



UNIVERSIDADE FEDERAL DE SANTA CATARINA  
DEPARTAMENTO DE BIOLOGIA CELULAR,  
EMBRIOLOGIA E GENÉTICA  
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM BIOLOGIA  
CELULAR E DO DESENVOLVIMENTO

LUCAS FELIPE FERNANDES BITTENCOURT

AVALIAÇÃO *IN VITRO* DO EFEITO CITOTÓXICO DE  
CHALCONAS SINTÉTICAS EM GLIOBLASTOMA  
MULTIFORME HUMANO

FLORIANÓPOLIS  
2014

LUCAS FELIPE FERNANDES BITTENCOURT

AVALIAÇÃO *IN VITRO* DO EFEITO CITOTÓXICO DE  
CHALCONAS SINTÉTICAS EM GLIOBLASTOMA  
MULTIFORME HUMANO

Dissertação de mestrado apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Biologia Celular e do Desenvolvimento - PGBCD, como requisito parcial para obtenção do título de Mestre em Biologia Celular e do Desenvolvimento.

Orientadora: Prof.<sup>a</sup> Dr.<sup>a</sup> Cláudia  
Beatriz Nedel Mendes de Aguiar  
Co-orientador: Prof. Dr. Ricardo  
Castilho Garcez

FLORIANÓPOLIS  
2014

Ficha de identificação da obra elaborada pelo autor,  
através do Programa de Geração Automática da Biblioteca Universitária da UFSC.

Bittencourt, Lucas Felipe Fernandes  
AVALIAÇÃO IN VITRO DO EFEITO CITOTÓXICO DE CHALCONAS  
SINTÉTICAS EM GLOBLASTOMA MULTIFORME HUMANO / Lucas Felipe  
Fernandes Bittencourt ; orientadora, Claudia Beatriz Nedel  
Mendes de Aguiar ; co-orientador, Ricardo Castilho Garcez. -  
Florianópolis, SC, 2014.  
75 p.

Dissertação (mestrado) - Universidade Federal de Santa  
Catarina, Centro de Ciências Biológicas. Programa de Pós-  
Graduação em Biologia Celular e do Desenvolvimento.

Inclui referências

1. Biologia Celular e do Desenvolvimento. 2. Câncer. 3.  
Quimioterapia. 4. Chalconas. 5. Glioblastoma multiforme.  
I. Mendes de Aguiar, Claudia Beatriz Nedel. II. Garcez,  
Ricardo Castilho. III. Universidade Federal de Santa  
Catarina. Programa de Pós-Graduação em Biologia Celular e do  
Desenvolvimento. IV. Título.

“Avaliação *in vitro* do efeito citotóxico de chalconas sintéticas em glioblastoma multiforme humano”

por

Lucas Felipe Fernandes Bittencourt

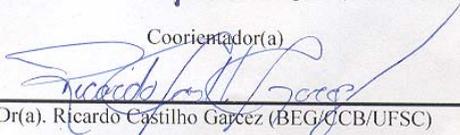
Dissertação julgada e aprovada em sua forma pelos membros titulares da Banca Examinadora (Port. 03/PPGBCD/2014) do Programa de Graduação em Biologia Celular e Desenvolvimento - UFSC, composta pelos Doutores

Orientador(a):



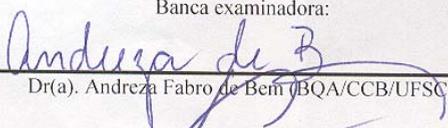
Dr(a). Claudia Beatriz Nedel Mendes de Aguiar (BEG/CCB/UFSC)

Coorientador(a)



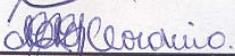
Dr(a). Ricardo Castilho Garcez (BEG/CCB/UFSC)

Banca examinadora:



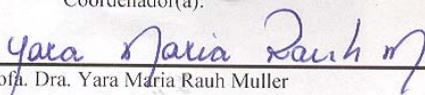
Dr(a). Andreza Fabro de Bem (BQA/CCB/UFSC)

Dr(a). Marcio Alvarez Silva (BEG/CCB/UFSC)



Dr(a). Mabel Mariela Rodriguez Cordeiro (MOR/CCB/UFSC)

Coordenador(a):



Prof. Dra. Yara Maria Rauh Muller  
Coordenadora do Programa de Pós-Graduação em Biologia Celular e d

Dedico este trabalho a todos que dele fizeram parte.

## AGRADECIMENTOS

Este trabalho é uma obra colaborativa com o envolvimento de inúmeras pessoas, em diferentes esferas de influência. Primeiramente, e mais importante, gostaria de agradecer a minha família, que sempre me apoiou na minha carreira nas decisões profissionais. Mãe, pai, vó, obrigado, por tudo.

Seguindo, agradeço a quem me ajudou indiretamente a completar esse trabalho, minha melhor amiga Regina, por dividir momentos inesquecíveis e a fascinação e empolgação pelo mundo da ciência. Meus melhores amigos, Rafael e Wendell que me acompanharam e ouviram as minhas angústias, nervosismos, empolgações e frustrações com calma e paciência, agradeço as incontáveis horas de conversas. Agradeço também aos meus amigos Tiago, Iulo, Manoela, Sabrina, Camila, Bea, Anderson, Matheus, Vitor e Dan.

Focando na dissertação em si, devo primeiramente agradecer de coração aos meus importantíssimos colegas de pós-graduação: Gilian, Yago, Fernanda, Bruna e Carmen por fazerem destes dois últimos anos algo realmente especial. Agradeço agora aos meus colegas de laboratório, Fabi, Leandra, Wagner, Daniel, Gianni e um obrigado especial à Tharine por toda a ajuda que me deu em experimentos, protocolos, literaturas e opiniões em geral. Agradeço também aos ICs que tanto gostei de conhecer, Flavinha e Kainato - obrigado pela ajuda nos experimentos e pelos inúmeros momentos de descontração na rotina ferrenha.

Bom, agora tenho que dar um grande obrigado para duas pessoas que compõem o meu grupo de pesquisa (LabGli) e sem as quais este trabalho não teria caminhado. Obrigado Karen e Carine pelo apoio absurdo que deram à minha pesquisa, pelos diversos experimentos juntos, horas no fluxo, discussões de resultados, de artigos, de relacionamentos, de problemas, de vida, enfim, de tudo. Hoje digo com orgulho que o nosso laço de amizade é a minha grande conquista no mestrado.

Por último mas jamais menos importante, agradeço à professora Carla Tasca por nos acolher em seu laboratório e permitir que pudéssemos desenvolver a nossa pesquisa. Depois, ao meu co-orientador Ricardo, por sempre pensar fora da caixa e achar ótimas maneiras de resolver problemas e, finalmente, à minha amiga e orientadora Claudia Nedel por me acolher no desespero da época do TCC e ter me dado um futuro na pesquisa científica. Eu não estaria aqui sem você Claudia, muito obrigado – de coração.

## RESUMO

O glioblastoma multiforme é o tumor primário do sistema nervoso central mais frequente em adultos. No Brasil, segundo dados do INCA, a incidência de tumores deste tipo foi de 6,96/100 000 habitantes em 2005. A mediana de sobrevida é, geralmente, menor que um ano desde o diagnóstico, e a maioria dos pacientes (90% a 95%) evolui para óbito em dois anos. Com o intuito de procurar novas alternativas para o tratamento dessas neoplasias, diversos compostos têm sido estudados, entre eles, as chalconas. Chalconas são compostos fenólicos que fazem parte da via de biossíntese de flavonóides em plantas e apresentam uma estrutura química simples e versátil. O objeto de estudo deste trabalho são três chalconas sintetizadas a partir da estrutura química comum da família das chalconas, são elas A23, C31 e J11. Usando células de glioblastoma multiforme da linhagem comercial A172 e proveniente de ressecção cirúrgica, GBM1, essas substâncias foram testadas em diferentes ensaios para elucidação do seu mecanismo de funcionamento. Inicialmente foram realizados testes de viabilidade celular por MTT para determinar-se a concentração inibitória de 50% da ação (IC50) de cada uma das chalconas. Em sequência, esta concentração foi utilizada para observar e quantificar o tipo de morte, se apoptótica ou necrótica, causado. Tentando elucidar a maneira com que esses compostos causaram a morte ou a redução de viabilidade observadas, diferentes ensaios foram realizados. Primeiramente para se medir os níveis de espécies reativas de oxigênio e de óxido nítrico, foram utilizadas as sondas fluorescentes DCFDA e DAF-2, respectivamente. Além destes resultados, foi mensurada também a distribuição das células no ciclo celular. Com os dados obtidos foi possível traçar um perfil aproximado dos mecanismos de ação de cada chalcona. Brevemente, A23 revelou-se um eficiente antioxidante e teve a maior taxa de indução de apoptose e necrose dentre as chalconas estudadas por uma via desconhecida. Contrariamente, C31 apresentou um efeito oxidativo e de aumento dos níveis de ON muito relevante, sendo por estas vias, sua provável ação de indução de apoptose e consequente redução de viabilidade. Por último tem-se que J11, promoveu aumento nos níveis de apoptose apenas em GBM1 e teve uma ação antioxidativa em ambas as células testadas. Seu efeito redutor de viabilidade provavelmente se deve a indução da produção de altos níveis de ON e pelo seu efeito citostático, observado na análise do ciclo celular. Com o exposto neste estudo, foi possível desvendar a ação de duas das três chalconas testadas e direcionar a pesquisa futura para as vias analisadas.

**Palavras-chave:** Glioblastoma multiforme; Câncer; Chalconas; Quimioterapia; Viabilidade Celular; Apoptose.

## ABSTRACT

The glioblastoma multiforme is the main tumor of the central nervous system and the most frequent in adults. In Brazil, according to INCA, the incidence of this type of tumor in 2005 was 6,96 for each 100.000 people. The average of survival is less than one year after diagnosis and after two years, 95% of patients will be deceased. In the search of new alternatives for the treatment of this disease, several compounds are being tested, among them, the chalcones. Chalcones are phenolic substances that participate in the flavonoids biosynthesis in plants. They possess a very simple and versatile chemical structure, being easy to manipulate. This study's object of research are three chalcones that were synthesized from the base structure of all chalcones with different radicals. They are: A23, C31 and J11. Using commercial glioblastoma cells A172 and patient obtained ones, GBM1 as a model of study, we tested their effects in different assays to better comprehend their mechanism of action. Initially the viability reduction assays were performed to calculate the IC50 (inhibitory concentration of 50%) of each chalcone. This concentration was used in all the other experiments. To observe the type of death and quantify it, the Annexin-V and PI/H assays were realized. Then, to understand the pathways that lead to the death observed, ROS and NO levels were measured using the fluorescent probes DCFDA and DAF-2, respectively. Besides these tests, the distribution of cells in the cell cycle was also quantified. With all the gathered data, an approximate pathway of action was traced for each chalcone. Briefly, A23 had an important anti-oxidative effect with high levels of apoptosis and necrosis induction. On the other hand, C31 had an oxidative effect that may justify its high levels of apoptosis induction. And finally, J11 increased the apoptosis levels only in GBM1 cells, having an anti-oxidative role in both tested cells. Its effect in viability reduction may be caused by the high levels of NO caused and also, by its cytostatic effect, observed in the cell cycle analysis. With this study it could be defined two of three chalcone's way of action in reducing glioblastoma multiforme cells in vitro. These results may aid and direct future research concerning the chalcones antitumor effect.

**Keywords:** Glioblastoma multiforme; Cancer; Chalcones; Chemotherapy; Apoptosis; Cell viability.

## SUMÁRIO

<b>1 INTRODUÇÃO</b> .....	15
1.1 Neoplasias do sistema nervoso central.....	16
1.2 Glioblastoma multiforme .....	19
1.3 Chalconas.....	20
1.4 Morte celular.....	22
1.5 Espécies reativas de oxigênio.....	24
1.6 Óxido Nítrico.....	24
1.7Ciclo Celular.....	26
<b>2 OBJETIVOS</b> .....	28
2.1 Objetivo Geral.....	28
2.2 Objetivos específicos.....	28
<b>3 MATERIAIS E MÉTODOS</b> .....	29
3.1 Cultura de células da linhagem A172 .....	29
3.2 Cultura primária de gliomas (GBM1).....	29
3.3 Cultura primária de astrócitos murinos.....	30
3.4 Tratamento das células.....	30
3.5 Síntese das chalconas .....	31
3.6 Ensaio de viabilidade celular por MTT .....	32
3.7 Ensaio de detecção de necrose.....	32
3.8 Ensaio de detecção de necrose e apoptose.....	33
3.9 Avaliação da produção de espécies reativas de oxigênio.....	33
3.10 Avaliação da produção de óxido nítrico .....	34
3.11 Análise do ciclo celular.....	34
3.12 Análise estatística.....	34
<b>4 RESULTADOS</b> .....	35
4.1 MTT .....	35
4.2 Cálculo do IC50 .....	38
4.3 Morte celular.....	39
4.4. Produção de EROs .....	42
4.5 Produção de ON.....	45
4.6 Análise da distribuição de células no ciclo celular.....	47

<b>4.7 Resumo dos resultados</b> .....	49
<b>5 DISCUSSÃO</b> .....	50
<b>6 PERSPECTIVAS FUTURAS</b> .....	58
<b>7 CONCLUSÃO</b> .....	59
<b>8 REFERÊNCIAS</b> .....	60
<b>9 APÊNDICE</b> .....	69
<b>9.1 AP1</b> .....	69
<b>9.2 AP2</b> .....	71
<b>ABREVIATURAS</b> .....	14
<b>ANEXOS</b> .....	73
<b>Anexos 1 Parecer do CEPSH</b> .....	73
<b>ÍNDICE DE ILUSTRAÇÕES</b> .....	12
<b>ÍNDICE DE TABELAS</b> .....	13

## ÍNDICE DE ILUSTRAÇÕES

[C1] Comentário: colocar apenas o título das figuras, conforme deleção abaixo.

