & SHI, 2004). A via intrínseca ou mitocondrial é iniciada por sinais de estresse provenientes do interior da célula, detectados pelas mitocôndrias, responsáveis por decidir se a célula entrará em processo de morte ou não. Caso isso ocorra, as mitocôndrias sofrem um desacoplamento mitocondrial 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 se liga 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 (KIECHLE & ZHANG, 2002; AMARANTE-MENDES, 2003; RIEDL & SHI, 2004).

Proteínas como a p-53, chamadas de “guardiãs do genoma”, 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). Algumas proteínas, membros da família Bcl-2, constituem um grupo que exerce funções opostas. Algumas atuam como proteínas antiapoptóticas e protegem a célula da morte (Bcl-2, Bcl-x_L, Bcl-w, Mcl-1 etc), outras proteínas pró-apoptóticas levam a célula à apoptose (Bax, Bak, Bad, Bid, etc). 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).

No melanoma, a via mitocondrial tem uma grande importância no controle da apoptose (RAISOVA *et al.*, 2001; HOSSINI *et al.*, 2003). Nesse tipo de tumor, as proteínas antiapoptóticas Bcl-2 parecem estar superexpressas e podem ser as principais responsáveis pela resistência a muitos agentes quimioterápicos (JANSEN

et al., 2000). Adicionalmente, a diminuição dos níveis da proteína pró-apoptótica Bax resulta em progressão do melanoma, em redução da susceptibilidade à resposta imune e à quimioterapia (FECKER *et al.*, 2006). Takaola *et al.* (1997) demonstraram um aumento na expressão da proteína Bcl-2 em células de melanoma, com severa metástase pulmonar. Jun *et al.* (2007) relacionaram a apoptose, em células de melanoma B16-F10, com a inibição da proteína Bcl-2, após o tratamento das mesmas com capsaicina. Assim, a modulação da via mitocondrial e/ou das proteínas relacionadas com os mecanismos pró-apoptóticos e anti-apoptóticos pode ser considerada uma estratégia promissora no tratamento quimiopreventivo ou quimioterapêutico do melanoma metastático.

2.5 Estresse oxidativo e glutathiona

Os mecanismos de morte celular também podem ser influenciados por um desequilíbrio da homeostase no metabolismo oxidativo, denominado estresse oxidativo (McCONKEY, 1998; ALLEN & TRESINI, 2000). 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).

O estímulo carcinogênico pode estar relacionado ao desequilíbrio redox intracelular, como consequência do acúmulo de espécies reativas que ocorrem devido a injúrias endógenas e exógenas (VALKO *et al.*, 2006). Não obstante, a persistência do estresse oxidativo em células tumorais pode ativar protooncogenes e fatores de transcrição; levar a uma instabilidade genômica e a uma resistência à quimioterapia e à radioterapia; provocar invasão celular e metástase (NAVARRO *et al.*, 1999).

As espécies reativas de oxigênio (EROs) e as espécies reativas de nitrogênio (ERNs) são moléculas quimicamente instáveis e altamente reativas; promovem reações de redução e de oxidação, prejudicando funções fisiológicas (SIES, 1997). Não obstante, essas moléculas são produzidas fisiologicamente durante o metabolismo na respiração celular mitocondrial, geradas pela incidência de radiação ultravioleta, de raios X e de raios gama; são produtos de reações catalisadas por

metais; estão presentes em forma de poluentes na atmosfera e são produzidas por neutrófilos e macrófagos nos processos inflamatórios. Essas moléculas reativas também são benéficas para o organismo, pois desempenham inúmeras funções fisiológicas na defesa contra agentes infecciosos e atuam como antitumorais ao induzir a célula à apoptose. Contudo, altas concentrações dessas espécies reativas podem prejudicar as estruturas celulares, causar peroxidação lipídica, oxidação de proteínas e oxidação do DNA (MATES *et al.*, 1999; VALKO *et al.*, 2006).

Os efeitos dessas espécies reativas no organismo são equilibrados por mecanismos de defesa antioxidante, enzimáticas e não enzimáticas. Os mais eficientes antioxidantes enzimáticos envolvem a superóxido dismutase (SOD), a catalase (CAT), a glutatona peroxidase (GPx) e a glutatona transferase (GSTs). Dentre os antioxidantes não-enzimáticos, encontram-se: melanina, glutatona, estrogênios, ácido úrico, vitamina C, vitamina E, carotenóides, flavonóides naturais, entre outros (SIES, 1997; McCALL & FREI, 1999; MATÉS, 2000; NORDBERG & ARNÉR, 2001).

A melanina, responsável pela pigmentação cutânea, é resultante de sucessivas reações oxidativas do aminoácido tirosina. Durante esse processo há uma grande geração de peróxido de hidrogênio e dopaquinona (DQ). Essas substâncias são altamente reativas, podendo levar à peroxidação lipídica e à alteração do DNA, o que possibilita o desencadeamento do processo de carcinogênese (FRANK *et al.*, 2001).

A superóxido dismutase (SOD) é uma das mais efetivas enzimas antioxidantes, a qual catalisa a dismutação de $O_2^{\bullet-}$ e forma espécies menos reativas, como o H_2O_2 (McCORD & FRIDOVICH, 1969). Estão descritas três isoformas de SOD em humanos: a Zn-SOD e a Cu-SOD, que estão presentes no citosol, e ainda a Mn-SOD, que está presente na mitocôndria. A presença de SOD é fundamental devido à formação de $O_2^{\bullet-}$ pela cadeia respiratória (McCORD & FRIDOVICH, 1969; NORDBERG & ARNÉR, 2001).

As catalases (CAT) são enzimas antioxidantes que estão localizadas na maioria das células de organismos aeróbios, em uma organela chamada de peroxissoma, em que o peróxido de hidrogênio é convertido em água e oxigênio molecular. Assim sendo, a catalase protege a célula do peróxido de hidrogênio gerado dentro da célula. As catalases também exercem uma função muito

importante ao prevenirem a formação do $\cdot\text{OH}$, via reação de Fenton, catalisada por $\text{Fe}^{++}/\text{Cu}^{++}$ (NORDBERG & ARNÉR, 2001). A glutathiona é o mais importante sistema antioxidante e compreende diferentes sistemas enzimáticos, como as peroxidases (GPx), as transferases (GST), as redutases (GR) e a glutathiona (GSH). O tripeptídeo glutathiona (L- γ -glutamil-L-cisteinil-glicina) é um importante antioxidante e o mais abundante tiol não-protéico intracelular. Sua forma reduzida é a GSH e a forma oxidada é a GSSG, glutathiona dissulfeto. A característica antioxidante da GSH é determinada pelo grupamento $-\text{SH}$ (sulfidrila), presente no resíduo cisteína. (DELEVE & KAPLOWITZ, 1991).

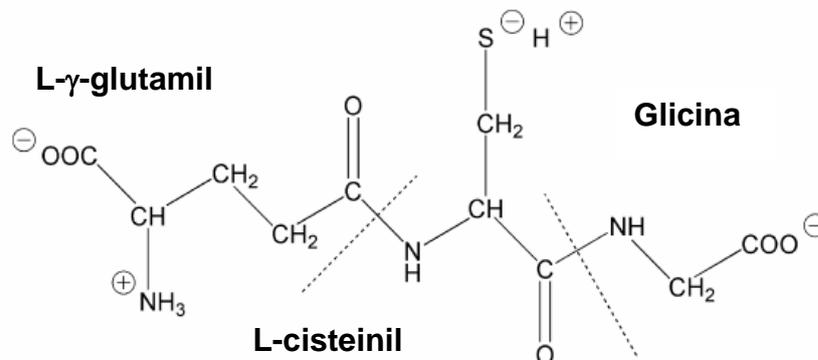


Figura 5: Estrutura da glutathiona
Fonte: LASH, 2006.

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 (DELEVE & KAPLOWITZ, 1991). A maior parte da GSH é sintetizada no fígado, mas sua síntese ocorre em todas as células do corpo, a partir dos aminoácidos L-glutamina, cisteína e glicina. A reação para síntese do GSH depende de ATP, que é catalisada pela γ -glutamil-cisteína-sintetase e pela GSH sintase. A GSH é importante na síntese de proteínas estruturais e de DNA, na ativação transcricional de genes específicos, na regulação do ciclo celular, bem como na regulação e manutenção do estado redox da célula (WANG & BALLATORI, 1998; BALLATORI *et al.*, 2005).

Em situações fisiológicas, a maioria da GSH é mantida em estado reduzido pela glutathiona redutase (GR). Porém, em situações de estresse oxidativo acontece

a desregulação dos níveis de GSH e de GSSG (WANG & BALLATORI, 1998). A quantidade de glutathiona oxidada acumula-se dentro da célula, e a relação entre GSH/GSSG pode ser usada como indicador de estresse oxidativo no organismo (HWANG *et al.*, 1992).

A GSH participa de reações de detoxificação, protege a célula contra danos oxidativos e nitrosativos, bem como é importante na metabolização de compostos tóxicos eletrofílicos e quimioterápicos (WANG & BALLATORI, 1998; BALLATORI *et al.*, 2005). 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. A perda de GSH citoplasmática é um evento característico de morte celular por apoptose, interferindo na capacidade redox da célula, tornando-a intolerante à presença de agentes oxidantes (SLATER *et al.*, 1995). Vários estudos relacionam a incidência de câncer com várias desordens nas funções enzimáticas, as quais estão ligadas à GSH (PASTORE *et al.*, 2003).

No melanoma, altos níveis de GSH são importantes na manutenção da viabilidade dos melanócitos e das células de melanoma. A GSH está envolvida na síntese de melanina conjugada com a dopaquinona (DQ), através da ação da enzima glutathiona-S-transferase (GST), e reduz o peróxido de hidrogênio por intermédio da ação da glutathiona peroxidase. Desta forma, a GSH protege o melanócito do efeito tóxico do peróxido de hidrogênio durante a síntese de melanina (PROTA, 1992). Níveis elevados de GSH nas células de melanoma metastático também estão envolvidos no mecanismo de resistência à ação de agentes quimioterápicos, uma vez que a conjugação de GSH com estes compostos diminui sua ação terapêutica (FRANK *et al.*, 2001; BENLLOCH *et al.*, 2005). Sendo assim, a permanência de altos níveis de GSH dentro da célula parece ser fundamental para a sobrevivência de células metastáticas intravascularmente e para a progressão extravascular (BENLLOCH *et al.*, 2005).

A glutathiona pode interagir com o fármaco, em local específico, através do seu grupamento tiol, e resultar em uma conjugação fármaco-glutathiona. Tal conjugado, menos ativo e mais hidrossolúvel, pode ser expulso da célula com a participação de proteínas transportadoras, inclusive a proteína associada à resistência a múltiplos fármacos (STAVROVSKAYA, 2000).

A resistência das células tumorais a múltiplos fármacos (MDR) é um dos principais motivos do insucesso da quimioterapia em tumores malignos. Mediada por diferentes mecanismos, essa resistência atua em diferentes etapas da ação citotóxica. Dentre os mecanismos de resistência, podemos citar: ativadores das proteínas transmembranas, responsáveis pelo efluxo de fármaco da célula (a glicoproteína-P e as proteínas de resistência a múltiplos fármacos); ativadores de enzimas do sistema de detoxificação da glutathione, que protegem a célula de vários danos; mecanismos envolvidos na alteração das proteínas; genes que controlam a apoptose (STAVROVSKAYA, 2000; GOTTESMAN *et al.*, 2002).

A alta concentração de GSH intracelular é relacionada à resistência tumoral a vários agentes quimioterápicos (ISHIKAWA *et al.*, 1996; FOJO & BATES, 2003). A resistência pode ocorrer devido ao efluxo desses agentes quimioterápicos presentes nas células, através de MRP, com participação ativa da GSH (SALERNO & GARNIER-SUILLEROT, 2001). Portanto, a depleção da GSH pode ser uma estratégia potente na sensibilização das células cancerígenas e no controle da resistência a diversos quimioterápicos (STAVROVSKAYA, 2000; FOJO & BATES, 2003; KACHADOURIAN & DAY, 2006).

2.6 Metabolismo energético de células tumorais

A perda da GSH citoplasmática é um evento característico da morte celular por apoptose. Porém, quando há também uma diminuição nos níveis da GSH mitocondrial, a produção de energia (ATP) celular é afetada (SLATER *et al.*, 1995).

Os níveis de ATP celular estão relacionados com o tipo de morte celular. Altos níveis de ATP levam à morte celular por apoptose, mas intensa depleção energética causa morte por necrose. Enquanto a morte por apoptose requer energia, a necrose ocorre quando não há mais ATP dentro da célula (REGULA *et al.*, 2003; SKULACHEV, 2006).

As células animais nucleadas têm duas formas de produzir energia: através da via mitocondrial e/ou através da glicólise. Em contraste com a maioria das células normais, onde as mitocôndrias são responsáveis por produzirem a maioria do ATP utilizado como combustível para o crescimento celular, no câncer a glicólise pode contribuir com até metade da energia necessária (PEDERSEN, 2007).

Células tumorais têm seu metabolismo energético alterado, com aumento significativo na capacidade glicolítica, mesmo na presença de oxigênio em altas concentrações (PEDERSEN, 1978; GATENBY & GILLIES, 2004; PEDERSEN, 2007). Contudo, tal característica pode ser uma estratégia metabólica para garantir o crescimento e a sobrevivência dessas células em ambientes com pouco oxigênio (GATENBY & GILLIES, 2004). Em 1956, Warburg relatou que a alta taxa glicolítica, em células tumorais, devia-se a uma deficiência na cadeia respiratória. Mais tarde, em 1978, Pedersen verificou que a atividade das mitocôndrias retiradas de células normais era tão eficiente quanto mitocôndrias retiradas de células tumorais, concluindo que a deficiência na fosforilação oxidativa era resultado da menor quantidade de mitocôndrias nas células tumorais.

As mitocôndrias são organelas que participam de muitos mecanismos essenciais para a vida e 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 na integração de estímulos pró e anti-apoptóticos relacionados com o processo de morte celular (DIAS & BAILLY, 2005).

Algumas disfunções mitocondriais são citadas como marca característica da morte por apoptose: perda do potencial de membrana mitocondrial, interrupção do transporte de elétrons, geração de espécies reativas de oxigênio e liberação de fatores pró-apoptóticos, como o citocromo c, o Smac/Diablo, a AIF e outros, desencadeando a ativação de proteínas executoras de apoptose, as caspases (ZIMMERMANN *et al.*, 2001; BRÁS *et al.*, 2004; DIAS & BAILLY, 2005).

Alguns tumores, como o melanoma, que são caracterizados pelo rápido desenvolvimento e por propriedade metastática, apresentam uma modificação energética em comparação com seu tecido de origem (PEDERSEN, 1978; ZU & GUPPY, 2004). O metabolismo energético pode ser um alvo alternativo para o tratamento de muitas neoplasias. Considerando o metabolismo predominantemente oxidativo do melanoma, 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. (ZU & GUPPY, 2004; DIAS & BAILLY, 2005; MORENO-SÁNCHEZ *et al.*, 2007).

2.7 Flavonóides e chalconas

Os flavonóides fazem parte de uma família de compostos polifenólicos, que existem nos vegetais, e representam uma das mais predominantes classes de compostos (HOLLMAN & KATAN, 1997). Mais de 8.000 compostos com estrutura de flavonóides estão identificados, formados a partir de um esqueleto básico e combinações de vários grupos substituintes, como hidroxilas e metoxilas (HODEK *et al.*, 2002). Dentre os flavonóides, podemos citar: chalconas, flavonas, flavononas, flavonóis, antrocianinas e isoflavonas (CANIVENC-LAVIER *et al.*, 1996).

De uma forma geral, os flavonóides, além de sua função fisiológica nos vegetais, apresentam atividade ansiolítica, antiinflamatória, antiviral, antiprotozoária e antitumoral (MANTHEY *et al.*, 2001; MARDER & PALADINI, 2002; FOURNET & MUÑOZ, 2002; CÁRDENAS *et al.*, 2006). Exercem várias propriedades bioquímicas e farmacológicas, e um dos efeitos mais investigados é sua participação na prevenção do câncer (CANIVENC-LAVIER *et al.*, 1996; SHIH *et al.*, 2000).

A atividade antitumoral dos flavonóides tem sido atribuída a uma grande variedade de mecanismos, incluindo seqüestro de radicais livres, participação de enzimas que detoxificam carcinógenos e inibição da ação de promotores de tumor (CANIVENC-LAVIER *et al.*, 1996; SHIH *et al.*, 2000). As atividades antioxidantes, bem como as propriedades citotóxicas dos flavonóides, são influenciadas pelo seu grau de pureza, pela posição dos substituintes e pela quantidade de hidroxilas (SCHROETER *et al.*, 2002).

Recentes trabalhos mostram que flavonóides, como a quercetina, têm efeito antiproliferativo e podem induzir a morte da célula por apoptose, em variados 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. Os flavonóides podem induzir as células à morte, por diferentes mecanismos apoptóticos (RAMOS, 2007). Nakagawa *et al.* (2004) mostraram a atividade do EGCG, flavonóide presente no chá verde, na inibição de células de leucemia linfoblástica aguda, Jurkat, com concomitante aumento intracelular da atividade da caspase-2. Outra característica desse composto é a inibição de proteínas anti-apoptóticas, como a Bcl-2 e a Bcl-x_L (LEONE *et al.*, 2003).

Em plantas, os flavonóides e os isoflavonóides são sintetizados a partir das chalconas, que estão abundantemente distribuídas nesses vegetais. Majoritariamente, as chalconas são encontradas nas pétalas das flores, sendo responsáveis pela pigmentação das mesmas. Também estão presentes em folhas, frutos, cascas, raízes de várias árvores e plantas (Ni *et al.*, 2004).

Quimicamente, as chalconas 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 6). 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). Tais características estruturais são responsáveis por diversas atividades biológicas, e a remoção de alguns desses aspectos resulta em perda de atividade do composto (MENG *et al.*, 2004).

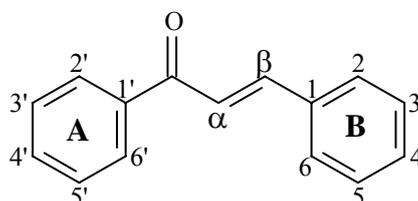


Figura 6: Núcleo fundamental das chalconas

As chalconas têm apresentado numerosas atividades biológicas, observadas nesses últimos anos. Dentre elas estão atividades: anti-ulcerogênica (YAMAMOTO *et al.*, 1992), anti-hipertensiva (OGAWA *et al.*, 2007), antimalárica (DOMINGUEZ *et al.*, 2001; LIU *et al.*, 2001; LIU, *et al.*, 2003; DOMINGUEZ *et al.*, 2005), antileishmaniose (ZHAI *et al.*, 1999; CHEN *et al.*, 2001; LIU *et al.*, 2003; BOECK *et al.*, 2006), antifúngica (LÓPEZ *et al.*, 2001; BOECK *et al.*, 2005; KONIECZNY *et al.*, 2007; BATOVSKA *et al.*, 2007), antioxidante (ZHAN & YANG, 2006; COTELLE *et al.*, 2005; CHIN *et al.*, 2007; CHOI *et al.*, 2007; KOZLOWSKI *et al.*, 2007), antibacteriana (ROJAS *et al.*, 2002; SELVAKUMAR *et al.*, 2006; KONIECZNY *et al.*, 2007), antimicobacteriana (KONIECZNY *et al.*, 2007; SIVAKUMAR *et al.*, 2007),

antiinflamatória (HERÊNCIA *et al.*, 1999; ROJAS *et al.*, 2002; MENG *et al.*, 2004; RANI *et al.*, 2004; WON *et al.*, 2005; LIU, *et al.*, 2007) e antitumoral (KOBORI *et al.*, 1999; IWASHITA *et al.*, 2000; XIA *et al.*, 2000; NAM *et al.*, 2003; SABZEVARI, *et al.*, 2004; RAO, *et al.*, 2004; HSU, *et al.*, 2004; YE, *et al.*, 2004; NAKATAMI *et al.*, 2005; WON *et al.*, 2005; FOREJTNÍKOVÁ *et al.*, 2005; BHAT *et al.*, 2005; HSU *et al.*, 2005; LIU & GO, 2006; HSU *et al.*, 2006; MODZELEWSKA *et al.*, 2006; CABRERA *et al.*, 2007).

Dentre as atividades farmacológicas antitumorais das chalconas, pode-se citar a inibição da angiogênese. A formação de novos capilares, angiogênese ou neovascularização, é vital para a sobrevivência e o desenvolvimento de uma massa tumoral. Robinson *et al.* (2005) sintetizaram chalconas substituídas, análogas à curcumina, um composto natural que tem exibido propriedades antitumorais. Os resultados mostraram que as chalconas têm igual ou maior habilidade para inibir o crescimento de células endoteliais *in vitro*, que a curcumina. Nam *et al.* (2003) produziram uma série de 2',5'-dihidroxicalconas com potente atividade citotóxica, em três linhagens celulares, incluindo melanoma murino B16, células tumorais de câncer de cólon HCT-116 e carcinoma epidermóide humano A431. Observaram também que vários compostos mostraram-se seletivamente citotóxicos para células endoteliais de cordão umbilical humano (HUVEC) e, conseqüentemente, inibidores da angiogênese.

Cabrera *et al.* (2007) sintetizaram uma grande quantidade de chalconas, incluindo hidroxicalconas, que se mostraram mais tóxicas que flavononas e flavonas, quando avaliadas quanto à sua capacidade antitumoral contra o carcinoma renal humano TK-10, o adenocarcinoma mamário humano MCF-7 e adenocarcinoma de cólon HT-29.

Estudos feitos por Kobori *et al.* (1999) descreveram que a 2',4',6',4'-tetrahidroxidihidrochalcona (floreína) induziu apoptose em células de melanoma murina B16-4A5 e em células de leucemia humana HL-60. Já Iwashita *et al.* (2000) demonstraram que a isoliquiritigenina (2',4',4'-trihidroxicalcona) e a buteína (2',4',3,4'-tetrahidroxicalconas) inibiram significativamente a proliferação celular e induziram células de melanoma B16- 4A5 à apoptose. Também Hsu *et al.* (2005) notaram que a isoliquiritigenina induziu células tumorais de hepatócito humano Hep G2 à apoptose e ao bloqueio do ciclo celular.

No desenvolvimento de agentes antitumorais contra o melanoma, uma das mais importantes características que o composto pode ter é a capacidade de promover a morte celular por apoptose, devido à fraca resposta dessas células aos estímulos apoptóticos (KLUZA *et al.*, 2002). Outro fator é o desenvolvimento de resistência dos tumores sólidos a fármacos antineoplásicos. Essa resistência a múltiplos fármacos é uma das principais causas de falhas da quimioterapia em malignidades humanas.

O crescimento e a metástase das células tumorais malignas dependem, entre outras propriedades, da sua habilidade para implantar, migrar, aderir, penetrar e atravessar barreiras estruturais, alcançando os vasos sanguíneos e o tecido alvo de metástase. A linhagem de melanoma murina B16, numerada B16-F1 à B16-F10, apresenta um heterogêneo potencial metastático, sendo que a sub linhagem F10 apresenta-se como a mais metastática nos pulmões, quando comparada a sub linhagem F1 (FIDLER, 1975; 1977; 1978).

O elevado potencial metastático da linhagem celular de melanoma B16-F10 e a difícil resposta a agentes citotóxicos justifica a pesquisa de novos fármacos que aumentem a eficácia e diminuam os efeitos adversos dos mesmos.

3. OBJETIVOS

3.1 Objetivo geral:

Estudar a sensibilidade da linhagem celular de melanoma B16-F10 a chalconas, derivadas do 3,4-metilenodioxibenzaldeído e derivadas da 2,4,6-trimetoxiacetofenona, e a hidroxichalconas.

3.2 Objetivos específicos:

1. Avaliar o efeito citotóxico de 13 chalconas derivadas do 3,4-metilenodioxibenzaldeído, de 11 chalconas derivadas da 2,4,6-trimetoxiacetofenona, e de 13 hidroxichalconas sobre a linhagem celular de melanoma B16-F10, através do teste do MTT
2. Analisar o efeito das chalconas ativas em células não-tumorais Vero, através do teste do MTT;
3. Identificar por qual via as chalconas causam morte celular: se por apoptose ou por necrose, através da fragmentação nuclear;
4. Investigar se o potencial citotóxico das chalconas é resultante do efeito pró-oxidante das mesmas, através da associação com agentes antioxidantes;
5. Investigar a possível produção de espécies reativas de oxigênio intracelular, pelas chalconas, através da microscopia de fluorescência;
6. Relacionar as concentrações intracelulares de glutathiona total citosólica com os possíveis efeitos citotóxicos causados pela chalconas;
7. Relacionar as alterações das concentrações intracelulares da glutathiona total mitocondrial com a glutathiona total citosólica, com espécies reativas de oxigênio e concentrações de ATP;

8. Avaliar a influência das chalconas selecionadas, no teor energético das células (concentração de ATP);

9. Verificar se as chalconas selecionadas têm potencial antimetastático, através da possível inibição da adesão 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 ácido clorídrico, o isopropanol, o dimetil sulfóxido (DMSO) e o tris (hidroximetil) aminometano foram adquiridos da Merck® (Darmstat, Alemanha); O ácido etilenodiaminotetraacético (EDTA) foi adquirido da Reagen (Rio de Janeiro, Brasil); A proteinase K foi adquirida da Invitrogen® (Alemanha); O brometo de dimetiazol difeniltetrazólio (MTT), a superóxido dismutase (SOD), a vitamina E hidrossolúvel (TROLOX®), o ácido N-[2-Hidroxietil]piperazina-N'-[2-etanosulfônico] (HEPES), a albumina, o meio de cultura Dulbecco modificado por Iscove (IMDM), a agarose, a RNase, a glutationa redutase (GR), o fosfato de nicotinamida adenina dinucleotídeo (NADPH), o ácido 5,5'-ditio-bis-2-nitrobenzóico (DTNB) e outros reagentes utilizados nos experimentos foram adquiridos da Sigma® (St. Louis, MO, EUA); O Kit luciferin-luciferase foi adquirido da Biorbit (Tuku, Finlândia).

4.2 Síntese das chalconas

A síntese das chalconas, derivadas do 3,4-metilenodioxibenzaldeído e da 2,4,6 trimetoxiacetofenona, e a síntese das hidroxichalconas foram realizadas no Departamento de Química da Universidade Federal de Santa Catarina (UFSC), pelo grupo de pesquisa do Prof. Rosendo Augusto Yunes.

4.3 Cultura de células

Foram utilizadas linhagens celulares de melanoma, B16-F10, de origem murina, e células não-tumorais, fibroblastos de rim de macaco (VERO). As células B16-F10 foram obtidas da American Type Culture Cell (ATCC) e as células Vero, da Associação Técnico-Científica Paul Ehrlich (APABCAM, Rio de Janeiro, Brasil). As células foram mantidas em garrafas plásticas de cultura, contendo meio DMEM, suplementado com 10% de soro fetal bovino, 100U/mL de penicilina, 100µg/mL de estreptomicina, 10mM HEPES, pH 7.4, em estufa umidificada, a 37°C, com 5% de

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.

4.3.1 Tratamento das células

Os compostos foram dissolvidos em uma solução de DMSO 10mM e armazenados em ambiente com temperatura de 4°C a 8°C. Essas soluções estoque foram diluídas em meio de cultura para atingir as concentrações de 10µM a 200µM nos experimentos. As células B16-F10 e as células Vero foram incubadas em placas de 12, 24 ou 96 poços, dependendo do procedimento experimental, mantidas por um período de 3 horas em estufa úmida, a 37°C, com 5% de CO₂, antes do tratamento com os compostos, para que pudessem aderir à placa, exceto no experimento para verificação da adesão celular. Após a adição dos compostos, as células permaneceram no ambiente acima citado por um período de 6 a 72 horas, conforme o experimento.

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

4.4 Ensaio de viabilidade celular (teste do MTT)

A viabilidade celular foi analisada pelo método do MTT (brometo de dimetiazol difeniltetrazólio) (VAN DE LOOSDRECHT *et al.*, 1991). O MTT é um sal de tetrazólio de cor amarela, que é reduzido a formazan de cor azulada, pela atividade oxidativa das células, funcionando, pois, como um indicador da função mitocondrial e, por conseguinte, da viabilidade celular. As células B16-F10, 1×10^5 , e células Vero, 1×10^5 , foram incubadas por 24 horas, em triplicata, com os compostos, em placas de 96 poços; 2×10^4 células B16-F10 foram incubadas por 48 horas e 1×10^4 células B16-F10, por 72 horas. Depois de decorrido o tempo de incubação, o meio de cultura foi retirado e acrescentado um novo meio e, então, o MTT (0,25µg/µL) foi adicionado, seguido de incubação por 3 horas, a 37°C. O meio de cultura foi

retirado, o precipitado formazan foi dissolvido com uma solução ácida de isopropanol (isopropanol com HCL 0,04 N) e a absorbância foi medida a 540nm, com o uso de um leitor de microplacas (Organon Teknika, Belgium). A densidade óptica, obtida do grupo controle, células sem tratamento, foi considerada como 100% de células viáveis.

4.5 Análise de apoptose pelo método de fragmentação nuclear

O isolamento de fragmentos apoptóticos do DNA foi realizado seguindo o método de HAN (1997). As células, 5×10^5 , foram incubadas com os compostos, em placas de 24 poços, na concentração de 100 μ M, mantidas por 24 horas, a 37°C, com 5% de CO₂, em estufa umidificada. As células foram lavadas duas vezes com PBS gelado. Posteriormente, foram 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 25°C. As amostras foram, então, centrifugadas a 12.000g, por 30 minutos. O *pellet* foi lavado duas vezes com etanol a 70%, gelado, secado à temperatura ambiente, dissolvido em tampão (10mM Tris-HCl pH 8.0; 0,1mM EDTA), contendo 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 a 1:100 em água destilada; a absorbância foi medida em 260nm; a concentração de DNA foi calculada pela equação: Concentração DNA (mg/mL) = (Abs/ ϵ) x diluição. O coeficiente de extinção (ϵ) foi considerado igual a 20. As bases nitrogenadas da dupla fita de DNA apresentam uma absorção máxima no comprimento de onda de 260nm. Neste comprimento de onda, o coeficiente de extinção igual a 20 indica que o DNA, em uma concentração de 1mg/mL, terá uma absorbância (A_{260nm}) igual a 20. A relação entre a concentração do DNA e a absorbância (A_{260nm}) é linear até o valor de 2,0.