<b>Figura 1:</b> Distribuição dos diferentes tipos de tumores do SNC em relação à incidência.....	14
<b>Figura 2:</b> Distribuição dos diferentes tipos de tumores do SNC em relação a sexo.....	15
<b>Figura 3:</b> Distribuição dos diferentes tipos de tumores do SNC em relação a etnia.....	15
<b>Figura 4:</b> Gráfico de incidência de tumores do SNC relacionados à idade em crianças e adolescentes.....	16
<b>Figura 5:</b> Gráfico de incidência de tumores do SNC relacionados à idade.....	16
<b>Figura 6:</b> Núcleo fundamental das chalconas.....	21
<b>Figura 7:</b> Morte celular, necrose e apoptose.....	23
<b>Figura 8:</b> Estrutura química dos compostos A23, J11 e C31.....	32
<b>Figura 9:</b> Análise inicial da ação de 11 chalconas na concentração de 50 $\mu\text{M}$ em células de glioblastoma multiforme, linhagem A172, por 24 horas.....	33
<b>Figura 10:</b> Curvas de concentração das chalconas A23, C31 e J11 por 24, 48 e 72 horas em células de glioblastoma multiforme, A172 e GBM1.....	35
<b>Figura 12:</b> Fotos representativas do ensaio de incorporação de iodeto de propídeo/Hoestch em A172 e GBM1.....	38
<b>Figura 13:</b> Ensaio de detecção de morte por necrose por IP/H em células A172 e GBM1 tratadas com as chalconas A23, C31 e J11 por 24 horas.....	39
<b>Figura 14:</b> Quantificação de células apoptóticas e necróticas, por citometria de fluxo, em A172 e GBM1 tratadas com chalconas A23, C31 e J11 por 24 horas.....	40
<b>Figura 15:</b> Quantificação dos níveis de espécies reativas de oxigênio geradas pelo tratamento com as chalconas A23, C31 e J11 por 3, 6, 12 e 24 horas em células A172 e GBM1.....	41
<b>Figura 16:</b> Quantificação dos níveis de óxido nítrico produzido pelo tratamento com as chalconas A23, C31 e J11 por 3, 6, 12 e 24 horas em células A172 e GBM1.....	43

<b>Figura 17:</b> Análise do ciclo celular por PI em citometria de fluxo em A172 e GBM1 tratadas com as chalconas A23, C31 e J11 por 24 horas.....	<b>45</b>
<b>Figura 18:</b> Histogramas de citometria de fluxo para Anexina-V e IP em células A172 tratadas com as chalconas A23, C31 e J11 .	<b>68</b>
<b>Figura 19:</b> Histogramas de citometria de fluxo para Anexina-V e IP em células GBM1 tratadas com as chalconas A23, C31 e J11 .....	<b>68</b>
<b>Figura 20:</b> Dot-plots de citometria de fluxo para IP na análise de ciclo celular em células A172 tratadas com as chalconas A23, C31 e J11. ....	<b>69</b>
<b>Figura 21:</b> Dot-plots de citometria de fluxo para IP na análise de ciclo celular em células GBM1 tratadas com as chalconas A23, C31 e J11 .....	<b>69</b>
<b>Figura 23:</b> Histogramas de citometria de fluxo para IP na análise de ciclo celular, em células GBM1 tratadas com as chalconas A23, C31 e J11.....	<b>71</b>
<b>Figura 22:</b> Histogramas de citometria de fluxo para IP na análise de ciclo celular, em células A172 tratadas com as chalconas A23, C31 e J11. ....	<b>71</b>

## ÍNDICE DE TABELAS

<b>Tabela 1</b> - Relação das múltiplas funções que o ON desempenha em mamíferos .....	<b>25</b>
<b>Tabela 2</b> - Valores calculados do IC50 de 24 horas para as chalconas A23, C31 e J11 relativos às células A172 e GBM1 .....	<b>39</b>
<b>Tabela 3</b> - Resumo de dados numéricos em porcentagem da análise de produção de EROS em A172 com o tratamento com as chalconas A23, C31 e J11 por 3, 6, 12 e 24 horas.....	<b>44</b>
<b>Tabela 4</b> - Resumo de resultados numéricos em porcentagem da análise de produção de EROS em GBM1 com o tratamento com as chalconas A23, C31 e J11 por 3, 6, 12 e 24 horas.....	<b>44</b>
<b>Tabela 5</b> - Resumo dos dados numéricos em porcentagem da análise de produção de ON em A172 com o tratamento com as chalconas A23, C31 e J11 por 3, 6, 12 e 24 horas. ....	<b>46</b>
<b>Tabela 6</b> - Resumo de resultados numéricos em porcentagem da análise de produção de ON em GBM1 com o tratamento com as chalconas A23, C31 e J11 por 3, 6, 12 e 24 horas .....	<b>46</b>
<b>Tabela 7</b> - Resumo de resultados numéricos em porcentagem da análise de ciclo celular em A172 com o tratamento das com as chalconas A23, C31 e J11 por 24 horas .....	<b>48</b>
<b>Tabela 8</b> - Resumo de resultados numéricos em porcentagem da análise de ciclo celular em GBM1 com o tratamento das com as chalconas A23, C31 e J11 por 24 hora.....	<b>48</b>
<b>Tabela 9</b> - Resumo comparativo dos resultados numéricos das chalconas A23, C31 e J11 em células A172 e GBM1 .....	<b>49</b>

## ABREVIATURAS

**SNC** – Sistema Nervoso Central  
**GBM** – Glioblastoma Multiforme  
**INCA** – Instituto Nacional do Câncer  
**OMS** – Organização Mundial de Saúde  
**ON** – Óxido Nítrico  
**iNOS** – Óxido Nítrico Sintase [Induzível](#)  
**COX-2** – Ciclooxigenase-2  
**TNF- $\alpha$**  - Fator de Necrose Tumoral  $\alpha$   
**ATP** – Adenosina Trifosfato  
**DNA** – Ácido Desoxirribonucleico  
**EROS** – Espécies Reativas de Oxigênio  
**ADP** – Adenosina Difosfato  
**CDKs** – Quinases Dependentes de Ciclina  
**DMEM F12** - Meio de Eagle Modificado por Dullbeco com Mistura Nutriente F12  
**SBF** – Soro Bovino Fetal  
**UFSC** – Universidade Federal de Santa Catarina  
**PBS** – Salina Tamponada por Fosfato  
**CEPSH** – Comitê de Ética de Pesquisa com Seres Humanos  
**CEUA** – Comissão de Ética no Uso de Animais  
**DMSO** – Dimetilsulfoxido  
**MTT** - Brometo de 3-(4,5-dimetil-2-tiazolil)-2,5-difenil-2H-tetrazólio  
**IP** – Iodeto de Propideo  
**H** – Hoechst  
**CSC** – Células Tronco de Câncer  
**MAPK** - *mitogen-activated protein kinase*  
 $\Delta\Psi_m$  – Potencial Mitocondrial  
**RIRR** - *ROS-induced ROS release*  
**GMPc** – [Monofostato Cíclico de Guanosina](#)  
**MPT** - *mitochondrial permeability transition pore*  
**IMAC** - *inner membrane anion channel*  
**VEGF** – Fator de Crescimento Endotelial Vascular  
**MMP** – Metaloproteinase de Matriz

## 1 INTRODUÇÃO

### 1.1 Neoplasias do sistema nervoso central

Os tumores cerebrais primários são uma pequena mas importante parcela de todos os tipos de cânceres em humanos. Com uma incidência de 1,4% apresentam uma mortalidade de 2,4% quando comparados a outras neoplasias nos Estados Unidos. Estes tumores são os mais comuns do sistema nervoso central (SNC), representando aproximadamente 50% de todas as neoplasias do mesmo (PREUSSER; HABERLER; HAINFELLNER, 2006; YIN et al., 2007).

Dentre os gliomas malignos, 76% são astrocitomas ou glioblastomas multiformes (Figura 1). Nos Estados Unidos, onde os dados estatísticos acerca desta doença são mais abundantes, temos um perfil do grupo que mais é suscetível à esta enfermidade. Dentre homens e mulheres, elas apresentam um índice positivo de incidência em relação aos homens (Figura 1). Em se tratando de etnia, negros tendem a ser muito mais susceptíveis a este tipo de tumor (Figura 2). Outro fator de impacto importante é a idade, já que esta é um tumor extremamente dependente de idade, com a sua incidência aumentando proporcionalmente com o passar dos anos (Figura 3). Ainda assim, em relação a todos os outros tipos de tumor, este ainda é o mais incidente em crianças e adolescentes (Figura 5).

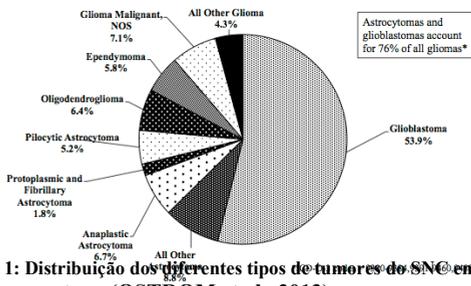


Figura 1: Distribuição dos diferentes tipos de tumores do SNC em relação à incidência (OSTROM et al., 2013)

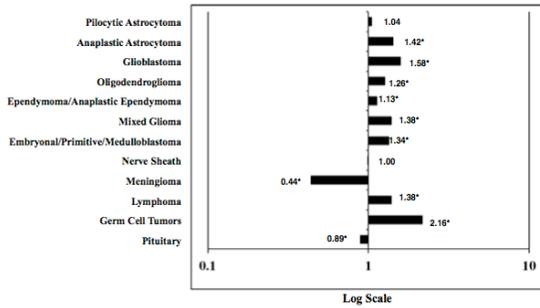


Figura 2: Distribuição dos diferentes tipos de tumores do SNC em relação a sexo. Esquerda homens e direita mulheres (OSTROM et al., 2013)

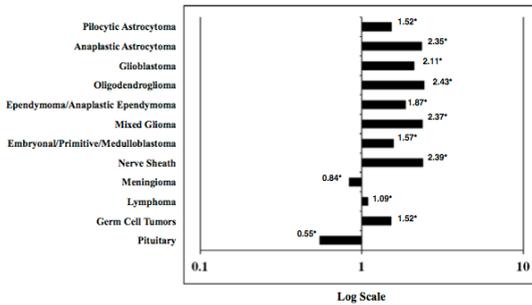


Figura 3: Distribuição dos diferentes tipos de tumores do SNC em relação a etnia. Esquerda brancos e direita negros (OSTROM et al., 2013)

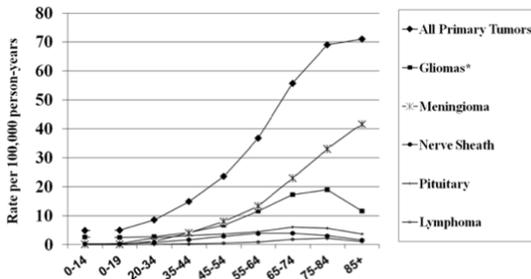


Figura 5: Gráfico de incidência de tumores do SNC relacionados à idade (OSTROM et al., 2013).

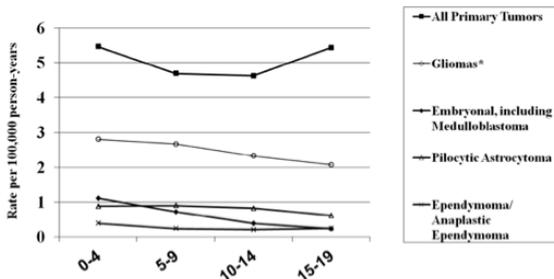


Figura 4: Gráfico de incidência de tumores do SNC relacionados à idade em crianças e adolescentes (OSTROM et al., 2013).

No Brasil, dados comparativos de 1970 mostram que a incidência deste câncer tem aumentado, de 2,24 a cada 100 mil habitantes para 3,35 em 1998 (MONTEIRO; KOIFMAN, 2003) e para 6,96 em 2005. A mediana de sobrevida é, geralmente, menor que um ano desde o diagnóstico, e a maioria dos pacientes (90% a 95%) evoluirá para óbito em dois anos (INCA, 2006).

## 1.2. Glioblastoma multiforme

A classificação utilizada atualmente foi elaborada pela Organização Mundial da Saúde (OMS) em 2007 e se baseia em parâmetros celulares, localizacionais e de grau de malignidade (BRAT et al., 2007). Com esta classificação, o diagnóstico clínico determina o tratamento cirúrgico ou com protocolos específicos de quimioterapia e o uso ou não de radioterapia adjuvante (LOUIS et al., 2007).

Celularmente, a classificação é realizada através da histologia de uma amostra do tumor, baseando-se na semelhança fenotípica das células tumorais com os diferentes tipos celulares gliais (astrócitos, oligodendrócitos e células ependimais) (MICHOTTE et al., 2004). Desta maneira, os gliomas são classificados em astrocitomas, oligodendromas e gliomas mistos.

Levando-se em consideração o grau de malignidade, os gliomas são classificados em níveis que vão de I a IV. Os gliomas de nível I e II são ditos de baixa malignidade, dependendo do grau de diferenciação. Estes, comumente são removidos cirurgicamente sem a necessidade de tratamento subsequente com quimioterápicos. Quando há infiltração e uma maior taxa de proliferação, são classificados como de nível II (VAN DEN BENT, 2007). Já gliomas de alto nível (III e IV) apresentam evidências histológicas de malignidade, como atipia nuclear e elevada atividade mitótica (WICK; WELLER, 2010). Geralmente a sobrevida dos pacientes portadores destes tumores é de 3 anos no máximo quando tratados com cirurgia e quimioterapia. Dentre os tumores de nível IV, encontramos o objeto do presente estudo, o glioblastoma multiforme (GBM), responsável por 70% dos casos de gliomas de alto grau diagnosticados (OHGAKI; KLEIHUES, 2007).

O GBM é um tumor com diversas características histológicas e celulares que refletem a sua malignidade. Apresentam células gigantes, decorrentes de um alto descontrole no ciclo celular, pleomorfismos nucleares e celulares, alta taxa de proliferação, padrão de crescimento multifocal e angiogênese intensa, se infiltrando efusivamente pelo tecido cerebral, o que

dificulta muito a ressecção cirúrgica e aumenta o índice de recidiva (BRANDES et al., 2008) (STUPP et al., 2010). A resistência também é uma característica muito relevante deste tipo de tumor, fazendo com que terapias pro-apoptóticas como quimioterapia e radioterapia não sejam eficientes no tratamento (VAN MEIR et al., 2010).

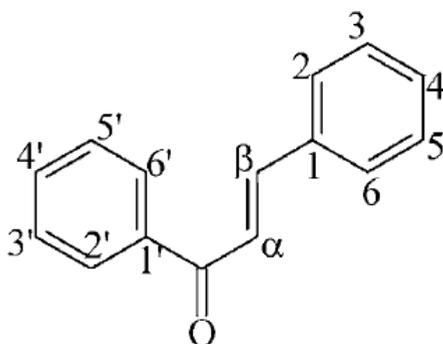
Sobre a origem destas neoplasias, duas teorias são mais bem aceitas pela comunidade acadêmica. A primeira é de que células maduras da glia, como astrócitos e oligodentrócitos sofrem mutações em oncogenes e genes supressores de tumor, levando-as a um estado não diferenciado e com alta proliferação (TONN et al., 1995).

A outra teoria, que é a mais aceita na comunidade acadêmica, propõe que as mutações nos genes aconteçam em progenitores neurais e não em células maduras, causando então uma transformação oncogênica, tornando-as células iniciadoras de tumor (PICCIRILLO; VESCOVI, 2007).

Desta forma, a busca por terapias alternativas que possam melhorar o prognóstico dos pacientes acometidos por esta doença é fundamental. As chalconas são compostos que têm sido estudados em vários tipos de tumores e despertado o interesse no tratamento destes (KAMEI et al., 1997) ([MAIORAL et al., 2013](#)).

### 1.3. Chalconas

O objeto do presente estudo são as chalconas, que são compostos de uma família que possui como núcleo fundamental o 1,3-diarilpropano (Figura 1), modificado pela presença de uma ligação olefínica de um grupamento cetona e/ou hidroxila. As chalconas são precursoras da via de biossíntese de flavonóides de pigmentação amarela, sendo encontradas em partes variadas de plantas como caules, folhas, raízes e sementes de gêneros como *Angelica*, *Glycyrrhiza*, *Humulus* e *Scutellaria*, que são usadas tradicionalmente para o tratamento de diversas doenças infecciosas e crônicas (SASAYAMA et al., 2007).



**Figura 6:** Núcleo fundamental das chalconas, 1,3-diarilpropano, modificado pela presença de uma ligação olefínica, de um grupo cetona e/ou de um grupo hidroxila (BOUMENDJEL et al., 2008).

Como estas substâncias são facilmente sintetizadas e alteradas, elas são compostos interessantes para estudos de estrutura/atividade. Com isso, diversos substituintes dos radicais têm sido testados com o objetivo de elucidar o mecanismo de ação das chalconas em uma gama de tumores. No entanto, estudos com câncer são apenas uma parte do que vem sendo estudado com estes compostos, tendo já sido descritas diversas atividades farmacológicas como ação anti-inflamatória, antipirética, analgésica, antimalárica e antibacteriana (KONTOGIORGIS; MANTZANIDOU; HADJIPAVLOU-LITINA, 2008) (KO et al., 2003) (WONG, 2006) (DUCKI, 2007) (CHENG; ZHANG; LIU, 2009).

Pode-se citar ainda a regulação da produção de óxido nítrico (NO), interferência na expressão da óxido nítrico sintase induzível (iNOS), modulação da atividade da ciclooxigenase-2 (COX-2), aumento da produção de fator de necrose tumoral  $\alpha$  (TNF- $\alpha$ ), além da ação citotóxica e antioxidante (LOA; CHOW; ZHANG, 2009; SHEN et al., 2007).

A principal ação das chalconas como antitumorais está relacionada à interferência no ciclo celular, principalmente no bloqueio do ciclo na fase G1 e G2/M, dependendo da sua estrutura (HSU et al., 2006). Com esta intervenção no ciclo, efeitos importantes são observados, como o aumento nos níveis de apoptose e inibição da polimerização da tubulina (RAO; PAGIDAS, 2010), componente do citoesqueleto. É importante ressaltar, que devido à estrutura química das chalconas abordadas neste estudo, estas conseguem penetrar a barreira hematoencefálica.

#### **1.4. Morte celular**

Eventos endógenos ou exógenos à célula podem causar a sua morte principalmente por duas maneiras distintas: necrose e apoptose. A primeira é uma morte acidental com extravasamento do conteúdo celular, aumento de espécies reativas de oxigênio (EROs), depleção de adenosina trifosfato (ATP), desregulação do equilíbrio de cálcio, ativação de proteases, recrutamento de células do sistema imune, iniciação de processos inflamatórios, estresse no tecido, entre outros. Esse tipo de morte normalmente é decorrente de fatores físicos externos, como ferimentos, infecções, radiação, fármacos e agentes químicos (GOLSTEIN; KROEMER, 2007).

O outro tipo de morte celular é a apoptose. Diferente da necrose, a apoptose é finamente regulada por uma série de proteínas. Entre elas, podemos citar principalmente as caspases, que podem ter ação de causar apoptose (pro-apoptóticas) ou inibi-la (anti-apoptóticas) (RANDJELOVIC, 2005).

A célula sofre mudanças profundas em diversos aspectos. Morfologicamente ela tem uma condensação na cromatina, acompanhada da fragmentação do núcleo, redução no volume celular (picnose) e retração dos pseudópodes. No estágios finais, a célula já começa a perder a integridade da membrana, formar os corpos apoptóticos e serem fagocitadas por macrófagos. Bioquimicamente ocorre a ativação das caspases, quebra do DNA e mudanças na membrana celular (como a exposição da fosfatidil

serina) para permitir o seu reconhecimento pelos macrófagos. As caspases são responsáveis por diversos efeitos intracelulares durante a apoptose, como clivagem de proteínas vitais, quebra do citoesqueleto, ativação de DNases, entre outros (WONG, 2011). Na Figura 2 estão esquematizados os processos de necrose e apoptose de uma célula. Na necrose observa-se perda da integridade da membrana plasmática e consequente extravasamento do conteúdo citoplasmático para o meio externo. Células apoptóticas estão encolhidas e desenvolvem vesículas, a sua integridade de membrana não é perdida até as fases finais. A cromatina se condensa e fragmenta. O citoplasma se divide formando os corpos apoptóticos que contêm as organelas e debris nucleares (BJELAKOVIĆ et al., 2005).

[Espécies reativas de oxigênio em excesso, bem como altos níveis de óxido nítrico são descritos como indutores de apoptose em células tumorais](#) (JEONG et al., 2010; LAM-HIMLIN et al., 2006).

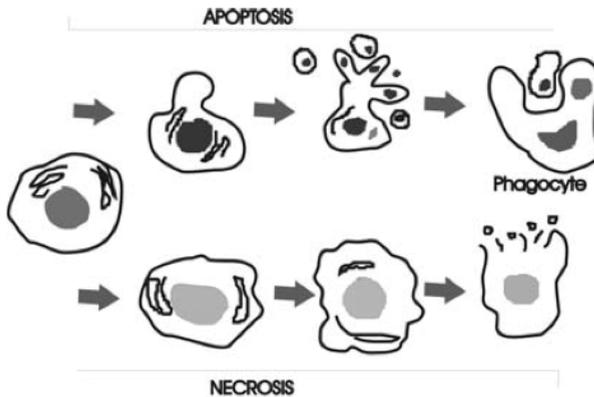


Figura 7: Morte celular, necrose e apoptose (BJELAKOVIĆ et al., 2005).

### 1.5. Espécies reativas de oxigênio

As EROs são subprodutos radicais altamente reativos. Entre eles podemos destacar o radical ânion superóxido ( $O_2^-$ ) e peróxido de hidrogênio ( $H_2O_2$ ), provenientes do consumo de oxigênio na fosforilação oxidativa da cadeia transportadora de elétrons. É nesta etapa que ocorre a transformação da adenosina difosfato (ADP) em ATP, que é o principal recurso energético na célula. Produzidas na mitocôndria, estas EROs rapidamente interagem com macromoléculas biológicas, causando alteração na conformação e função de proteínas e danos ao DNA por destruição de bases púricas e pirimídicas. As EROs podem também promover por quebra da fita de DNA por oxidação lipídica e de tióis proteicos, levando ao possível desenvolvimento de neoplasias (CERUTTI, 1985).

Entre suas principais consequências celulares em gliomas, podemos destacar a indução da apoptose diretamente na mitocôndria e/ou na superfície celular, ativando receptores pro-apoptóticos. (USHIO-FUKAI, 2006) (ENGEL; EVENS, 2005) (JEONG et al., 2010).

### 1.6. Óxido Nítrico

O ON é a segunda molécula gasosa com inúmeras funções sinalizadoras reconhecida pela ciência (Tabela 1), antes do ON, apenas o etileno desempenhava tal papel. Desde a sua descoberta, uma série de funções importantes tem sido atribuída ao óxido nítrico, demonstrando a importância universal que o radical possui como molécula sinalizadora. A produção de ON em mamíferos pode se dar de duas maneiras: a constitutiva, que ocorre na presença de cálcio e da enzima óxido nítrico sintase (NOS, do inglês – *nitric oxide synthase*), localizada no endotélio, plaquetas, neurônios e outros tecidos. Esta produção é transitória e da ordem picomolar. Já a produção indutiva independe do cálcio e se mantém por horas, sendo da ordem nanomolar. Esta última é a mais relacionada à citotoxicidade do ON e seus

principais efeitos celulares (proliferação, indução de apoptose, interferência no ciclo celular, entre outros) (KONSTADT, 1995; PREUSSER; HABERLER; HAINFELLNER, 2006).

**Tabela 1** - Relação das múltiplas funções que o ON desempenha em mamíferos (WINK; MITCHELL, 1998).

Papel	Efeitos	
Protetor	Antioxidante	
	Inibição da adesão de leucócitos	
	Proteção contra a toxicidade dada pelos fatores de necrose tumoral	
Regulatório	Tônus vascular	
	Adesão celular	
	Permeabilidade vascular	
	Neurotransmissão	
	Broncodilatação	
	Inibição da adesão de plaquetas	
	Supervisão do sistema imune	
	Função renal	
Deletério	Inibição do funcionamento de enzimas	
	Indução de danos ao RNA	
	Indução da peroxidação de lipídeos	
	Aumento da susceptibilidade à:	Radiação
		Agentes alcalinizantes
		Metais tóxicos
	Exaurimento das reservas de antioxidantes	

A produção de ON pela enzima NOS não é a única via disponível para os animais. Foi constatado que a produção do radical a partir do nitrito ocorre sob condições específicas e que é importante para a vasodilatação em situação de hipóxia.

Adicionalmente, estudos *in vitro* demonstraram que as enzimas óxido-redutases, sob hipóxia, também geram óxido nítrico através

da redução do nitrito. Essa situação ocorre frequentemente em grandes massas tumorais onde a circulação não se dá com eficiência. O nitrito pode funcionar como um sinal único e significativo durante um amplo leque de processos fisiológicos e fisiopatológicos, incluindo a alteração da expressão gênica, modificação da sinalização promovida pelo cGMP, inibição da atividade do citocromo P450 e nitrosilação de proteínas (BRIGHT et al., 2009).

Em tumores como os gliomas, o ON tem uma regulação muito delicada e seu aumento ou diminuição podem tanto estar relacionados com características agravantes da doença como transformação neoplásica, vascularização, inibição de apoptose e danos por radicais livres quanto características benéficas como a melhoria na eficácia de tratamentos com quimioterápicos, indução de apoptose e neovascularização (PREUSSER; HABERLER; HAINFELLNER, 2006).

### **1.7. Ciclo Celular**

O ciclo celular é coordenado por eventos que regulam a duplicação do material genético na divisão celular, sendo dividido em 3 fases bem definidas: fase G<sub>0</sub>/G<sub>1</sub> onde a célula ou está em repouso (interfase) ou está se preparando para a divisão; fase S ou de síntese, quando o material genético é replicado; e finalmente a fase G<sub>2</sub>/M, onde a divisão de fato acontece, com a separação do citoplasma e dos componentes celulares em duas células-filhas (SCHAFER, 1998). A proliferação celular é normalmente determinada por sinais extracelulares que ativam um programa de expressão gênica e que regulam proteínas requeridas para divisão celular (SHERR, 1996).

As principais proteínas de controle direto do ciclo são as

CDKs (quinases dependentes de ciclinas). Quando ocorre a fosforilação de um resíduo de sua treonina e uma ligação com uma ciclina, as CDKs desempenham o seu papel regulatório do ciclo, fazendo-o progredir ou estacionar (BLAIN; MONTALVO; MASSAGUÉ, 1997). O controle destas CDKs já foi descrito com uma maneira eficiente de controlar a proliferação descontrolada observada em neoplasias (CHANG et al., 2004).

Como o ciclo celular nos cânceres é altamente desregulado, ele se torna um alvo importante para estudos com novos compostos. A bibliografia relacionada à influência das chalconas no ciclo celular de gliomas é escassa mas os efeitos descritos nesses trabalhos são essenciais para fundamentar este trabalho. Dentre estes efeitos, os mais recorrentes são os de parada do ciclo em alguma fase e problemas na síntese/polimerização do citoesqueleto (ZOLDAKOVA et al., 2010).

## **2 OBJETIVOS**

### **2.1 Objetivo Geral**

O presente estudo tem como objetivo geral avaliar a ação citotóxica, e as consequências, das chalconas sintéticas A23, C31 e J11 em células de glioblastoma multiforme provenientes de paciente (GBM1) e da linhagem comercial A172 *in vitro*, estudando o seu uso como uma possível substância antitumoral.

### **2.2 Objetivos específicos**

- Avaliar os efeitos das chalconas A23, C31 e J11 na viabilidade de células GBM1 e A172 nos períodos de 24, 48 e 72 horas.
- Observar e quantificar o efeito de indução de apoptose e necrose pelo tratamento com as chalconas nestas células.
- Determinar os níveis de espécies reativas de oxigênio e de óxido nítrico nas células de GBM1 e A172, tratadas ou não com as chalconas, nos tempos de 3, 6, 12 e 24 horas.
- Analisar a distribuição das células GBM1 e A172 nas fases do ciclo celular após o tratamento com as chalconas A23, C31 e J11.

### **3 MATERIAIS E MÉTODOS**

#### **3.1 Cultura de células da linhagem A172**

As células da linhagem comercial A172 foram cultivadas em meio de Eagle modificado por Dullbeco com mistura nutriente F12 (DMEM-F12; Invitrogen), (DE SALDANHA DA GAMA FISCHER et al., 2011), acrescido de glicose (0,6%), glutamina (2mM), bicarbonato de sódio (0,06%) e penicilina/estreptomicina (1U/1  $\square$ g) e suplementado com 10 % de soro bovino fetal (SBF; Cultilab). As células foram mantidas a 37°C em estufa úmida com atmosfera de 5% de CO<sub>2</sub>. Quando atingida confluência, aproximadamente 80% (2 a 3 dias), as células foram tripsinizadas (Tripsina/EDTA, 0,05%; Gibco) e plaqueadas em placas de 96 poços (10<sup>4</sup> células/poço) para os experimentos.

#### **3.2 Cultura primária de gliomas (GBM1)**

A amostra de glioblastoma multiforme foi obtida através de ressecção cirúrgica realizada em paciente do Hospital Celso Ramos, em Florianópolis, Santa Catarina. A amostra coletada por cirurgiões foi colocada em tubos cônicos de 15 ml contendo DMEM-F12 e 10% de SBF e transportada para a Universidade Federal de Santa Catarina (UFSC) para processamento. Uma vez em fluxo laminar, o fragmento de tumor foi dissecado para remoção das membranas cerebrais e vasos sanguíneos. O tecido foi dissociado mecanicamente com tripsina e auxílio de uma pipeta Pasteur. Então, as células foram lavadas com salina tamponada por fosfato (PBS) e foram plaqueadas em garrafas de cultura de 25 cm<sup>2</sup>, contendo DMEM-F12 acrescido de glicose (0,6%), glutamina (2mM), bicarbonato de sódio (0,06%) e penicilina/estreptomicina (1U/1  $\square$ g) e suplementado com 10 %

de SBF. As células foram mantidas em condições de cultura. Quando atingida a confluência de 80% (2 a 3 dias), as células foram tripsinizadas e plaqueadas em placas de 96 poços ( $10^4$  células/poço) para os experimentos. Todos os procedimentos e formulários de autorização para obtenção das amostras foram aprovados pelo Comitê de Ética em Pesquisa com Seres Humanos (CEPSH – 108.286) (Anexo 1).

### **3.3 Cultura primária de astrócitos murinos**

As culturas de astrócitos foram provenientes do córtex cerebral de ratos Wistar neonatos (0 - 3 dias de vida). Após a decapitação, os cérebros foram removidos e dissecados em PBS-glicose (0,6%), para remoção do córtex e retirada das meninges, em fluxo laminar. O tecido foi picotado e dissociado manualmente com pipeta Pasteur em PBS-glicose. As células foram precipitadas por centrifugação e ressuspensas em meio de cultura DMEM-F12, acrescido de glicose (0,6%), glutamina (2mM), bicarbonato de sódio (0,06%) e penicilina/estreptomicina (1U/1  $\mu$ g) e suplementado com 10 % de SBF (MENDES-DE-AGUIAR et al., 2008). As células foram plaqueadas em placas de cultura de 96 poços, previamente tratadas com 1,5  $\mu$ g/ml de polilisina, na concentração de 0,1 mg/ml e mantidas em estufa úmida a 37°C a 5% de CO<sub>2</sub> até a confluência (10-14 dias), trocando-se o meio de cultura a cada 3-4 dias. Todos os procedimentos foram aprovados pela Comissão de Ética no Uso de Animais (CEUA) sob o protocolo PP00582.

### **3.4 Tratamento das células**

As chalconas utilizadas neste trabalho foram gentilmente cedidas pelo Prof. Dr. Rosendo Augusto Yunes, do Departamento de Química, Centro de Ciências Físicas e Matemáticas da UFSC. Primeiramente, células da linhagem de glioblastoma humano A172, na densidade de  $10^4$  células por poço, foram tratadas por 24 horas com 50  $\mu$ M de onze chalconas (A23, C24, C31, D10, J1, J11, J21, J31, L9, L10 e L11). As três com maior potencial de

redução da viabilidade em A172 (A23, C31 e J11) foram escolhidas para os experimentos subsequentes. Desta forma, foi realizada uma curva de tempo e concentração destas chalconas. Após confluência de 80 %, as células foram tratadas com 1, 10, 25, 50, 75 e 100  $\mu\text{M}$  de A23, C31 e J11 por 24, 48 e 72 horas. O mesmo volume final de DMSO (Dimetilsulfóxido, Vetec) foi utilizado como controle do veículo. Após os tratamentos, as células foram submetidas ao teste de viabilidade por MTT, como descrito abaixo. Após realizada a curva de concentração, todos os outros experimentos foram realizados utilizando-se dos valores calculados da IC50 (concentração máxima de inibição de metade da atividade).