A fragmentação do DNA foi analisada por eletroforese, em gel de agarose a 1%, e corado com 1 μ L de brometo de etídio (1g/100mL). A corrida foi realizada a 200V, por 10 minutos, em tampão TAE (Tris - ácido acético – EDTA). Foram aplicados 2 μ g 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®).

4.6 Determinação da curva dependente de concentração

Para determinar a curva dependente de concentração, 1×10^5 células foram incubadas, por 24 horas, com os compostos em concentrações crescentes (0, 25, 50, 100, 150 e $200\mu\text{M}$); para a curva de 48 horas, foram incubadas 2×10^4 células com os compostos em concentrações crescentes (0, 10, 20, 30 e $50\mu\text{M}$); para a curva de 72 horas, foram incubadas 1×10^4 células com os compostos em concentrações crescentes (0; 2,5; 5; 10; $20\mu\text{M}$). 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, 48 e 72 horas, através das curvas dependentes de concentração, por regressão linear.

4.7 Determinação da citotoxicidade das hidroxichalconas associadas aos antioxidantes SOD e TROLOX®

Um elevado ou moderado nível de espécies reativas é potencialmente citotóxico para a célula, bloqueando sua proliferação, por induzir a morte por apoptose e até por necrose (DREHER & JUNOD, 1996).

Neste experimento, verificou-se a possível citotoxicidade dos compostos pela produção de espécies reativas de oxigênio. Para tal, utilizaram-se agentes antioxidantes como a superóxido dismutase (SOD) e um análogo hidrossolúvel da vitamina E (Trolox®). As células, 1×10^5 , foram incubadas com os compostos sintéticos em concentrações crescentes (0, 25, 50, 75, $100\mu\text{M}$) juntamente com 100U/mL da SOD. Além disso, foram incubadas 1×10^5 células com os compostos sintéticos em concentrações crescentes (0, 25, 50, 75, $100\mu\text{M}$) juntamente com $100\mu\text{M}$ Trolox®. As células tratadas foram mantidas em estufa umidificada, a 37°C , com 5% CO_2 , seguido do ensaio do MTT, após 24 horas.

4.8 Avaliação da produção de espécies reativas de oxigênio, através de microscopia de fluorescência

Este método, proposto por Sauer *et al.* (2003) consiste em avaliar a presença de espécies reativas de oxigênio 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 espécies reativas de oxigênio, é oxidada em diclorofluoresceína (DCF), emitindo fluorescência. As células, 8×10^5 , foram tratadas com os compostos, na concentração de 25 μ M, em placas de 12 poços, e mantidas por 5 horas, a 37°C, com 5% de CO₂, em estufa umidificada. Adicionou-se a DCFH-DA 10 μ M às células, e estas foram mantidas por 30 minutos, a 37°C, com 5% CO₂, em estufa umidificada. As células foram centrifugadas e lavadas cinco vezes com PBS. Em seguida foram analisadas por microscopia de fluorescência, sob luz azul.

4.9 Determinação da concentração de glutathiona total citosólica

A glutathiona total citosólica (GSH + GSS) foi quantificada empregando-se o método da glutathiona redutase, proposto por Tietze (1969). Nesse método, os grupamentos sulfidrila da GSH interagem com o DTNB, originando a GSTNB (forma oxidada de GSH) que, na presença da glutathiona redutase e de NADPH, é reduzida novamente 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 glutathiona redutase sobre a GSTNB e GSH intracelular. As células, 3×10^5 , tratadas com compostos nas concentrações 25, 50, 75, 100 μ M e não tratadas (controles) foram incubadas durante 24 horas. Em seguida, foram lavadas três vezes com PBS, ressuspensas em 100 μ L de EDTA 1mM e ultra-sonicadas por 10 segundos. Uma quantidade de 20 μ L de cada homogenato foi transferida para placas de 96 poços, seguida da adição de 180 μ L da solução de reação (DTNB 75 μ M, NADPH 120 μ M, glutathiona redutase 1U/mL e EDTA 10mM em tampão fosfato 100mM, pH 7.4). A absorbância foi medida após 15 minutos, a 412nm, com um leitor

de microplacas (Organon Teknika). Os valores foram expressos em percentuais em relação ao controle.

4.10 Determinação da concentração de glutathiona total mitocondrial

Para determinar a concentração da glutathiona mitocondrial, mitocôndrias foram isoladas por centrifugação em tampão Tris-sacarose (10mM/250mM), (SCHENKMAN & CINTI, 1978). A glutathiona mitocondrial (GSH + GSS) foi quantificada empregando-se o método da glutathiona redutase, proposto por Tietze (1969). As células, 3×10^5 , tratadas com compostos nas concentrações 25, 50, 75, 100 μ M e não tratadas (controles) foram incubadas durante 24 horas, em placas de 24 poços. Em seguida, foram lavadas três vezes com PBS, ressuspensas em 1000 μ L de Tampão Tris/Sacarose 10mM/250mM, homogeneizadas, centrifugadas a 1500rpm, ressuspensas em 100 μ L de EDTA 1mM e ultra-sonicadas por 10 segundos. Um total de 20 μ L de cada homogenato foi transferido para placas de 96 poços, seguido da adição de 180 μ L da solução de reação (DTNB 75 μ M, NADPH 120 μ M, glutathiona redutase 1U/mL e EDTA 10mM em tampão fosfato 100mM, pH 7,4). A absorbância foi medida após 15 minutos, a 412nm, com um leitor de microplacas (Organon Teknika). Os valores foram expressos em percentuais, em relação ao controle.

4.11 Determinação da concentração de ATP através do método luciferin – luciferase

O método luciferin/luciferase é muito utilizado na determinação da concentração de ATP em amostras biológicas. Foi inicialmente desenvolvido por Strehler & Totter (1954) e adaptado por Fromme *et al.* (1987). O primeiro passo da reação consiste na ativação da enzima luciferase pela ligação no ATP, na presença de MgCl₂. O ATP é hidrolisado a AMP, que permanece ligado à luciferin e ao pirofosfato (PPi). Esse complexo reage subseqüentemente com O₂, resultando na emissão de um feixe de luz ($h\nu$), na liberação de AMP, CO₂ e oxiluciferin (DELUCA, 1976). A quantidade de luz emitida é naturalmente proporcional à quantidade inicial

de ATP existente no meio de reação, o qual foi medido da seguinte forma: em uma cubeta de plástico, adicionou-se o tampão luciferin/luciferase; em seguida, adicionou-se, ao tampão, a solução contendo luciferin/luciferase; misturou-se cuidadosamente; a cubeta foi colocada no luminômetro para a medida do sinal de fundo, o qual foi medido através de um registrador previamente calibrado; tendo o sinal de fundo registrado, a amostra foi adicionada e então foi realizada uma segunda leitura, na qual o sinal da amostra foi adicionado ao sinal 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 (FROMME *et al.*, 1987).

4.12 Análise da inibição de adesão celular pelo método do cristal violeta

A inibição de moléculas de adesão celular pode desestabilizar alguns tumores potencialmente metastáticos (JOHNSON, 1999). Para avaliar o potencial inibitório dessas moléculas de adesão, foi utilizado o método colorimétrico proposto por Amarante-Mendes, 1994. As células B16-F10, 2×10^5 , foram incubadas com 25, 50, 75, 100 μM dos compostos, e mantidas por 24 horas, a 37°C , com 5% de CO_2 , em estufa umidificada. Após esse período, retirou-se o sobrenadante e adicionou-se 200 μL de glutaraldeído 0,2%. A placa com as células aderidas ficou uma noite sob refrigeração e, após, as mesmas foram lavadas duas vezes com PBS. Adicionou-se 100 μL de cristal violeta e manteve-se em estufa a 37°C , por 30 minutos. Em seguida, lavou-se em água corrente e eluiu-se com 100 μL de metanol. A leitura foi realizada em 620nm.

4.13 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

t de Bonferroni; para comparação da viabilidade celular, entre as linhagens B16-F10 e Vero, foi utilizado o teste *t Student*, um valor de $P < 0,05$ foi considerado estatisticamente significativo.

4.14 Desenho experimental

Neste trabalho, foram estudados os efeitos citotóxicos das chalconas derivadas do 3,4-metilenodioxibenzaldeído, da 2,4,6 trimetoxiacetofenona e das hidroxichalconas, por meio do ensaio de viabilidade celular (teste do MTT). Os compostos que apresentaram citotoxicidade estatisticamente significativa foram avaliados quanto à toxicidade em células não-tumorais (linhagem Vero) e quanto à forma de morte celular, pela técnica de fragmentação nuclear. Os compostos que não foram significativamente tóxicos para as células Vero e induziram a morte celular por apoptose das células de melanoma, foram avaliados quanto à atividade dependente de concentração e quanto à produção de espécies reativas de oxigênio, através da inibição desses compostos associados a antioxidantes e através da microscopia de fluorescência. Foram avaliados quanto à possibilidade da indução de depleção de glutathione total citosólica e glutathione total mitocondrial, de possível depleção de ATP intracelular e da possibilidade da inibição de moléculas de adesão celular (Figura 7).

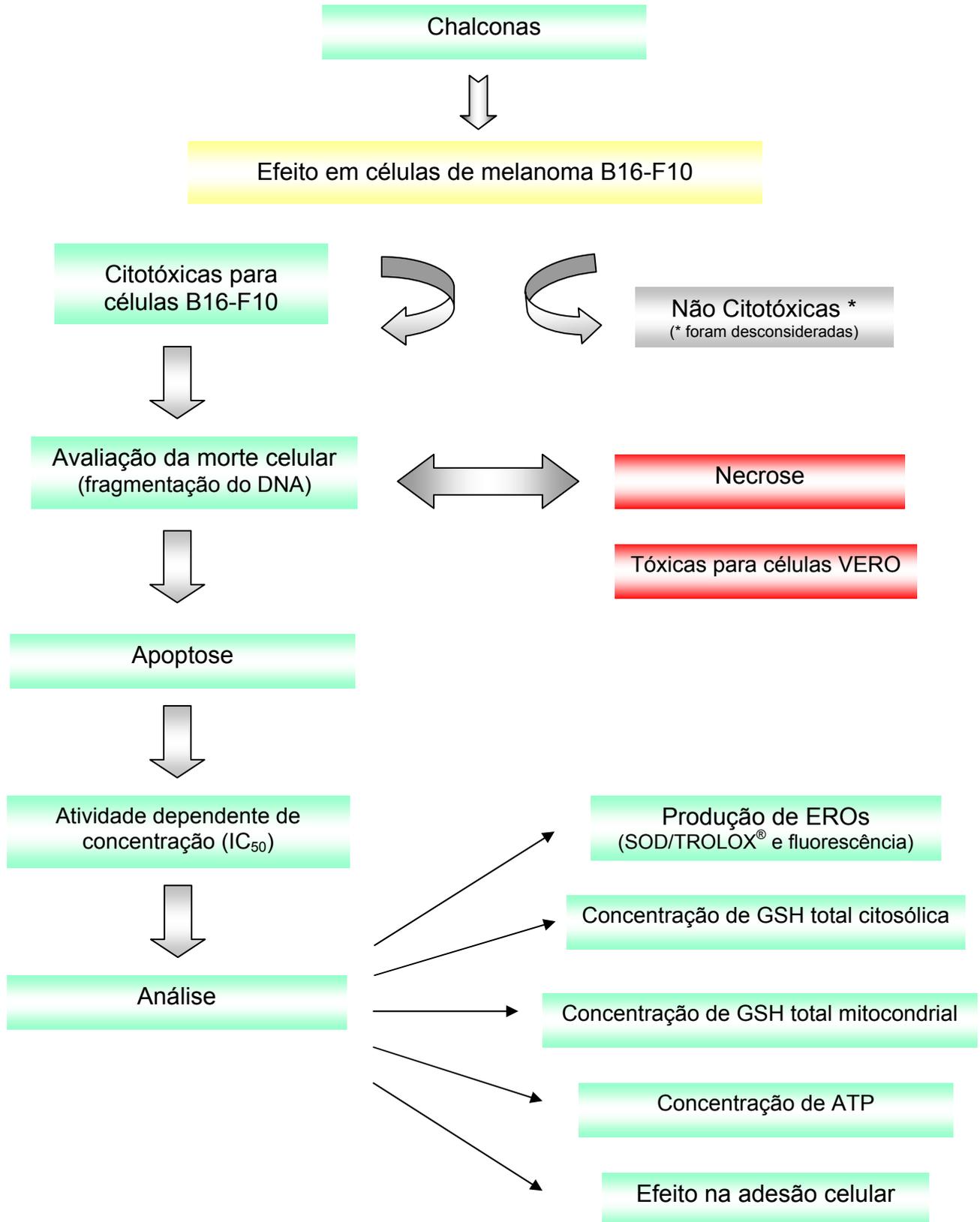


Figura 7: Desenho experimental

5. RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.1 Síntese das chalconas

5.1.1 Chalconas derivadas do 3,4-metilenodioxibenzaldeído

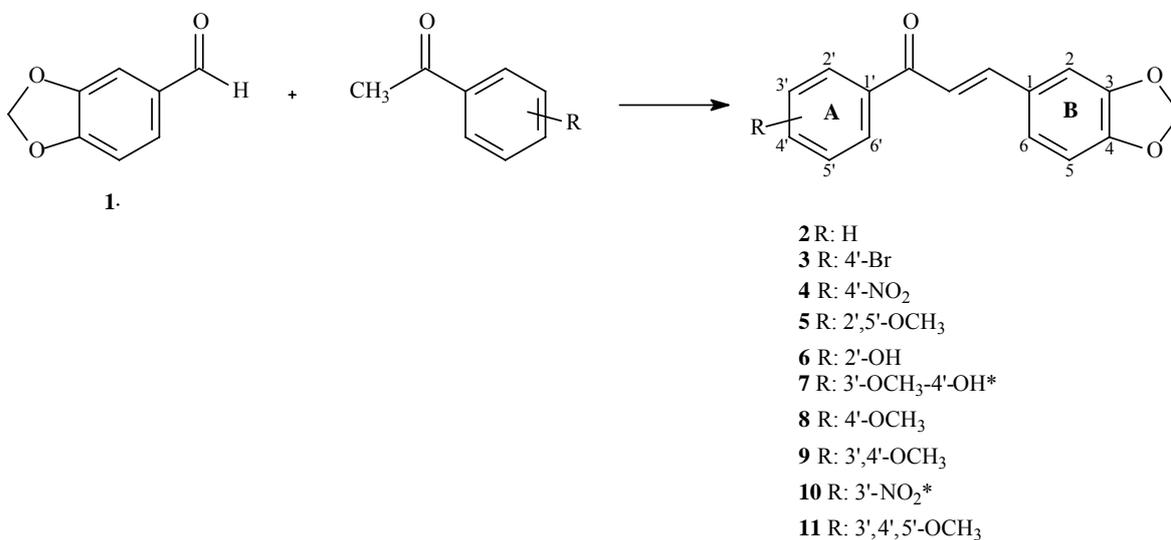


Figura 08: Reação da síntese das chalconas derivadas do 3,4-metilenodioxibenzaldeído. (*novos compostos).

5.1.2 Chalconas derivadas da 2,4,6-trimetoxiacetofenona

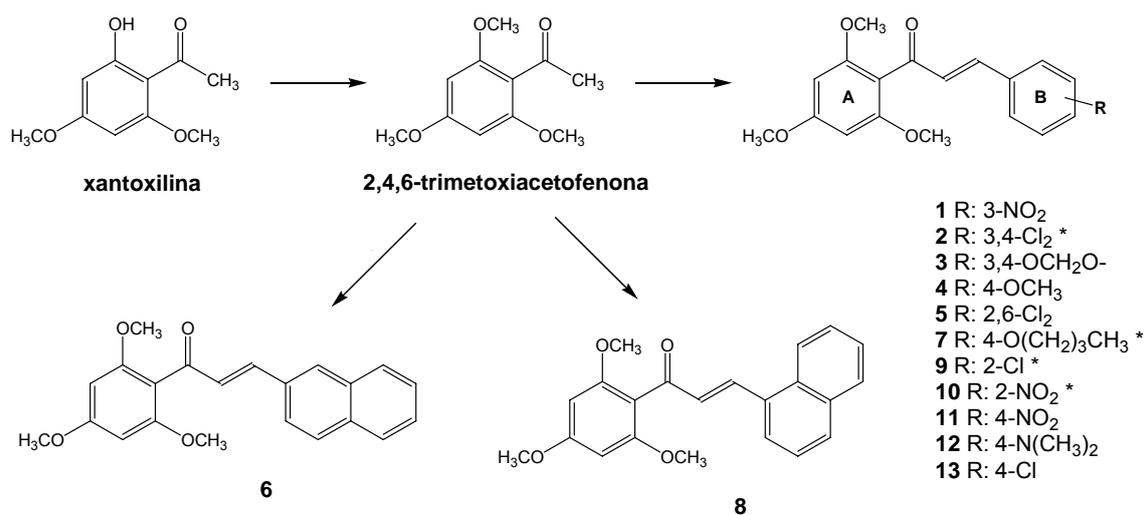


Figura 09: Reação da síntese das chalconas derivadas da 2,4,6-trimetoxiacetofenona. (*novos compostos).

5.1.3 Chalconas hidroxiladas

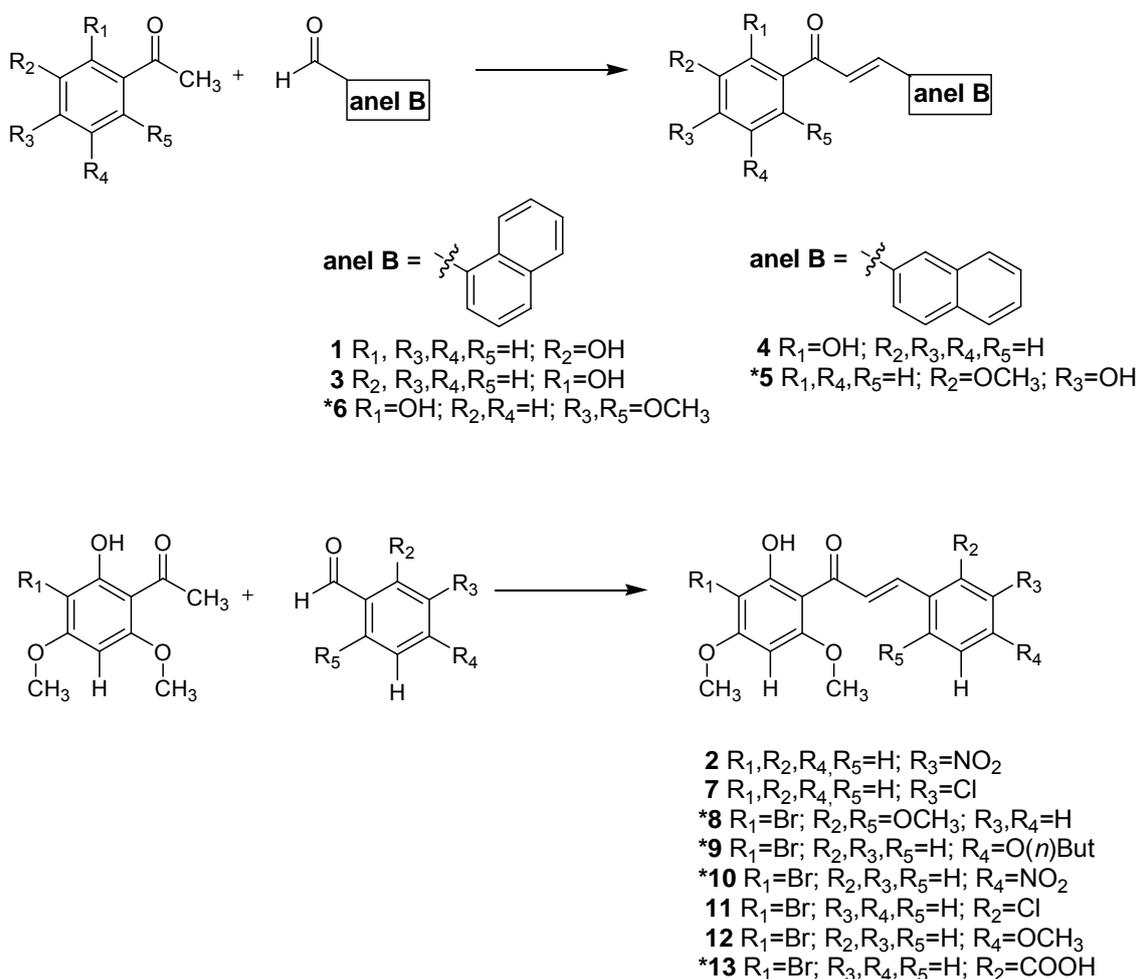


Figura 10: Reação da síntese das hidroxichalconas. (*novos compostos).

5.2 Citotoxicidade das chalconas em células tumorais, células não-tumorais e análise do DNA

Apesar de recentes avanços no conhecimento dos processos biológicos responsáveis pelo surgimento do câncer, ainda não se conhecem os mecanismos de citotoxicidade contra várias linhagens celulares tumorais humanas. Considerando o potencial citotóxico de muitos produtos naturais, a síntese de compostos baseados no núcleo básico chalcona pode ser uma estratégia promissora no desenvolvimento de fármacos antitumorais.

Em busca de novas chalconas com atividade citotóxica para células de melanoma B16-F10, realizou-se uma triagem com as chalconas derivadas do 3,4-metilenodioxibenzaldeído e da 2,4,6-trimetoxiacetofenona e com as chalconas hidroxiladas (hidroxichalconas), na concentração de 100 μ M (Figuras 11, 14, 17). Em cada experimento efetuou-se um controle apenas com o DMSO, nas mesmas concentrações utilizadas para dissolver os compostos. Esses resultados não foram significativamente diferentes do controle das células sem tratamento (dados não mostrados). Dessa forma, está representado nos gráficos apenas o controle das células (sem tratamento).

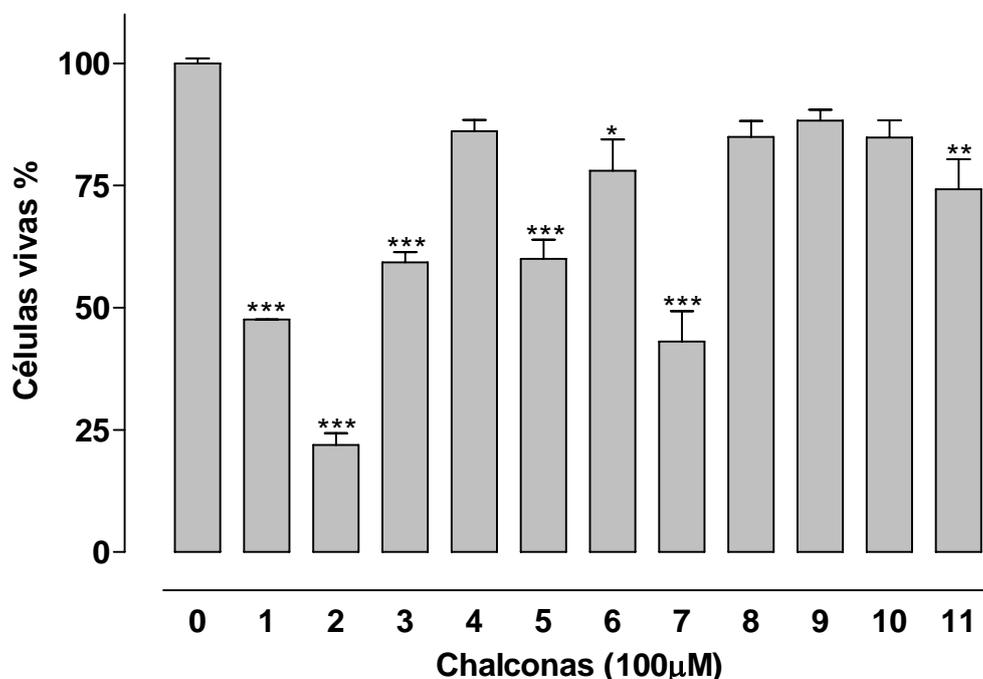


Figura 11: Efeito citotóxico das chalconas derivadas do 3,4-metilenodioxibenzaldeído em células B16-F10. As células, 1×10^5 , foram incubadas com as chalconas, por 24h, e a viabilidade celular foi avaliada pelo método do MTT. A densidade óptica do grupo controle (0, células sem tratamento) foi considerada como 100% de viabilidade celular. Cada ponto representa a média \pm E.P.M. (n=3). Um valor de * $P < 0,05$, ** $P < 0,01$ e *** $P < 0,001$ foi considerado estatisticamente significativo quando comparado com o controle, usando ANOVA, seguido de teste *t* de Bonferroni.

Dentre as chalconas derivadas do 3,4-metilenodioxibenzaldeído, as que apresentaram efeito citotóxico relevante foram as de número 1, 2 e 7, diminuindo a viabilidade celular em $52 \pm 0,03\%$; $78 \pm 2,4\%$ e $57 \pm 6,2\%$, respectivamente, pelo

teste do MTT. As chalconas **3, 5, 6 e 11** reduziram a viabilidade celular em $41 \pm 2,1\%$; $40 \pm 3,9\%$; $22 \pm 6,4$ e $26 \pm 6,2$, e os resultados, quando comparados ao controle, também foram considerados estatisticamente significativos. As chalconas **4, 8, 9 e 10** não apresentaram efeito citotóxico significativo (Figura 11).

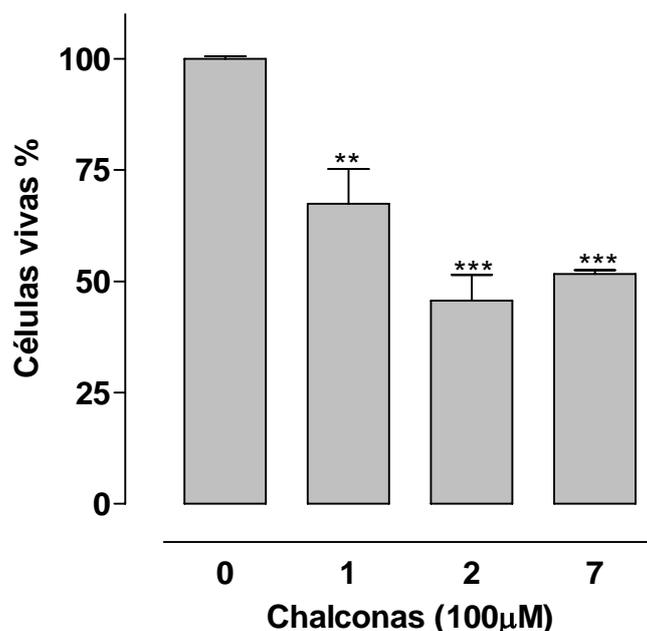


Figura 12: Efeito citotóxico das chalconas derivadas do 3,4-metilenodioxibenzaldeído em células VERO (não-tumorais). As células, 1×10^5 , foram incubadas com as chalconas, por 24h, e a viabilidade celular foi avaliada pelo método do MTT. A densidade óptica do grupo controle (0, células sem tratamento) foi considerada como 100% de viabilidade celular. Os ensaios foram realizados em triplicata e cada ponto representa a média \pm E.P.M. ($n=3$). Um valor de $**P<0,01$ e $***P<0,001$ foi considerado estatisticamente significativo quando comparado com o controle, usando ANOVA, seguido de teste t de Bonferroni.

Tabela 1: Comparação da viabilidade das células B16-F10 e das células Vero tratadas com chalconas derivadas do 3,4-metilenodioxibenzaldeído.

Chalconas (3,4-metilenodioxibenzaldeído)	B16-F10 (% viabilidade celular)	Vero (% viabilidade celular)	valor p
1	$48 \pm 0,03$	$67 \pm 5,8$	Ns
2	$22 \pm 2,4$	$46 \pm 5,7$	= 0,008
7	$43 \pm 6,2$	$52 \pm 0,9$	Ns

* O valor de P foi determinado usando o Student t test. Valores não significativos = ns.

Motivados pela atividade citotóxica das chalconas **1**, **2** e **7** nas células B16-F10, estes compostos foram selecionados para darmos continuidade à pesquisa.

Considerando que um fármaco antineoplásico deve ter como alvo principal a célula tumoral, devendo proporcionar pouca ou nenhuma toxicidade às células normais, testamos a ação das chalconas escolhidas em células não-tumorais Vero, que consiste na linhagem celular estável de rim de macaco, recomendada para a investigação de compostos químicos tóxicos *in vitro* (LABRADOR *et al.*, 2007). Os compostos **1**, **2** e **7** reduziram a viabilidade das células Vero em $33 \pm 5,8\%$; $54 \pm 5,7\%$ e $48 \pm 0,9\%$, respectivamente (Figura 12). Comparando a toxicidade desses compostos, pode-se perceber que os mesmos foram menos tóxicos para as células Vero do que para as células de melanoma B16-F10 (Tabela 1).

Além da menor toxicidade para as células não-tumorais, são desejáveis fármacos antitumorais capazes de inibir a proliferação e induzir a morte celular por apoptose (JUN *et al.*, 2007). O processo apoptótico envolve a participação ativa das células afetadas na cascata de autodestruição, que culmina em desintegração nuclear, degradação do DNA e formação de “corpos apoptóticos”, os quais são rapidamente retirados do tecido por macrófagos (WYLLIE *et al.*, 1980; WYLLIE, 1985; ARENDS *et al.*, 1990). A apoptose acontece sem causar reação inflamatória, ao contrário da necrose que ocorre geralmente em resposta à injúria severa às células, sendo esta caracterizada morfológicamente por inchaço citoplasmático e mitocondrial, pela ruptura da membrana plasmática e por liberação do conteúdo extracelular. Conseqüentemente, ocorre a geração de uma resposta inflamatória, que pode causar lesão e até morte de células vizinhas. Nessas condições, células, em quantidade significativa, são prejudicadas ao mesmo tempo.

Devido ao desencadeamento do processo inflamatório, há alterações irreversíveis no tecido e/ou órgão afetado (CURTIN *et al.*, 2002).

A fim de saber se esses compostos causavam apoptose ou necrose, foi realizada uma eletroforese em gel de agarose, em que se verificou que as chalconas **1**, **2** e **7**, na concentração de $100\mu\text{M}$, não fragmentaram o DNA das células B16-F10. Isso indica que a morte celular foi induzida por necrose (Figura 13).

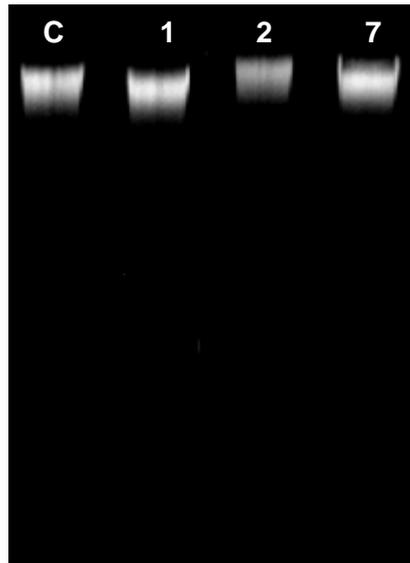


Figura 13: Necrose induzida por chalconas derivadas do 3,4-metilenodioxibenzaldeído em células B16-F10. As células, 5×10^5 , foram incubadas com os compostos 1, 2 e 7, por 24h, na concentração de $100\mu\text{M}$, representados na figura com os respectivos números e por C - controle, (células sem tratamento). Os extratos nucleares foram obtidos e o DNA foi analisado por eletroforese em gel de agarose 1%, corado pelo brometo de etídio, como descrito nos materiais e métodos.

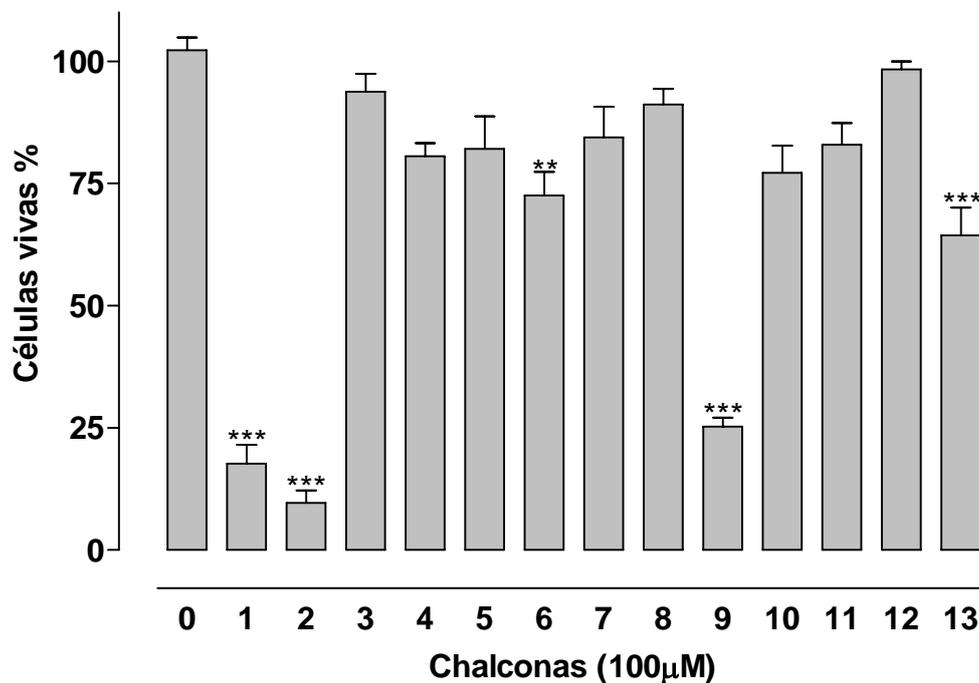


Figura 14: Efeito citotóxico das chalconas derivadas da 2,4,6-trimetoxiacetofenona em células B16-F10. As células, 1×10^5 , foram incubadas com as chalconas, por 24h, e a viabilidade celular foi avaliada pelo método do MTT. A densidade óptica do grupo controle (0, células sem tratamento) foi considerada como 100% de viabilidade celular. Cada ponto representa a média \pm E.P.M. ($n=3$). Um valor de $**P<0,01$ e $***P<0,001$ foi considerado estatisticamente significativo quando comparado com o controle, usando ANOVA, seguido de teste t de Bonferroni.

Com a intenção de se encontrar um composto com maior potencial antitumoral do que os anteriormente testados, e ao mesmo tempo menos citotóxico para as células normais, procurou-se investigar outras chalconas que atendessem a esses requisitos. Foi investigado o grupo de chalconas derivadas da 2,4,6-trimetoxiacetofenona. Dentre estas, algumas chalconas apresentaram pronunciado efeito citotóxico. As chalconas de número **1**, **2** e **9** diminuíram a viabilidade celular em $82 \pm 3,8\%$; $90 \pm 2,5\%$ e $75 \pm 1,9\%$, respectivamente. A chalcona **6** e a **13** apresentaram uma menor citotoxicidade do que as chalconas anteriormente citadas: $27 \pm 4,7\%$ e $36 \pm 5,7\%$, respectivamente. Portanto, também foram consideradas significativamente citotóxicas, ao passo que as chalconas **3**, **4**, **5**, **7**, **8**, **10**, **11** e **12** não apresentam efeito citotóxico relevante (Figura 14).

Considerando a atividade citotóxica dos compostos **1**, **2** e **9**, estes foram escolhidos para analisar o possível dano ao DNA que viessem causar, através de eletroforese em gel de agarose. Verificou-se que tais compostos fragmentaram o DNA das células B16-F10, através do aparecimento de bandas características, que confirmaram a morte celular por apoptose (Figura 15).

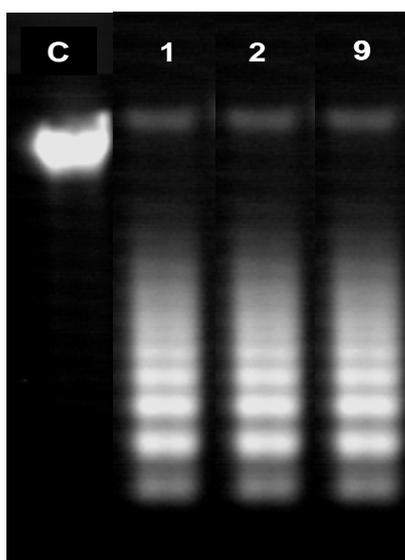


Figura 15: Fragmentação do DNA induzida por chalconas derivadas da 2,4,6-trimetoxiacetofenona em células B16-F10. As células, 5×10^5 , foram incubadas com os compostos **1**, **2**, e **9**, por 24h, na concentração de $100\mu\text{M}$, sendo representados na figura pelos respectivos números e por C - controle (células sem tratamento). Os extratos nucleares foram obtidos e a fragmentação do DNA foi analisada por eletroforese em gel de agarose 1,0%, corado pelo brometo de etídio, como descrito nos materiais e métodos.

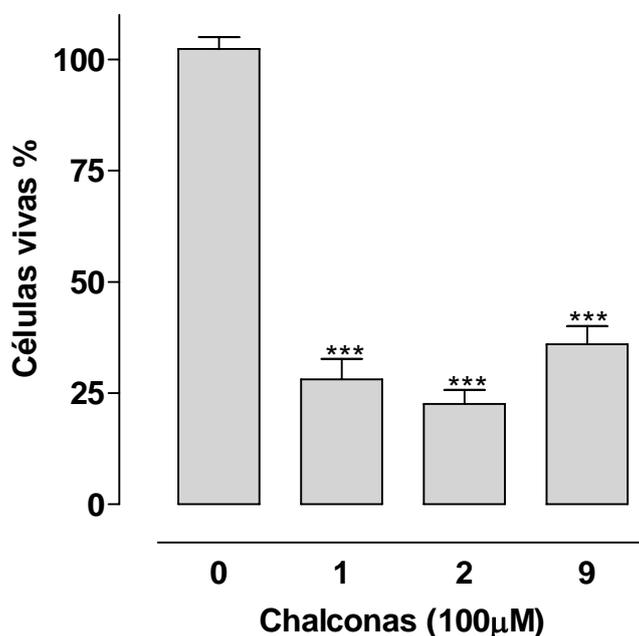


Figura 16: Efeito citotóxico das chalconas derivadas da 2,4,6-trimetoxiacetofenona em células VERO (não tumorais). As células, 1×10^5 , foram incubadas com as chalconas, por 24h, e a viabilidade celular foi avaliada pelo método do MTT. A densidade óptica do grupo controle (0, células sem tratamento) foi considerada como 100% de viabilidade celular. Cada ponto representa a média \pm E.P.M. (n=3). Um valor de $***P < 0,001$ foi considerado estatisticamente significativo, quando comparado com o controle, usando ANOVA, seguido de teste *t* de Bonferroni.

Tabela 2: Comparação da viabilidade das células B16-F10 e células VERO tratadas com chalconas derivadas da 2,4,6 trimetoxiacetofenona.

Chalconas (2,4,6 trimetoxiaceofenona)	B16-F10 (% viabilidade celular)	Vero (% viabilidade celular)	valor p
1	18 \pm 3,8	28 \pm 4,6	Ns
2	10 \pm 2,5	22 \pm 3,1	Ns
9	25 \pm 1,9	36 \pm 4,1	Ns

* O valor de P foi determinado usando o Student *t* test. Valores não significativos = ns.

Com o objetivo de verificar a ação dos compostos estudados em células não tumorais, testamos as chalconas derivadas 2,4,6-trimetoxiacetofenona em células Vero. Na figura 16 é possível observar a toxicidade dos compostos 1, 2 e 9 sobre as células Vero. A porcentagem de morte celular foi de 72 \pm 4,6 %; 78 \pm 3,1 e 64 \pm 4,1%, respectivamente, se comparada ao controle (100% de células viáveis).

Comparando a viabilidade celular das B16-F10 e das células Vero tratadas com as chalconas **1**, **2** e **9**, é possível verificar que a diferença não é significativa (Tabela 2).

Como a maioria dos fármacos disponíveis atualmente para o tratamento do câncer é tóxica para células normais, e considerando também a toxicidade demonstrada pelas chalconas **1**, **2** e **9** para células não-tumorais, conclui-se que estes compostos apontam para a inviabilidade da continuidade das pesquisas com os mesmos.

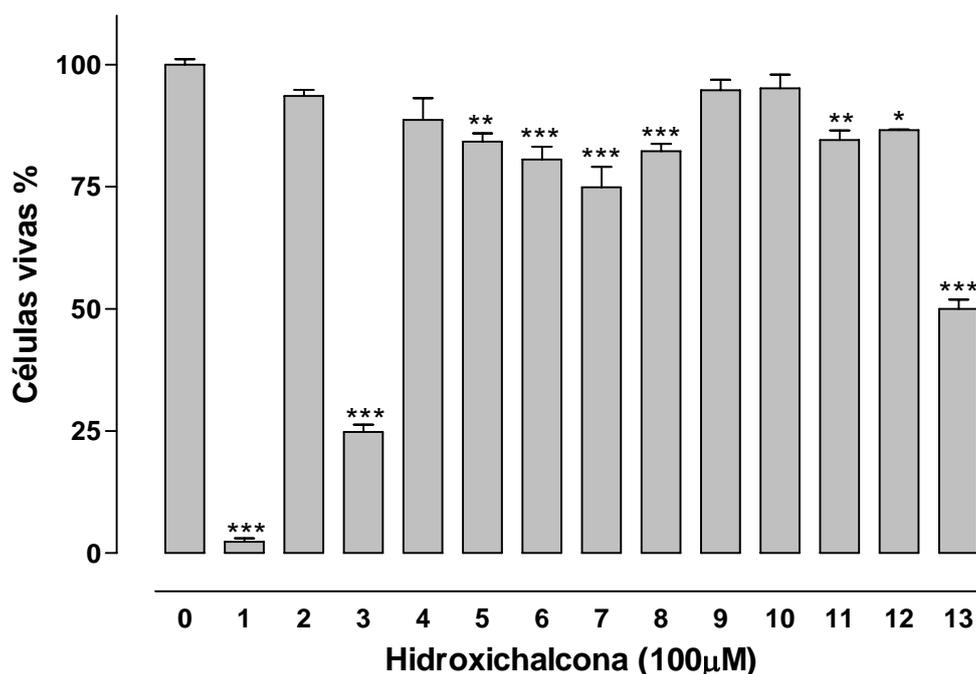


Figura 17: Efeito citotóxico das hidroxichalconas em células B16-F10. As células, 1×10^5 , foram incubadas com as hidroxichalconas, por 24h, e a viabilidade celular foi avaliada pelo método do MTT. A densidade óptica do grupo controle (0, células sem tratamento) foi considerada como 100% de viabilidade celular. Cada ponto representa a média \pm E.P.M. (n=3). Um valor de *P<0,05, **P<0,01 e ***P<0,001 foi considerado estatisticamente significativo quando comparado com o controle, usando ANOVA, seguido de teste *t* de Bonferroni.

Na busca por compostos mais efetivos e menos citotóxicos para as células não-tumorais, as hidroxichalconas foram testadas em células B16-F10 e em células Vero. As hidroxichalconas que apresentaram maiores efeitos citotóxicos, nas células B16-F10, foram as de número **1**, **3** e **13**, reduzindo a viabilidade celular em $98 \pm 0,7\%$, $75 \pm 1,5\%$ e $50 \pm 1,9\%$, respectivamente. As hidroxichalconas **5**, **6**, **7**, **8**, **11** e **12** reduziram a viabilidade celular em $16 \pm 1,7\%$; $19 \pm 2,6\%$; $25 \pm 4,2\%$; $18 \pm 1,5$; 15

$\pm 2\%$ e $13 \pm 0,13$, respectivamente (Figura 17). As demais hidroxichalconas apresentaram baixa ou nenhuma atividade citotóxica para essa linhagem celular.

Sabzevari *et al.* (2004) observaram a importância da presença do grupo hidroxila no anel-A e/ou no anel B das chalconas para a citotoxicidade destas e descreveram que uma maior quantidade de hidroxilas no anel-A tende a diminuir o efeito citotóxico destes compostos. As hidroxichalconas testadas nos experimentos realizados apresentam uma hidroxila no anel-A, característica que indica ser responsável pela maior citotoxicidade das hidroxichalconas **1**, **3** e **13**. Dimmock *et al.* (1999) também descreveram que a introdução de grupos hidroxilas na estrutura das chalconas aumenta o efeito citotóxico. Porém, esta atividade pode ser regulada pela configuração da molécula, como pode ser observado nos anéis A e B das hidroxichalconas **4** e **5**. O mesmo fato é observado com a chalcona **6**, quando a presença do grupo metóxi, na posição 5, pode mudar a conformação da molécula. Isso também pode explicar a falta de significativa atividade das chalconas hidroxiladas **2**, **7**, **8**, **9**, **10**, **11** e **12** (Figura17).

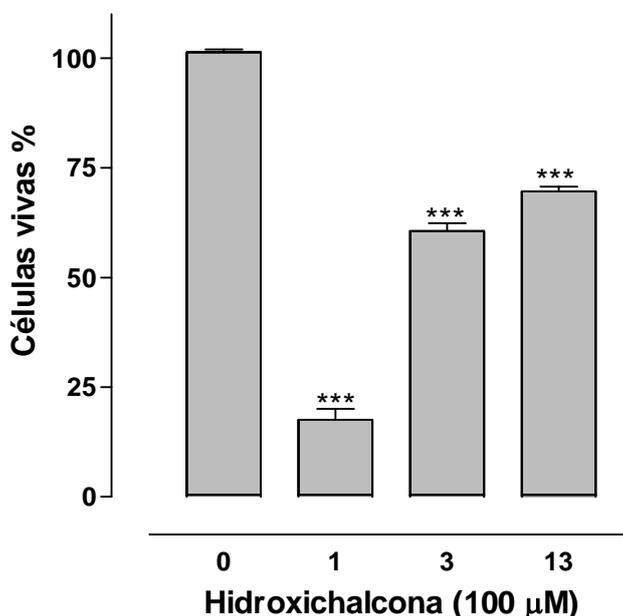


Figura 18: Efeito citotóxico das hidroxichalconas em células VERO (não tumorais). As células, 1×10^5 , foram incubadas com as hidroxichalconas, por 24h, e a viabilidade celular foi avaliada pelo método do MTT. A densidade óptica do grupo controle (0, células sem tratamento) foi considerada como 100% de viabilidade celular. Cada ponto representa a média \pm E.P.M. (n=3). Um valor de $***P < 0,001$ foi considerado estatisticamente significativo, quando comparado com o controle, usando ANOVA, seguido de teste *t* de Bonferroni.

Na figura 18, é possível observar a toxicidade das hidroxichalconas **1**, **3**, e **13** sobre as células Vero. A porcentagem de morte celular foi de $82 \pm 2,5\%$; $39 \pm 1,8\%$ e $30 \pm 1,0\%$, respectivamente, comparada com o grupo controle (100% de células viáveis). A viabilidade das células Vero foi significativamente maior que a das células de melanoma, mostrando que a morte das células tumorais, induzida pelas hidroxichalconas, foi mais evidente (Tabela 3), e o valor de P foi extremamente significativo.

Tabela 3: Comparação da viabilidade das células B16-F10 e das células VERO tratadas com hidroxichalconas.

Hidroxichalconas	B16-F10 (% viabilidade celular)	Vero (% viabilidade celular)	valor p
1	$2 \pm 0,7$	$18 \pm 2,5$	< 0.0003
3	$25 \pm 1,5$	$61 \pm 1,8$	< 0.0001
13	$50 \pm 1,9$	$70 \pm 1,0$	< 0.0001

O valor de P foi determinado usando o Student *t* test.

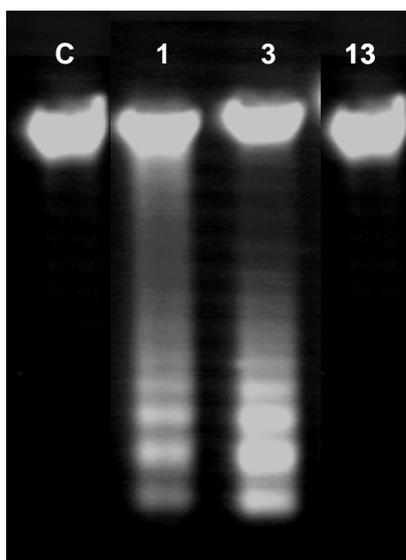


Figura 19: Fragmentação do DNA induzida por hidroxichalconas em células B16-F10. As células, 5×10^5 , foram incubadas com os compostos **1**, **3** e **13**, por 24h, nas respectivas IC_{50} de $57\mu\text{M}$, $63\mu\text{M}$ e $123\mu\text{M}$, sendo representados na figura pelos respectivos números e por C - controle (células sem tratamento). Os extratos nucleares foram obtidos e a fragmentação do DNA foi analisada por eletroforese em gel de agarose 1,0%, corado pelo brometo de etídio, como descrito nos materiais e métodos.

Devido à atividade citotóxica das hidroxichalconas **1**, **3** e **13**, nas células B16-F10, e a menor toxicidade nas células não tumorais, prosseguimos com a análise do DNA, através da eletroforese em gel de agarose. Verificamos que as hidroxichalconas **1** e **3** causaram fragmentação do DNA das células B16-F10, com o surgimento de bandas características da morte celular por apoptose, enquanto que a hidroxichalcona **13** não fragmentou o DNA, o que caracteriza a morte celular por necrose (Figura 19). A principal característica da apoptose é a fragmentação do DNA por DNases que atacam as regiões de ligação da dupla fita de DNA, ocorrendo a clivagem internucleossomal e a conseqüente formação de fragmentos de 180-200 pares de base (WYLLIE, 1980).

Apoptose ou morte celular programada é um mecanismo que controla a proliferação celular (GHOBRIAL *et al.*, 2005). Estudos citam as chalconas hidroxiladas como indutoras de apoptose em várias linhagens celulares. Kobori *et al.* (1999) descreveram a morte celular por apoptose de células de melanoma murino B16-4A5 e de leucemia humana HL-60, induzidas pela 2',4',6',4'-tetrahidroxidihidrochalcona (floreína). Iwashita *et al.* (2000) demonstraram que a isoliquiritigenina (2',4',4'-trihidroxichalcona) e a buteína (2',4',3,4'-tetrahidroxichalcona) inibiram, de forma evidente, a proliferação celular e induziram células de melanoma B16-4A5 à apoptose. A indução da apoptose em células tumorais metastáticas, como o melanoma, é considerada uma das promissoras estratégias preventivas ou quimioterapêuticas (JUN *et al.*, 2007). Entretanto, a maioria dos trabalhos é focada em alvos específicos, não mostrando se a toxicidade ocorreu através de apoptose.

O desenvolvimento de novos fármacos para o tratamento de tumores malignos, como o melanoma, pode ser baseado na capacidade inibitória da proliferação celular desses compostos, bem como na capacidade de induzirem células à apoptose, pois a habilidade da célula maligna em evitar esta forma de morte celular é uma marca característica do câncer, e a resistência à apoptose constitui um importante problema clínico (HANAHAN & WEINBERG, 2000).

5.3 Atividade das hidroxichalconas dependente de concentração

Foi analisada a influência de diferentes concentrações das hidroxichalconas para a citotoxicidade do melanoma B16-F10, nos tempos de 24, 48 e 72 horas de incubação.

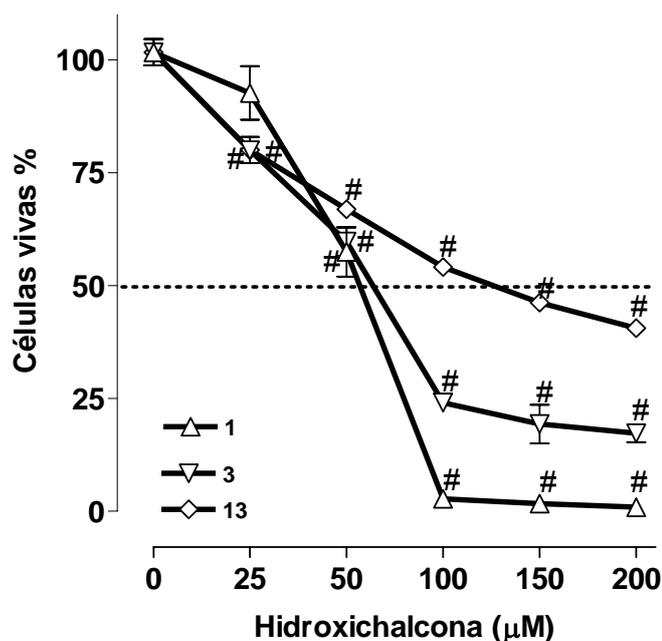


Figura 20: Atividade das hidroxichalconas dependente de concentração em células B16-F10, em 24h. Células, 1×10^5 , foram incubadas com as chalconas (0-200µM). A viabilidade celular foi avaliada pelo método do MTT. A densidade óptica do grupo controle (0, células sem tratamento) foi considerada como 100% de viabilidade celular. Cada ponto representa a média \pm E.P.M. (n=3). Um valor de $^{\#}P < 0,001$ foi considerado estatisticamente significativo, quando comparado com o controle, usando ANOVA, seguido de teste *t* de Bonferroni.

As chalconas 1, 3 e 13 causaram morte celular de maneira dependente de concentração. Os valores da IC_{50} desses compostos, em 24 horas, foram 57µM, 63µM e 123µM, respectivamente (Figura 20). Em 48 horas foram utilizadas menores concentrações das hidroxichalconas, pois o tempo de exposição a esses compostos foi maior.

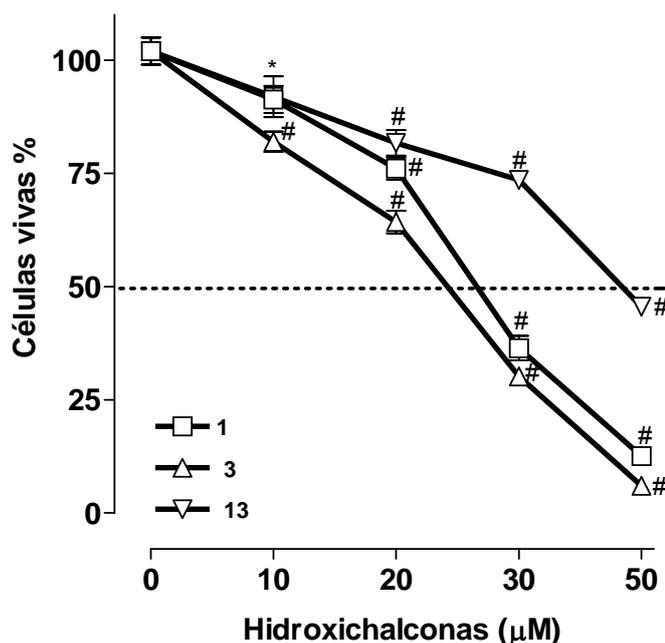


Figura 21: Atividade das hidroxichalconas dependente de concentração em células B16-F10, em 48h. Células, 2×10^4 , foram incubadas com as chalconas (0-50µM). A viabilidade celular foi avaliada pelo método do MTT. A densidade óptica do grupo controle (0, células sem tratamento) foi considerada como 100% de viabilidade celular. Cada ponto representa a média \pm E.P.M. (n=3). Um valor de *P < 0,05 e #P < 0,001 foi considerado estatisticamente significativo, quando comparado com o controle, usando ANOVA, seguido de teste *t* de Bonferroni.

Tabela 4: Valores de IC₅₀ das hidroxichalconas 1, 3 e 13 em 24, 48 e 72 horas de incubação, nas células de melanoma B16-F10.

Hidroxichalconas	IC ₅₀ (µM) 24h	IC ₅₀ (µM) 48h	IC ₅₀ (µM) 72h
1	57	30	12
3	63	28	17
13	123	50	30

Os valores das IC₅₀, das hidroxichalconas **1**, **3** e **13**, em 48 horas, foram 30µM, 28µM e 50µM, respectivamente, diminuindo aproximadamente para a metade os valores das IC₅₀ obtidos em 24 horas (Figura 21). Em 72 horas de incubação, a atividade das hidroxichalconas dependente de concentração foi analisada, e os valores da IC₅₀ das hidroxichalconas **1**, **3** e **13** foram 12µM, 17µM e 30µM, respectivamente (Figura 22). Como observado na tabela 4, os valores das IC₅₀ em 24, 48 e 72 horas diminuíram de acordo com o tempo de incubação.

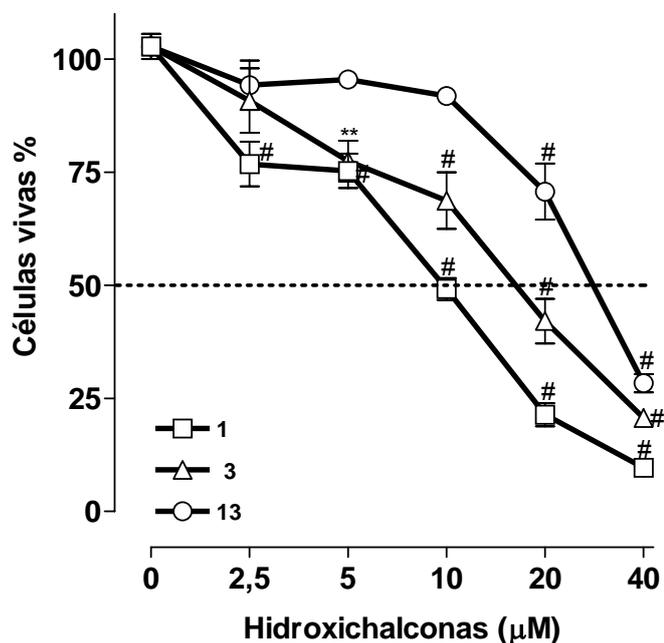


Figura 22: Atividade das hidroxichalconas dependente de concentração em células B16-F10, em 72h. Células, 1×10^4 , foram incubadas com as chalconas (0-40µM). A viabilidade celular foi avaliada pelo método do MTT. A densidade óptica do grupo controle (0, células sem tratamento) foi considerada como 100% de viabilidade celular. Cada ponto representa a média \pm E.P.M. (n=3). Um valor de **P < 0,01 e #P < 0,001 foi considerado estatisticamente significativo, quando comparado com o controle, usando ANOVA, seguido de teste t de Bonferroni.

5.4 Citotoxicidade das hidroxichalconas na presença de antioxidantes

Antes de associar a enzima SOD (superóxido dismutase) e o Trolox® (forma hidrossolúvel análoga a vitamina E) aos compostos, no tratamento das células B16-F10, estes antioxidantes foram testados em diversas concentrações, a fim de mostrar qual concentração não seria citotóxica para a B16-F10: 100, 500 e 1000 U/mL, de SOD; 25, 50, 100, 150 e 200µM, de Trolox®. A SOD, na concentração de 100U/mL, e o Trolox®, na concentração de 100µM, mostraram não alterar a viabilidade celular pelo teste do MTT (Figura 23 – A e 24 - A). Portanto, esses antioxidantes, nessas concentrações, foram associados às hidroxichalconas **1**, **3** e **13** para a verificação da suposta atividade pró-oxidante das mesmas (Figuras 23 – B, C e D e 24 – B, C e D).