### 3.5 Síntese das chalconas

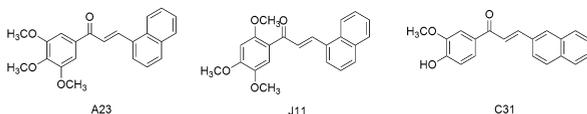
Os reagentes usados foram obtidos comercialmente da Sigma-Aldrich e os solventes da Vetec. As chalconas foram preparadas por condensação aldólica entre os aldeídos (1 mmol) e acetofenonas (1 mmol) correspondentes, usando metanol como solvente, em condições básicas (KOH 50% p/v), em agitação magnética, à temperatura ambiente, por 24 horas. Ao final da reação, adicionou-se água destilada e acidificou-se o meio com HCl 10% para auxiliar a precipitação dos compostos, que foram obtidos por filtração à vácuo. Os produtos das reações foram purificados por recristalização em dichloromethane and hexane. As estruturas foram identificadas por ponto de fusão, espectroscopia no infravermelho (IV), ressonância magnética de hidrogênio (RMN  $^1\text{H}$ ) e de carbono (RMN  $^{13}\text{C}$ ) e análise elementar (CHN), como descrito na literatura (CHIARADIA et al., 2011) (BORCHHARDT et al., 2009).

Nome químico dos compostos:

**A23** – (2E)-1-(3',4',5'-trimethoxy-phenyl)-3-(1-naphthyl)-2-propen-1-ona

**C31** – (2*E*)-1-(3'-methoxy,4'-hydroxy-phenyl)-3-(2-naphthyl)-2-propen-1-ona

**J11** – (2*E*)-1-(2',4',5'-trimethoxy-phenyl)-3-(1-naphthyl)-2-propen-1-ona



**Figura 8:** Estrutura química dos compostos A23, J11 e C31.

### 3.6 Ensaio de viabilidade celular por MTT

A análise de viabilidade celular foi realizada pelo ensaio de redução de MTT (Brometo de 3-(4,5-dimetil-2-tiazolil)-2,5-difenil-2H-tetrazólio) (MOSMANN, 1983). O MTT é um sal de tetrazólio solúvel em água, convertido em formazana púrpura após a clivagem do anel de tetrazólio por desidrogenases mitocondriais, avaliando desta forma a viabilidade celular. Após o tratamento das placas, o meio de cultura foi removido e as células foram incubadas com uma solução de MTT (Sigma) 0,2 mg/ml em PBS por duas horas a 37°C. Após este período, o MTT foi removido e DMSO foi adicionado para que os cristais de formazana criados fossem dissolvidos. Os valores foram obtidos em leitora multimodo Infinite M200 TECAN em comprimento de onda de 540nm. A viabilidade celular é proporcional à leitura da absorbância obtida.

### 3.7 Ensaio de detecção de necrose

O ensaio de iodeto de propídeo e Hoechst (IP/H, Sigma) foi usado para detectar células em estágio de necrose. O IP é uma substância capaz de penetrar em células com a membrana plasmática comprometida. Uma vez que emite fluorescência na

cor vermelha, é possível mensurar a morte necrótica por incorporação dessa substância nas células. O H penetra em células de membrana intacta ou rompida ligando-se ao DNA, emitindo fluorescência em azul. Assim sendo, foi feita então uma razão entre os valores das leituras de ambas as fluorescências e determinou-se a porcentagem de células IP positivas e H positivas. As leituras de fluorescência foram realizadas em leitora multimodo Infinite M200 TECAN em comprimento de onda de 620 nM (IP) e 460 nM (H) (GIL-AD et al., 2004).

### 3.8 Ensaio de detecção de necrose e apoptose

O ensaio de apoptose e necrose foi realizado utilizando-se o *kit* Anexina-V FITC (AN, Millipore) em citometria de fluxo. Após 24 horas de tratamento com as chalconas, células de A172 e GBM1 foram tripsinizadas, centrifugadas e ressuspensas em PBS gelado, centrifugadas novamente e ressuspensas em tampão de ligação 1 X fornecido pelo *kit*. Após isso as células foram separadas em 3 grupos, IP+/AN - (células necróticas), AN+/IP- (células apoptóticas) e AN-/IP- (células vivas). Foram respeitados o tempo e concentração de cada um dos reagentes utilizados, segundo especificação do fabricante. Os resultados foram obtidos em citômetro de fluxo FACSCanto II com obtenção de 10 mil eventos por experimento.

### 3.9 Avaliação da produção de espécies reativas de oxigênio

Os níveis de EROs intracelulares foram analisados através da sonda fluorescente H<sub>2</sub>DCFDA (Sigma). Após os tratamentos das células A172 e GBM1 com as chalconas, por 3, 6, 12 e 24 horas, H<sub>2</sub>DCFDA (10 µM) foi adicionado às culturas por 20 minutos. O H<sub>2</sub>DCFDA difunde-se pela membrana celular e quando hidrolisado por esterases intracelulares forma a diclorofluoresceína (DCFH, não fluorescente), que reage com H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> intracelular, formando a diclorofluoresceína oxidada (DCF, fluorescente). Os níveis de fluorescência foram medidos em leitora multimodo M200 Tecan em comprimento de onda de

excitação e emissão de 485 nM e 520 nM respectivamente.

### **3.10 Avaliação da produção de óxido nítrico**

Os níveis intracelulares de óxido nítrico foram medidos através da utilização da sonda fluorescente DAF-2DA (Sigma). Após os tratamentos das células A172 e GBM1 com as chalconas, por 3, 6, 12 e 24 horas, foi adicionado ao meio de cultura 10  $\mu$ M de DAF-2DA, por 40 minutos. O DAF-2 diacetato entra na célula e é transformado por esterases intracelulares em DAF-2, sua forma menos permeável, que então forma a triazolofluoresceína (DAF-2T), esta reage com ON que então fluoresce. Os níveis de fluorescência foram medidos em leitora multimodo M200 Tecan em comprimento de onda de excitação e emissão de 495 nM e 515 nM, respectivamente.

### **3.11 Análise do ciclo celular**

A distribuição de células nas diferentes fases do ciclo celular foi analisada por citometria de fluxo com IP. Após os tratamentos das células A172 e GBM1 com as chalconas, as células foram lavadas, tripsinizadas e centrifugadas para posterior fixação em etanol 70%, em PBS gelado, a 4°C por 30 minutos. Depois da fixação, as células foram lavadas e incubadas com uma solução contendo 0,002 mg/ml de RNase A (Biosciences), 0,007% de Triton 1% (USB) e 0,6 mg/ml de IP por 30 minutos no escuro a 4°C. Ao fim do período de incubação, as células foram novamente lavadas, centrifugadas e colocadas em solução de PBS com 1% de SBF para leitura (MA et al., 2013). Os dados foram então obtidos em citômetro de fluxo FACSCanto II com obtenção de 10 mil eventos por experimento (HU et al., 2009).

### **3.12 Análise estatística**

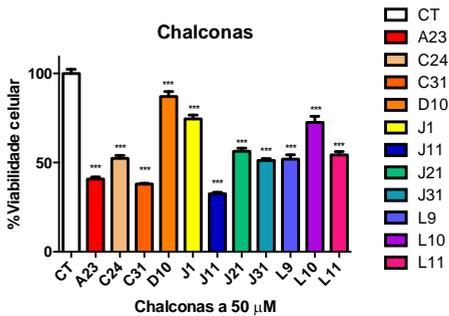
Os dados foram analisados estatisticamente pelos testes de ANOVA de uma e duas vias, conforme a necessidade, seguindo

pelo teste de Student-Newman-Keuls e Bonferroni para níveis de significância. Resultados foram considerados estatisticamente diferentes quando  $p < 0,05$ .

## 4 RESULTADOS

### 4.1 MTT

Baseando-se na análise inicial das 11 chalconas, foram escolhidas as 3 que demonstraram uma redução proeminente na viabilidade ( $> 50\%$ ) em células de glioma A172 na concentração de  $50 \mu\text{M}$  em comparação com células não tratadas. Estas foram: A23 –  $59,26 \pm 1,2\%$  / C31 –  $62,12 \pm 0,6\%$  e J11 –  $67,45 \pm 0,72\%$  (Figura 9). Estas três chalconas foram então, selecionadas para os experimentos subsequentes.



**Figura 9:** Análise inicial da ação de 11 chalconas na concentração de  $50 \mu\text{M}$  em células de glioblastoma multiforme, linhagem A172, por 24 horas. Valores expressos como médias  $\pm$  SEM (erro padrão), com n mínimo de 3 por grupo. Diferenças significativas são relativas ao grupo controle (CT): \* $P < 0,05$ , \*\* $P < 0,01$  e \*\*\* $P < 0,001$ .

As chalconas selecionadas então foram utilizadas no tratamento das culturas submetidas ao ensaio de MTT para avaliar a sua eficácia de redução da viabilidade celular em uma curva com seis

diferentes concentrações: 1, 10, 25, 50, 75 e 100  $\mu\text{M}$  por 24 horas. Nesses experimentos, observamos que A23 e C31 mostraram uma pequena redução da viabilidade, significativa em 25 e 50  $\mu\text{M}$  em A172 e GBM1, respectivamente. Já J11 teve efeitos significativos a 10  $\mu\text{M}$  em A172 porém, quando testada em GBM1, este efeito só foi observado a 75  $\mu\text{M}$  (Figura 10).

Posteriormente, as chalconas então foram testadas por 48 e 72 horas de tratamento. Ainda com aumento dos tempos de tratamento, as diferenças observadas não foram significativas. Apenas em GBM1, o tratamento por 48 horas com as três chalconas atingiu o limiar de 50% de redução de viabilidade celular em uma concentração menor do que a concentração necessária para tal em 24 horas (10  $\mu\text{M}$  para A23, 25  $\mu\text{M}$  para C31 e 50  $\mu\text{M}$  para J11 (Figura 10). Esses efeitos não se repetiram ou se intensificaram com o tratamento por 72 horas, onde as três chalconas atingiram 50% de redução de viabilidade em uma concentração média de 50  $\mu\text{M}$ .

Como o DMSO é o veículo no qual as chalconas foram diluídas, realizamos todos os experimentos com o grupo controle do veículo, com as concentrações máximas deste utilizadas nas diluições. Visando evidenciar que a ação observada nos experimentos é causada pelas chalconas e não pelo seu veículo, observamos então que, para os tratamentos de 1, 10, 25, 50, 75 e 100  $\mu\text{M}$ , foram utilizadas concentrações finais de DMSO de 0,004%, 0,04%, 0,01%, 0,2%, 0,3% e 0,4%, respectivamente. Dessa maneira, pudemos averiguar que o veículo não exerce influência significativa na viabilidade celular em ambas as culturas testadas, nessas concentrações, em 24 horas. Ainda, nas células A172, nos tempos de 48 e 72 horas, foi observada uma redução da viabilidade tempo-dose dependente a partir de 0,3%, efeito não observado em GBM1, sugerindo uma susceptibilidade maior de A172 ao efeito citotóxico do DMSO.

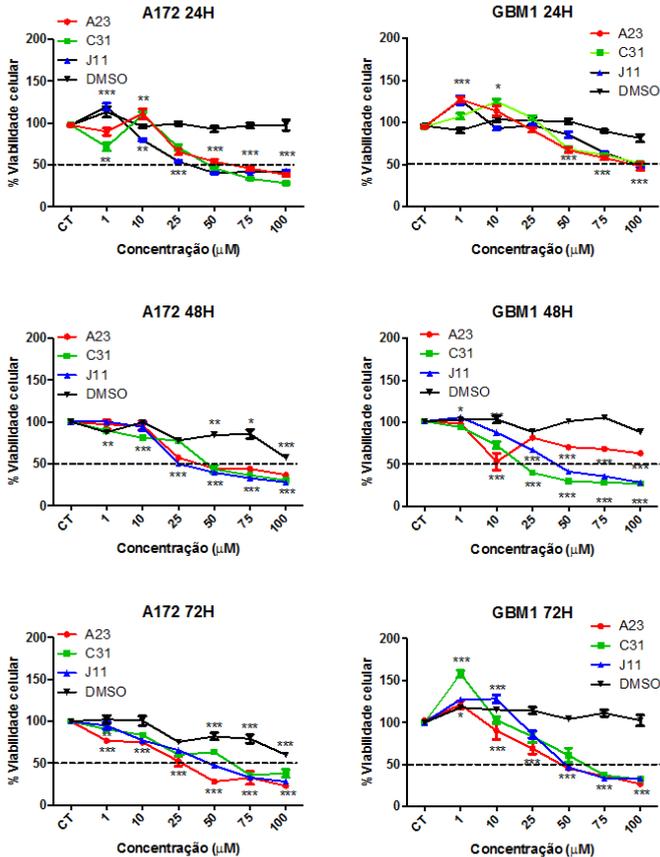


Figura 10: Curvas de concentração das chalconas A23, C31 e J11 por 24, 48 e 72 horas em células de glioblastoma multiforme, A172 e GBM1. Valores expressos como médias  $\pm$  SEM (erro padrão), com n mínimo de 3 por grupo. Diferenças significativas são relativas ao grupo controle (CT): \* $P < 0.05$ , \*\* $P < 0.01$  e \*\*\* $P < 0.001$ .

**Formatado:** Índice de ilustrações; Figuras, À esquerda, Espaçamento entre linhas: simples, Controle de linhas órfãs/viúvas, Ajustar espaçamento entre texto latino e asiático, Ajustar espaçamento entre texto e números asiáticos, Tabulações: Não em 28 pt + 56 pt + 84 pt + 112 pt + 140 pt + 168 pt + 196 pt + 224 pt + 252 pt + 280 pt + 308 pt + 336 pt

Com a finalidade de avaliar o possível efeito citotóxico das chalconas em células não tumorais, astrócitos murinos foram utilizados como controle. Na Figura 11 podemos observar que as chalconas não reduziram significativamente a viabilidade celular. Além disso, C31 aumentou de maneira significativa em 100  $\mu\text{M}$ . O veículo DMSO também aumentou a viabilidade em 50 e 75  $\mu\text{M}$ .

Excluído: 1

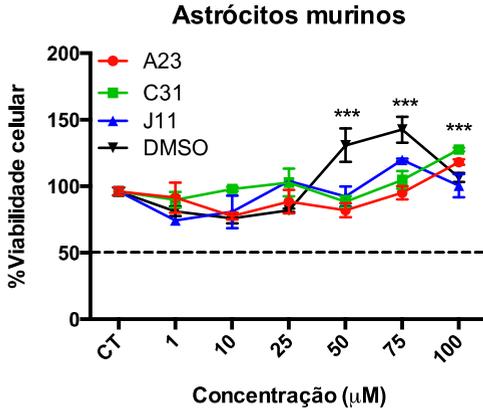


Figura 11: Curva de concentração das chalconas A23, C31 e J11 em astrócitos murinos por 24 horas. Valores expressos como médias  $\pm$  SEM (erro padrão), com n de 1. Diferenças significativas são relativas ao grupo controle (CT): \* $P < 0.05$ , \*\* $P < 0.01$  e \*\*\* $P < 0.001$ .

#### 4.2 Cálculo do IC50

Para melhor entender os mecanismos envolvidos na redução de viabilidade celular observada nas curvas de concentração, valores de IC50 foram calculados para cada chalcona em relação a cada linhagem celular A172 e GBM1 (Tabela 2). Com isto, avaliamos o tipo de morte e possíveis mecanismos envolvidos nesses processos.

**Tabela 2** - Valores calculados do IC50 de 24 horas para as chalconas A23, C31 e J11 relativos às células A172 e GBM1. Valores expressos em  $\mu\text{M}$ .

	<b>A172</b>	<b>GBM1</b>
<b>A23</b>	65,58 $\pm$ 1,31	86,34 $\pm$ 0,48
<b>C31</b>	50,83 $\pm$ 0,83	90,34 $\pm$ 1,73
<b>J11</b>	43,93 $\pm$ 1,12	89,62 $\pm$ 1,52

### 4.3 Morte celular

Foram realizados os ensaios de IP/H e Anexina-V com a finalidade de avaliar qual tipo de morte é acarretada em função do tratamento com as chalconas, se por necrose ou apoptose. Com o ensaio de IP/H, verificamos a quantidade de células mortas por necrose como consequência do tratamento com as chalconas. Observamos que A23 promoveu aumento significativo de necrose, em relação ao controle em ambas as células testadas, A172 (42,99  $\pm$  1,72%) e GBM1 (41,58  $\pm$  2,59%). C31 também mostrou um aumento significativo em ambas as células testadas, A172 (27,34  $\pm$  1,2%) e GBM1 (34,13  $\pm$  3,41%). Contudo, J11 não mostrou efeito significativo em relação à necrose em ambas as células (Figuras 12 e 13).