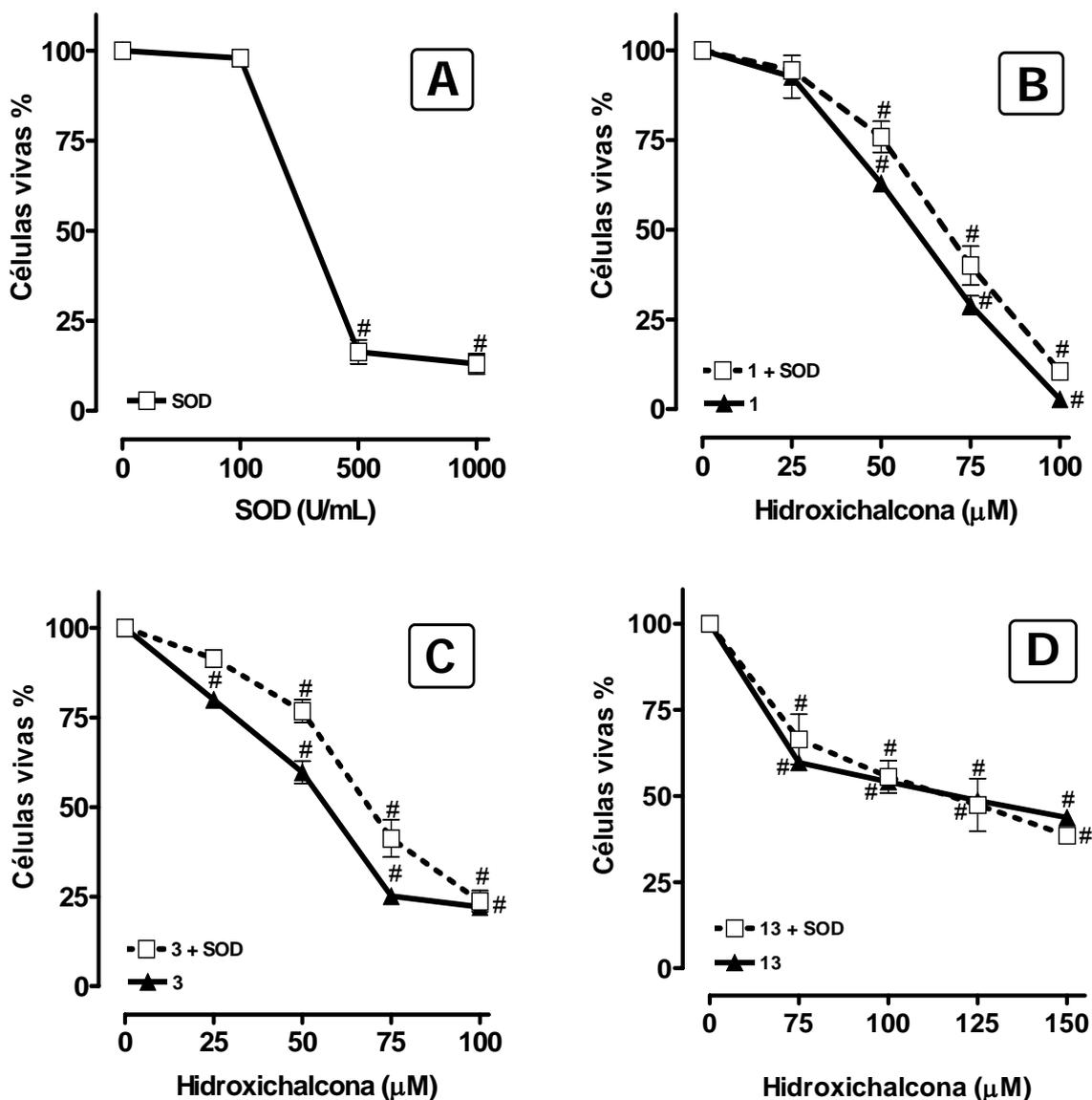


Figura 23: A – Atividade da SOD dependente de concentração em células B16-F10. Células, 1×10^5 , foram incubadas com a SOD (100, 500, 1000 u/mL) por 24h. B, C e D – Atividade das hidroxichalconas 1, 3 e 13 dependente de concentração, associadas à SOD (100U/mL) em células B16-F10. Células, 1×10^5 , foram incubadas com as hidroxichalconas 1 e 3 (0-100μM); 13 (0-150μM) por 24h. A viabilidade celular foi avaliada pelo método do MTT. A densidade óptica do grupo controle (0, células sem tratamento) foi considerada como 100% de viabilidade celular. Cada ponto representa a média \pm E.P.M. (n=3). Um valor de $^{\#}P < 0,001$ foi considerado estatisticamente significativo, quando comparado com o controle, usando ANOVA, seguido de teste *t* de Bonferroni.

As hidroxichalconas 1 e 3, quando associadas à SOD, foram menos citotóxicas para as células B16-F10 do que quando utilizadas sozinhas, pois a morte celular diminuiu significativamente. As concentrações dessas hidroxichalconas para

matar 50% das células de melanoma (IC_{50}), em 24 horas, foram de $57\mu\text{M}$ e de $63\mu\text{M}$. Após a associação com a SOD, a IC_{50} aumentou para $68\mu\text{M}$ e $68,5\mu\text{M}$, respectivamente, enquanto que a morte celular induzida pela hidroxichalcona **13** não foi afetada pela adição de SOD ao experimento, pois não alterou significativamente a IC_{50} desse composto (Tabela 5).

Tabela 5: Comparação das IC_{50} (hidroxichalconas e hidroxichalconas + SOD) em células B16-F10

Hidroxichalconas	Hidroxichalconas (IC_{50}) μM	+ SOD (IC_{50}) μM	valor p
1	57	68	< 0.0001
3	53	68.5	=0.0014
13	123	125	ns

O valor de P foi determinado usando o Student t test. Valores não significativos = ns.

Tais resultados podem sugerir a formação de espécies reativas de oxigênio (EROs), mais especificamente radicais superóxido ($O_2^{\bullet-}$), como conseqüência do tratamento das células B16-F10 com os compostos **1** e **3**. Provavelmente, a associação da SOD aos compostos foi o fator determinante na diminuição da geração de EROs e, conseqüentemente, da citotoxicidade. Vários compostos naturais podem induzir a morte celular por apoptose, em células tumorais, por aumentar a produção de EROs mitocondriais, seguida pela formação de poros na mitocôndria, tornando-a permeável, ocasionando a liberação de citocromo c (LEE *et al.*, 2001). Li *et al.* (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.

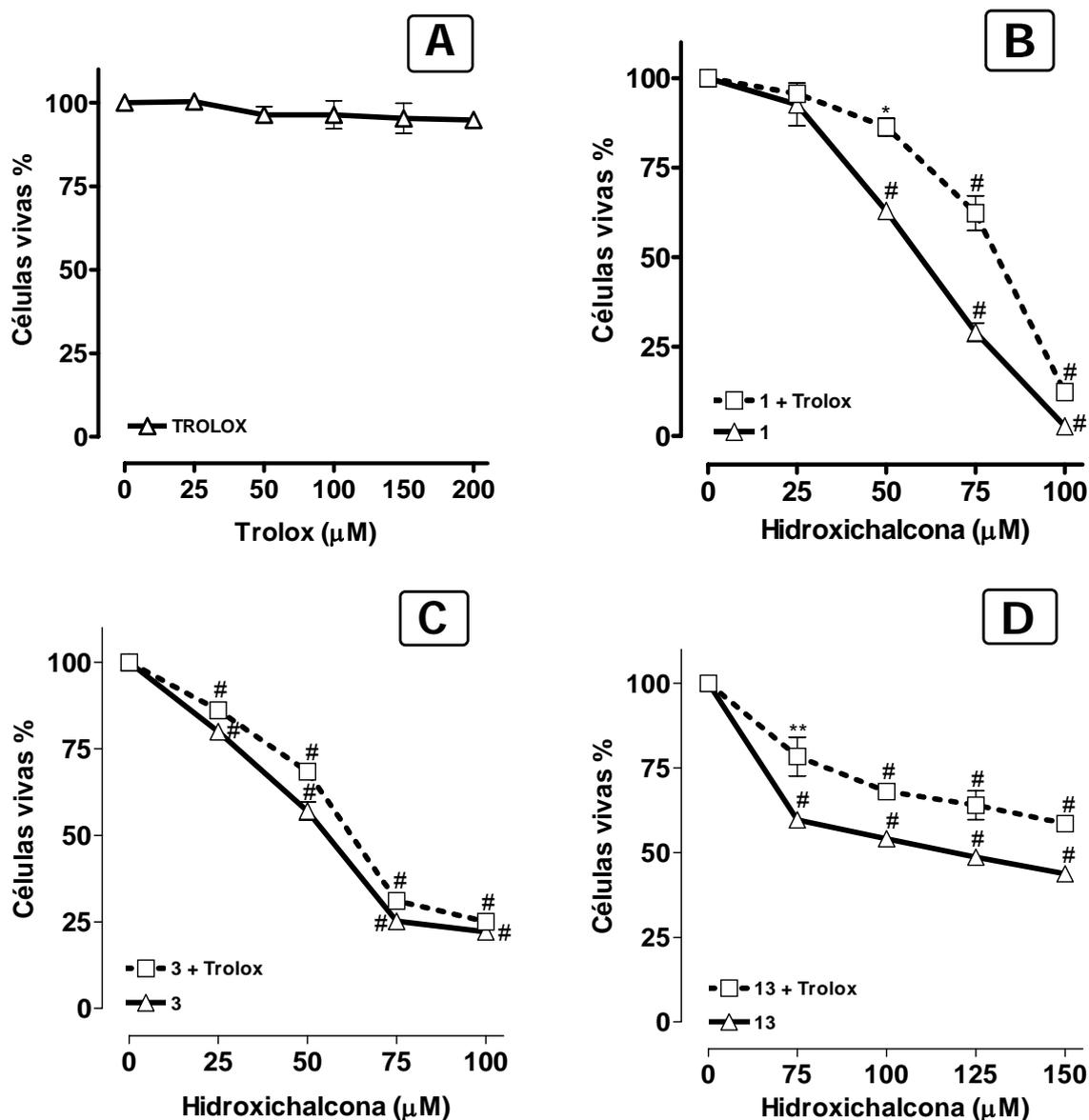


Figura 24: A – Atividade do TROLOX® dependente de concentração em células B16-F10. Células, 1×10^5 , foram incubadas com TROLOX® (0-200μM) por 24h. **B, C e D – Atividade das hidroxichalconas 1, 3 e 13 depende de concentração, associadas ao TROLOX® (100μM) em células B16-F10.** Células, 1×10^5 , foram incubadas com as hidroxichalconas 1 e 3 (0-100μM); 13 (0-150μM) por 24h. A viabilidade celular foi avaliada pelo método do MTT. A densidade óptica do grupo controle (0, células sem tratamento) foi considerada como 100% de viabilidade celular. Cada ponto representa a média \pm E.P.M. (n=3). Um valor de *P < 0,05, **P < 0,01 e #P < 0,001 foi considerado estatisticamente significativo, quando comparado com o controle, usando ANOVA, seguido de teste t de Bonferroni.

O análogo hidrossolúvel da vitamina E (Trolox®), quando associado à hidroxichalcona 1 e à hidroxichalcona 13, também reduziu a citotoxicidade desses compostos e aumentou significativamente a IC₅₀, de 57μM para 68μM e de 123μM para uma concentração maior que 150μM, respectivamente, enquanto que a

hidroxichalcona **3**, associada ao Trolox®, não foi significativamente menos citotóxica (Tabela 6).

Tabela 6: Comparação das IC₅₀ (hidroxichalconas e hidroxichalconas + TROLOX®), em células B16-F10

Hidroxichalconas	Hidroxichalconas (IC ₅₀) µM	+ Trolox (IC ₅₀) µM	valor p
1	57	83	< 0.0001
3	63	64.5	ns
13	123	>150	< 0.0001

* O valor de P foi determinado usando o Student *t* test. Valores não significativos = ns.

A vitamina E inibe a peroxidação lipídica através do seqüestro de radicais peroxil lipídicos (LO₂^{•-}); adicionalmente reage com o radical hidroxil ([•]OH), com o radical peroxil (RO₂[•]), com o radical superóxido (O₂^{•-}); provavelmente, reage com o radical hidroperoxil (HO₂[•]) (HALLIWEL, 2000); tem um efeito protetor no organismo, resultado da inibição dos radicais livres, e reduz também a citotoxicidade de alguns agentes antitumorais (GREENBERG *et al.*, 1994; SYLVESTER, 2007). Através dos resultados mostrados até aqui, podemos inferir que a associação da SOD ou do Trolox®, com as hidroxichalconas, diminuiu a toxicidade para as células de melanoma B16-F10, evidenciando a característica pró-oxidante destas moléculas.

5.5 Produção de espécies reativas de oxigênio pelas hidroxichalconas

Níveis elevados ou moderados de espécies reativas de oxigênio (EROs) são potencialmente citotóxicos e bloqueiam a proliferação celular, por induzirem a morte por apoptose e até por necrose (DREHER & JUNOD, 1996).

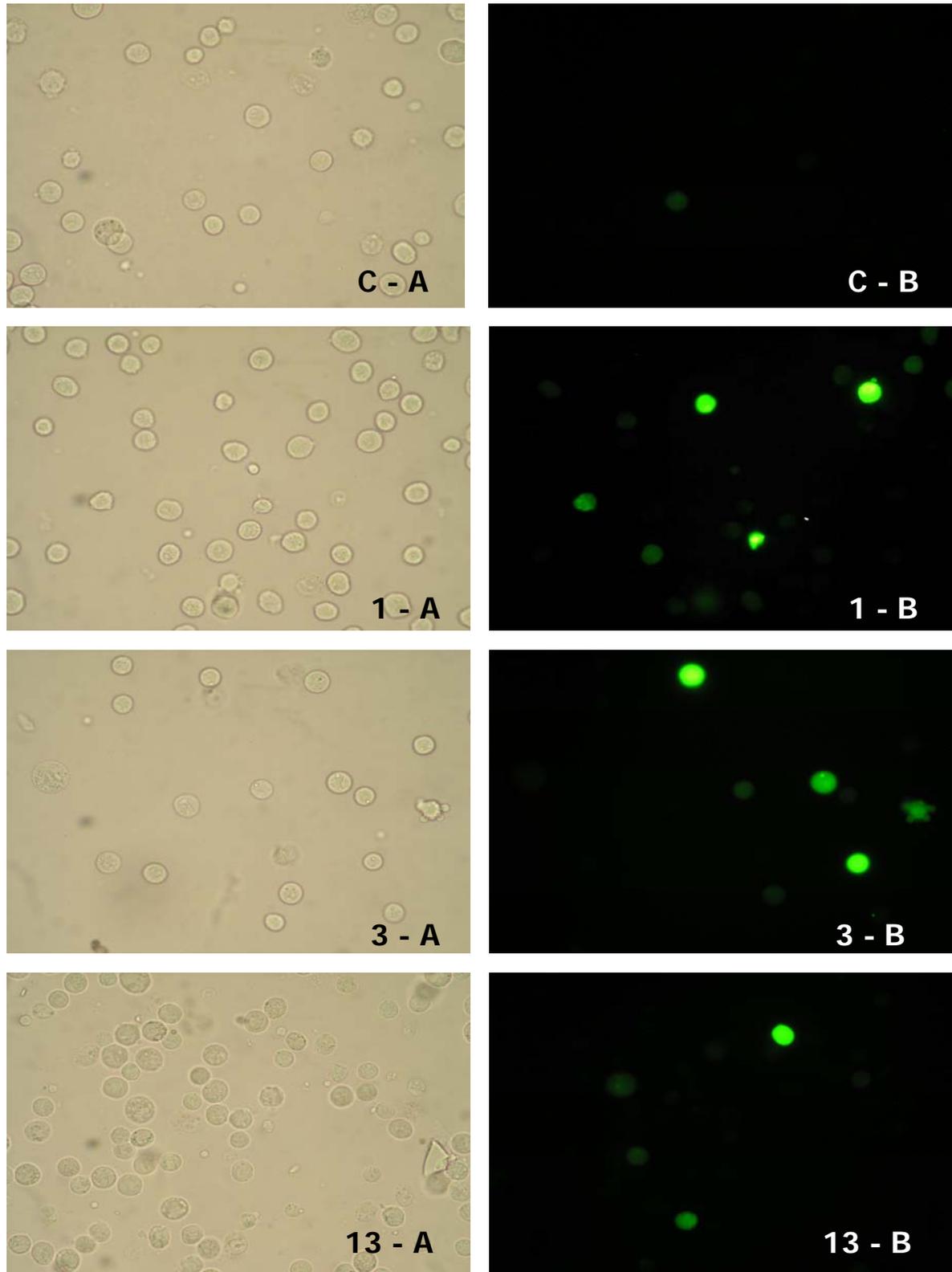


Figura 25: Avaliação da produção de espécies reativas de oxigênio pelas hidroxichalconas 1, 3 e 13, por microscopia de fluorescência. As células B16-F10, 8×10^5 , foram incubadas com as hidroxichalconas ($25\mu\text{M}$), por 5h, posteriormente foram tratadas com (DCF-DA). **C - A, células sem tratamento (microscopia óptica); C - B, células sem tratamento (microscopia de fluorescência); A - (1, 3 e 13) controle (células incubadas com DCF-DA); B - (1, 3 e 13) células tratadas com os compostos e com DCF-DA).**

A produção intracelular de EROs pelas hidroxichalconas **1**, **3** e **13** também foi avaliada pelo método da acetato diclorofluoresceína (DCFH-DA), que é transformada, no citoplasma, em diclorofluoreceína reduzida (DCFH). Na presença de espécies reativas de oxigênio, é oxidada à diclorofluoresceína (DCF), que emite fluorescência. Neste experimento não quantitativo, as EROs foram observadas mais intensamente nas células tratadas com as hidroxichalconas **1** e **3**, apresentando-se fluorescentes. Nas células tratadas com a hidroxichalcona **13**, também foram evidenciadas espécies reativas intracelularmente, comparadas ao controle (Figura 25). Esses resultados condizem com os experimentos anteriores, onde todas as hidroxichalconas parecem ter algum potencial pró-oxidante.

5.6 Concentração de glutathiona total citosólica

A glutathiona (GSH) é o mais abundante antioxidante celular dos mamíferos. 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 (LASH, 2006).

As células tumorais tendem a exibir altos níveis de GSH intracelular, possivelmente como uma resposta adaptativa ao seu metabolismo acelerado e aos seus elevados níveis de espécies reativas de oxigênio (BATIST *et al.*, 1996). Por sua vez, as células de melanoma B16-F10 também possuem uma alta concentração de glutathiona intracelular, e este fator é relacionado à resistência dessas células à quimioterapia e à radioterapia. Assim, a depleção de GSH tem sido descrita como uma potencial estratégia para a sensibilização das células tumorais (BENLLOCH *et al.*, 2005).

As chalconas têm chamado atenção de pesquisadores pelo seu potencial citotóxico e pela capacidade em depletar GSH. Sabzevari *et al.* (2004) investigaram os mecanismos citotóxicos da fletina, da isoliquiritigenina e de outras hidroxichalconas em hepatócitos isolados de ratos. Observaram que todas as chalconas testadas foram citotóxicas, e a hidroxichalcona 2',3',4'-THC foi a mais potente na depleção da GSH. Isso ocorre provavelmente pela formação de um conjugado entre as já citadas hidroxichalconas e a GSH. Como consequência, a depleção da GSH dos hepatócitos provocou um aumento significativo na

citotoxicidade dessas hidroxichalconas. Kachadourian & Day (2006) compararam a indução da depleção da glutathiona pelas hidroxichalconas e flavonas em células tumorais. As hidroxichalconas demonstraram-se mais efetivas em células epiteliais pulmonares humanas A549 e em células de leucemia humana HL-60, pois depletaram mais de 50% da GSH intracelular. Park *et al.* (2007) comprovaram, em seus experimentos, o envolvimento da depleção de GSH e a produção de EROs, induzidos por antimycina A (AMA), sobre células de adenocarcinoma cervical HeLa. Também constataram que a depleção de GSH e a produção de EROs provocam a morte celular por apoptose.

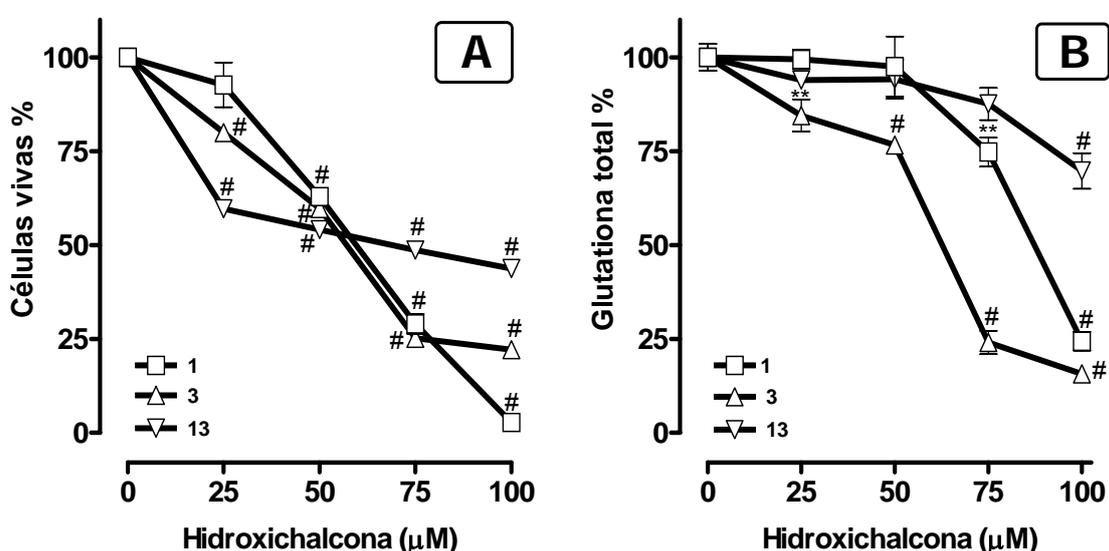


Figura 26: A – Atividade das hidroxichalconas dependente de concentração em células B16-F10. Células, 1×10^5 , foram incubadas com as chalconas (0-100µM), por 24h. A viabilidade celular foi avaliada pelo método do MTT. A densidade óptica do grupo controle (0, células sem tratamento) foi considerada como 100% de viabilidade celular. **B - Efeito das hidroxichalconas na concentração de glutathiona total citosólica em células B16-F10.** Os compostos (0-100µM) foram adicionados às células, 3×10^5 , e incubados por 24h. As células foram lisadas e os níveis de GSH foram quantificados pelo método de Tietze (1969). O controle (0, células sem tratamento) foi considerado como 100% da concentração de GSH total (GSH+GSSG). Cada ponto representa a média \pm E.P.M. (n=3). Um valor de $**P < 0,01$ e $\#P < 0,001$ foi considerado estatisticamente significativo, usando ANOVA, seguido de teste *t* de Bonferroni.

Em nosso trabalho pode-se sugerir que a morte das células B16-F10, por apoptose induzida pelas hidroxichalconas **1** e **3**, foi provocada pela produção de EROs e pela conseqüente depleção da glutathiona dessas células (Figuras 19, 23, 24, 25, 26). As hidroxichalconas **1** e **3** depletaram GSH a partir da concentração de 50µM e 25µM, respectivamente, sendo que, em 50µM e em maiores concentrações, a morte das células B16-F10, induzida pela hidroxichalcona **1**, foi muito mais

significativa do que a depleção de GSH. Igualmente, a morte celular induzida pela hidroxichalcona **3**, nas concentrações de 25 μ M e 50 μ M, foi significativamente maior do que a depleção de glutathiona (Figura 26). A hidroxichalcona **3** foi a que mais depletou GSH, um total de 50%, quando as células de melanoma B16-F10 foram tratadas com a concentração de 60.3 μ M, enquanto que a hidroxichalcona **1** depletou 50% da GSH, quando utilizada na concentração de 85,8 μ M, revelando a necessidade de uma concentração maior da hidroxichalcona **1** para a depleção de GSH. A hidroxichalcona **13** foi o composto que menos induziu a produção de espécies reativas de oxigênio, e o composto que menos depletou glutathiona intracelular, das B16-F10. Considerando que a depleção da GSH citoplasmática é uma característica de morte celular por apoptose e a hidroxichalcona **13** induziu as células de melanoma à morte, por necrose, acredita-se em outros mecanismos envolvidos na atividade citotóxica desse composto.

A única hidroxila presente no anel A das hidroxichalconas **1**, **3** e **13** é, em princípio, a responsável pela atividade desses compostos na depleção da GSH. Sabzevari *et al.* (2004) apontaram chalconas com apenas uma hidroxila no anel A como sendo mais citotóxicas do que as chalconas que apresentam hidroxila apenas no anel B. Esses radicais fenoxil das hidroxichalconas facilmente oxidam a GSH em GSSG. Outra forma de depletar GSH, quando a mesma não é oxidada, é a conjugação com chalconas, por adição à ligação α,β -insaturadas da carbonila. Porém, as concentrações das hidroxichalconas **1** e **3** para depletar a GSH foram maiores que as concentrações necessárias para causar a morte celular das células de melanoma. Isso pode indicar outros fatores envolvidos na morte celular, induzida pelas hidroxichalconas, além da depleção da GSH.

5.7 Concentração de glutathiona total mitocondrial

O maior antioxidante celular, a glutathiona, está majoritariamente localizada no citoplasma, mas uma pequena porção, 15%, encontra-se na mitocôndria (GRIFFITH & MEISTER, 1985; MEISTER, 1995).

Recentemente, tem-se associado alterações na concentração de GSH mitocondrial (GSHm) com a ativação das vias sinalizadoras e com a expressão de genes que regulam a apoptose, o crescimento e a diferenciação celular (ZAMZAMI

et al., 1996; FILOMENI, 2002). A glutationa mitocondrial tem um papel fundamental no controle da geração de espécies reativas de oxigênio e na modulação da morte celular por várias vias (GARCIA-RUIZ & FERNANDEZ-CHECA, 2006). Alterações nas concentrações de GSH e no estado redox da mitocôndria associam-se com o estresse oxidativo induzido por vários agentes oxidantes (McKERNAN *et al.* 1991; BRODIE & REED, 1992).

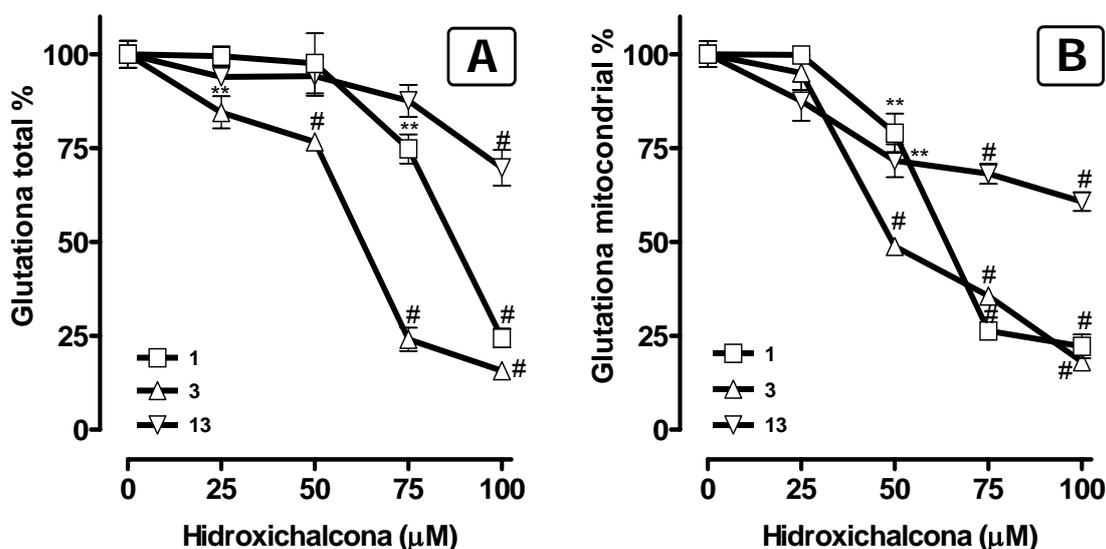


Figura 27: A - Efeito das hidroxichalconas na concentração de glutatona total citosólica em células B16-F10. Os compostos (0-100µM) foram adicionados às células, 3×10^5 , e incubados por 24h. As células foram lisadas e os níveis de GSH foram quantificados pelo método de Tietze (1969). O controle (0, células sem tratamento) foi considerado como 100% da concentração de GSH total (GSH+GSSG). **B - Efeito das hidroxichalconas na concentração de glutatona total mitocondrial em células B16-F10.** Os compostos (0-100µM) foram adicionados às células, 3×10^5 , e incubados por 24h. As mitocôndrias das células foram isoladas e lisadas. Os níveis de GSH total mitocondrial foram quantificados pelo método de Tietze (1969). Cada ponto representa a média \pm E.P.M. (n=3). Um valor de **P<0,01 e #P < 0,001 foi considerado estatisticamente significativo, usando ANOVA, seguido de teste *t* de Bonferroni.

Nos experimentos realizados, as hidroxichalconas **1** e **3** foram as que mais depletaram GSH mitocondrial (Figura 27). Se compararmos a habilidade desses compostos na formação de EROs com a depleção de GSH mitocondrial, podemos perceber que as hidroxichalconas **1** e **3**, que têm o maior efeito pró-oxidante, apresentado em experimentos anteriores, são as que mais proporcionam depleção da GSHm. Não obstante, a hidroxichalcona **13** também tem um efeito pró-oxidante, porém menor, e também depleta GSH mitocondrial.

Tabela 7: Comparação das concentrações de glutatona total citosólica (GSH) e glutatona total mitocondrial (GSHm) \pm E. P. M., em células B16-F10

[μM]	1 (%GSH)	1 (%GSHm)	3 (% GSH)	3 (%GSHm)	13 (% GSH)	13 (%GSHm)
25	99,5 \pm 2,6	99,8 \pm 1,9	84,5 \pm 4,3	95,0 \pm 4,6	94,0 \pm 2,1	87,5 \pm 5,2
50	97,6 \pm 7,9	79,0 \pm 5,2	76,6 \pm 1,7	48,8 \pm 1,3	94,1 \pm 5,2	71,61 \pm 4,4
75	74,8 \pm 3,9	26,3 \pm 1,7	24,0 \pm 3,1	35,6 \pm 0,1	87,6 \pm 4,3	68,1 \pm 2,7
100	24,4 \pm 2,5	22,2 \pm 3,1	15,7 \pm 0,5	18,1 \pm 1,1	69,7 \pm 4,8	60,8 \pm 2,5

Slater *et al.* (1995) postularam que a perda da GSH citoplasmática seria um dos eventos característicos de morte celular por apoptose, através da influência na capacidade redox tamponante da célula, tornando-a intolerante à presença de agentes oxidantes. Além disso, citaram também que pode ocorrer diminuição dos níveis de glutatona mitocondrial que afeta a produção de energia celular. Geralmente, em nossos resultados, as hidroxichalconas depletaram mais a GSH total mitocondrial que a GSH total celular (Tabela 7).

5.8 Concentração de ATP

A mitocôndria é responsável por 80% a 90% do ATP necessário para a respiração e a sobrevivência celular e tem um importante papel nos estímulos pró e anti-apoptóticos (DIAS & BAILLY, 2005). O objetivo deste experimento está baseado no interesse por agentes antitumorais que tenham capacidade de promover a morte celular por apoptose, através da depleção energética celular, tendo em vista a difícil resposta a estímulos apoptóticos das células de melanoma (KLUZA & LANSIAUX, 2002).

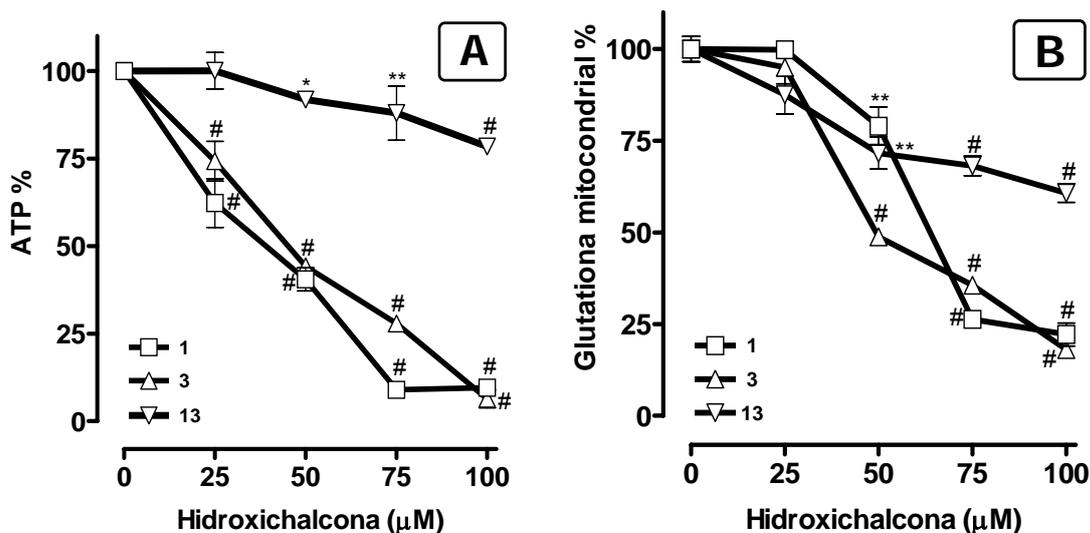


Figura 28: A - Efeito das hidroxichalconas na concentração de ATP em células B16-10. Os compostos (0-100μM) foram adicionados às células, 3×10^5 , e incubados por 24h. As células foram lisadas e os níveis de ATP foram quantificados pelo método luciferin-luciferase, conforme descrito em Materiais e Métodos. **B - Efeito das hidroxichalconas na concentração de glutatona total mitocondrial em células B16-10.** Os compostos (0-100μM) foram adicionados às células, 3×10^5 , e incubados por 24h. As mitocôndrias foram isoladas e lisadas, os níveis de GSH mitocondrial foram quantificados pelo método de Tietze (1969). Cada ponto representa a média \pm E.P.M. (n=3). Um valor de *P < 0,05, **P < 0,01 e #P < 0,001 foi considerado estatisticamente significativo, usando ANOVA, seguida de teste t de Bonferroni.

Nossos resultados demonstraram que as hidroxichalconas **1**, **3** e **13** depletaram ATP das células B16-F10, de maneira dependente de concentração. Os compostos **1** e **3** causaram depleção significativa de ATP a partir da concentração de 25μM, ao passo que a hidroxichalcona **13** depletou ATP de forma significativa apenas na concentração de 100μM (Figura 28). Sabzevari *et al.* (2004) sugerem que a citotoxicidade da floretina, da isoliquiritigenina e de outras dez chalconas hidroxiladas, testadas em leucemia K562 e em células de melanoma, seja consequência da disfunção mitocondrial induzida por estes compostos.

As hidroxichalconas **1** e **3**, evidenciadas nesse experimento pela depleção do ATP, também induziram a apoptose nas células B16-F10. A morte celular por apoptose pode ser consequência da perda gradativa de energia celular causada pelas hidroxichalconas. Skulachev (2006) mostrou as inter-relações entre processos bioenergéticos e morte celular programada, onde o mau funcionamento da mitocôndria normalmente resulta em diminuição gradual dos níveis intracelulares de ATP, dando início à apoptose. Porém, em alguns casos, pode ocorrer um aumento no potencial de membrana e na concentração de ATP no estágio inicial da morte

celular por apoptose, mas, no decorrer do processo, os níveis energéticos diminuem. Em nossos resultados não foi observado um aumento inicial dos níveis de ATP, como sugerido acima. Tal fato talvez fosse evidenciado se tivéssemos utilizado uma concentração inicial menor que 25µM. Hu *et al.* (2007) demonstraram que IN6CPPBD induz apoptose em melanoma humano, através de disfunção mitocondrial. Garland e Halestrap (1997) mostraram que a depleção de ATP intracelular, por desequilíbrio mitocondrial, induziu a morte celular por apoptose e provocou a fragmentação do DNA em células da linhagem pró-B, dependentes de interleucina-3 (IL-3).

A hidroxichalcona **13** possivelmente induziu a morte celular por necrose e, surpreendentemente, não apresentou diminuição significativa nos níveis de ATP celular. Contraditoriamente, Edinger & Thompson (2004) definem a necrose como resultado final de um amplo distúrbio energético a níveis incompatíveis com a sobrevivência celular, como resultado de estímulos exógenos que ocorrem após uma situação de estresse.

Quando se compara os níveis de ATP das células tratadas com as hidroxichalconas **1** e **3**, com a quantidade de glutathiona mitocondrial, observa-se que a depleção do ATP foi maior que a depleção da glutathiona mitocondrial. Este fato pode estar relacionado com o estresse oxidativo, disfunção mitocondrial e diminuição da síntese de ATP gerados por tais compostos. Cao *et al.* (2006) demonstraram que a curcumina induz estresse oxidativo ao DNA mitocondrial (DNAm_t), de maneira dependente de concentração. O mecanismo é baseado no elevado nível de EROs e peroxidação lipídica, causados pela curcumina. A depleção do DNAm_t reduz a fosforilação oxidativa, diminui a síntese de ATP e induz a disfunção mitocondrial. Kachadouriam & Day (2006) relacionaram baixas concentrações de GSH em células epiteliais humanas de pulmão A549, tratadas com 2',5' hidroxichalcona, com a disfunção na mitocôndria destas células. Podemos relacionar a depleção da GSH mitocondrial e a depleção do ATP com o potencial pró-oxidante das hidroxichalconas. Slater *et al.* (1995) relacionaram a perda da GSH citoplasmática e da GSH mitocondrial com a presença de agentes oxidantes, sendo que esta última tem como consequência a perda do ATP celular.

Nossos resultados mostraram que as características pró-oxidantes das hidroxichalconas **1** e **3** podem ser responsáveis pela depleção da GSH citoplasmática e mitocondrial. Dessa forma, a diminuição das citadas GSH

citoplasmática e GSH mitocondrial prejudicam a mitocôndria e, conseqüentemente, depletam o ATP. Esses compostos também podem interferir no potencial de membrana mitocondrial, diminuir a respiração celular e prejudicar a síntese de ATP.

5.9 Adesão celular

As duas principais características do câncer são a proliferação celular descontrolada e a formação de metástase, sendo que esta é uma das maiores causas que levam à mortalidade (DEMIERRE & NATHANSON, 2003).

Várias etapas estão envolvidas na metástase tumoral, como: adesão, invasão e migração, sendo que o processo de adesão celular está envolvido na maioria, se não em todos os passos intermediários da cascata metastática (ZHANG *et al.* 2001).

A maioria das pesquisas tem como alvo o crescimento tumoral. Entretanto, poucos trabalhos têm como objetivo a pesquisa de fármacos específicos para prevenir a metástase.

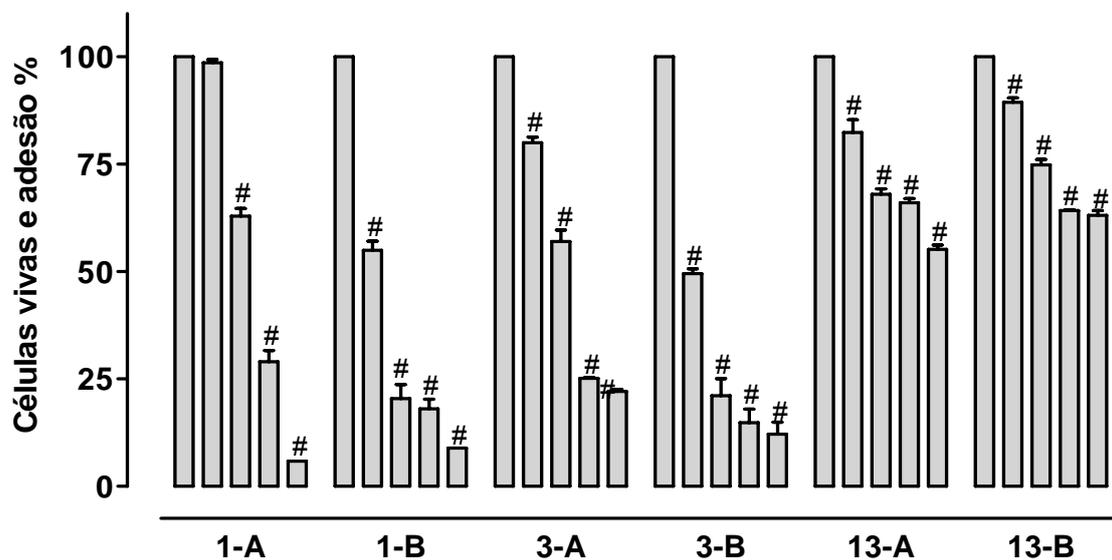


Figura 29: Viabilidade e adesão celular dependentes de concentração das hidroxichalconas nas B16-F10, em 24h. A viabilidade celular foi avaliada pelo método do MTT, representada por 1-A, 3-A e 13-A. Células, 1×10^5 , foram incubadas com as hidroxichalconas 1, 3 e 13 nas concentrações de 25, 50, 75 e 100 μM . A densidade óptica do grupo controle (células sem tratamento) foi considerada como 100% de viabilidade. As barras 1-B, 3-B e 13-B representam a decrescente adesão celular das B16-F10, 1×10^5 , tratadas com as hidroxichalconas nas concentrações de 25, 50, 75 e 100 μM , avaliada pelo método colorimétrico utilizando cristal violeta. Cada ponto representa a média \pm E.P.M. (n=3). Um valor de $^{\#}P < 0,001$ foi considerado estatisticamente significativo, quando comparado ao controle, usando ANOVA, seguido de teste *t* de Bonferroni.

Assim sendo, foi avaliada, através de um método colorimétrico, a inibição da adesão de células de melanoma B16-F10, tratadas com hidroxichalconas nas concentrações de 25, 50, 75 e 100 μ M, por 24 horas. A inibição da adesão celular foi comparada com a avaliação da viabilidade celular, em que as células foram tratadas com 25, 50, 75 e 100 μ M, por 24 horas. Uma significativa inibição da adesão das células de melanoma B16-F10, pelas hidroxichalconas **1**, **3** e **13** (Figura 29), foi observada. Comparando-se com a viabilidade celular, pôde-se observar uma maior inibição da adesão pelos compostos **1** e **3**. As hidroxichalconas **1** e **3**, na concentração de 25 μ M, foram citotóxicas para $1,4 \pm 0,8$ % e $20 \pm 1,3$ % das células B16-F10, enquanto que a inibição da adesão celular por esses compostos foi de $45 \pm 2,1$ % e $50 \pm 1,1$ %, respectivamente. A baixa citotoxicidade dessas hidroxichalconas para as células, na concentração de 25 μ M, e a maior inibição da adesão exclui a hipótese de que a inibição da adesão estaria sendo causada pela morte celular. Mas o contrário pode ser sugerido, pois a inibição da adesão está envolvida no processo de morte celular, porém não é o único fator que deve ser considerado. Gava e colaboradores (2005) testaram o complexo de rutênio (NAMI-A) em células de melanoma B16, *in vivo* e *in vitro*, e observaram a diminuição da expressão de moléculas de adesão celular CD44, CD54 e β_3 -integrina nas células tratadas com esse composto. Eles sugerem que o controle da metástase deve-se à inibição da invasão da célula tumoral.

Já a inibição da adesão celular provocada pela hidroxichalcona **13** foi menor, comparando-se com a morte causada por este mesmo composto. Acredita-se que a morte celular induzida pelo composto **13** esteja pouco relacionada com o mecanismo de adesão celular. Nesse caso, a inibição da adesão pode ter ocorrido em decorrência da morte celular. Zhang *et al.* (2001) estudaram o comportamento da quercetina, um flavonóide citotóxico para células de melanoma B16-BL6, e verificaram que tal composto inibe a invasão e a mobilidade das células, mas não afeta a adesão celular. Eles sugerem que a interferência em uma das etapas da metástase tumoral pode mudar o comportamento das células metastáticas, conduzindo-as à apoptose ou a uma parada no ciclo celular.

6. CONCLUSÕES

Dentre os compostos naturais, semi-sintéticos e sintéticos, que despertam interesse por suas propriedades biológicas, as chalconas, particularmente as hidroxiladas, destacam-se pelo seu potencial antitumoral. Quanto aos mecanismos possíveis de ação desses compostos, os resultados obtidos na pesquisa nos guiaram para as seguintes conclusões:

- Das chalconas derivadas do 3,4-metilenodioxibenzaldeído testadas nas células de B16-F10, as que apresentaram efeito citotóxico relevante foram as chalconas **1**, **3** e **7**. Porém, essas chalconas, apesar de apresentarem pouco efeito citotóxico para as células não-tumorais, induziram células de melanoma à morte, por necrose;
- Das chalconas derivadas da 2,4,6 trimetoxiacetofenona, as que apresentaram efeito citotóxico pronunciado para as células de melanoma foram as denominadas **1**, **3** e **9**. Por conseguinte, esses compostos provocaram a morte celular por apoptose, mas não agiram seletivamente contra as células tumorais;
- Dentre as chalconas testadas, as hidroxiladas foram as selecionadas para continuação da pesquisa, como conseqüência do maior efeito citotóxico das hidroxichalconas **1**, **3** e **13** para as células de melanoma, do menor efeito citotóxico para as células não-tumorais e por indução da morte celular por apoptose;
- Atribui-se a citotoxicidade das hidroxichalconas **1**, **3** e **13** às hidroxilas no anel-A aromático, que têm fundamental importância para esses compostos. Já a presença de outros substituintes na molécula do composto **13** parece ter diminuído o efeito citotóxico desse composto;
- Os compostos **1**, **3** e **13** demonstraram causar a morte celular de forma dependente de concentração;
- As hidroxichalconas **1**, **3** e **13** foram menos citotóxicas quando associadas aos agentes antioxidantes, tornando notória a atividade pró-oxidante das mesmas para as células de melanoma. Além disso, a produção de radicais livres intracelulares também foi verificada após o tratamento das células com os mesmos compostos;
- A depleção da concentração da GSH total citosólica, proporcionada pelos compostos **1**, **3** e **13**, pode estar relacionada com a atividade pró-oxidante destes compostos;

- As hidroxichalconas **1**, **3** e **13** depletaram significativamente a GSH total mitocondrial, que foi proporcional à produção de espécies reativas pelas células tratadas com estes compostos. A depleção da GSH total mitocondrial hipoteticamente está relacionada com a disfunção mitocondrial e com a morte celular por apoptose, induzida pelos compostos **1** e **3**.
- Os compostos **1**, **3** e **13** depletaram ATP de maneira dependente de concentração. Essa perda energética é o provável motivo da morte por apoptose das células de melanoma tratadas com as hidroxichalconas **1** e **3**, que certamente está relacionada à produção de EROs, depleção de GSH total citosólica e GSH total mitocondrial;
- Somando-se às evidências anteriores, a inibição da adesão celular pode contribuir para a atividade das hidroxichalconas **1** e **3** nas células de melanoma, fator este que está relacionado ao potencial antimetastático.

7. PERSPECTIVAS

As hidroxichalconas **1** e **3** mostraram-se promissoras para a continuidade da pesquisa. Nesse sentido, poder-se-á avaliar mecanismos de ação mais específicos ainda não elucidados. A disfunção da mitocôndria, causada por esses compostos, pode ser investigada através da avaliação do potencial de membrana mitocondrial, enquanto que a conseqüente morte por apoptose, pela via intrínseca, pode ser confirmada através da liberação do citocromo c, pois este é liberado quando a mitocôndria sofre algum estímulo pró-apoptótico, injúria mitocondrial ou estímulo de proteínas pró-apoptóticas;

Outra forma de avaliar a morte celular pela via intrínseca seria investigar esses compostos quanto à capacidade de inibição das proteínas anti-apoptóticas, como a Bcl-2, que está presente em altas concentrações no melanoma e o torna resistente a diversos fármacos, e avaliar a capacidade de ativação de proteínas pró-apoptóticas, como a Bax;

O conhecimento de quais moléculas de adesão (CAMs) estão sendo inibidas pelas hidroxichalconas **1** e **3** também pode nos fornecer um resultado específico a respeito do potencial metastático destes compostos;

Considerando a aplasia medular como um efeito tóxico dos quimioterápicos em geral, é fundamental testar os compostos de interesse em células progenitoras da medula óssea, a fim de conhecer o potencial citotóxico destes para estas células;

Como tais compostos mostraram potencial antitumoral significativo e são menos tóxicos para as células não tumorais, a continuidade da pesquisa é justificável, considerando a resistência das células tumorais aos fármacos já disponíveis e os efeitos indesejáveis causados pelos mesmos.

8. REFERÊNCIAS

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

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

AMARANTE-MENDES, J. G.; STAROBINAS, N. *et al.* Colorimetric assay for the measurement of thymocyte/thymic stromal cell adhesion. **Journal Brazilian of Medical and Biological Research**, v. 27, n. 6, p. 1321-1330, 1994.

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

BAGHERI, M. & SAFAI, B. Cutaneous malignancies of keratinocytic origin. **Clinical Dermatology**, v. 19, p. 244-252, 2001.

BALLATORI, N.; HAMMOND, C. L. *et al.* Molecular mechanisms of reduced glutathione transport: role of the MRP/CFTR/ABCC and OATP/SLC21A families of membrane proteins. **Toxicology and Applied Pharmacology**, v. 204, p. 238– 255, 2005.

BATIST, G.; SCHEETER, R. L. *et al.* **Glutathione system and drug resistance**. New York: Dekker, p. 503-521, 1996.

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

BENLLOCH, M.; ORTEGA, A. *et al.* Acceleration of glutathione efflux and inhibition of γ -glutamyltranspeptidase sensitive metastatic B16 melanoma cells to endothelium-induced cytotoxicity. **The Journal of Biological Chemistry**, v. 280, n. 8, p. 6950-6959, 2005.

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

BOECK, P.; FALCÃO, C. A. B. *et al.* Synthesis of chalcone analogues with increased antileishmanial activity. **Bioorganic and Medicinal Chemistry**, v. 14, p. 1538-1545, 2006.

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

BRÁS, M.; QUEENAN, B. *et al.* Programmed cell death via mitochondria: different modes of dying. **Biochemistry**, v. 70, n. 2, p. 231-239, 2005.

BRODIE, A. E. & REED, D. J. Glutathionedisulfite reduction in tumor mitochondria after-butylhidroperoxide treatment. **Chemico-Biological Interactions**, v. 84, p. 125 -

132, 1992.

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

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

CANIVENC-LAVIER, M. C.; VERNEVAUT, M. F. *et al.* Comparative effects of flavonoids and model inducers on drug-metabolizing enzymes in rat liver. **Toxicology**, v. 114, p. 19-27, 1996.

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

CÁRDENAS, M.; MARDER, M. *et al.* Antitumor activity of some natural flavonoids and synthetic derivatives on various human and murine cancer cell lines. **Bioorganic and Medicinal Chemistry**, v. 14, n. 9, p. 2966-2971, 2006.

CARVALHO, A. C.; GIUGLIANI, R. *et al.* Melanoma hereditário: prevalência de fatores de risco em um grupo de pacientes no Sul do Brasil. **Brazilian Annals of Dermatology**, v. 79, n. 1, p. 53-60, 2004.

CHAKRABARTY, A. & GEISSE, J. K. Medical therapies for non-melanoma skin cancer. **Clinics in Dermatology**, n. 22, p.183-188, 2004.

CHAN, M.; FONG, D. *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.; DANIEL, K. *et al.* Dietary flavonoids as proteasome inhibitors and apoptosis inducers in human leukemia cells. **Biochemical Pharmacology**, v. 69, p. 1421-1432, 2005.

CHEN, M.; ZHAI, L. *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.; JUNG, H. A. *et al.* Antioxidant constituents of the roots and stolons of licorice (*Glycyrrhiza glabra*). **Journal of Agriculture and Food Chemistry**, v. 55, p. 4691-4697, 2007.

CHOI, J. M.; YOON, B. S. *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.

CHOTIA, J. & JONES, E. Y. The molecular structure of cell adhesion molecules. **Annual Review Biochemistry**, v. 66, p. 823-862, 1997.

CLARK, W. H.; ELDER, D. E. *et al.* A study of tumor progression. The precursor lesions of superficial spreading and nodular melanoma. **Human Pathology**, v. 15, p. 1147-1165, 1984.

CLARK, W. H.; ELDER, D. E. *et al.* Model predicting survival in stage I melanoma based on tumor progression. **Journal of the National Cancer Institute**, v. 81, p. 1893-1904, 1989.

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

CURTIN, J. F.; DONOVAN, M. *et al.* Regulation and measurement of oxidative stress in apoptosis. **Journal of Immunological Methods**, v. 265, p. 49-72, 2002.

DAHL, C.; GULDBERG, P. The genome and epigenome of malignant melanoma. **APMIS**, v. 115, p. 1161-1176, 2007.

DELEVE, L. D. & KAPLOWITZ, N. Glutathione metabolism and its role in hepatotoxicity. **Pharmacology and Therapeutics**, v. 52, n. 3, p. 287-305, 1991.

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

DEMIERRE, M. F. & NATHANSON, L. Chemoprevention of melanoma: an unexplored strategy. **Journal of Clinical Oncology**, v. 21, p. 158-165, 2003.

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

DIMMOCK, J. R. ELIAS, D. W. Bioactivities of chalcones. **Current Medicinal Chemistry**, v. 6, n. 12, p. 1125-1149, 1999.

DOMINGUEZ, J. N. ; CHARRIS, J. E. *et al.* Synthesis of quinolinyl chalcones and evaluation of their antimalarial activity. **European Journal of Medicinal Chemistry**, v. 36, n. 6, p. 555-60, 2001.

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

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

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

EWEND, M. G.; CAREY, L. A. *et al.* Treatment of melanoma metastases in the brain. **Seminars in Surgical Oncology**, v. 12, n. 6, p. 429-435, 1996.

FECKER, L. F.; GEILEN, C. C. *et al.* Loss of proapoptotic Bcl-2-related multidomain proteins in primary melanomas os associated with poor prognosis. **Journal of**

Investigative Dermatology, v. 126, p. 1366-1371, 2006.

FIDLER, I. J. Biological behaviour of malignant melanoma cells correlated to their survival *in vivo*. **Cancer Research**, v. 35, p. 218-224, 1975.

FIDLER, I. J. & Kripke, M. L. Metastasis results from preexisting variant cells within a malignant tumor. **Science**, v. 197, p. 893-895, 1977.

FIDLER, I. J. Tumor heterogeneity and the biology of cancer invasion and metastasis. **Cancer Research**, v. 38, 2651-2660, 1978.

FILOMENI, G.; ROTILIO, G. *et al.* Cell signaling and the glutathione redox system. **Biochemical Pharmacology**, v. 64, p. 1057-1064, 2002.

FOJO, T. & BATES, S. Strategies for reversing drug resistance. **Oncogene**, v. 22, p. 7512-7523, 2003.

FOREJTŇIKOVÁ, H.; LUNEROVÁ, K. *et al.* Chemoprotective and toxic potentials of synthetic and natural chalcones and dihydrochalcones *in vitro*. **Toxicology**, v. 208, p. 81-93, 2005.

FOURNET, A. & MUÑOZ V. Natural products as trypanocidal, antileishmanial and antimalarial drugs. **Current Topics in Medicinal Chemistry**, v. 2, n. 11, p. 1215-1237, 2002.

FRANK, L.; MEYSKENS, J. *et al.* Redox Regulation in Human Melanocytes and melanoma. **Pigment Cell Research**, v. 14, p. 148-154, 2001.

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

FROMME, P., BOEKEMA, E. J. *et al.* Isolation and characterization of a supramolar complex of subunit-III of the ATP-synthase from chloroplasts. **Verlag der Zeitschrift für Naturforschung**, v. 42, n. 11-12, p. 1239-1245, 1987.

GARBE, C. & EIGENTLER, T. K. Diagnosis and treatment of cutaneous melanoma: state of the art 2006. **Melanoma Research**, v. 17, p. 117-127, 2007.

GARCIA-RUIZ, C. & FERNANDEZ-CHECA, J. C. Mitochondrial glutathione: hepatocellular survival-death switch. **Journal of Gastroenterology and Hepatology**, v. 3, p. 3-6, 2006.

GARLAND, J. M. & HALESTRAP A. Energy metabolism during apoptosis: Bcl-2 promotes survival in hematopoietic cells induced to apoptose by growth factor withdrawal by stabilizing a form of metabolic arrest. **The Journal of Biological Chemistry**, v. 272, n. 8, p. 4680-4688, 1997.

GATENBY R. A. & GILLIES R. J. Why do cancers have high aerobic glycolysis? **Nature Reviews Cancer**, v. 4, p. 891-899, 2004.

GAVA, B.; ZORZET, S. *et al.* Inhibition of B16 melanoma metastases with the

ruthenium complex imidazolium trans-imidazoledimethylsulfoxide-tetrachlororuthenate and down-regulation of tumor cell invasion. **The Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics**, v. 317, n. 1, p. 284-291, 2005.

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

GOTTESMAN, M. M.; FOJO, T. *et al.* Multidrug resistance in cancer; role of ATP-dependent transporters. **Nature Reviews, Cancer**, v. 2, p. 48-58, 2002.

GRAY-SHOPFER, V.; WELLBROCK, C. *et al.* Melanoma biology and new targeted therapy. **Nature**, v. 445, p. 851-857, 2007.

GREENBERG, E. R.; BARON, J. A. *et al.* Clinical-trial of antioxidant vitamins to prevent colorectal adenoma, **The New England Journal of Medicine**, v. 331, p. 141-147, 1994.

GRIFFITH, O. W. & MEISTER, A. Origin and turnover of mitochondrial glutathione. **Proceedings of National Academy of Sciences**, v. 82, p. 4668-4672, 1985.

GUERRY, D.; SYNNESTVEDT, M. *et al.* Lessons from tumor progression: the invasive radial growth phase of melanoma is common, incapable of metastasis, and indolent. **Journal of Investigative Dermatology**, v. 100, p. 342-345, 1993.

GUIMARÃES, J. R. Q. **Manual de Oncologia**. 1ed. São Paulo: BBS, 2004, 725 p.

HAASS, N. K.; SMALLEY, K. S. M. *et al.* Adhesion, migration and communication in melanocytes and melanoma. **Pigment Cells Research**, v. 18, p. 150-159, 2005.

HAKIMUDDIN, F.; PALIYATH, G. *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.

HALLIWELL, B.; GUTTERIDGE, M. C. **Free radicals in biology and medicine**. New York: Oxford University Press, 2000.

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.

HANAHAHAN D. & WEINBERG R. A. The hallmarks of cancer. **Cell**, v. 100, p. 57-70, 2000.

HART, I. R.; BIRCH, M. *et al.* Cell adhesion receptor expression during melanoma progression and metastasis. **Cancer Metastasis Reviews**, v. 10, p. 115-128, 1991.

HERÊNCIA, F.; FERRÁNDIZ, M. L. *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.

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

HOLLMAN, P. C. & KATAN, M. B. Absorption, metabolism and health effects of dietary flavonoids in man. **Biomedicine and Pharmacotherapy**, v. 51, p. 305-310, 1997.

HOLZMANN, B.; GOSSLAR, U. *et al.* Alpha 4 integrins and tumor metastasis. **Current Topics in Microbiology and Immunology**, v. 231, p. 125-141, 1998.

HOSSINI, A. M.; EBERLE, J. *et al.* Conditional expression of exogenous Bcl-X(S) triggers apoptosis in human melanoma cells in vitro and delays growth of melanoma xenografts. **FEBS letters**, v. 553, p. 250-256, 2003.