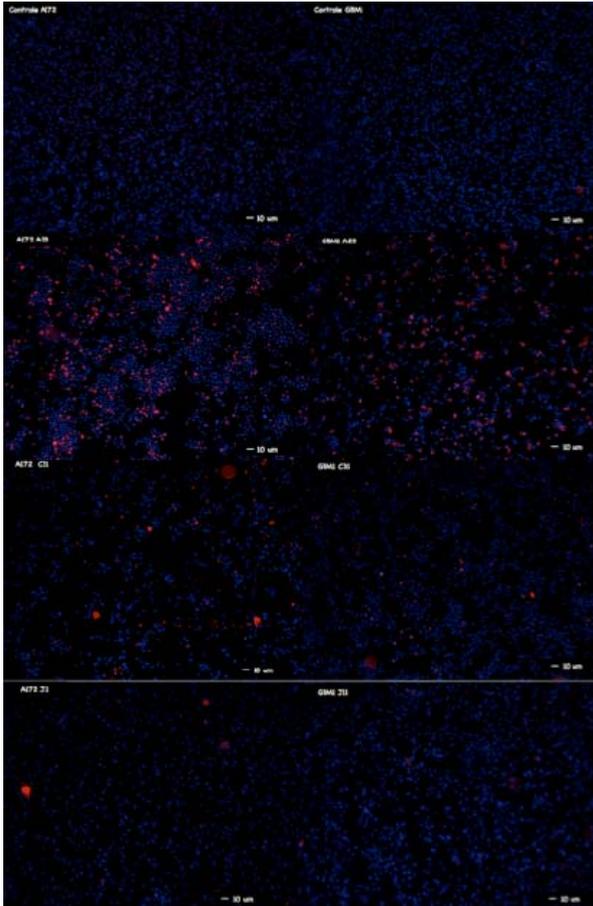
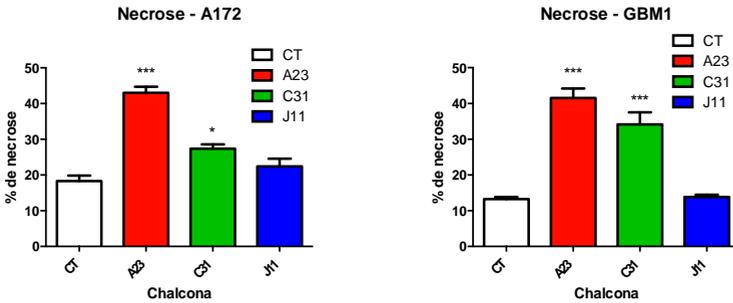


Figura 12: Fotos representativas do ensaio de incorporação de iodeto de propídeo/Hoechst em A172 e GBM1. As células foram fotografadas em microscópio epifluorescente em aumento de 100X.



**Figura 13:** Ensaio de detecção de morte por necrose por IP/H em células A172 e GBM1 tratadas com as chalconas A23, C31 e J11 por 24 horas. Valores expressos como médias  $\pm$  SEM (erro padrão), com n mínimo de 3 por grupo. Diferenças significativas são relativas ao grupo controle (CT): \* $P < 0.05$ , \*\* $P < 0.01$  e \*\*\* $P < 0.001$ .

Com a finalidade de se obter dados quantitativos complementares e verificar o montante de células em apoptose e necrose com os tratamentos, foi utilizado o *kit* de Anexina-V.

Segundo a análise de citometria (Figura 14), observamos que A23 aumentou em aproximadamente 100 vezes a quantidade de apoptose em células A172 (Controle  $0,33 \pm 0,1\%$  dos eventos / A23 -  $33,73 \pm 3,43\%$  dos eventos). Estes resultados foram ainda mais pronunciados em GBM1, onde o aumento foi de mais de 200 vezes em relação ao controle (Controle -  $0,08 \pm 0,05\%$  de eventos / A23 -  $17,0 \pm 2,08\%$  de eventos).

A chalcona C31 apresentou valores significativos,  $15,57 \pm 0,34\%$  de eventos em A172 e  $16 \pm 1,44\%$  de eventos em GBM1.

Já J11 não apresentou diferença significativa em A172, e sim em GBM1,  $12,74 \pm 2,99\%$  de eventos. Os histogramas obtidos nestes ensaios estão no apêndice (AP1).

Com relação à morte por necrose, apenas A23 demonstrou um efeito significativo em relação ao controle em ambas as células testadas. Contudo, a tendência observada anteriormente é mantida (Figura 8), com A23 aumentando significativamente os níveis de necrose em A172 e GBM1 ( $27,25 \pm 3,66\%$  e  $17,15 \pm 2,37\%$  de eventos, respectivamente), C31 e J11 aumentam os

níveis, mas não de uma maneira estatisticamente significativa (C31 -  $4,48 \pm 0,55\%$  e  $4,82 \pm 0,66\%$  dos eventos e J11 -  $3,65 \pm 0,2\%$  e  $6,8 \pm 1,28\%$  dos eventos em A172 e GBM1, respectivamente).

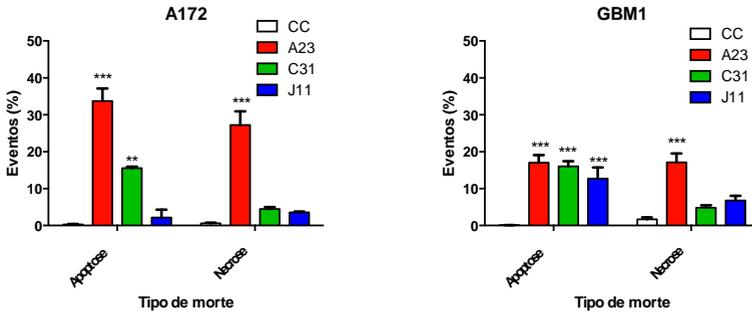


Figura 14: Quantificação de células apoptóticas e necróticas, por citometria de fluxo, em A172 e GBM1 tratadas com chalconas A23, C31 e J11 por 24 horas. Valores expressos como médias  $\pm$  SEM (erro padrão), com n mínimo de 3 por grupo. Diferenças significativas são relativas ao grupo controle (CC): \* $P < 0,05$ , \*\* $P < 0,01$  e \*\*\* $P < 0,001$ .

#### 4.4. Produção de EROs

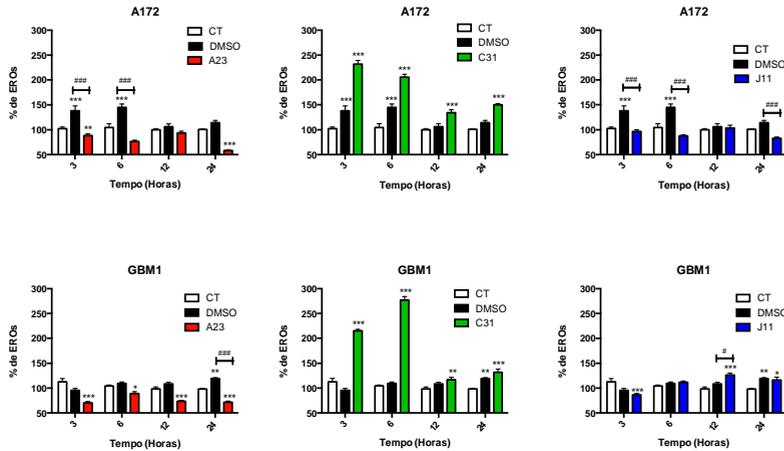
Analisando, então, a produção de EROs (Figura 15 e Tabela 3), observamos que o veículo das chalconas, DMSO, causou um aumento significativo destas espécies em 3 e 6 horas nas células A172. Contudo, esse aumento de EROs foi revertido aos valores do controle não tratado com o tratamento de A23, indicando sua atividade antioxidativa. Observamos ainda que em 3 e 24 horas de tratamento com A23, os níveis de EROs são significativamente reduzidos em relação aos controles de mesmo tempos.

Em GBM1, este efeito antioxidativo é novamente observado em todos os tempos testados. É importante salientar

que esses valores são inferiores aos dos controles não tratados e inferiores também ao controle com DMSO por 24 horas (Tabelas 3 e 4).

A chalcona C31 apresentou um efeito completamente oposto, aumentando de modo estatisticamente significativo os níveis de EROS em todos os tempos analisados e em ambas as células, A172 e GBM1 (Tabelas 3 e 4).

Por fim, a chalcona J11 teve uma ação ambígua sobre as células, ora agindo como antioxidante e ora agindo como oxidante (Tabelas 3 e 4).



**Figura 15: Quantificação dos níveis de espécies reativas de oxigênio geradas pelo tratamento com as chalconas A23, C31 e J11 por 3, 6, 12 e 24 horas em células A172 e GBM1. Valores expressos como médias  $\pm$  SEM (erro padrão), com n mínimo de 3 por grupo. Diferenças significativas são relativas ao grupo controle (CT): \*P<0.05, \*\*P<0.01 e \*\*\*P<0.001.**

**Tabela 3** - Resumo de dados numéricos em porcentagem da análise de produção de EROS em A172 com o tratamento com as chalconas A23, C31 e J11 por 3, 6, 12 e 24 horas. Os valores em negrito correspondem aos mencionados no texto.

HORAS	CT	DMSO	A23	C31	J11
3	<b>102,40</b>	<b>138,1</b>	<b>88,23</b>	<b>231,8</b>	<b>96,06</b>
6	<b>104,50</b>	<b>144,9</b>	<b>76,63</b>	<b>205,7</b>	<b>87,65</b>
12	<b>99,91</b>	106,2	93,65	<b>134,1</b>	103,50
24	<b>100,80</b>	<b>114,1</b>	<b>58,31</b>	<b>149,8</b>	<b>82,60</b>

**Tabela 4** - Resumo de resultados numéricos em porcentagem da análise de produção de EROS em GBM1 com o tratamento com as chalconas A23, C31 e J11 por 3, 6, 12 e 24 horas. Os valores em negrito correspondem aos mencionados no texto.

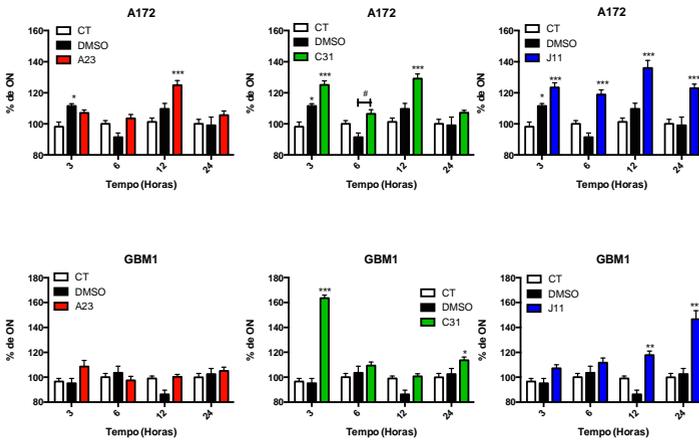
HORAS	CT	DMSO	A23	C31	J11
3	<b>112,50</b>	<b>95,52</b>	<b>70,31</b>	<b>215,4</b>	<b>96,06</b>
6	<b>104,40</b>	109,60	<b>89,03</b>	<b>276,9</b>	<b>87,65</b>
12	<b>98,59</b>	<b>108,70</b>	<b>73,58</b>	<b>116,8</b>	<b>126,5</b>
24	<b>98,54</b>	<b>119,00</b>	<b>71,86</b>	<b>132,0</b>	<b>82,60</b>

Com a finalidade de estudar outros efeitos intracelulares, relacionados à morte celular, desencadeados pelo tratamento com as chalconas, investigamos os níveis de óxido nítrico (ON) nas células.

#### 4.5 Produção de ON

A análise dos níveis de ON intracelular (Figura 16, Tabelas 5 e 6) revelou que DMSO aumenta seus níveis em 3 horas apenas em A172, sem efeito estatisticamente significativo em GBM1. A chalcona A23 causa um pico de concentração de ON em 12 horas em A172, mas não demonstra efeitos em GBM1.

No tratamento com C31, os níveis de ON são aumentados em 3 e 12 horas em A172 e em 3 e 24 horas em GBM1. Com J11 vemos um aumento consistente e constante dos níveis de ON em todos os tempos analisados em A172. Em GBM1 esse aumento é crescente e inicia-se com 12 horas de tratamento (Tabela 6).



**Figura 16: Quantificação dos níveis de oxido nítrico produzido pelo tratamento com as chalconas A23, C31 e J11 por 3, 6, 12 e 24 horas em células A172 e GBM1. Valores expressos como médias  $\pm$  SEM (erro padrão), com n mínimo de 3 por grupo. Diferenças significativas são relativas ao grupo controle (CT): \*P<0.05, \*\*P<0.01 e \*\*\*P<0.001.**

**Tabela 5** - Resumo dos dados numéricos em porcentagem da análise de produção de ON em A172 com o tratamento com as chalconas A23, C31 e J11 por 3, 6, 12 e 24 horas. Os valores em negrito correspondem aos mencionados no texto.

HORAS	CT	DMSO	A23	C31	J11
3	<b>98,26</b>	<b>111,60</b>	107,1	<b>125,1</b>	<b>123,4</b>
6	<b>100,0</b>	<b>91,50</b>	103,6	<b>106,4</b>	<b>118,8</b>
12	<b>101,3</b>	109,70	<b>124,9</b>	<b>129,1</b>	<b>135,9</b>
24	<b>100,0</b>	99,17	105,7	107,2	<b>122,9</b>

**Tabela 6** - Resumo de resultados numéricos em porcentagem da análise de produção de ON em GBM1 com o tratamento com as chalconas A23, C31 e J11 por 3, 6, 12 e 24 horas. Os valores em negrito correspondem aos mencionados no texto.

HORAS	CT	DMSO	A23	C31	J11
3	<b>96,58</b>	95,1	108,6	<b>163,5</b>	107,2
6	<b>100,0</b>	103,5	97,49	109,4	111,7
12	<b>98,97</b>	86,22	100,3	100,7	<b>117,8</b>
24	<b>99,9</b>	102,5	105,1	<b>113,6</b>	<b>146,6</b>

#### 4.6 Análise da distribuição de células no ciclo celular

Segundo a análise de ciclo celular, observamos que A172 apresentou uma redução do número de células na fase G0/G1 em relação ao controle, com tratamento de A23 e C31 (Figura 17). Em contrapartida, o tratamento com A23 aumentou a quantidade de células nas fases S e M.

Diferentemente, C31 não mostrou aumento do número de células em outras fases e J11 não teve nenhum efeito no ciclo celular em A172 (Tabela 7)

Em GBM1 verificamos aumento do número de células na fase S com o tratamento de A23 e C31, sem diminuição do número de células na fase G0/G1. J11 desta vez apresentou um aumento do número de células em G0/G1 sem aumento nas outras fases (Tabela 8). Os histogramas obtidos estão no apêndice (AP2).

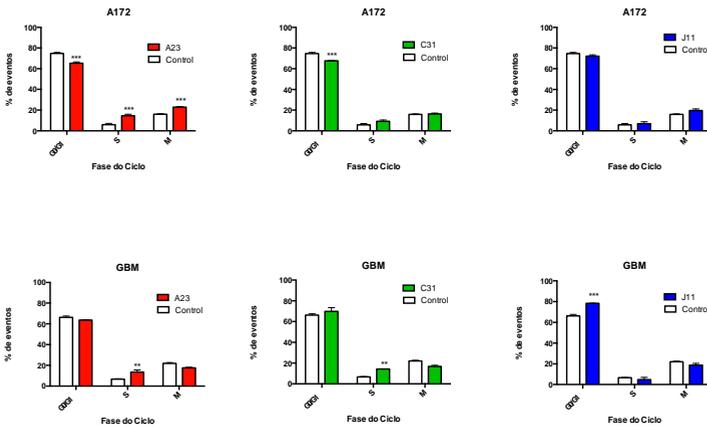


Figura 17: Análise do ciclo celular por PI em citometria de fluxo em A172 e GBM1 tratadas com as chalconas A23, C31 e J11 por 24 horas. Valores expressos como médias  $\pm$  SEM (erro padrão), com n mínimo de 3 por grupo. Diferenças significativas são relativas ao grupo controle (Control): \* $P < 0.05$ , \*\* $P < 0.01$  e \*\*\* $P < 0.001$ .