HSU, Y. L.; KUO, P. L. *et al.* Isoliquiritigenin inhibits the proliferation and induces the apoptosis of human non-small cell lung cancer A549 cells. **Clinical and Experimental Pharmacology and Physiology**, v. 31, p. 414-418, 2004.

HSU, Y. L.; KUO, P. 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, p. 704-713, 2006.

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

HU, W. P.; YU, H. S. *et al.* DC-81-Idole conjugate agent induces mitochondria mediated apoptosis in human melanoma A375 cells. **Chemical Research in Toxicology**, v. 20, p. 905-912, 2007.

HWANG, C.; SINSKEY, H. F. *et al.* Oxidized redox state of glutathione in the endoplasmic-reticulum. **Science**, v. 57, p. 1496-1502, 1992.

HYNES, R. O. Integrins: versatility, modulation, and signaling in cell adhesion. **Cell**, v. 69, p. 11-25, 1992.

INCA - INSTITUTO NACIONAL DO CÂNCER. www.inca.gov, acesso em 25 nov. 2007.

ISHIKAWA, T.; BAO, J. J. *et al.* Coordinated Induction of MRP/GS-X Pump and γ -glutamylcysteine synthetase by heavy metals in human leukemia cells. **The Journal of Biological Chemistry**, v. 271, n. 25, p. 14981-14988, 1996.

IWASHITA, K.; KOBORI, M. *et al.* Flavonoids inhibit cell growth and induce apoptosis in B16 melanoma 4A5 cells. **Bioscience, Biotechnology, and Biochemistry**, v. 64, p. 1813-1820, 2000.

JANSEN, B.; Wacheck, V. *et al.* Chemosensitisation of malignant melanoma by Bcl-2 antisense therapy. **Lancet**, v. 356, p. 1728-1733, 2000.

JOHNSON, J. D. & YOUNG B. Demographics of brain metastasis. **Neurosurgery Clinics of North America**, v. 7, n. 3, p. 337-344, 1996.

JOHNSON, J. P. Cell adhesion molecules in the development and progression of malignant melanoma. **Cancer and Metastasis Reviews**, v. 18, p. 345-357, 1999.

JUN, H. S.; PARK, T. *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.

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

KEER, J. F. R.; WYLLIE, A. H. *et al.* Apoptosis: a basic biological phenomenon with wide-ranging implications in tissue kinetics. **British Journal of Cancer**, v. 26, p. 239-257, 1972.

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

KLUZA, J.; LANSIAUX, A. Induction of apoptosis in HL-60 leukemia and B16 melanoma cells by the acronycine derivative S23906-1. **Biochemical Pharmacology**, v. 63, p. 1443-1452, 2002.

KOBORI, M.; IWASHITA, K. *et al.* Phloretin-induced apoptosis in B16 melanoma 4A5 cells and HL60 human leukemia cells. **Bioscience, Biotechnology, and Biochemistry**, v. 63, n. 4, p. 719-725, 1999.

KONIECZNY, M. T.; KONIECZNY, W. *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.; TROUILLAS, P. *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.

LABRADOR, V; FREIRE, P. F. *et al.* Cytotoxicity of butylated hydroxyanisole in Vero cells. **Cell Biology and Toxicology**, v. 23, p. 189-199, 2007.

LASH, L. H. Mitochondrial glutathione transport; physiological, pathological and toxicological implications. **Chemico-Biological Interactions**, v. 163, n. 1-2, p. 54-67, 2006.

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

LEE, M. L.; TOMSU, K. *et al.* Duration of survival for disseminated malignant melanoma: results of a meta-analysis. **Melanoma Research**, v. 10, n. 81, p. 154-160, 2000.

LENS, M. B. & DAWES, M. Global perspectives of contemporary epidemiological trends of cutaneous malignant melanoma. **British Journal of Dermatology**, v. 150, p. 179-185, 2004.

LEONE, M.; ZHAI, D. *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.; RAGHEB, K. *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., WILAIRAT, P. *et al.* Antimalarial alkoxyated and hydroxylated chalcones [corrected]: structure-activity relationship analysis. **Journal of Medicinal Chemistry**, v. 44, n. 25, p. 4443-52, 2001.

LIU, M.; WILAIRAT, P. *et al.* Structure-activity relationships of antileishmanial and antimalarial chalcones. **Bioorganic and Medicinal Chemistry**, v. 11, p. 2729-2738, 2003.

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

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

LOPEZ, S. N.; CASTELLI, M. V. *et al.* In vitro antifungal evaluation and structure-activity relationships of a new series of chalcone derivatives and synthetic analogues, with inhibitory properties against polymers of the fungal cell wall. **Bioorganic and Medicinal Chemistry**, v. 9, n. 8, p. 1999-2013, 2001.

LUI, P.; CASHIN, R. *et al.* Treatments for metastatic melanoma: Synthesis of evidence from randomized trials. **Cancer Treatment**, p. 1-16, 2007.

MANTHEY, J. A.; GROHMANN, K. *et al.* Biological properties of citrus flavonoids pertaining to cancer and inflammation. **Current Medicinal Chemistry**, v. 8, n. 2, p. 135-153, 2001.

MARDER, M. & PALADINI, A. C. GABA(A)-Receptor ligands of flavonoid structure. **Current Topics in Medicinal Chemistry**, v. 2, n. 8, p. 853-867, 2002.

MATES, J. M.; PEREZ-GOMEZ, C. *et al.* Antioxidante enzymes e human diseases. **Clinical Biochemistry**, v. 32, p. 595-603, 1999.

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

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 (hemocuprein). **The Journal of Biological Chemistry**, v. 244, p. 60409-60455, 1969.

McGARY, E. C.; LEV, D. C. *et al.* Cellular Adhesion Pathways and Metastatic Potential of Human Melanoma. **Cancer Biology and Therapy**, v. 1, n. 5, p. 459-465, 2002.

McKERNAN, T. M.; WOODS, E. B. *et al.* Uptake of glutathione by renal cortical mitochondria. **Archives Biochemistry and Biophysics**, v. 288, p. 653-663, 1991.

MEISTER, A.; Mitochondrial changes associated with glutathione deficiency. **Biochimica Biophysica Acta**, v. 1271, p. 35-42, 1995.

MENG, C. Q.; ZHENG, X. S. *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.

MIDDLETON, M. R.; GROB, J. J. *et al.* Randomized phase III study of temozolomide versus dacarbazine in the treatment of patients with advanced metastatic malignant melanoma. **Journal of Clinical Oncology**, v. 18, p. 158-166, 2000.

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

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

NAKAGAWA, H.; HASUMI, K. *et al.* Generation of hydrogen peroxide primarily contributes to the induction of Fe(II)-dependent apoptosis in Jurkat cells by epigallocatechin gallate. **Carcinogenesis**, v. 25, p. 1567-1574, 2004.

NAKATAMI, N.; ICHIMARU, M. *et al.* Induction of apoptosis in human promyelocytic leukemia cell line HL-60 by C-benzylated dihydrochalcones, uvaretin, isouvaretin and diuvaretin. **Biological and Pharmaceutical Bulletin**, v. 28, n. 1, p. 83-86, 2005.

NAM, N. H.; KIM, Y. *et al.* Cytotoxic 2',5' dihydroxychalcones with unexpected antiangiogenic activity. **European Journal of Medicinal Chemistry**, v. 38, p. 179-

187, 2003.

NATALI, P. G.; HAMBY, C. V. *et al.* Clinical significance of alpha(v)beta3 integrin and intercellular adhesion molecule-1 expression in the cutaneous malignant melanoma lesions. **Cancer Research**, v. 57, p. 1554-1560, 1997.

NAVARRO, J.; OBRADOR, E. *et al.* Changes in glutathione status and the antioxidant system in blood and in cancer cells associate with tumor growth in vivo. **Free Radical Biology & Medicine**, v. 23, n. 3-4, p. 410-418, 1999.

NESBIT, M. & HERLYN, M. Adhesion receptors in human melanoma progression. **Invasion Metastasis**, v. 14, p. 131-146, 1994.

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

NI, L.; MENG, C. Q. *et al.* Recent advances in therapeutic chalcones. **Expert Opinion**, v. 14, n. 12, p. 1669-1691, 2004.

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.

OGAWA, H.; OKADA, Y. 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 non-apoptotic death in tumour cells. **Nature**, v. 4, p. 592-603, 2004.

PARK, W. H. HAN, Y. W. *et al.* An ROS generator, antimycin A, inhibits the growth of HeLa cells via apoptosis. **Journal of Cellular Biochemistry**, v. 102 n. 1, p. 98-109, 2007.

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

PEDERSEN P. L. The cancer cell's "power plants" as promising therapeutic targets: An overview. **Journal of Bioenergetics and Biomembranes**, v. 39, n. 1, p. 1-12, 2007.

PEDERSEN, P. L. Tumor mitochondria and the bioenergetics of cancer cells. **Progress in Experimental Tumor Research**, v. 22, p. 190-274, 1978.

PROTA, G. Melanins and melanogenesis. **San Diego: Academic Press Inc**, p. 55, 1992.

RAISOVA, M.; HOSSINI, A. M. *et al.* The bax/bcl-2 ratio determines the susceptibility

of human melanoma cells to CD95/Fas-mediated apoptosis. **Journal of Investigative Dermatology**, v. 117, p. 333-340, 2001.

RAMOS, S. Effects of dietary flavonoids on apoptotic pathways related to cancer chemoprevention. **Journal of Nutritional Biochemistry**, v. 18, p. 427-442, 2007.

RANI, P.; SRIVASTAVA, V. K. *et al.* Synthesis and antiinflammatory activity of heterocyclic indole derivatives. **European Journal of Medicinal Chemistry**, v. 39, n. 5, p. 449-52, 2004.

RAO, Y. K.; FANG, S. H. *et al.* Differential effects of synthesized 2'-oxygenated chalcona derivatives: modulation of human cell cycle phase distribution. **Bioorganic & Medicinal Chemistry**, v. 12, p. 2679-2686, 2004.

REED, J. C. Apoptosis and cancer: strategies for integrating programmed cell death. **Seminars in Hematology**, p. 37, n. 4, p. 9-16, 2000.

REGULA, K. M.; ENS, K. *et al.* Mitochondria-assisted cell suicide: a license to Hill. **Journal of Molecular and Cellular Cardiology**, v. 35, p. 559-567, 2003.

RHODES, A. R. Cutaneous melanoma and intervention strategies to reduce tumor-related mortality: what we know, what we don't know, and what we think we know that isn't so. **Dermatologic Therapy**, v. 19, p. 50-69, 2006.

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

RIKER, A. I.; GLASS, F. *et al.* Cutaneous melanoma: methods of biopsy and definitive surgical excision. **Dermatologic Therapy**, v. 18, n. 387-393, 2005.

RIKER, I. A.; JOVE, R. *et al.* Immunotherapy as part of a multidisciplinary approach to melanoma treatment. **Frontiers in Bioscience**, v. 11, p. 1-14, 2006.

ROBINSON, T. P.; HUBBARD, R. B. *et al.* Synthesis and biological evaluation of aromatic enones related to curcumin. **Bioorganic and Medicinal Chemistry**, v. 13, p. 4007-4013, 2005.

ROJAS, J.; DOMINGUEZ, J. N. *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.

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

SALERNO, M. & GARNIER-SUILLEROT, A. Kinetics of glutathione and daunorubicin efflux from multidrug resistance protein overexpressing small-cell lung cancer cells. **European Journal of Pharmacology**, v. 421, p. 1-9, 2001.

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

p. 19-21.

SASSE, A. D.; SASSE, E. C. *et al.* Chemoimmunotherapy versus chemotherapy for metastatic malignant melanoma. **Cochrane Database Systematic Reviews**, v. 24, n.1, 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.

SCHENKMAN, J. B.; CINTI, D. L. Preparation of microsomes with calcium. **Methods Enzymology**, v. 52, p. 83-89, 1978.

SCHROETER, H.; BOYD, J. P. E. *et al.* MAPK signaling in neurodegeneration: influences of flavonoids and of nitric oxide. **Neurobiology of Aging**, v. 23, p. 861-880, 2002.

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

SHEN, S.; CHEN, Y. *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.

SHIH, H.; PICKWELL, G. V. *et al.* Differential effects of flavonoid compounds on tumor promoter-induced activation of the human CYP1A2 enhancer. **Archives of Biochemistry and Biophysics**, v. 372, p. 287-294, 2000.

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

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, p. 1695-1700, 2007.

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

SLATER, A. F. G.; STEFAN, C. *et al.* Signalling mechanisms and oxidative stress in apoptosis. **Toxicology Letters**, v. 82-83, p. 149-153, 1995.

SOENGAS, M. S. & LOWE, S. W. Apoptosis and melanoma chemoresistance. **Oncogene**, v. 22, p. 3138-3151, 2003.

SOMASUNDAR, P.; RIGGS, D. R. *et al.* Inhibition of melanoma growth by hemocyanin occurs via early apoptotic pathways. **The American Journal of Surgery**, v.190, p. 713-716, 2005.

STAVROVSKAYA, A. A. Cellular mechanisms of multidrug resistance of tumor cells. **Biochemistry**, v. 65, n. 1, p. 112-126, 2000.

STREHLER, B. L. & TOTTER, J. R. Determination of ATP and related compounds: firefly luminescence and other methods. **Methods of Biochemical Analysis**, v. 1, p. 341-56, 1954.

SYLVESTER, P. W. Vitamin E and apoptosis. **Vitamins and Hormones**, v. 76, p. 329-356, 2007.

TAKAOKA, A.; ADACHI, M. *et al.* Anti-cell death activity promotes pulmonary metastasis of melanoma cells. **Oncogene**, v. 14, p. 2971-2977, 1997.

TARHINI, A. A. & AGARWALA, S. S. Cutaneous melanoma: available therapy for metastatic disease. **Dermatologic Therapy**, v.19, p. 19-25, 2006.

TARHINI, A. A. & AGARWALA, S. S. Management of brain metastases in patients with melanoma. **Current Opinion in Oncology**, v. 16, p. 161-166, 2004.

TIETZE, F. Enzymic method for quantitative determination of nanogram amounts of total and oxidized glutathione: applications to mammalian blood and other tissues. **Analytical Biochemistry**, v. 27, n. 3, p. 502-22, 1969.

VALKO, M.; RHODES, C. J. *et al.* Free radicals, metals and antioxidants in oxidative stress-induced cancer. **Chemico-Biological Interactions**, v. 160, p. 1-40, 2006.

VAN DE LOOSDRECHT, A. A., NENNIE, E. *et al.* Cell mediated cytotoxicity against U 937 cells by human monocytes and macrophages in a modified colorimetric MTT assay. A methodological study. **Journal of Immunological Methods**, v. 141, n.1, p.15-22, 1991.

WANG, W. & BALLATORI, N. Endogenous glutathione conjugates: occurrence and biological functions. **Pharmacological Reviews**, v. 50, n. 3, p. 335-355, 1998.

WARBURG, O. On the origin of cancer cells. **Science**, v. 123, p. 309-314, 1956.

WHO - World Health Organization. Disponível em: <<http://www.who.int/cancer>>, Acesso em 25 nov. 2007.

WON, S. J.; LIU, C. T. *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.

WYLLIE, A. H. Glucorticoid-induced thymocyte apoptosis is associated with endogenous endonuclease activation. **Nature**, v. 284, p. 555-556, 1980.

WYLLIE, A. H.; KERR, J. F. K. *et al.* Cell death: the significance of apoptosis. **International Review of Cytology**, v. 68, p. 251-305, 1980.

WYLLIE, A. H. The biology of cell death in tumors. **Anticancer Research**, v. 5, p.

131-142, 1985.

XIA, Y.; YANG, Z. U. *et al.* Antitumor agents. Part 202: Novel 2'-Amino Chalcones: Design, Synthesis and Biological Evaluation. **Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters**, v. 10, p. 699-701, 2000.

YAMAMOTO, K.; Kakegawa, H. *et al.* Gastric cytoprotective anti-ulcerogenic actions of hydroxychalcones in rats. **Planta Medica**, v. 58, n. 5, p. 389-393, 1992.

YE, C. L.; LIU, J. W. *et al.* In vitro anti-tumor activity of 2',4'-dihydroxy-6'-methoxy-3',5'-dimethylchalcone against six established human cancer cell lines. **Pharmacological Research**, v. 50, p. 505-510, 2004.

ZAMZAMI, N.; SUSIN, S. A. *et al.* Mitochondrial control of nuclear apoptosis. **The Journal of Experimental Medicine**, v. 183, p. 1533-1544, 1996.

ZHAI, L.; CHEN, M. *et al.* The antileishmanial activity of novel oxygenated chalcones and their mechanism of action. **Journal of Antimicrobial Chemotherapy**, v. 43, p. 793-803, 1999.

ZHAN, C. & YANG, J. Protective effects of isoliquiritigenin in transient middle cerebral artery occlusion-induced focal cerebral ischemia in rats. **Pharmacological Research**, v. 53, p. 303-309, 2006.

ZHANG, X.; XU, Q. *et al.* Quercetin inhibits the invasion and mobility of murine melanoma B16-BL6 cells through inducing apoptosis via decreasing Bcl-2 expression. **Clinical Experimental Metastasis**, v. 18, p. 415-421, 2001.

ZIMMERMANN, K. C.; BONZON, C. *et al.* The machinery of programmed cell death. **Pharmacology and Therapeutics**, v. 92, p. 57-70, 2001.

ZU, X, L. & GUPPY, M. Cancer metabolism: facts, fantasy, and fiction. **Biochemical and Biophysical Research Communications**, v. 313, p. 459-465, 2004.

9. **ANEXOS**

9.1 Trabalhos apresentados em eventos

NAVARINI, Andréia L. F.; LOCATELLI, Claudriana; CHIARADIA, Louise D.; MASCARELLO, Alessandra; NUNES, Ricardo José; YUNES, Rosendo A.; CRECZYNSKI-PASA, Tânia. B. Citotoxic effect of synthetic hydroxychalcones on melanoma cells. In: Reunião Latinoamericana de Química Medicinal 1ª, 2007, Montevideo. Anais da 1ª Reunião Latinoamericana de Química Medicinal, 2007, v. 1, p. 46.

LOCATELLI, Claudriana; NAVARINI, Andréia L. F.; CRECZYNSKI-PASA, Tânia. B.; LEAL, Paulo C.; YUNES, Rosendo A.; Gallic acid esters derivatives induce apoptosis in melanoma cells by gsh depletion and promote inhibition of cell adhesion. In: Reunião Latinoamericana de Química Medicinal 1ª, 2007, Montevideo. Anais da 1ª Reunião Latinoamericana de Química Medicinal, 2007, v. 1, p. 50.

CHIARADIA, Louise D.; NAVARINI, Andréia L. F.; SILVA, Maria Cláudia Santos da; LEAL, Paulo C.; CRECZYNSKI-PASA, Tânia. B. NUNES, Ricardo José; YUNES, Rosendo A. Ação de chalconas derivadas do 3,4-metilenodioxenzaldeído e da 2,4,6-trimetoxiatetofenona em células de melanoma (B16-F10). Reunião Anual da Sociedade Brasileira de Química 30º, 2007, Águas de Lindóia. **Anais eletrônicos...** Disponível em: <http://www.sec.sbq.org.br/cdrom/30ra/index2.htm>.

MASCARELLO, Alessandra; NAVARINI, Andréia L. F.; CHIARADIA, Louise D.; LEAL, Paulo C.; FRITZEN, Márcio; CRECZYNSKI-PASA, Tânia. B. NUNES, Ricardo José; YUNES, Rosendo A. Obtenção de chalconas hidroxiladas e avaliação de sua atividade em células de melanoma B16-F10. Reunião Anual da Sociedade Brasileira de Química 30º, 2007, Águas de Lindóia. **Anais eletrônicos...** Disponível em: <http://www.sec.sbq.org.br/cdrom/30ra/index2.htm>

NAVARINI, Andréia L. F.; FRITZEN, Márcio; CHIARADIA, Louise D.; YUNES, Rosendo A.; SILVA, Maria Cláudia Santos da; CRECZYNSKI-PASA, Tânia. B. Ação de Chalconas sobre células de melanoma (B16-F10). In: Reunião Anual da SBPC 58ª, 2006, Florianópolis. **Anais eletrônicos...** Florianópolis: UFSC, 2006. Disponível em: <http://www.sbpnet.org.br/livro/58ra>.

LOCATELLI, Claudriana; FRITZEN, Márcio; NAVARINI, Andréia L. F.; CRECZYNSKI-PASA, Tânia. B. Novas perspectivas para o tratamento de melanoma. In: Seminário de Desenvolvimento de Pesquisa da UnC, 2006, Caçador. **Anais...** Caçador, 2006, 1 CD-ROM.

9.2 Artigo a ser submetido na revista "European Journal of Medicinal Chemistry"

Hydroxychalcones induce apoptosis on B16-F10 melanoma cells suggesting be through ATP depletion

Andréia Lilian Formento-Navarini^{a#}, Louise Domeneghini Chiaradia^{b#}, Alessandra Mascarello^{b#}, Márcio Fritzen^a, Ricardo Jose Nunes^b, Rosendo Augusto Yunes^b, and Tânia Beatriz Creczynski-Pasa^a

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

Keywords: hydroxychalcones, melanoma, antitumoral, apoptosis, ATP

Corresponding Author:

Tânia Beatriz Creczynski-Pasa

Universidade Federal de Santa Catarina

Centro de Ciências da Saúde

Departamento de Ciências Farmacêuticas

Campus Trindade

CEP: 88040-900, Florianópolis – SC, Brasil

Tel.: +55 48 3721-8057

Fax: +55 48

E-mail: taniac@mbox1.ufsc.br

These authors contributed equally to this study.

Abstract

Searching leads compounds of new drugs for cancer therapy, we studied the toxicity of thirteen hydroxychalcones never tested against melanoma cells line (B16-F10). The compounds were obtained by aldolic condensation between aldehydes and hydroxylated acetophenones, in alkaline conditions. Three of these chalcones showed cytotoxicity for the melanoma cell line. Two of them induced mitochondrial GSH and ATP depletion and induced cell death through apoptosis in melanoma cells preferentially to a non-tumoral cell line (Vero). And one of the chalcones tested induced cell death through necrosis but did not decrease significantly the intracellular mitochondrial GSH and ATP levels in melanoma cells. The structure-activity analysis reveals that the predominant factor for the activity is the molecule shape, and secondarily the number of hydroxyl groups.

Introduction

Malignant melanoma is a highly lethal disease, and the incidence and mortality associated to this kind of cancer is increasing worldwide. Currently, between 2 and 3 million non-melanoma skin cancers and 132,000 melanoma skin cancers occurs globally each year.¹ Many factors predispose an individual to skin cancer including personal and family history of the disease and geographic location.² The clinical direction of melanoma is determined by dissemination of the tumor and the phase at diagnosis is a important factor. Metastasis of malignant melanoma is related with a poor prognosis and the median survival time with advanced disease. The metastasis and growth of tumors depend on the cell capability to migrate, implant, adhere and penetrate into the membrane, reaching the blood vessel and the tissue.^{3,4} Selected B16 murine cell lines (B16-F10 and B16-F1) showed a different metastatic potential: the F10 line colonized in the lungs more efficiently than F1; the F10 cell line was the most invasive and also the most virulent in subcutaneous implantation model.³

Among the drugs exerting anticancer activity against malignant melanoma, dacarbazine has been extensively used, however, with response rates of 11 to 25% and with short survival time. Thus, the development of chemotherapy agents against malignant melanoma is justified.⁵

Chalcones are essential intermediate compounds in the flavonoid biosynthesis in plants. Naturally occurring chalcones are mainly in hydroxylated form and several reports have documented their biological properties.^{6,7} Many studies have demonstrated antileucemic,⁸⁻¹¹ antitumoral,^{9,12-24} antiinflammatory,²⁵⁻²⁷ antibacterial,²⁸ anti-ulcerogenic,²⁹ antioxidant,^{6,7,12,30,31} antimalarial,³² antileishmaniasis^{32,33} and hypotensive³⁴ activities for hydroxychalcones, besides others pharmacological effects. Concerning antitumoral activity, Kobori *et al.* (1999) described that the 2',4',6',4-tetrahydroxidihydrochalcone (phloretin) induced cell death by apoptosis in B16 mouse melanoma 4A5 and in HL-60 human leukemia cell lines;⁹ Iwashita *et al.* (2000) showed that the isoliquiritigenin (2',4',4-trihydroxychalcone) and butein (2',4',3,4-tetrahydroxychalcone) inhibited cell proliferation and induced apoptosis in B16 melanoma 4A5 cells;¹⁶ also, Hsu *et al.* (2005) described that isoliquiritigenin induced apoptosis and blocking cell cycle progression in Hep G2 (human hepatoma cells).²⁴ For new antitumoral agents it is very important to show cell toxicity through apoptosis. The death through apoptosis is characterized by nuclear condensation what induces DNA fragmentation caused by endonucleolytic cleavage of genomic DNA.³⁵ The apoptosis or programmed cell death is a mechanism to control the cell proliferation, thus the resistance of malignant cell to apoptosis is hallmark of cancer and constitutes an important clinical problem.^{36,37}

The mitochondria is responsible for the production of 80-90% of ATP needed for cell respiration and survival and play an important role in the pro- and anti-apoptotic stimuli.³⁸ Skulachev (2006) showed the interrelations between bioenergetics processes and programmed death phenomena, and concluded that ATP is required for certain steps of apoptosis and necrosis. Usually the malfunctioning of mitochondria results in strong decrease in the cellular ATP initial level, however, in some cases, the apoptosis is accompanied by ATP increases at early stage followed by a decrease at the final stage.³⁹ The energy production is also affected when mitochondrial glutathione (GSH) is depleted, besides changes on mitochondrial GSH levels have been related with apoptosis regulation, cell differentiation and growth.^{40,41}

The objective of this research is based on the idea that in the development of antitumoral agents, one of the most important characteristics whose the compound must have is the capacity to promote the cell death through apoptosis, and the melanoma cells have a relatively poor answer to the apoptotic stimulus.⁴² Also is

based on the fact that solid tumor cells develop resistance to antineoplastic drugs, and multidrug resistance is one of the major causes of chemotherapy failures by human malignances.^{43,44} The B16-F10 melanoma cell line has high metastatic potential, and in general does not respond easily to cytotoxic agents, justifying the research of new drugs with increased efficacy and less adverse effects. Thus, in this work we studied and characterized, for the first time, as apoptosis the murine B16-F10 melanoma cell death, induced by synthetic hydroxychalcones, suggesting being through mitochondrial GSH and ATP depletion. A structure-activity analysis was done to find out a relationship with the cytotoxic effects.

Results and discussion

Synthesis

Thirteen hydroxychalcones were prepared by aldolic condensation as presented in Figure 1. Chalcones **1**, **3** and **6** are derived from 1-naphtaldehyde; chalcones **2** and **7** are derived from xanthoxyline (2-hydroxy-4,6-dimethoxyacetofenone); chalcones **4** and **5** are derived from 2-naphtaldehyde; and chalcones **8** to **13** are derived from monobromide xanthoxyline (2-hydroxy-3-bromo-4,6-dimethoxychalcone). The obtained yields were between 36 and 66%. The medium yields were due to the presence of hydroxyl groups in the acetophenones. Even in the cases that the hydroxyl group are in the position 2 (making a hydrogen bond between this hydrogen atom and the oxygen atom of the carbonyl group), is possible that in the reaction, the hydrogen atom is abstracted by the basic catalyst, resulting in secondary products.

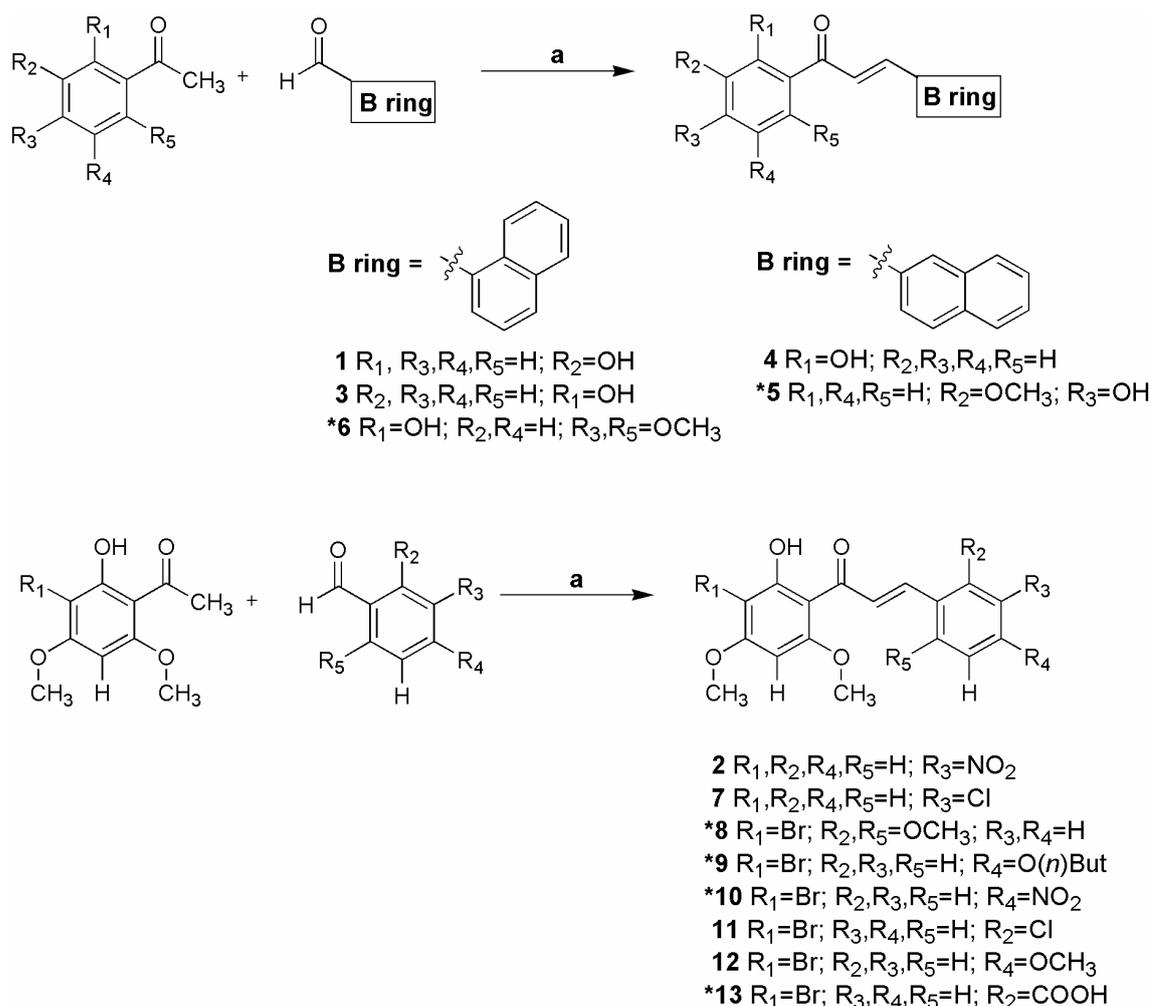


Figure 1. Synthesis of chalcones. The reaction consists in an aldolic condensation as described in the Material and Methods a) methanol, KOH 50%, r.t., 24h. *new compounds.