**Tabela 7** - Resumo de resultados numéricos em porcentagem da análise de ciclo celular em A172 com o tratamento das com as chalconas A23, C31 e J11 por 24 horas. Os valores em negrito correspondem aos mencionados no texto.

	<b>G0/G1</b>	<b>S</b>	<b>M</b>
<b>CT</b>	<b>74,750</b>	<b>5,942</b>	<b>15,920</b>
<b>A23</b>	<b>65,37</b>	<b>14,68</b>	<b>22,86</b>
<b>C31</b>	<b>67,660</b>	9,304	16,560
<b>J11</b>	72,120	6,997	19,590

**Tabela 8** - Resumo de resultados numéricos em porcentagem da análise de ciclo celular em GBM1 com o tratamento das com as chalconas A23, C31 e J11 por 24 horas. Os valores em negrito correspondem aos mencionados no texto.

	<b>G0/G1</b>	<b>S</b>	<b>M</b>
<b>CT</b>	<b>66,320</b>	<b>6,585</b>	<b>21,950</b>
<b>A23</b>	63,73	<b>13,56</b>	17,48
<b>C31</b>	69,90	<b>14,33</b>	16,80
<b>J11</b>	<b>78,380</b>	4,679	18,690

#### 4.7 Resumo dos resultados

Resumidamente, podemos observar na Tabela 9 um quadro geral das atividades estatisticamente significantes de cada chalcona, em A172 e GBM1 em cada um dos ensaios aplicados no presente trabalho. Com isto, podemos facilmente identificar e comparar o perfil de ação individual das chalconas.

**Tabela 9** - Resumo comparativo dos resultados numéricos das chalconas A23, C31 e J11 em células A172 e GBM1 nos ensaios de redução de viabilidade por MTT (com cálculo do IC50), detecção de necrose e apoptose por Anexina-V, medição de EROs por DCFDA, medição de ON por DAF2DA e análise da distribuição de células no ciclo celular por IP

	A172			GBM1		
	A23	C31	J11	A23	C31	J1
<b>MTT 24H</b>	25 µM	25 µM	10 µM	50 µM	50 µM	75 µ
<b>IC 50</b>	65,58 µM	50,83 µM	43,93 µM	86,34 µM	90,34 µM	89,6 µ
<b>Necrose</b>	↑□27,25%	-	-	↑□17,75%	-	-
<b>Apoptose</b>	↑□33,73%	↑□15,57%	-	↑□17%	↑□16%	↑□12,
<b>EROs</b>						
<b>3H</b>	↓□14,17%	↑□129,8%	↓□6,34%	↓42,19%	↑ 102,9%	↓ 16,
<b>6H</b>	↓□27,87%	↑□□□□□□%	↓□□□□□□%	↓□15,37%	↑□172,5%	↓□16,
<b>12H</b>	-	↑□□□□□□	-	↓□25,01%	↑□18,21%	↑□□□
<b>24H</b>	↓□42,49%	% ↑□ 49%	↓□ 18,2%	↓□26,68%	↑□33,46%	↓□15,
<b>ON</b>					□	
<b>3H</b>	-	↑□□□□□□□	↑□□□□□□□	-	↑□□□□□□□	□
<b>6H</b>	-	↑□□□□□□	↑□□□□□□□	-	-	□
<b>12H</b>	↑□□□□□□□	↑□□□□□□□	↑□□□□□□□	-	-	↑□□□□
<b>24H</b>	-	-	↑□□□□□□□		□↑□□□□□□□	↑□□□□
<b>Ciclo</b>						
<b>G0/G1</b>	↓□□□□□□	↓□□□□□	-	-	-	↑□□□□
<b>S</b>	↑□□□□□□□	-	-	-	□↑□□□□□□□	-
<b>M</b>	↑□□□□□□□	-	-	↑6,98%%	-	-

## 5 DISCUSSÃO

Com base nos resultados obtidos através da experimentação, é possível traçar uma possível linha de ação das chalconas testadas.

Com o experimento inicial de análise de redução de viabilidade com as 11 chalconas na concentração de 50  $\mu\text{M}$  em células de linhagem de glioblastoma multiforme A172, evidenciou-se uma ação mais importante com os compostos A23, C31 e J11. Nos experimentos seguintes de curva de concentração (de 1 a 100  $\mu\text{M}$ ) em A172 e em células de cultura primária de glioblastoma multiforme, GBM1, pudemos elucidar uma particularidade desta célula que é a sua resistência.

Como podemos observar nos resultados, a linhagem A172 é de alguma maneira menos resistente do que as células de paciente, GBM1, em se tratando de redução de viabilidade e indução de apoptose/necrose. Essa diferenciação pode se dar por duas razões. A primeira é pelo fato das passagens de cultura de A172 serem muito mais altas do que as de GBM1, ou por esta última ser uma população mais heterogênea, contendo diversas populações de células. A segunda provável razão está relacionada às células-tronco de câncer (CSCs). Estudos demonstram que diferentes linhagens celulares contém quantidades diferentes de CSCs e ainda, em linhagens mais antigas, o desgaste das sucessivas repicagens leva a uma diminuição gradual do nível desses tipos de célula, fazendo com que a cultura se degrade, diminuindo a velocidade de proliferação e a resistência a fármacos, entre outros (STIEBER et al., 2014) (BARONCHELLI et al., 2013).

Tecnicamente pudemos observar uma inconsistência entre os dados de medição de necrose obtidos pelo ensaio de IP/H e Anexina-V por citometria de fluxo. No primeiro, os valores foram em geral mais altos para todas as chalconas e C31 apresentou aumento significativo em relação ao controle em A172 e GBM1. Estes resultados não se repetiram na citometria provavelmente devido à sensibilidade desta técnica, que analisa individualmente

as células, diferentemente do ensaio de IP/H que analisa a fluorescência geral da placa. Considerando, então, que a citometria é uma técnica mais fina e precisa, devemos considerar a sua quantificação ao invés da quantificação de fluorescência. Contudo, como cada técnica tem as suas vantagens e desvantagens, o ensaio de IP/H serviu para observarmos visualmente o efeito das chalconas em relação à necrose.

Em se tratando de morte celular apoptótica, podemos observar que os níveis encontrados com a chalcona A23 foram maiores em A172 do que em GBM1, provavelmente pela maior sensibilidade de A172, já discutida anteriormente. A chalcona C31 no entanto apresentou valores no mesmo patamar em ambas as células. Contudo, observando J11, vemos que esta não aumentou significativamente os níveis de apoptose em A172 mas sim em GBM1. Uma provável explicação reside no possível papel de agente citostático de J11 e no fato de que GBM1 por ser uma cultura mista, ou menos homogênea que A172, possua uma taxa de proliferação maior, tendo assim, um maior impacto quando submetida a uma substância que controla o ciclo, represando-o. Esta teoria tem como apoio estudos que demonstram agentes citostáticos, que como J11, represam células na fase G0/G1 (principalmente pela modulação de ciclinas e CDKs) e induzem apoptose em células tumorais (CHEN et al., 2006). Contudo, ensaios suplementares para se determinar e comparar as taxas de proliferação das células usadas como modelo nesse estudo ainda são necessários.

Seguindo nos estudos das causas da apoptose observada, chegamos à análise das espécies reativas de oxigênio geradas pelo tratamento com as chalconas. As EROs têm um papel muito relevante nos cânceres de uma maneira geral. O estado redox das células é um fator crucial para a sua susceptibilidade ao estímulo apoptótico. Substâncias antioxidantes como o selênio, que reduz os níveis de EROS, vêm sendo estudadas como reguladores de diversos mecanismos como a proliferação celular, angiogênese e a motilidade celular em diversos tipos de tumores (CHEN; PRABHU; MASTRO, 2013).

Em contrapartida, altos níveis de EROs ou estresse

oxidativo são considerados como um estímulo à apoptose por causarem danos intracelulares tanto em organelas quanto no material genético. Alguns estudos mostram que, além desses danos, os EROs em grandes quantidades interferem nos proteossomos. Esta interferência acaba impedindo a reciclagem de proteínas defeituosas e levando ao seu acúmulo dentro da célula, que por sua vez é um sinal pro-apoptótico. Outra ação extremamente importante do aumento de EROs na células é a interferência na resistência a drogas mediada pela glicoproteína P, causando uma sensibilização nas células de glioma e, consequentemente, tornando a quimioterapia mais eficiente (RAE et al., 2013).

Nos resultados obtidos, podemos sugerir que A23 em ambas as células teve um efeito antioxidante e provavelmente seu mecanismo de ativação de apoptose não está atrelado à produção de EROs. Já com C31, a produção elevada de EROs em ambas as células revela que provavelmente este é um dos principais mecanismos de ativação das cascatas apoptóticas, já que o aumento é bem expressivo. Como J11 teve uma ação ambígua e que não pende para características somente oxidativas ou antioxidativas, provavelmente a sua ação apoptótica é bem pouco relacionada às EROs.

Estudos revelam que algumas chalconas e flavonóides desencadeiam apoptose por meio da modulação de vias de transdução de sinal, como a do fosfatidilinositol-3-quinase/Akt e a via MAPK (*mitogen-activated protein kinase*), afetando desta maneira, as funções celulares por fosforilação de proteínas e/ou regulações gênicas (RAMOS, 2008). Foi reportado também que algumas chalconas são capazes de induzir a apoptose em células de glioblastoma da linhagem T98G e U87MG pelo aumento dos níveis de EROs, mudanças no potencial mitocondrial ( $\Delta\Psi_m$ ) e na fosforilação de MAPKs (FESTA et al., 2011).

O aumento na produção de EROs pode ainda levar a um fenômeno conhecido como liberação de EROs induzida por EROs (RIRR, do inglês - *ROS-induced ROS release*) que, abreviadamente, é uma cascata de produção de EROs. Este fenômeno ocorre quando um pico na produção de EROs acontece

por conta de diversos fatores como estresse celular, injúria, isquemia/reperfusão, substâncias tóxicas ou no presente caso, drogas e isso leva à abertura de canais mitocondriais, como o poro de transição de permeabilidade mitocondrial (MPT, do inglês - *mitochondrial permeability transition pore*) e o canal de ânion da membrana interna da mitocôndria (IMAC, do inglês - *inner membrane anion channel*). Estes, por sua vez, levam a um colapso do  $\Delta\Psi$ , causando um aumento transitório nos níveis de EROs no citosol. Difundido no citosol o EROs age como um segundo mensageiro para causar RIRR em mitocôndrias próximas, causando um efeito em cadeia de positivo com injúrias mitocondriais e celulares significativas (ZOROV; JUHASZOVA; SOLLITT, 2006).

Procurando outra explicação que justificasse a apoptose observada anteriormente, o óxido nítrico foi uma opção. Como a bibliografia da ação deste gás em gliomas tratados com chalconas é praticamente ausente, e diversos estudos apontam o ON como um importante regulador de diversos aspectos na célula, vimos nele o potencial regulador apoptótico que procurávamos.

O ON é um gás conhecido por seu papel de molécula sinalizadora e de neurotoxina. Estudos demonstram que em tumores sólidos como o GBM1, a hipóxia tumoral, causada por perfusão inadequada, é um dos principais desafios na radioterapia e na quimioterapia. Evidências recentes mostram que a radiação ionizante induz a produção de ON. Este aumento na produção de ON melhora a circulação sanguínea intratumoral. Como consequência, acontece a redução do inchaço e da inflamação decorrente das áreas necróticas, causadas pela hipóxia, permitindo que radiação e quimioterápicos circulem mais efetivamente dentro dos tumores. Além disso, o ON ainda tem outra ação bem relevante, que é a de diminuir a motilidade das células cancerosas (NAGANE et al., 2013) (BADN; SIESJÓ, 2010).

O ON pode ainda atuar de forma direta, como um radical livre ou de forma indireta, através de compostos resultantes da

sua reação com o oxigênio ( $O_2$ ) ou com o radical superóxido ( $O^-$ ),

por exemplo, dando origem às espécies reativas de nitrogênio. No primeiro caso, o óxido nítrico pode interagir de diversas maneiras, podendo ser, diretamente com metais complexos presentes na hemoglobina/mioglobina, com a enzima guanilato ciclase, com o citocromo P450 ou com proteínas responsivas à união com ferro.

Além disso, o óxido nítrico pode reagir com radicais de alta energia, tais como radicais baseados em carbono, lipídios e dióxido de nitrogênio. No segundo caso, o óxido nítrico reage com o oxigênio ou o radical superóxido, formando as espécies reativas de nitrogênio, que podem catalisar as seguintes reações:

nitrosação, formando como produtos nitrosamina e s-nitrosotiol;

oxidação, resultando na quebra de moléculas de DNA, peroxidação de lipídios e hidroxilação; e nitração, formando nitrotirosina (BOHLEN UND HALBACH, 2003).

Outros estudos demonstram a atividade indutora de apoptose do ON quando este é produzido em grandes quantidades e uma atividade anti-apoptótica quando é produzido em baixos e constantes níveis (DIMMELER; ZEIHNER, 1997).

Outra ação do ON é também de regular o ciclo celular. Foi demonstrado que altos níveis de ON podem afetar a produção de ciclinas - diminuindo ou aumentando, bem como super regular genes como o p53 (WINK; MITCHELL, 1998).

Nossos resultados indicam que a ação apoptótica de J11 pode ter uma grande parcela relacionada ao aumento dos níveis de ON intracelular. Mesmo este efeito não sendo visto com tanta constância em GBM1 quanto em A172, ainda assim é plausível se pensar que o aumento observado é um dos agentes

desencadeadores da apoptose nestas células. Apesar de J11 ser a chalcona que tem os maiores níveis e talvez a maior participação do ON no seu mecanismo causador de apoptose, as outras chalconas tem também picos que muito possivelmente estão relacionados sinergicamente aos níveis de EROs e a influência no ciclo celular, para causar a apoptose observada nos ensaios de Anexina-V.

Com estas informações, podemos entender o motivo dos efeitos observados nos resultados e as possíveis implicações das chalconas como agentes antitumorais. Mais estudos para se entender a fundo os mecanismos envolvidos são necessários, principalmente para se entender por qual via a apoptose é causada, se intrínseca ou extrínseca, se estas chalconas alteram a produção ou regulação das ciclinas no ciclo celular, de que maneira elas têm esse efeito oxidante ou antioxidante observado e quais são as consequências, além do aumento de apoptose com o óxido nítrico.

Como o aumento de apoptose observado na citometria não pode ser explicado em sua totalidade pelos ensaios anteriores, é natural investigar que ações as chalconas têm no ciclo celular. Estas interferências no ciclo já vêm sendo estudadas há algum tempo. No entanto, a bibliografia referente ao uso destas substâncias em gliomas ainda é muito escassa. Em um estudo conseguiu-se bloquear o ciclo celular em células de linhagem de glioblastoma multiforme humano na fase M. Este bloqueio se deu pela despolimerização dos microtúbulos das fibras do fuso com o uso de um derivado de chalconas, JAI-51, que tem uma ação semelhante à da colchicina. Este derivado teve ainda seus resultados reafirmados na experimentação *in vivo*, no qual os tumores tiveram um crescimento mais lento com o tratamento intravenoso se comparado com os grupos controles (BOUMENDJEL et al., 2009).