The structures of the compounds **5**, **6**, **8**, **9**, **10** and **13**, (new compounds), were confirmed by chemical identification data: 1H NMR, ^{13}C NMR, IR and elemental analysis. To the chalcone **1**, the corresponding peak to the hydroxyl group is not shown because during the analysis it possibly changed with deuterated hydrogen atom of the used solvent, chloroform. 1H NMR spectra revealed that all structures were geometrically pure and configured *E* ($J_{H\alpha-H\beta} = 15,2-16,4$ Hz).

Biological Assays

Initially, a screening of the hydroxychalcones toxicity for melanoma B16-F10 cells was done. In the figure 2 is possible to observe that the compounds **1**, **3** e **13** reduced the cells viability in $97.7 \pm 0.7\%$, $75.2 \pm 1.5\%$ and $50 \pm 1.9\%$, respectively, when compared with the control (non treated cells). All others chalcones presented an inexpressive effect at the concentration tested. We choose $100\mu\text{M}$ as the maximal concentration since much higher than that concentration does not normally reach the plasma blood^{45,46} and we are looking for compounds with high activity (low IC_{50}) which eventually could be used in a future as a drug for chemotherapy with very low or without side effects.

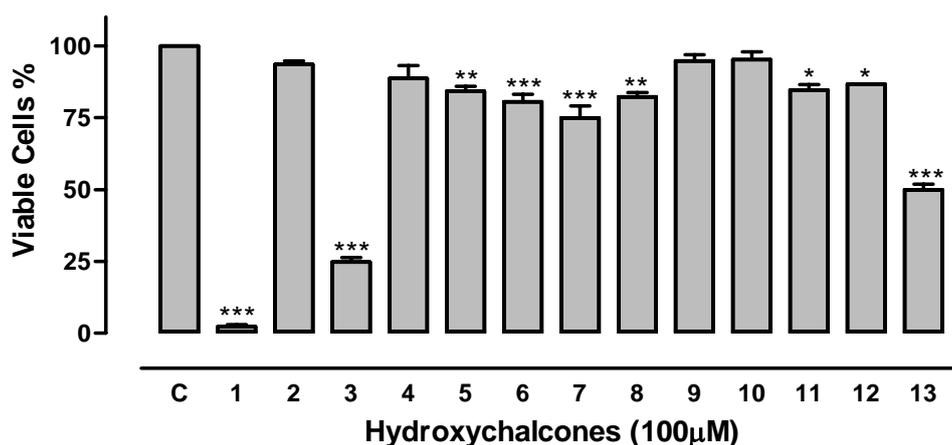


Figure 2: Toxicity of hydroxychalcones for murine melanoma B16-F10 cell line. The compounds, $100\mu\text{M}$, were incubated with the cells (1×10^5) for 24h. The cell viability was monitored through MTT assay. Optical density of control groups (C) was taken as 100% of cell viability. The cell viability was checked in the beginning of experiment by Trypan Blue exclusion. Each point represents the mean \pm S.E.M. of three experiments in triplicates. * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$ and *** $P < 0.001$ compared to control groups, using ANOVA followed by Bonferroni's t test.

Recently, Cabrera *et al.* (2007) have analyzed the relation between the structure of some chalcones, flavonones and flavones with their activity against the human kidney carcinoma cells TK-40, human mammary adenocarcinoma cells MCF-7 and human colon adenocarcinoma cells HT-29. In general, no cytotoxic selectivity between the different cellular lines was observed. However, in the same substituted series the activity decreases in the order chalcones > flavonones > flavones. Some

others requirements for the activity are the presence of the hydroxyl group that have hydrogen bond donor ability and the conjugated enone group considering that the compounds lack their activity when are changed to an aldol structure.²²

The importance of the presence of an hydroxyl substituent was indicated previously by Sabzevari *et al.* (2004) working with the cytotoxic activity of twelve hydroxylated chalcones against K562 leukemia or melanoma cells.¹⁴ They observed that an increase in the number of hydroxyl groups on an aromatic ring decreases the *pKa* value of the first hydroxyl group and that seems that chalcones with lower *pKa* values are less toxic to hepatocytes because they have more hydroxyl groups on their A-ring. However, it should be considered that the arrangement of the hydroxyl groups on the A-ring or B-ring plays a crucial role in determining the mechanism of cytotoxicity towards isolated rat hepatocytes. Thus, if hydroxyl group is in ortho position the chalcone can be metabolized to a quinone intermediate which can react with cell nucleophile and deplete GSH.

In this case the importance of the hydroxyl group in A-ring is also important to the activity as can be observed in chalcones **1** and **3**. However, this activity is conditioned by the conformation of the molecule as can be observed with chalcones **4** and **5** where the B-ring is a 1-naphtyl or 2-naphtyl groups. This same fact is observed with chalcone **6** where the presence of a methoxyl group in position 6 may also change the conformation of the molecule. This fact may explain also the lack of strong activity of chalcones **2**, **7**, **8**, **9**, **10**, **11** and **12**, xanthoxylone derivatives. The presence of a methoxy group in position 6 should give a steric effect forcing the carbonyl group out of the plane of the A-ring and then decreasing the hydrogen bond between the 2-hydroxyl groups. This conformation change appears to be important to maintain the activity of these compounds. Chalcone **13** with a carboxyl substituent in B-ring exhibits a good activity that may be explained by the probable formation of a non member ring between this group and the carbonyl group. Thus, the planarity and the rigidity of the molecular structure seem to be important factors to the activity in these cases.

We further investigated the cytotoxic effect of the more active compounds: **1**, **3** and **13**. The IC_{50} values were determined from concentration-response curve, which are $12 \pm 0.7 \mu\text{M}$, $17 \pm 1.5 \mu\text{M}$ and $30 \pm 1.9 \mu\text{M}$, to the chalcones **1**, **3** and **13** respectively (Figure 3).

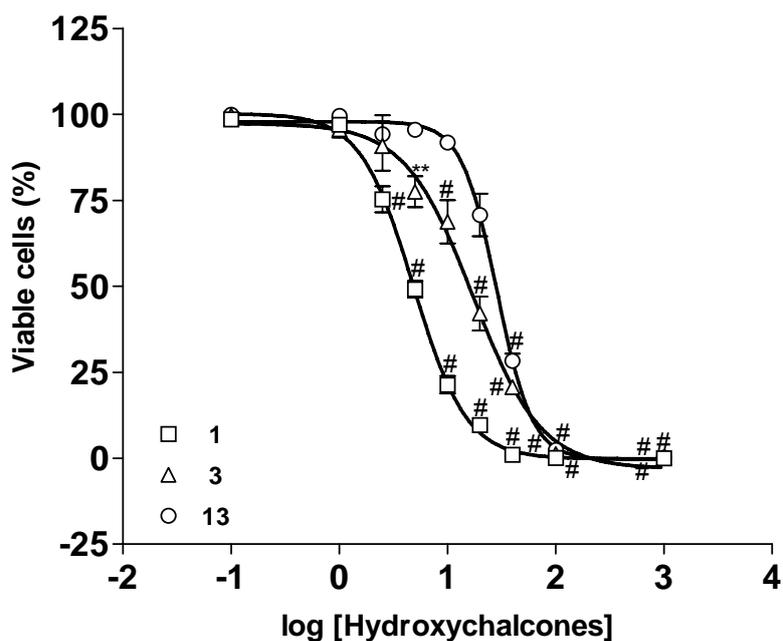


Figure 3: Concentration-response of synthetic hydroxychalcones 1, 3 and 13 on murine melanoma B16-F10 cell line. Cells, 1×10^4 , were incubated with the compounds (0 – 40 μ M) in triplicate for 72h, after that they were washed and processed for MTT assay. Optical density of control groups was taken as 100% of cell viability. Each bar represents the mean \pm S.E.M. of three experiments. **P < 0.01 and #P < 0.001 compared to control groups, using ANOVA followed by Bonferroni's *t* test.

In order to verify if the compounds would show some selectivity they were tested against a non-tumoral cell line (VERO). In the Figure 4 it is possible to observe the toxicity of compounds 1, 3 and 13. The concentrations of the compounds tested were those that correspond to the IC₅₀ for B16-F10 cells. The results are summarized in Table 1. Comparing the cell death promoted in VERO cells is possible to observe that the cytotoxicity was higher in B16-F10 cells with significant *p* value.

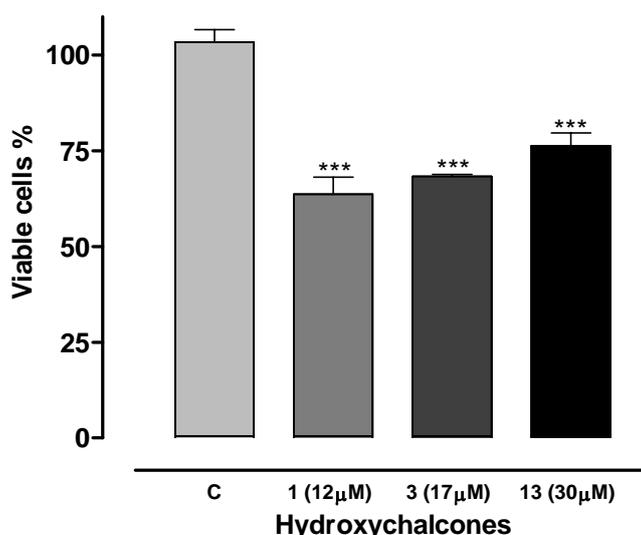


Figure 4: Cytotoxic effect of synthetic hydroxychalcones 1, 3 and 13 on VERO cells (non-tumoral cell line). Cells, 1×10^4 , were incubated for 72h, with the compounds at concentration which corresponds to the IC_{50} for cell toxicity for B16-F10 (12, 17 and 30 μM respectively), after that they were washed and processed for MTT assay. Optical density of control groups (C) was taken as 100% of cell viability. Cell viability was checked in the beginning of the experiment by Trypan Blue exclusion. Each point represents the mean \pm S.E.M. of three experiments. *** $P < 0,001$ compared to control groups, using ANOVA followed by Bonferroni's t test.

Table 1: Comparison of the cellular viability in B16-F10 and VERO cells lines after treatment with hydroxychalcones.

Hydroxychalcone	B16-F10 ($IC_{50} \pm$ EPM, μM)	Vero (Viable cells \pm EPM, % of control)	p value*
1	12 ± 0.7	63.6 ± 4.6	< 0.0001
3	17 ± 1.5	68.4 ± 0.45	< 0.0001
13	30 ± 1.9	76.4 ± 1.0	< 0.0001

* P values were determined using Student t test.

In order to elucidate the mechanism of death of B16-F10 cells induced by hydroxychalcones it was investigated if these compounds could induce DNA fragmentation, a biochemical mark of apoptosis.⁴⁷ The cell death induced by the chalcones **1** and **3** (bands B and C) seems to be through apoptosis, which is expected for antitumoral drugs (Figure 5). The cell death induced by the

hydroxychalcone **13** (band D), seems to be through necrosis. The band without treatment with hydroxychalcones (A) showed a uniform chromatin. The results were obtained by DNA fragmentation revealed in agarose gel electrophoresis.

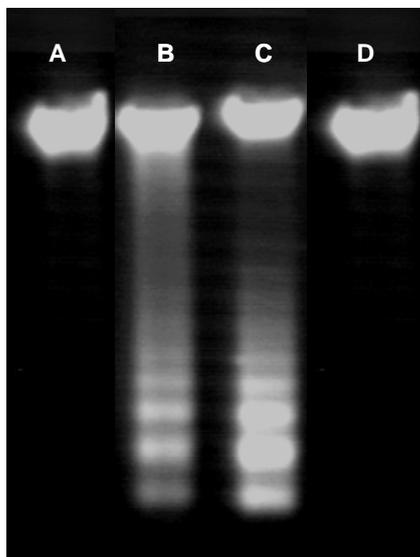


Figure 5. Cytotoxic effect of synthetic hydroxychalcones on induced DNA fragmentation in B16-F10 cells. B16-F10 cells (5×10^5 cells) were treated for 24 hours with hydroxychalcones at: 0 μM , Lane A - Control untreated; Lane B - 12 μM hydroxychalcone **1**; Lane C - 17 μM hydroxychalcone **3**; Lane D - 30 μM hydroxychalcone **13** (IC_{50} concentrations for cell toxicity). After incubation, the samples were processed for DNA extraction and analysed through agarose gel electrophoresis as described in Materials and Methods.

The mitochondria is a central organelle involved in apoptosis, with the capacity to activate directly the execution pathways.⁴⁸ Hu *et al.* (2007) demonstrated that IN6CPBD induces apoptosis in human melanoma through a mitochondrial dysfunction.⁴⁹ Sabzevari *et al.* (2004) suggests that the cytotoxic activity of the phloretin, isoliquiritigenin, and of ten other hydroxylated chalcones, in K562 leukemia or melanoma cells, are due their ability to mitochondrial uncoupling.¹⁴ Cao *et al.* (2007) also detected the induction of apoptosis through mitochondrial hyperpolarization and mtDNA damage in human hepatoma G2 cells by curcumin.⁴⁸ Garland and Halestrap (1997) also showed that the depletion of intracellular ATP, by ATPase mitochondrial uncoupling, induced cell death through apoptosis, exhibiting DNA fragmentation in cell lines pro-B interleukin-3 (IL-3)-dependent.⁴⁰

In the Figure 6, it is possible to see that the hydroxychalcones **1** and **3** decreased the levels of ATP in the melanoma cells in a concentration-dependent manner; the ATP depletion was higher than the death of these cells. The cell death through apoptosis can be a consequence energy cell loss, caused by the compounds.⁵⁰ It is supposed that the hydroxychalcone **13** induced cell death through necrosis, since it was not observed DNA breakage induced by this compound (Fig.5). However unexpectedly it did not alter significantly ATP intracellular level of melanoma cells as expected for death induced by necrosis. The necrosis has believed to occur as a consequence of cell injury and depletion of ATP; since apoptosis require ATP and necrosis does not.^{50,51}

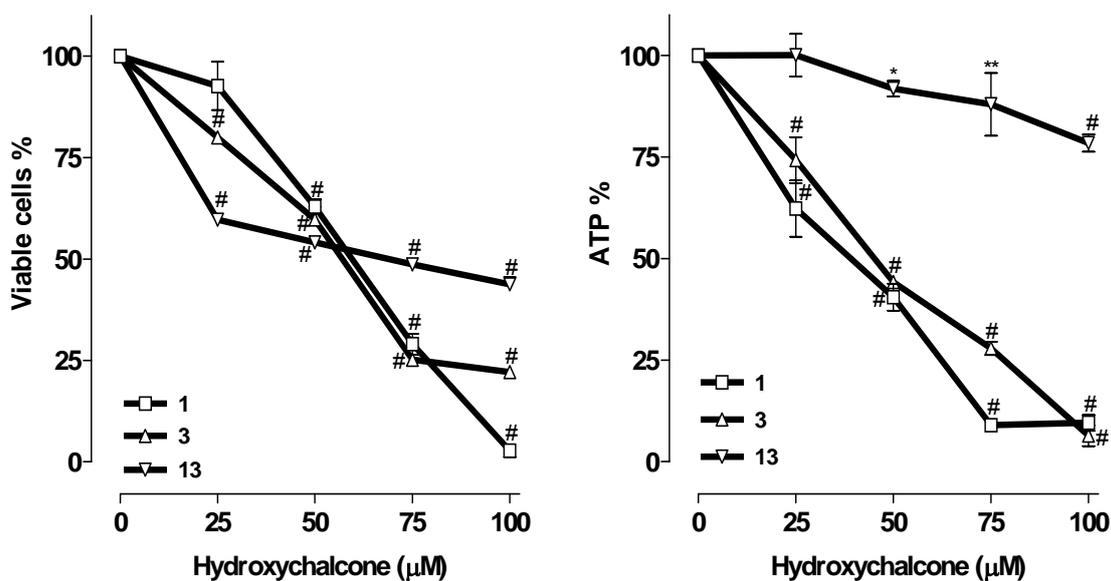


Figure 6. Effect of hydroxychalcones 1, 3 and 13 on ATP levels, compared to cytotoxic effect, in B16-F10 cells. Cells, 1×10^5 , were incubated with the compounds (0 – 100 μM) for 24h, after that they were washed and processed for MTT assay, to analyze the cell viability. Cells 3×10^5 were incubated with the compounds at the same concentrations for 24h, for ATP concentration measurements. The cellular ATP content was measured with luciferin-luciferase kit, as described in Materials and Methods. Each bar represents the mean \pm S.E.M. of three experiments in triplicate. * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$ and # $P < 0.001$ compared to control groups, using ANOVA followed by Bonferroni's t test.

We further analyzed a possible effect of hydroxychalcones on mitochondria work measuring mitochondrial GSH levels in melanoma cells after treatment with the compounds. Besides of antioxidants properties of flavonoids the chemopreventive activity of some compounds may be due their prooxidants characteristics. They also

can potentiate the cytotoxicity of prooxidants agents in tumor cells and its effects involve mitochondrial dysfunction.⁵²

Kachadouriam & Day (2006) showed that lower GSH levels in the mitochondria of in human lung epithelial cells A549, treated with 2',5'-hydroxychalcone involved mitochondrial dysfunction.⁵² The Figure 7 shown that only compounds **1** and **3** reduced the level of mitochondrial GSH at 24 h, fact that may be related to ATP depletion induced by these compounds. The GSH, present in mitochondria, plays an important role in the control of reactive oxygen species generation, in the integrity of mitochondrial membranes, release of proapoptotic factors and in the modulation of cell death by several pathways.^{53,54} Besides the GSH in mitochondria protect the integrity of mitochondrial components, thus playing a determinant role in the response of apoptosis. The hydroxychalcones **1** e **3** may be considered promising compounds, based on the fact that mitochondrial GSH depletion cause mitochondrial dysfunction, and the rapid growth of tumor cells is also highly energy-dependent.

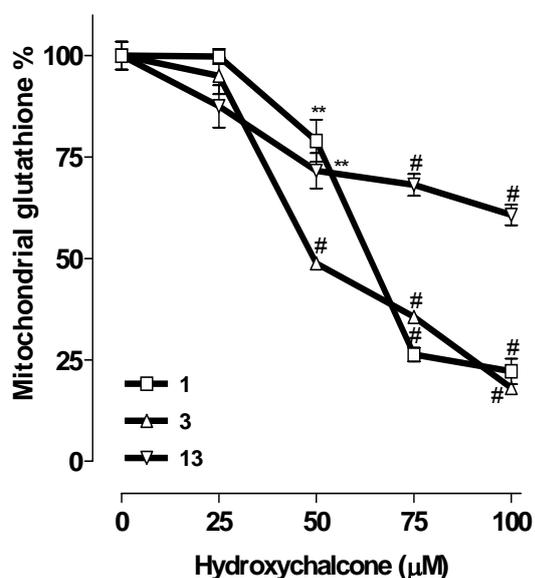


Figure 7. Effect of hydroxychalcones 1, 3 and 13 on mitochondrial GSH levels. Cells 3×10^5 were incubated with the compounds (0 - 100 μM) for 24h. Mitochondrial glutathione (GSH + GSSG) was measured in cell lysates using the glutathione reductase method, as described in Materials and Methods section. Each bar represents the mean \pm S.E.M. of three experiments in triplicate. *P < 0.05, **P < 0.01 and #P < 0.001 compared to control groups, using ANOVA followed by Bonferroni's t test.

In summary, thirteen hydroxychalcones were synthesized, and **1**, **3** and **13** exhibited effective cytotoxicity against melanoma B16-F10 cells. Compound **1** was

the most active, with IC₅₀ value of 12µM. Compounds **1** and **3** induced apoptosis suggesting to be through mitochondrial GSH and ATP depletion. Compound **13** induced cell death through necrosis and no ATP depletion. The main characteristic between chalcones **1** and **3** is the presence of unit 1-naphtyl at B-ring. The higher activity of compound **1** seems to be due to the free hydroxyl group at A-ring.

The compounds **1** and **3** are promising to continue the research. Further studies are being developed by our group to elucidate the mechanism of action. The structure-activity analysis reveals that the predominant factor for the activity is the molecule shape, and secondarily the number of hydroxyl groups in the chalcone.

Experimental

Preparation of the compounds: The compounds were prepared by aldolic condensation. All reagents used were obtained commercially (Merck, Sigma-Aldrich), except the xanthoxyline (2-hydroxy-4,6-dimethoxyacetophenone) and the monobromide xanthoxyline (2-hydroxy-3-bromo-4,6-dimethoxychalcone), that were prepared as previously described.⁵⁵ All chalcones were prepared by magnetic agitation of hydroxylated acetophenone (2 mmol), methanol (30 ml), KOH 50% w/v (5 ml) and the corresponding aldehyde (2 mmol), at room temperature for 24 hours. Distilled water and chloridric acid 10% were added in the reaction for total precipitation of the compounds. The compounds were then obtained by vacuum filtration and later recrystallized in dichloromethane and hexane. The chalcones **1**, **3**, **4**, **7** and **12** were previously cited, respectively, by Hollinshead (1996),⁵⁶ Subbanwad and Vibhute (1993),⁵⁷ Liu *et al.* (2003),⁵⁸ Hsu *et al.* (1959)⁵⁹ and by Bora *et al.* (2000).⁶⁰ The compounds **2** and **11** were described by Boeck and co-workers (2006)³³ and the structures **5**, **6**, **8**, **9**, **10** and **13** are new chalcones.

Physico-chemical data of the compounds: The purified chalcones were obtained in yields between 36% and 66%. The structures were identified using melting points (m.p.), infrared spectroscopy (IR), ¹H and ¹³C nuclear magnetic resonance spectroscopy (NMR), and to the unpublished ones, also elementary analyses. Melting points were determined with a Microquímica MGAPF-301 apparatus and are uncorrected. IR spectra were recorded with a Abb Bomen FTLA 2000 spectrometer

on KBr disks. NMR (^1H and ^{13}C NMR) were recorded on Varian Oxford AS-400 (400 MHz), using tetramethylsilane as an internal standard. Elementary analyses were obtained with a CHNS EA 1110. Percentages of C and H were in agreement with the product formula (within $\pm 0.4\%$ of theoretical values to C). The purity of the synthesized chalcones was analyzed by thin-layer chromatography (TLC) using Merck silica pre-coated aluminum plates 200 μm in thickness with several solvent systems of different polarities. Compounds were visualized with ultraviolet light ($\lambda = 254$ e 360 nm) and using sulfuric anisaldehyde solution followed by heat as developing agent and purified by recrystallization from hexane and dichloromethane. ^1H NMR spectra revealed that all the structures were geometrically pure and configured E ($J_{\text{H}\alpha\text{-H}\beta} = 15,2 - 16,4$ Hz).

Physico-chemical data of synthesized compounds:

1 – (2E)-1-(3'-hydroxyphenyl)-3-(1-naphtyl)-2-propen-1-one. Yellow solid, m.p. 174-175. ^1H NMR (CDCl_3) δ 7.10 (d, 1H, $J = 8.0$ Hz, H4'), 7.40 (dd, 1H, H5'), 7.51-7.65 (m, 5H, H3, H4, H6, H7, H2'), 7.60 (d, 1H, $J = 15.6$ Hz, H α), 7.90 (d, 2H, H5, H8), 7.94 (d, 1H, $J = 8.4$ Hz, H6'), 8.26 (d, 1H, $J = 8.0$ Hz, H2), 8.67 (d, 1H, $J = 15.6$ Hz, H β). ^{13}C NMR (CDCl_3) δ 115.07 (C2'), 120.22 (C4'), 120.32 (C6'), 123.41 (C α), 124.97 (C2), 125.56 (C3), 125.89 (C8), 126.52 (C6), 127.30 (C7), 129.07 (C4), 130.08 (C5), 130.93 (C5'), 132.01 (C9), 132.34 (C10), 134.16 (C1), 139.91 (C1'), 140.39 (C β), 158.06 (C3'), 189.09 (C=O). IR $\nu_{\text{max}}/\text{cm}^{-1}$ 3176, 1642, 1351, 1571, 1273, 1475, 1172, 962, 772, 707 (KBr). Anal. Calcd for $\text{C}_{19}\text{H}_{14}\text{O}_2$: C 83.19, H 5.14. Found: C 83.42, H 5.21. Yield: 51%.

2 – (2E)-1-(2'-hydroxy-4',6'-dimethoxyphenyl)-3-(3-nitrophenyl)-2-propen-1-one. Orange solid, m.p. 171-172 $^\circ\text{C}$. ^1H NMR (CDCl_3) δ 3.85 (s, 3H, OCH_3), 3.94 (s, 3H, OCH_3), 5.98 (s, 1H, H5'), 6.12 (s, 1H, H3'), 7.74 (d, 1H, $J = 15.6$ Hz, H α), 7.84-7.88 (m, 2H, H4, H5), 7.98 (d, 1H, $J = 15.6$ Hz, H β), 8.22 (d, 1H, $J = 7.75$ Hz, H6), 8.46 (s, 1H, H2), 14.09 (s, 1H, OH). ^{13}C NMR (CDCl_3) δ 55.56 (OCH_3), 55.82 (OCH_3), 91.37 (C5'), 93.84 (C3'), 106.20 (C1'), 122.08 (C2), 123.99 (C4), 129.78 (C α), 130.51 (C5), 134.01 (C6), 137.43 (C1), 138.68 (C β), 148.71 (C3), 162.45 (C2'), 166.45 (C6'), 168.46 (C4'), 191.78 (C=O). IR $\nu_{\text{max}}/\text{cm}^{-1}$ 1640, 4580 (KBr). Anal. Calcd for $\text{C}_{17}\text{H}_{15}\text{NO}_6$: C 62.00, H 4.59, N 4.59. Found: C 62.08, H 4.26. Yield: 51%.

3 – (2E)-1-(2'-hydroxyphenyl)-3-(1-naphtyl)-2-propen-1-one. Yellow solid, m.p. 106-108 $^\circ\text{C}$. ^1H NMR (CDCl_3) δ 6.97 (dd, 1H, $J = 7.4$ Hz, H5'), 7.06 (d, 1H, $J = 8.4$ Hz, H3'), 7.51-7.62 (m, 4H, H3, H6, H7, H4'), 7.76 (d, 1H, $J = 15.2$ Hz, H α), 7.90-7.99 (m, 4H, H6', H4, H5, H8), 8.29 (d, 1H, $J = 8.4$ Hz, H2), 8.79 (d, 1H, $J = 15.2$ Hz, H β), 12.88 (s, 1H, OH). ^{13}C NMR (CDCl_3) δ 118.93 (C3'), 119.17 (C5'), 122.99 (C α), 123.67 (C2), 125.59 (C8), 125.68 (C1'), 126.67 (C3), 127.41 (C6), 129.07 (C4, C5),

130.00 (C9, C6'), 131.48 (C10), 136.74 (C1, C4'), 142.66 (C β), 163.93 (C2'), 194.12 (C=O). IR $\nu_{\max}/\text{cm}^{-1}$ 3451, 1635, 1351, 1576, 1203, 1015, 3047, 1435, 1162, 972, 760 (KBr). Anal. Calcd for C₁₉H₁₄O₂: C 83.19, H 5.14. Found: C 83.88, H 5.18. Yield: 57%.

4 – (2E)-1-(2'-hydroxyphenyl)-3-(2-naphtyl)-2-propen-1-one. Yellow solid, m.p.: 135-137 °C (lit. p.f.: 146-148 °C)¹³². ¹H NMR (CDCl₃) δ 6.96 (d, 1H, J = 8.0 Hz, H3'), 7.03-7.10 (m, 1H, H5'), 7.48- 7.54 (m, 3H, H3, H4, H4'), 7.75 (d, 1H, J = 16.0 Hz, H α), 7.78- 7.89 (m, 5H, H5, H6, H7, H8, H6'), 7.93 (d, 1H, J = 16.0 Hz, H β), 8.04 (s, 1H, H1), 12.89 (s, 1H, OH). ¹³C NMR (CDCl₃) δ 118.89 (C3'), 120.41 (C5'), 121.93 (C3), 123.89 (C α), 125.65 (C1'), 126.80 (C6), 127.13 (C7), 127.33 (C1), 128.40 (C5), 129.08 (C8), 129.94 (C4), 131.39 (C6'), 132.31 (C10), 133.57 (C9), 134.78 (C2), 136.65 (C4'), 145.79 (C β), 163.86 (C2'), 193.91 (C=O). IR $\nu_{\max}/\text{cm}^{-1}$ 3195 (OH), 1689 (C=O), 1568 (C=C), 3046, 1482, 1432, 1021, 985, 819, 752 (Ar) (KBr). Anal. Calcd for C₁₉H₁₄O₂: C 83.19, H 5.14. Found: C 82.04, H 5.18. Yield: 66%.

5 – (2E)-1-(3'-methoxy-4'-hydroxyphenyl)-3-(2-naphtyl)-2-propen-1-one. Light yellow solid, m.p.: 166-168 °C. ¹H NMR (CDCl₃) δ 4.01 (s, 3H, OCH₃), 6.10 (s, 1H, OH), 7.02 (d, 1H, J = 8.0 Hz, H5'), 7.29 (s, 1H, H2'), 7.52-7.54 (m, 1H, H6'), 7.66-7.72 (m, 3H, H3, H6, H7), 7.83 (d, 1H, J = 15.6 Hz, H α), 7.80-7.87 (m, 3H, H4, H5, H8), 7.97 (d, 1H, J = 15.6 Hz, H β), 8.05 (s, 1H, H1). ¹³C NMR (DMSO-d₆) δ 56.37 (*m*-OCH₃), 110.74 (C2'), 114.05 (C5'), 121.99 (C3), 123.96 (C α), 126.97 (C6'), 127.51 (C6), 128.03 (C7), 128.85 (C1), 128.91 (C8), 130.68 (C4, C5), 131.33 (C1'), 132.81 (C10), 133.63 (C9), 134.54 (C2), 144.30 (C β), 147.15 (C4'), 150.64 (C3'), 188.74 (C=O). IR $\nu_{\max}/\text{cm}^{-1}$ 3265 (OH), 1643, 1202 (C=O), 1280, 1025 (C-O), 1563 (C=C), 2950, 2835, 1522, 1445, 970, 844, 816, 779 (Ar) (KBr). Anal. Calcd for C₂₀H₁₆O₃: C 78.93, H 5.30. Found: C 78.86, H 5.76. Yield: 39%.

6 – (2E)-1-(2'-hydroxy-4',6'-dimethoxyphenyl)-3-(1-naphtyl)-2-propen-1-one. Yellow solid, m.p. 116-117 °C. ¹H NMR (CDCl₃) δ 3.85 (s, 3H, OCH₃), 3.92 (s, 3H, OCH₃), 5.98 (s, 1H, H3'), 6.14 (s, 1H, H5'), 7.50-7.61 (m, 3H, H3, H6, H7), 7.83-7.92 (m, 3H, H4, H5, H8), 7.97 (d, 1H, J = 15.2 Hz, H α), 8.31 (d, 1H, H2), 8.61 (d, 1H, J = 15.2 Hz, H β), 12.83 (OH). ¹³C NMR (CDCl₃) δ 55.87 (OCH₃), 56.15 (OCH₃), 91.54 (C5'), 94.03 (C3'), 101.63 (C1'), 124.00 (C α), 125.39 (C2), 125.71 (C8), 126.46 (C3), 127.03 (C6), 128.93 (C7), 130.46 (C4), 130.55 (C5), 132.02 (C9), 133.32 (C10), 133.99 (C1), 139.49 (C β), 162.79 (C2'), 166.55 (C6'), 168.68 (C4'), 192.79 (C=O). IR $\nu_{\max}/\text{cm}^{-1}$ 3450, 1627, 1341, 1571, 1215, 1109, 1440, 1153, 975, 810, 768 (KBr). Anal. Calcd for C₂₁H₁₈O₄: C 75.43, H 5.43. Found: C 75.66, H 5.94. Yield: 58%.

7 – (2E)-1-(2'-hydroxy-4',6'-dimethoxyphenyl)-3-(3-chlorophenyl)-2-propen-1-one. Yellow solid, m.p.: 104-106 °C. ¹H NMR (CDCl₃) δ 3.84 (s, 3H, OCH₃), 3.93 (s, 3H, OCH₃), 5.97 (s, 1H, H3'), 6.11 (s, 1H, H5'), 7.33-7.35 (m, 3H, H4, H5, H6), 7.57 (s, 1H, H2), 7.68 (d, 1H, J = 15.6 Hz, H α), 7.87 (d, 1H, J = 15.6 Hz, H β), 13.95 (s, 1H, OH). ¹³C NMR (CDCl₃) δ 55.89 (OCH₃), 56.19 (OCH₃), 91.58 (C5'), 94.02 (C3'), 106.50 (C1'), 126.88 (C α), 128.09 (C6), 129.10 (C2), 130.07 (C4), 130.35 (C5), 135.06 (C3), 137.68 (C1), 140.70 (C β), 162.73 (C2'), 166.68 (C6'), 168.68 (C4'), 192.51 (C=O). IR $\nu_{\max}/\text{cm}^{-1}$ 3451 (OH), 1624, 1215 (C=O), 1029 (C-O), 1576 (C=C),

2936, 1439, 977, 909, 822 (Ar) (KBr). Anal. Calcd for C₁₇H₁₅ClO₄: C 64.06, H 4.74. Found: C 64.61, H 5.39. Yield: 36%.

8- (2E)-1-(2'-hydroxy-3'-bromo-4',6'-dimethoxyphenyl)-3-(2,6-dimethoxyphenyl)-2-propen-1-one. Orange solid, m.p. 193-194 °C. ¹H NMR (CDCl₃) δ 3.91 (s, 6H, OCH₃), 3.96 (s, 6H, OCH₃), 6.04 (s, 1H, H5'), 6.57 (d, 2H, J = 8.4 Hz, H3, H5), 7.28 (t, 1H, H4), 8.29 (d, 1H, J = 15.6 Hz, Hα), 8.34 (d, 1H, J = 15.6 Hz, Hβ), 14.65 (s, 1H, OH). ¹³C NMR (acetone-d₆) δ 55.72 (2 OCH₃), 56.06 (OCH₃), 56.32 (OCH₃), 88.35 (C5'), 94.76 (C3'), 104.21 (C1', C3, C5), 112.81 (C1), 129.11 (Cα), 132.35 (C4), 134.85 (Cβ), 160.81 (C2, C6), 162.35 (C6'), 162.91 (C2'), 166.31 (C4'), 205.56 (C=O). IR ν_{max}/cm⁻¹ 3442, 2941, 1616, 1552, 1325, 1253, 1193, 916, 782 (KBr). Anal. Calcd for C₁₉H₁₉BrO₆: C 53.92, H 4.52. Found: C 53.67, H 4.44. Yield: 42%.

9 – (2E)-1-(2'-hydroxy-3'-bromo-4',6'-dimethoxyphenyl)-3-(4-butoxyphenyl)-2-propen-1-one. Yellow solid, m.p. 172-173 °C. ¹H NMR (CDCl₃) δ 0.98 (t, 3H, -CH₃), 1.47-1.60 (m, 2H, -CH₂CH₃), 1.75-1.81 (m, 2H, -CH₂CH₂CH₃), 3.98 (s, 3H, OCH₃), 3.99 (s, 3H, OCH₃), 4.01 (t, 2H, -OCH₂-), 6.06 (s, 1H, H5'), 6.91 (d, 2H, J = 8.4 Hz, H3, H5), 7.54 (d, 2H, J = 8.4 Hz, H2, H6), 7.75 (d, 1H, J = 15.6 Hz, Hα), 7.83 (d, 1H, J = 15.6 Hz, Hβ), 14.96 (OH). ¹³C NMR (acetone-d₆) δ 13.42 (CH₃), 19.18 (-CH₂CH₃), 31.28 (-CH₂CH₂CH₃), 56.25 (OCH₃), 67.86 (-OCH₂-), 88.37 (C5'), 94.61 (C3'), 104.43 (C1'), 115.19 (C3, C5), 124.46 (Cα), 128.04 (C1), 130.71 (C2, C6), 143.72 (Cβ), 160.02 (C4), 168.46 (C2'), 168.82 (C6'), 176.12 (C4'), 198.07 (C=O). IR ν_{max}/cm⁻¹ 3450, 2945, 1615, 1554, 1221, 963 (KBr). Anal. Calcd for C₂₁H₂₃BrO₅: C 57.94, H 5.33. Found: C 57.27, H 5.27. Yield: 47%.

10 – (2E)-1-(2'-hydroxy-3'-bromo-4',6'-dimethoxyphenyl)-3-(4-nitrophenyl)-2-propen-1-one. Yellow solid, m.p. 230-231 °C. ¹H NMR (CDCl₃) δ 3.94 (s, 3H, OCH₃), 3.97 (s, 3H, OCH₃), 6.03 (s, 1H, H5'), 7.61 (d, 2H, J = 8.0 Hz, H2, H6), 7.74 (d, 1H, J = 16.0 Hz, Hα), 7.93 (d, 1H, J = 16.0 Hz, Hβ), 8.24 (d, 2H, J = 8.0 Hz, H3, H5), 14.73 (s, 1H, OH). ¹³C NMR (CDCl₃) δ 55.74 (OCH₃), 56.32 (OCH₃), 86.69 (C5'), 91.63 (C3'), 106.55 (C1'), 109.77 (C3, C5), 123.78 (Cα), 126.66 (C2, C6), 128.82 (C1), 131.03 (Cβ), 150.47 (C4), 161.92 (C6'), 162.62 (C2'), 162.68 (C4'), 203.27 (C=O). IR ν_{max}/cm⁻¹ 3450, 2943, 1600, 1509, 1345, 1093, 976, 852 (KBr). Anal. Calcd for C₁₇H₁₄BrNO₆: C 50.02, H 3.46, N 3.43. Found: C 49.57, H 3.02, N 4.53. Yield: 42%.

11 – (2E)-1-(2'-hydroxy-3'-bromo-4',6'-dimethoxyphenyl)-3-(2-chlorophenyl)-2-propen-1-one. Light yellow solid, m.p. 210-212 °C. ¹H NMR (CDCl₃) δ 3.98 (s, 3H, OCH₃), 4.04 (s, 3H, OCH₃), 6.21 (s, 1H, H5'), 7.29-7.32 (m, 2H, H4, H5), 7.43 (d, 1H, H3), 7.67 (d, 1H, H6), 7.83 (d, 1H, J = 15.2 Hz, Hα), 8.18 (d, 1H, J = 15.2 Hz, Hβ), 14.67 (s, 1H, OH). ¹³C NMR (acetone-d₆) δ 56.85 (OCH₃), 57.08 (OCH₃), 87.80 (C5'), 92.80 (C3'), 106.00 (C1'), 127.72 (Cα), 128.60 (C5), 130.22 (C6), 131.06 (C3), 131.62 (C4), 134.33 (C2), 136.21 (C1), 139.49 (Cβ), 162.90 (C2'), 163.00 (C6'), 163.93 (C4'), 193.25 (C=O). IR ν_{max}/cm⁻¹ 3450, 2934, 1618, 1557, 1216, 1125, 965, 788 (KBr). Anal. Calcd for C₁₇H₁₄BrClO₄: C 51.35, H 3.55. Found: C 51.45, H 3.58. Yield: 62%.

12 – (2E)-1-(2'-hydroxy-3'-bromo-4',6'-dimethoxyphenyl)-3-(4-methoxyphenyl)-2-propen-1-one. Yellow solid, m.p. 144-146 °C. ¹H NMR (CDCl₃) δ 3.86 (s, 3H, OCH₃), 3.97 (s, 3H, OCH₃), 3.99 (s, 3H, OCH₃), 6.07 (s, 1H, H5'), 6.93 (d, 2H, *J* = 8.8 Hz, H3, H5), 7.56 (d, 2H, *J* = 8.8 Hz, H2, H6), 7.79 (d, 1H, *J* = 16.4 Hz, H_α), 7.89 (d, 1H, *J* = 16.4 Hz, H_β), 14.81 (OH). ¹³C NMR (acetone-d₆) δ 55.17 (OCH₃), 56.25 (OCH₃), 56.37 (OCH₃), 88.34 (C5'), 94.76 (C3'), 106.66 (C1'), 114.70 (C3, C5), 124.61 (C_α), 128.10 (C1), 130.68 (C2, C6), 143.59 (C_β), 162.17 (C4), 162.92 (C2', C6'), 163.28 (C4'), 205.72 (C=O). IR $\nu_{\max}/\text{cm}^{-1}$ 3443, 1615, 1557, 1220, 1177, 824 (KBr). Anal. Calcd for C₁₈H₁₇BrO₅: C 54.98, H 4.36. Found: C 51.95, H 4.46. Yield: 40%.

13 - (2E)-1-(2'-hydroxy-3'-bromo-4',6'-dimethoxyphenyl)-3-(2-carboxyphenyl)-2-propen-1-one. Yellow solid, m.p. 230 °C. ¹H NMR (acetone-d₆) δ 3.79 (s, 3H, OCH₃), 3.85 (s, 3H, OCH₃), 6.00 (s, 1H, H5'), 7.64 (t, 1H, *J* = 8.0 Hz, H4), 7.64 (d, 1H, *J* = 16.0 Hz, H_α), 7.79 (d, 1H, *J* = 8.0 Hz, H6), 7.87 (t, 1H, *J* = 8.0 Hz, H5), 7.87 (d, 1H, *J* = 16.0 Hz, H_β), 7.92 (d, 1H, *J* = 8.0 Hz, H3), 14.23 (COOH), 14.57 (OH). ¹³C NMR (acetone-d₆) δ 57.25 (OCH₃), 57.74 (OCH₃), 88.12 (C5'), 94.78 (C3'), 106.14 (C1'), 124.40 (C_α), 126.49 (C6), 130.09 (C4), 130.73 (C2), 132.61 (C3), 134.88 (C5), 135.66 (C1), 136.76 (C_β), 156.72 (C6'), 165.62 (C2'), 166.90 (C4'), 180.67 (COOH), 206.97 (C=O). IR $\nu_{\max}/\text{cm}^{-1}$ 3441, 2942, 2640, 1627, 1559, 1216, 1125, 964, 781 (KBr). Anal. Calcd for C₁₈H₁₅BrO₆: C 53.09, H 3.71. Found: C 49.08, H 3.71. Yield: 59%.

Biological Assays

Reagents: Tissue culture media and fetal bovine serum were purchased from CULTILAB (São Paulo, Brazil), penicillin/streptomycin were purchased from GIBCO (Grand Island, NY), isopropanol were purchased from Merck (Darmstat, Germany), 3-[4,5-Dimethylthiazol-2-yl]-2,5-diphenyltetrazolium bromide (MTT) and N-[2-Hydroxyethyl]piperazine-N'-2-ethanesulfonic acid] (HEPES) were purchased from Sigma (St. Louis, MO, USA). The luciferin-luciferase kit was purchased from Bio-Orbit® (Turku, Finland).

Cell Culture: Murine B16-F10 melanoma cells line were obtained from American Type Culture Cell (ATCC) and VERO cells Associação Técnico Científica Paul Ehrlich (APABCAM, Rio de Janeiro, Brazil). The cells were cultured in DMEM supplemented with 10% heat-inactivated fetal bovine serum, 100 U/ml penicillin, 100 µg/ml streptomycin and 10 mM HEPES. The cell cultures were maintained at 37 °C in a 5% CO₂ humidified atmosphere and pH 7.4. Once the cells reached 90%

confluency, a cell suspension was prepared by trypsinization cultures (B16-F10 and Vero). In all experiments, viable cells were checked in the beginning of experiment by Trypan Blue exclusion.

Cytotoxicity: The cytotoxic effect of synthetic hydroxychalcones was evaluated using a MTT assay. Briefly, 1×10^4 cells/well were incubated in triplicate with compounds dissolved in DMSO (0,1% final concentration) and diluted with medium culture to their final concentrations in 72h, respectively, in microplates 96-well. After the incubation time at 37 °C, the cells were washed with new medium culture and 10 μ l MTT (5mg/ml) was added followed by 3h of incubation at 37 °C. The precipitated formazan was dissolved in 100 μ l acid isopropanol solution (isopropanol containing HCl 0.04M) and the absorbance was measured at 540nm using microwell system reader (Organon Teknika, Belgium). The cells, 1×10^4 cells were incubated with the hydroxychalcones in concentration range of 0 - to 40 μ M for 72h, following with MTT assay. The IC₅₀S values (a concentration that produces 50% reduction in the viable cell number) were calculated from the concentration-response curves. The cell viability was checked in the beginning of experiment by Tripan Blue exclusion.

DNA fragmentation analysis by gel eletrophoresis: Briefly, 5×10^5 cells/well were incubated with compounds dissolved in DMSO (0,1% final concentration) at concentration IC₅₀ and diluted with medium culture to their final concentrations, in 24h. To isolate DNA fragments cells were harvested and washed twice with cold phosphate buffer saline (PBS). Cell pellets were then incubated in a lyses buffer containing 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. DNA was then precipitated with 2.5 vol of ethanol-NaCl at -25 °C overnight and dried in air. After washing with ice-cold 70% ethanol, the pellets were then dissolved in TE buffer containing 10 mM Tris–HCl, pH 8.0, 1 mM EDTA and 0.6 mg/ml RNase A and incubated at 37 °C for 1 h. DNA solutions were then separated in 1.5% agarose gels, stained with ethidium bromide and visualized by 2UV Transilluminator (MacroVue UV-20 Hoefer) for ladder formation.

Bioluminescent assay for ATP: The amount of intracellular ATP was determined by bioluminescent assay measuring the light output of the luciferin-luciferase reaction. Approximately 3^5 cells were incubated in the presence of hydroxychalcones at

different concentrations then they were pelleted and extracted with 40 μ L of 1.25% trichloroacetic acid. The extracts were kept on ice for 30' min. and neutralized with 20 μ L of 1 M Tris-acetate, pH 7.5. After centrifugation, the supernatants were diluted with the supplied dilution buffer (X4) and used for ATP quantification.

Mitochondrial glutathione measurement: Mitochondria enriched preparation was obtained by centrifugation. Total glutathione (GSH + GSSG, reduced and disulphide forms, respectively) was measured through the glutathione reductase method [25]. Approximately 3^5 cells were washed in PBS and homogenized in a buffer containing Tris-sacarose 10mM/250mM, resuspended in 100 μ L chilled Milli-Q water containing 1mM EDTA and sonicated for 10 s. Then, 20 μ L of each homogenate were transferred to a 96-well plate followed by addition of 180 μ L of the reaction medium containing DTNB 75 μ M; NADPH 120 μ M, glutathione reductase 1 U/mL and EDTA 10 mM in phosphate buffer 100 mM, pH 7.4. A standard curve was made with GSH (0.001–1 μ M). The absorbance was measured immediately and then every min during 5 min at 412 nm using a Microwell Systems (Organon Teknika). Values were expressed as percentage of control GSH values.

Statistical analysis: The statistical program GraphPad Prism® 4.0 Windows (Graph Pad software, Inc., San Diego CA 2003)⁶¹ was used to calculate the IC₅₀ and the statistical significance. The results were presented as mean \pm S.E.M. of triplicates from three independent experiments. Statistical significance was assessed by ANOVA followed by Bonferroni's *t*-test, for comparisons of cell viability between B16-F10 and VERO lines the *t Student* test was used. *p values* < 0.05 was taken as statistically significant.

Acknowledgments

This research was supported by grants and fellowships from CNPq (Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico), CAPES (Coordenação de Pessoal de Nível Superior) and FAPESC (Fundação de Amparo à Ciência e Tecnologia de Santa Catarina). This work is part of the thesis of Andreia L. F. Navarini and Alessandra Mascarello, who are MSc students in Pharmacy and Chemistry, respectively. We would like to thank the Department of Chemistry and

also to Hospital Universitário for some facilities, both from Universidade Federal de Santa Catarina.

References

1. WHO. World Health Organization. Disponível em: <www.who.int/cancer>. Accessed in 30 may 2007.
2. Xu, L. Y.; Koo, J. *Int J Dermato*. **2006**, *45*, 1275-1283.
3. Fidler, I. J. *Cancer Research*. **1978**, *38*, 2651-2660. Fidler, I. J. *Cancer Research*. **1975**, *35*, 218-224.
4. Freitas, Z. F. O.; Rodrigues, E. G.; Oliveira V.; Carmona, A. K.; Travassos, L. R. *Melanoma Research*. **2004**, *14*, 333-344.
5. Avril, M. F.; Aamdal, S.; Grob, J. J.; Hauschild, A.; Morhr, P.; Bonerandi, J. J.; Weichenthal, M.; Neuber, K.; Bieber, T.; Gilde, K.; Porta, V. Guillem; Fra, J.; Bonnetterre, J.; Saiag, P.; Kamanabrou, D.; Pehamberger, H.; Sufliarsky, J.; Larriba, J. L. Gonzalez; Scherrer, A.; Menu, Y. *J Clin Oncol*. **2004**, *22*, 1118-1125.
6. Dimmock, J. R.; Elias, D. W.; Beazely, M. A.; Kandepu, N. M. *Curr Med Chem*. **1999**, *6*(12), 1125-49.
7. Ni, L.; Meng, Q. C.; Sikorski, J. A. *Expert Opin Ther Patents*. **2005**, *14*(12), 1669-1691.
8. Nakatani, N.; Ichimaru, M.; Moriyasu, M.; Kato, Atsushi. *Biol Pharm Bull*. **2005**, *28*(1), 83-86.
9. Kobori, M.; Iwashita, K.; Shinmoto, H.; Tsushida, T. *Cells Biosci Biotechnol Biochem*. **1999**, *63*(4), 719-725.
10. Saydam, G.; Aydin, H. H.; Sahin, F.; Kucukoglu, O.; Erciyas, E.; Terzioglu, E.; Buyukkececi, F.; Omay, S. B. *Leuk Res*. **2003**, *27*, 57-64.
11. Rao, Y. K.; Fang, S. H.; Tzeng, Y. M. *Bioorg Med Chem*. **2004**, *12*, 2679-2686.
12. Go, M. L.; Wu, X.; Liu, X. L. *Curr Med Chem*. **2005**, *12*, 483-499.
13. Hsu, Y. L.; Kuo, P. L.; Chiang, L. C.; Lin, C. C. *Clin Exper Pharm Physiol*. **2004**, *31*, 414-418.
14. Sabzevari, O.; Galati, G.; Moridani, M. Y.; Siraki A.; Brien P. J. O. *Chem-Biol Int*. **2004**, *148*, 57-67.
15. Chun-Lin, Y.; Liu, J. W.; Wei D. Z.; Lu, Y. H.; Qian F. *Pharm Res*. **2004**, *50*, 505-510.
16. Iwashita, K.; Kobori, M.; Yamaki, K.; Tsushida, T. *Biosci Biotechnol Biochem*. **2000**, *64*(9), 1813-1820.
17. Won, S. J.; Liu, C. T.; Tsao, L. T.; Weng J. R.; Ko, H. H.; Wang, J. P.; Lin, C. N. *Eur J Med Chem*. **2005**, *40*, 103-112.
18. Takahashi, T.; Baba, M.; Nischino, H.; Okuyama T. *Cancer Lett*. **2006**, *231*, 319-325.
19. Yakamoto, S.; Aizu, E.; Jiang, H.; Nakadate, T.; Kiyoto, I.; Wang, J. C.; Kato, R. *Carcinogenesis*. **1991**, *12*, 317- 323.
20. LeBlanc, R.; Dickson, J.; Brown, T.; Stewart, M.; Pati, H. N.; VanDerveer, D.; Arman, H.; Harris, J.; Pennington, W.; Holt, H. L.; Lee, M. *Bioorg Med Chem*. **2005**, *13*(21), 6025-6034.
21. Tatsuzaki, J.; Bastow, K. F.; Nakagawa-Goto, K.; Nakamura, S.; Itokawa, H.; Kuo-Hsiung L. *J Nat Prod*. **2006**, *69*, 1445-1449.
22. Cabrera, M.; Somoens, M.; Falchi, G.; Lavaggi, M. L.; Piro, O. E.; Castellano, E. E.; Vidal, A.; Azqueta, A.; Monge, A.; Ceráin, A. L.; Sagrera, G.; Seoane, G.; Cerecetto, H.; González, M. *Bioorg Med Chem*. **2007**, *15*, 3356-3367.

23. Kachadourian, R.; Day, B. J. *Free Rad Biol Medicine*. **2006**, *41*, 65-76.
24. Hsu, Y. L.; Kuo, P. L.; Lin, C. C. *Life Scien*. **2005**, *77*, 279-292.
25. Sogawa, S.; Nihro, Y.; Ueda, H.; Izumi, A.; Miki, T.; Matsumoto, H.; Satoh, T. *J Med Chem*. **1993**, *36*, 3904-3909.
26. Liu, Y. C.; Hsieh, C. W.; Wu, C. C.; Wung, B. S. *Life Scien*. **2007**, *80*(15), 1420-1430.
27. Ko, H. H.; Tsao, L. T.; Yu, K. L.; Liu, C. T.; Wang, J. P.; Lin, C. N. *Bioorg Med Chem*. **2003**, *11*, 105-11.
28. Lin, Y. M.; Zhou, Y.; Flavin, M. T.; Zhou, L. M.; Nie, W.; Chen, F. C. *Bioorg Med Chem*. **2002**, *10*, 2795-2802.
29. Yamamoto, K.; Kakegawa, H.; Ueda, H.; Matsumoto, H.; Sudo, T.; Miki, T.; Satoh, T. *Planta Medica*. **1992**, *58* (5), 389-393.
30. Anto, R. J.; Sukumran, K.; Kuttan, G.; Rao, M. N. A.; Subbaraju, V.; Kuttan, R. *Cancer Lett*. **1995**, *97*, 33-37.
31. Zhan, C.; Yang, J. *Pharmacol Res*. **2006**, *53*, 303-309.
32. Liu, M.; Wilairat, P.; Croft, S. L.; Tan, A. L. C.; Go, M. L. *Bioorg Med Chem*. **2003**, *11*, 2729-2738.
33. Boeck, P.; Falcão, C. A. B.; Leal, P. C.; Yunes, R. A.; Cechinel, V.; Torres-Santos, E. C.; Rossi-Bergamann, B. *Bioorg Med Chem*. **2006**, *14*, 1538-1545.
34. Ogawa, H.; Okada, Y.; Kamisako, T.; Baba, K. *Clin Exper Pharm Physiol*. **2007**, *34*, 238-243.
35. Lowe, S. W.; Rusley, H. E.; Jacks, T.; Houseman, D. E. *Cell*. **1993**, *74*, 957-967.
36. Ghobrial, I. M.; Witzig, T. E.; Adjei, A. A. *CA Cancer J Clin*. **2005**, *55*, 178-194.
37. Hanahan, D.; Weinberg, R. A. *Cell*. **2000**, *100*, 57-70.
38. Dias, N.; Bailly, C. *Biochem Pharm*. **2005**, *70*, 1-12.
39. Skulachev, V. P. *Apoptosis*. **2006**, *11*, 473-485.
40. Garland, J. M.; Halestrap, A. *J Biol Chem*. **1997**, *272* (8), 4680-4688.
41. Lash, L. H. *Chem Biol Interact*. **2006**, *163* (1-2), 54-67.
42. Kluza, J.; Lansiaux, A.; Watzet, N.; Hildebrand, M. P.; Léonce, S.; Pierré, A.; Hickman, J. A.; Bailly, C. *Biochemical Pharmacology*. **2002**, *63*, 1443-1452.
43. Stavrovskaya, A. A. *Biochemistry*. **2000**, *65* (1), 95-106.
44. Ozben, T. *FEBS Lett*. **2006**, *580* (12), 2903-2909.
45. Cos, P.; Calomme, M.; Sindambiwe, J. B.; De Bruyne, T.; Cimanga, K.; Pieters, L.; Vlietinck, A. J.; Vanden Berghe, D. *Planta Med*. **2001**, *67*(6), 515-519.
46. Cos, P.; Rajan, P.; Vedernikova, I.; Calomme, M.; Pieters, L.; Vlietinck, A. J.; Augustyns, K.; Haemers, A.; Vanden Berghe, D. *Free Rad Res*. **2002**, *36*(6), 711-716.
47. Wyllie, A. H.; Kerr, J. F. K.; Currie, A. R. *Int Rev Cytol*. **1980**, *68*, 251-305.
48. Cao, J.; Liu, Y.; Jia, L.; Zhou, H. M.; Kong, Y.; Yang, G.; Jiang, L. P.; Li, Q. J.; Zhong, L. F. *Free Radical Biology & Medicine*. **2007**, *43*, 968-975.
49. Hu, W. P.; Yu, H.; Sung, P. J.; Tsai, F. Y.; Shen, Y. K.; Chang, L. S.; Wang, J. J. *Chem, Res. Toxicol*. **2007**, *20*, 905-912.
50. Regula, K. M.; Ens, K.; Kirshenbaum, L. A. *Journal of Molecular and Cellular Cardiology*. **2003**, *35*, 559-567.
51. Wyllie, A. H. *Br J Cancer*. **1993**, *67* (2), 205-208.
52. Kachadourian, R.; Day, B. J. *Free Radical & Biology & Medicine*. **2006**, *41*, 65-76.
53. Fernández-Checa J. C. *Biochemical and Biophysical Research Communications*. **2003**, *304*, 471-479.
54. Garcia-Ruiz, C.; Fernández-Checa J. C. *J. Gastroenterol. Hepatol*. **2006**, *3*, 3-6.

55. Cechinel, V. F.; Vaz, Z. R.; Zunino, L.; Calixto, J. B.; Yunes, R. A. *Eur. J. Med. Chem.* **1996**, *31*, 833-839.
56. Hollinshead, S. P. *Tetrahedron Let.* **1996**, *51*, 9157-9160.
57. Subbanwad, G. R.; Vibhute, Y. B. *Asian J Chem.* **1993**, *5*, 352-357.
58. Liu, M.; Wilairat, P.; Croft, S. L.; Tan, A. L. C.; Go, M. L. *Bioorg Med Chem.* **2003**, *11*, 2729-2738.
59. Hsu, K. K.; Hung, M.; Chen, F. C. *Taiwan Kexue.* **1959**, *13*, 92-94.
60. Bora, U.; Bose, G.; Chaudhuri, M. K.; Dhar, S. S.; Gopinath, R.; Khan, A. T.; Patel, B. K. *Organic Letters.* **2000**, *2* (3), 247-249.
61. Motulsky, H. J.; A. Christopoulos. *Ed. GraphPad software Inc.* **2003**, 257-275.