Foi visto que chalconas sintéticas e seus derivados têm, de fato, uma influência no ciclo celular em células leucêmicas, causando diversos efeitos. Um exemplo é o represamento de células em fases específicas, dependendo da chalcona testada. Esse represamento se dá pela diminuição na expressão de ciclinas

ou alteração no seu funcionamento, levando à apoptose (MAIORAL et al., 2013).

No presente estudo, pudemos visualizar que a chalcona A23 em A172 não é efetiva na parada do ciclo celular, mas talvez o acelere por ignorar os pontos de checagem, produzindo células defeituosas que vão, eventualmente, entrar em apoptose. A chalcona C31 em A172 indica que possivelmente as células que não estão presentes em G0/G1 tinham problemas graves ou foram severamente danificadas pela ação de C31 e entraram nas vias apoptóticas, não sendo então, detectadas neste ensaio. Contudo, A23 e C31 em GBM1 têm uma ação diferente, de parada do ciclo na fase M, represando neste ponto as células e impedindo-as de seguirem o ciclo. Isso pode acontecer por diversos motivos, como dano de DNA causado pelas chalconas, não permitindo que a célula passe no *check point* da fase M (YOON et al., 2002). Diferentemente, J11 em GBM1 sugere um efeito citostático, já que existe um número maior de células em G0/G1 que não inicia a divisão celular.

As chalconas são capazes de elevar significativamente a expressão das proteínas p21 e p27 (SHEN et al., 2007) e diminuir os níveis de ciclina B1, ciclina A e Cdc2, além de aumentar a expressão de Bax e Bak e reduzir os níveis de Bcl-2 e Bcl-XL, ativando a via apoptótica mitocondrial (NISHIMURA et al., 2007). Este potencial é ampliado pela capacidade desses compostos de inibir a angiogênese, um processo fundamental para o crescimento tumoral. Isso ocorre por meio da regulação da expressão do fator de crescimento endotelial vascular (VEGF), das metaloproteinases de matriz (MMPs), do receptor do fator de crescimento epidermal (EGFR), da inibição do fator de transcrição NF- $\kappa$ B e das vias de sinalização PI3K/Akt (MOJZIS et al., 2008).

Fazendo uma análise de futuros bons compostos para a continuação da pesquisa temos resumidamente que, a chalcona A23, apesar de ter o mais significativo aumento nos níveis de apoptose, também tem o mais alto nível de necrose, que consequente levará à inflamação. Sua atividade antioxidante pode ser interessante, mas seu aumento pontual de ON e a baixa

influência no ciclo levam a concluir que este composto deve sofrer alterações estruturais visando diminuir o efeito necrótico para prosseguirem suas pesquisas.

O composto C31, teve um efeito mediano no aumento de apoptose sem o aumento de necrose, sendo então, uma chalcona que não há de causar inflamação *in vivo*. Sua atividade oxidante é muito relevante e importante, sendo provavelmente a principal causa do aumento nos níveis de morte por apoptose observados. Sua ação na produção de ON merece ser estudada mais a fundo por ter sido relativamente alta. Os efeitos no ciclo celular foram desconexos e não levam a uma conclusão clara. Sendo assim, esta chalcona é de extremo interesse para uma continuidade nas pesquisas.

Finalmente, J11 foi a chalcona com maior resultado na redução de viabilidade, atingindo o IC50 em uma concentração menor que A23 e C31. Apresentou aumento de apoptose em GBM1 de uma maneira discreta. Sua ação predominantemente antioxidante tem que ser melhor estudada para avaliar se esta característica não está impedindo que esta substância aumente com mais eficiência os níveis de apoptose. A ação na produção de ON é muito relevante tanto pela constância quanto pela quantidade de aumento em relação ao controle. Junto com o resultado, a princípio discreto da análise de ciclo celular, pode-se teorizar que esta chalcona tem um importante efeito citostático e que este foi mais eficiente do que causar morte celular de fato na redução de viabilidade. Assim sendo, J11 é um promissor composto adjuvante que deve ser estudado.

## **6 PERSPECTIVAS FUTURAS**

Com o exposto, podemos concluir que para se elucidar com mais precisão os efeitos das chalconas na células testadas, mais ensaios são necessários. Entre eles, podemos sugerir os de invasão/motilidade celular, expressão de caspases para determinar se a morte apoptótica observada é dependente ou independente destas proteínas e análises da influência das chalconas na expressão de genes chave que regulam a proliferação, angiogênese e processos metastáticos e infiltrativos (TENG; SZE; LIAO, 2013).

## 7 CONCLUSÕES

Como conclusão, tivemos que das onze chalconas testadas, A23, C31 e J11 tiveram os melhores desempenhos em reduzir a viabilidade de células de A172. As células de GBM obtidas de paciente, GBM1 demonstram ser mais resistentes à ação das chalconas do que a linhagem celular de GBM, A172. Em 24 horas, as chalconas testadas não tiveram efeito redutor de viabilidade no modelo de células normais, os astrócitos murinos. O veículo das chalconas, DMSO, não teve influência na viabilidade de nenhum tipo celular testado, em 24 horas.

As chalconas A23 e C31 promoveram apoptose nas células de GBM1 e A172. J11 por sua vez induziu apoptose apenas em GBM1. A23 causou necrose em ambas as células testadas.

A chalcona A23 tem ação antioxidante, diminuindo EROs em A172 e GBM1. C31 tem uma ação antagonista, oxidativa, aumentando EROs em ambas as células testadas. J11 apresentou uma discreta ação antioxidante aos efeitos do DMSO em A172 e uma leve ação oxidante em 12 e 24 horas em GBM1.

Os níveis de ON foram aumentados de forma constante e relevante com o tratamento de J11 em células de A172, picos em 12 e 24 horas de GBM1 também foram observados. A23 teve um pico em 12 horas em A172 e C31 teve picos em 3 e 12 horas em A172 e em 3 e 24 horas em GBM1.

No ciclo celular, em A172, A23 aumentou o número de

células nas fases M e G2, C31 reduziu o número de células em G0/G1 e J11 não teve efeito. Em GBM1, A23 e C31 levaram mais células à fase S e J11 aumentou a quantidade de células em G0/G1.

## 8 REFERÊNCIAS

- BADN, W.; SIESJÖ, P. The dual role of nitric oxide in glioma. **Current pharmaceutical design**, v. 16, n. 4, p. 428–430, 2010.
- BARONCHELLI, S. et al. Delineating the cytogenomic and epigenomic landscapes of glioma stem cell lines. **PLoS one**, v. 8, n. 2, p. e57462, 2013.
- BJELAKOVIĆ, G. et al. Apoptosis: programmed cell death and its clinical implications. **Med ...**, 2005.
- BLAIN, S. W.; MONTALVO, E.; MASSAGUÉ, J. Differential interaction of the cyclin-dependent kinase (Cdk) inhibitor p27Kip1 with cyclin A-Cdk2 and cyclin D2-Cdk4. **The Journal of biological chemistry**, v. 272, n. 41, p. 25863–25872, 10 out. 1997.
- BOHLEN UND HALBACH, VON, O. Nitric oxide imaging in living neuronal tissues using fluorescent probes. **Nitric Oxide**, v. 9, n. 4, p. 217–228, dez. 2003.
- BORCHHARDT, D. M. et al. Biochemical evaluation of a series of synthetic chalcone and hydrazide derivatives as novel inhibitors of cruzain from *Trypanosoma cruzi*. **Journal of the Brazilian Chemical Society**, v. 21, n. 1, p. 142–150, 1 dez. 2009.

- BOUMENDJEL, A. et al. Antimitotic and antiproliferative activities of chalcones: forward structure-activity relationship. **Journal of medicinal chemistry**, v. 51, n. 7, p. 2307–2310, 10 abr. 2008.
- BOUMENDJEL, A. et al. A novel chalcone derivative which acts as a microtubule depolymerising agent and an inhibitor of P-gp and BCRP in in-vitro and in-vivo glioblastoma models. **BMC cancer**, v. 9, n. 1, p. 242, 2009.
- BRANDES, A. A. et al. Glioblastoma in adults. **Critical reviews in oncology/hematology**, v. 67, n. 2, p. 139–152, ago. 2008.
- BRAT, D. J. et al. Newly codified glial neoplasms of the 2007 WHO Classification of Tumours of the Central Nervous System: angiocentric glioma, pilomyxoid astrocytoma and pituitaryoma. **Brain pathology (Zurich, Switzerland)**, v. 17, n. 3, p. 319–324, jul. 2007.
- BRIGHT, J. et al. Pollen generates nitric oxide and nitrite: a possible link to pollen-induced allergic responses. **Plant physiology and biochemistry : PPB / Société française de physiologie végétale**, v. 47, n. 1, p. 49–55, jan. 2009.
- CERUTTI, P. A. Prooxidant states and tumor promotion. **Science (New York, N.Y.)**, v. 227, n. 4685, p. 375–381, 25 jan. 1985.
- CHANG, Y. C. et al. Inhibition of cell cycle progression by penta-acetyl geniposide in rat C6 glioma cells. **Toxicology and applied ...**, 2004.
- CHEN, J.-C. et al. Gypenosides Induced Apoptosis in Human Colon Cancer Cells through the Mitochondria-dependent Pathways and Activation of Caspase-3. **Anticancer research**, v. 26, n. 6B, p. 4313–4326, 1 nov. 2006.
- CHEN, Y.-C.; PRABHU, K. S.; MASTRO, A. M. Is selenium a

potential treatment for cancer metastasis? **Nutrients**, v. 5, n. 4, p. 1149–1168, abr. 2013.

CHENG, J.-X.; ZHANG, X.; LIU, B.-L. Health-related quality of life in patients with high-grade glioma. **Neuro-oncology**, v. 11, n. 1, p. 41–50, fev. 2009.

CHIARADIA, L. D. et al. Synthesis, Biological Evaluation, And Molecular Modeling of Chalcone Derivatives As Potent Inhibitors of Mycobacterium tuberculosis Protein Tyrosine Phosphatases (PtpA and PtpB). **Journal of medicinal chemistry**, v. 55, n. 1, p. 390–402, 20 dez. 2011.

DE SALDANHA DA GAMA FISCHER, J. et al. Chemo-Resistant Protein Expression Pattern of Glioblastoma Cells (A172) to Perillyl Alcohol. **Journal of Proteome Research**, v. 10, n. 1, p. 153–160, 7 jan. 2011.

DIMMELER, S.; ZEIHNER, A. M. Nitric oxide and apoptosis: another paradigm for the double-edged role of nitric oxide. **Nitric Oxide**, v. 1, n. 4, p. 275–281, ago. 1997.

DUCKI, S. The development of chalcones as promising anticancer agents. **IDrugs : the investigational drugs journal**, v. 10, n. 1, p. 42–46, jan. 2007.

ENGEL, R. H.; EVENS, A. M. Oxidative stress and apoptosis: a new treatment paradigm in cancer. **Frontiers in bioscience: a journal and virtual ...**, 2005.

FESTA, M. et al. Xanthohumol Induces Apoptosis in Human Malignant Glioblastoma Cells by Increasing Reactive Oxygen Species and Activating MAPK Pathways. **Journal of Natural Products**, v. 74, n. 12, p. 2505–2513, 27 dez. 2011.

GIL-AD, I. et al. Characterization of phenothiazine-induced apoptosis in neuroblastoma and glioma cell lines: clinical

- relevance and possible application for brain-derived tumors. **Journal of molecular neuroscience : MN**, v. 22, n. 3, p. 189–198, 2004.
- GOLSTEIN, P.; KROEMER, G. Cell death by necrosis: towards a molecular definition. **Trends in biochemical sciences**, v. 32, n. 1, p. 37–43, jan. 2007.
- HSU, Y. L. et al. Chalcone inhibits the proliferation of human breast cancer cell by blocking cell cycle progression and inducing apoptosis. **Food and chemical toxicology : an international journal published for the British Industrial Biological Research Association**, v. 44, n. 5, p. 704–713, maio 2006.
- HU, L. et al. Thrombin induces tumor cell cycle activation and spontaneous growth by down-regulation of p27Kip1, in association with the up-regulation of Skp2 and MiR-222. **Cancer research**, v. 69, n. 8, p. 3374–3381, 15 abr. 2009.
- JEONG, J. C. et al. Mulberry fruit (*Morus fructus*) extracts induce human glioma cell death in vitro through ROS-dependent mitochondrial pathway and inhibits glioma tumor growth in vivo. **Nutrition and Cancer**, v. 62, n. 3, p. 402–412, 1 jan. 2010.
- KAMEI, H. et al. Tumor cell growth suppression by chalcone (1,3-diphenyl-2-propen-1-one). **Cancer Biotherapy and Radiopharmaceuticals**, v. 12, n. 1, p. 51–54, 1 fev. 1997.
- KO, H.-H. et al. Structure-activity relationship studies on chalcone derivatives. the potent inhibition of chemical mediators release. **Bioorganic & medicinal chemistry**, v. 11, n. 1, p. 105–111, 2 jan. 2003.
- KONSTADT, S. Nitric oxide: has it progressed from molecule of the year to wonder drug of the decade? **Journal of cardiothoracic and vascular anesthesia**, v. 9, n. 6, p. 625–626, dez. 1995.

KONTOGIORGIS, C.; MANTZANIDOU, M.; HADJIPAVLOU-LITINA, D. Chalcones and their potential role in inflammation.

**Mini reviews in medicinal chemistry**, v. 8, n. 12, p. 1224–1242, out. 2008.

LAM-HIMLIN, D. et al. Malignant glioma progression and nitric oxide. **Neurochemistry International**, v. 49, n. 8, p. 764–768, 1 dez. 2006.

LOA, J.; CHOW, P.; ZHANG, K. Studies of structure-activity relationship on plant polyphenol-induced suppression of human liver cancer cells. **Cancer chemotherapy and pharmacology**, v. 63, n. 6, p. 1007–1016, maio 2009.

LOUIS, D. N. et al. The 2007 WHO classification of tumours of the central nervous system. **Acta neuropathologica**, v. 114, n. 2, p. 97–109, ago. 2007.

MA, Z. et al. Knocking down SMC1A inhibits growth and leads to G2/M arrest in human glioma cells. **International journal of clinical and experimental pathology**, v. 6, n. 5, p. 862–869, 2013.

MAIORAL, M. F. et al. Apoptotic events induced by synthetic naphthylchalcones in human acute leukemia cell lines.

**Biochimie**, v. 95, n. 4, p. 866–874, 1 abr. 2013.

MENDES-DE-AGUIAR, C. B. N. et al. Thyroid hormone increases astrocytic glutamate uptake and protects astrocytes and neurons against glutamate toxicity. **Journal of neuroscience research**, v. 86, n. 14, p. 3117–3125, 1 nov. 2008.

MICHOTTE, A. et al. Neuropathological and molecular aspects of low-grade and high-grade gliomas. **Acta neurologica Belgica**, v. 104, n. 4, p. 148–153, dez. 2004.

MOJZIS, J. et al. In vitro antiproliferative and antiangiogenic

- effects of Flavin7. **Physiological research / Academia Scientiarum Bohemoslovaca**, v. 57, n. 3, p. 413–420, 2008.
- MONTEIRO, G. T. R.; KOIFMAN, S. [Brain tumors mortality in Brazil, 1980-1998]. **Cadernos de saúde pública**, v. 19, n. 4, p. 1139–1151, jul. 2003.
- MOSMANN, T. Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: application to proliferation and cytotoxicity assays. **Journal of immunological methods**, v. 65, n. 1-2, p. 55–63, 16 dez. 1983.
- NAGANE, M. et al. Radiation-induced nitric oxide mitigates tumor hypoxia and radioresistance in a murine SCCVII tumor model. **Biochemical and biophysical research communications**, v. 437, n. 3, p. 420–425, 2 ago. 2013.
- NISHIMURA, R. et al. Isobavachalcone, a chalcone constituent of *Angelica keiskei*, induces apoptosis in neuroblastoma. **Biological & pharmaceutical bulletin**, v. 30, n. 10, p. 1878–1883, out. 2007.
- OHGAKI, H.; KLEIHUES, P. Genetic pathways to primary and secondary glioblastoma. **The American journal of pathology**, v. 170, n. 5, p. 1445–1453, maio 2007.
- OSTROM, Q. T. et al. CBTRUS statistical report: Primary brain and central nervous system tumors diagnosed in the United States in 2006-2010. **Neuro-oncology**, v. 15 Suppl 2, p. ii1–i56, 1 nov. 2013.
- PICCIRILLO, S. G. M.; VESCOVI, A. L. Brain tumour stem cells: possibilities of new therapeutic strategies. **Expert opinion on biological therapy**, v. 7, n. 8, p. 1129–1135, ago. 2007.
- PREUSSER, M.; HABERLER, C.; HAINFELLNER, J. A. Malignant glioma: neuropathology and neurobiology. **Wiener**

**medizinische Wochenschrift (1946)**, v. 156, n. 11-12, p. 332–337, jun. 2006.

RAE, C. et al. The role of copper in disulfiram-induced toxicity and radiosensitization of cancer cells. **Journal of nuclear medicine : official publication, Society of Nuclear Medicine**, v. 54, n. 6, p. 953–960, jun. 2013.

RAMOS, S. Cancer chemoprevention and chemotherapy: Dietary polyphenols and signalling pathways. **Molecular Nutrition & Food Research**, v. 52, n. 5, p. 507–526, maio 2008.

RAO, S. D.; PAGIDAS, K. Epigallocatechin-3-gallate, a natural polyphenol, inhibits cell proliferation and induces apoptosis in human ovarian cancer cells. **Anticancer research**, v. 30, n. 7, p. 2519–2523, jul. 2010.

SASAYAMA, T. et al. Trans-4-Iodo,4'-boranyl-chalcone induces antitumor activity against malignant glioma cell lines in vitro and in vivo. **Journal of neuro-oncology**, v. 85, n. 2, p. 123–132, nov. 2007.

SCHAFFER, K. A. The cell cycle: a review. **Veterinary pathology**, v. 35, n. 6, p. 461–478, nov. 1998.

SHEN, J.-C. et al. Inhibitor of growth 4 suppresses cell spreading and cell migration by interacting with a novel binding partner, liprin alpha1. **Cancer research**, v. 67, n. 6, p. 2552–2558, 15 mar. 2007.

SHERR, C. J. Cancer cell cycles. **Science (New York, N.Y.)**, v. 274, n. 5293, p. 1672–1677, 6 dez. 1996.

STIEBER, D. et al. Glioblastomas are composed of genetically divergent clones with distinct tumourigenic potential and variable

stem cell-associated phenotypes. **Acta neuropathologica**, v. 127, n. 2, p. 203–219, fev. 2014.

STUPP, R. et al. **High-grade malignant glioma: ESMO Clinical Practice Guidelines for diagnosis, treatment and follow-up. Annals of oncology : official journal of the European Society for Medical Oncology / ESMO**Oxford University Press,, maio 2010.

TENG, C.-C.; SZE, C.-I.; LIAO, W. C. Induction of apoptosis of malignant gliomas cells by a prenylated chalcone. **Pharmaceutical biology**, p. 1–8, 5 nov. 2013.

TONN, J.-C. et al. Differential effects of vincristine and phenytoin on the proliferation, migration, and invasion of human glioma cell lines. **Journal of neurosurgery**, v. 82, n. 6, p. 1035–1043, jun. 1995.

USHIO-FUKAI, M. Redox signaling in angiogenesis: Role of NADPH oxidase. **Cardiovascular research**, v. 71, n. 2, p. 226–235, 15 jul. 2006.

VAN DEN BENT, M. J. Anaplastic oligodendroglioma and oligoastrocytoma. **Neurologic clinics**, v. 25, n. 4, p. 1089–109–ix–x, nov. 2007.

VAN MEIR, E. G. et al. Exciting new advances in neuro-oncology: the avenue to a cure for malignant glioma. **CA: a cancer journal for clinicians**, v. 60, n. 3, p. 166–193, maio 2010.

WICK, W.; WELLER, M. [Anaplastic glioma. Neuropathology, molecular diagnostics and current study concepts]. **Der Nervenarzt**, v. 81, n. 8, p. 928–30–932–5, ago. 2010.

WINK, D. A.; MITCHELL, J. B. Chemical biology of nitric oxide: Insights into regulatory, cytotoxic, and cytoprotective mechanisms of nitric oxide. **Free radical biology & medicine**, v. 25, n. 4-5, p. 434–456, set. 1998.

WONG, E. T. Tumor growth, invasion, and angiogenesis in malignant gliomas. **Journal of neuro-oncology**, v. 77, n. 3, p. 295–296, maio 2006.

WONG, R. S. Y. Apoptosis in cancer: from pathogenesis to treatment. **Journal of experimental & clinical cancer research : CR**, v. 30, n. 1, p. 87, 2011.

YIN, D. et al. Glioblastoma multiforme cells: expression of erythropoietin receptor and response to erythropoietin. **International journal of oncology**, v. 31, n. 5, p. 1193–1198, nov. 2007.

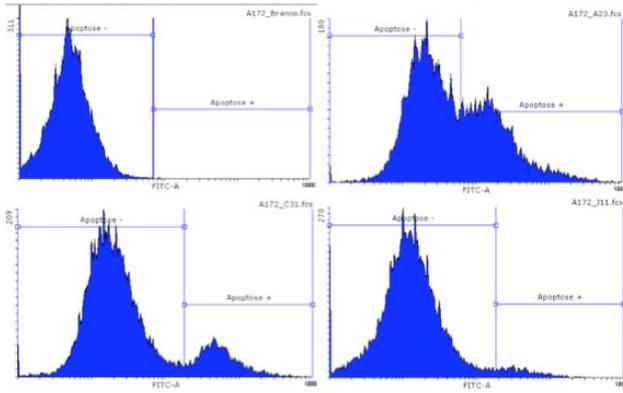
YOON, J.-T. et al. CP248, a derivative of exisulind, causes growth inhibition, mitotic arrest, and abnormalities in microtubule polymerization in glioma cells. **Molecular cancer therapeutics**, v. 1, n. 6, p. 393–404, abr. 2002.

ZOLDAKOVA, M. et al. Effects of a combretastatin A4 analogous chalcone and its Pt-complex on cancer cells: A comparative study of uptake, cell cycle and damage to cellular compartments. **Biochemical Pharmacology**, v. 80, n. 10, p. 1487–1496, 1 jan. 2010.

ZOROV, D. B.; JUHASZOVA, M.; SOLLOTT, S. J. Mitochondrial ROS-induced ROS release: an update and review. **Biochimica et Biophysica Acta (BBA)**; 2006.

## 9 APÊNDICE

### 9.1 AP1



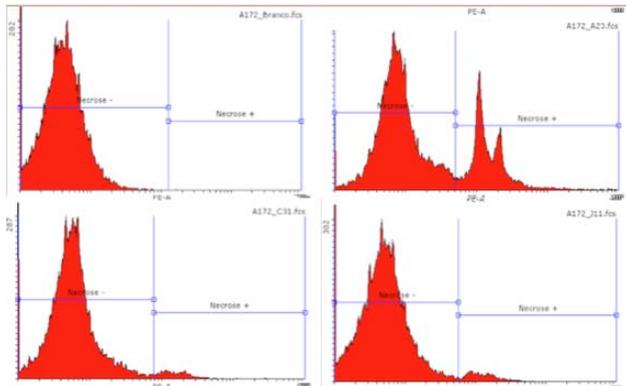


Figura 18: Histogramas representativos de citometria de fluxo para Anexina-V (Azul) e IP (Vermelho), obtidos com o software Flowing 2.0. Células A172 tratadas com as chalconas A23, C31 e J11.

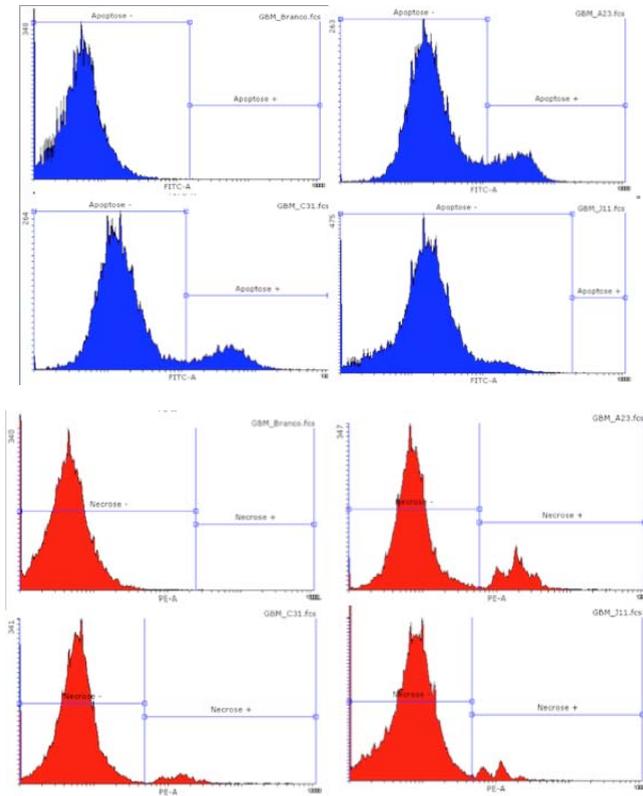


Figura 19: Histogramas representativos de citometria de fluxo para Anexina-V(Azul) e IP(Vermelho), obtidos com o software Flowing 2.0. Células GBM1 tratadas com as chalconas A23, C31 e J11.

## 8.2 AP2

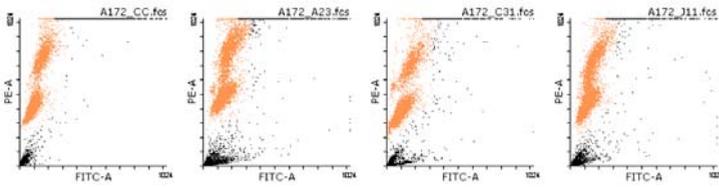


Figura 20: Dot-plots representativos de citometria de fluxo para IP(Laranja) na análise de ciclo celular, obtidos com o software Flowing 2.0. Células A172 tratadas com as chalconas A23, C31 e J11.

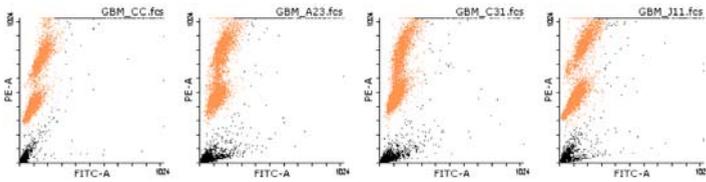
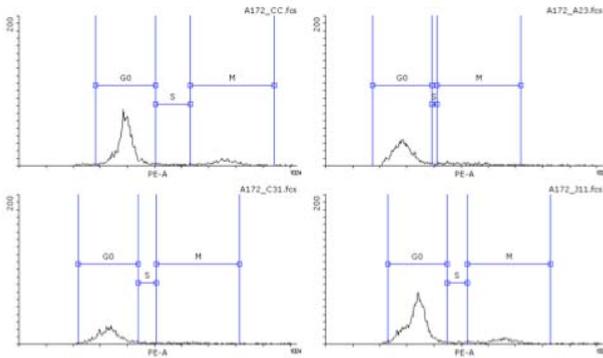
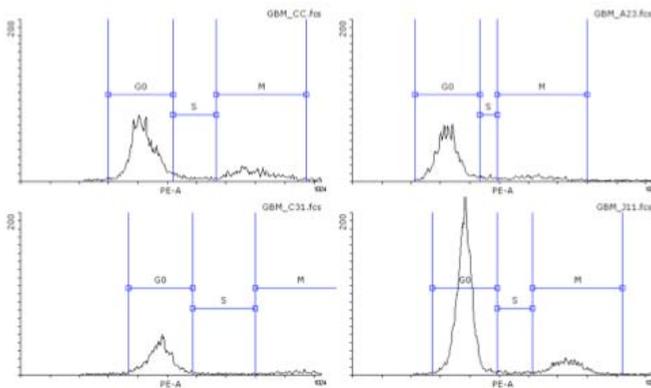


Figura 21: Dot-plots representativos de citometria de fluxo para IP(Laranja) na análise de ciclo celular, obtidos com o software Flowing 2.0. Células GBM1 tratadas com as chalconas A23, C31 e J11.



**Figura 23:** Histogramas representativos de citometria de fluxo para IP na análise de ciclo celular, obtidos com o software Flowing 2.0. Células A172 tratadas com as chalconas A23, C31 e J11.



**Figura 22:** Histogramas representativos de citometria de fluxo para IP na análise de ciclo celular, obtidos com o software Flowing 2.0. Células GBM1 tratadas com as chalconas A23, C31 e J11.

## ANEXOS

## Parecer do CEP SH

UNIVERSIDADE FEDERAL DE  
SANTA CATARINA - UFSC




---

**PROJETO DE PESQUISA**

**Título:** CARACTERIZAÇÃO E ESTABELECIMENTO DE CULTURAS CELULARES PRIMÁRIAS A PARTIR DE GLIOMAS PROVENIENTES DE PACIENTES SUBMETIDOS À CIRURGIA DE RESSECÇÃO NO HOSPITAL GOVERNADOR CELSO RAMOS, FLORIANÓPOLIS, SC

**Área Temática:**

Área 3. Fármacos, medicamentos, vacinas e testes diagnósticos novos (fases I, II e III) ou não registrados no país (ainda que fase IV), ou quando a pesquisa for referente a seu uso com modalidades, indicações, doses ou vias de administração diferentes daquelas estabelecidas, incluindo seu emprego em combinações.

**Versão:** 1

**CAAE:** 04087112,9,0000,0121

**Pesquisador:** Cláudia Beatriz Nedel Mendes de Aguiar

**Instituição:** UNIVERSIDADE FEDERAL DE SANTA CATARINA (Hospital Universitário HU- UFSC)

---

**PARECER CONSUBSTANCIADO DO CEP**

**Número do Parecer:** 108.286

**Data da Relatoria:** 24/09/2012

**Apresentação do Projeto:**

O estudo de Aguiar pretende estudar culturas de células de gliomas ressecados de pacientes do Hospital Celso Ramos, Florianópolis.

**Objetivo da Pesquisa:**

Estabelecer linhagens tumorais primárias a partir de gliomas humanos provenientes de pacientes submetidos à ressecção de tumores no Hospital Celso Ramos, Florianópolis, SC, estudando nestas linhagens os efeitos do tratamento com temozolamida e carmustina na modulação do aminoácido excitatório glutamato e o perfil de células tronco presentes.

**Avaliação dos Riscos e Benefícios:**

Os riscos suplantam os benefícios.

**Comentários e Considerações sobre a Pesquisa:**

Contribuirá sobre o conhecimento generalizável sobre o tema.

**Considerações sobre os Termos de apresentação obrigatória:**

TCLE adequado, anuência do HGCR.

**Recomendações:**

Não se aplica

**Conclusões ou Pendências e Lista de Inadequações:**

Pela aprovação

**Endereço:** Campus Universitário Reitor João David Ferreira Lima

**Bairro:** Trindade

**CEP:** 88.040-900

**UF:** SC

**Município:** FLORIANÓPOLIS

**Telefone:** (48)3721-9206

**Fax:** (48)3721-9696

**E-mail:** cep@reitoria.ufsc.br

UNIVERSIDADE FEDERAL DE  
SANTA CATARINA - UFSC



**Situação do Parecer:**

Aprovado

**Necessita Apreciação da CONEP:**

Não

**Considerações Finais a critério do CEP:**

Aprovado

FLORIANOPOLIS, 26 de Setembro de 2012

---

Assinado por:  
Washington Portela de Souza

**Endereço:** Campus Universitário Reitor João David Ferreira Lima  
**Bairro:** Trindade **CEP:** 88.040-900  
**UF:** SC **Município:** FLORIANOPOLIS