



Universidade Federal de Santa Catarina

Centro de Ciências Biológicas

Departamento de Biologia Celular, Embriologia e Genética

Laboratório de Biologia Celular de Gliomas

Luan da Silva Gomes

Estudo dos efeitos da chalcona sintética Ea2 em células de glioblastoma humano

Trabalho apresentado como requisito para a conclusão da disciplina de Trabalho de Conclusão de Curso II (BIO7016) do currículo do Curso de Graduação em Ciências Biológicas da Universidade Federal de Santa Catarina.

Orientadora: Dr.^a Cláudia Beatriz Nedel

Co-orientadora: Flávia Garcia Lopes.

Florianópolis

2016

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

Gomes, Luan da Silva

Estudo dos efeitos da chalcona sintética Ea2 em células
de glioblastoma humano / Luan da Silva Gomes ;
orientadora, Cláudia Beatriz Nedel ; coorientadora,
Flávia Garcia Lopes. - Florianópolis, SC, 2016.
57 p.

Trabalho de Conclusão de Curso (graduação) -
Universidade Federal de Santa Catarina, Centro de Ciências
Biológicas. Graduação em Ciências Biológicas.

Inclui referências

1. Ciências Biológicas. 2. Glioblastoma. 3. Chalcona. I.
Beatriz Nedel, Cláudia . II. Garcia Lopes, Flávia. III.
Universidade Federal de Santa Catarina. Graduação em
Ciências Biológicas. IV. Título.

Luan da Silva Gomes

Estudo dos efeitos da chalcona sintética Ea2 em células de glioblastoma humano

Este Trabalho de Conclusão de Curso foi julgado adequado para obtenção do Título de “Licenciado em Ciências Biológicas”, e aprovado em sua forma final pelo Curso de Ciências Biológicas.

Florianópolis, 01 de Dezembro de 2016.

Professora Dra. Maria Risoleta F. Marques
Coordenadora do Curso de Ciências Biológicas

Banca examinadora:

Prof^a. Dr^a. Cláudia Beatriz Nedel
Orientadora
Universidade Federal de Santa Catarina

Dra. Talita da Silva Jeremias
Examinadora
Universidade Federal de Santa Catarina

Prof^ª. Dr^ª Yara Costa Netto Muniz
Examinadora
Universidade Federal de Santa Catarina

Msc. Karen Andrinéia de Oliveira
Suplente
Universidade Federal de Santa Catarina

Dedico este trabalho aos meus pais, pela oportunidade de chegar até aqui.

Agradecimentos

À Universidade Federal de Santa Catarina por possibilitar a existência do trabalho.

À minha orientadora Cláudia Nedel, por ter me aceitado no laboratório, o que permitiu que o trabalho se tornar-se real. Aprendi muito nesse ínterim, obrigado.

À minha co-orientadora Flávia Garcia Lopez, que simplesmente me ajudou em vários passos dessa trajetória, especialmente com a parte prática dos experimentos. Tudo teria sido muito mais difícil sem sua ajuda, sempre serei grato por isso.

Ao colega de laboratório João Vitor Kruger, pela parceria com as rotinas de laboratório e experimentos.

Aos colegas de sala de cultura, Carolina Poluceno Silva e Rodrigo Lucas, por tornarem as tardes de trabalho na cultura mais descontraídas e por todo conhecimento compartilhado.

À professora Carla Tasca, que cedeu o espaço onde nossos experimentos tomavam forma, e ao pessoal do laboratório de Neuroquímica 4 por toda ajuda nas rotinas de laboratório.

Ao Marcelo Falchetti e Gabriel Matos, por compartilharem os fardos que o cotidiano pode ocasionar.

Às colegas de graduação, Mahoany Machado, Amanda Tuyama, Tamires Gregorio, Nágilla Alberton e Natani Coser. Vocês ajudaram a tornar esses 5 anos mais leves e descontraídos.

Às amigas de longa data que começaram muito antes da biologia. Jhonatan da Rosa, Elizangela Souza da Rosa, Renato Hack Ivo, Alessandra Ferreira e Alessandra Luíse Nienkotter. Vocês ajudam a manter a vida mais fácil de viver, e isso foi indiretamente crucial durante todo o tempo da faculdade – e da vida, claro.

À minha namorada Adriane Fagundes, por estar sempre ao meu lado desde quando nos conhecemos e nos tornamos grandes amigos, lá no início da graduação. E hoje ainda mais por ser minha companheira para todas as horas, seja em desespero de final de semestre ou para as horas de lazer e alegria. Não poderia contar em duas mãos o número de vezes que você me manteve calmo frente às inúmeras adversidades desta trajetória. Obrigado por todo companheirismo, felicidade e carinho. Amo você!

À minha família, especialmente minha mãe e meu pai, por acreditarem mim desde sempre, dando muito apoio para que eu chegasse até aqui. Às minhas irmãs e irmãos, que são uma parte muito importante da minha vida. Amo muito todos vocês!

“Not all those who wander are lost.”

J.R.R. Tolkien

RESUMO

Gliomas correspondem ao tipo de câncer intracraniano mais comum, chegando a 80% dos tumores que atingem essa região. O glioblastoma multiforme representa o tipo mais agressivo, com sobrevida de aproximadamente 12 meses após o diagnóstico. O tratamento para esse tumor costuma incluir ressecção cirúrgica, quimioterapia e radioterapia. Entretanto, mesmo com mais de quatro décadas de pesquisas, houve pouca melhora nos índices de sobrevivência e na qualidade de vida dos pacientes. Desta forma, a procura por tratamentos alternativos a serem aplicados junto às terapias tradicionais se faz evidente. Nesse aspecto, as chalconas apresentam uma opção promissora. As chalconas são precursoras na biossíntese de flavonoides e são usadas tradicionalmente para tratar doenças inflamatórias ou infecciosas, embora na última década tem-se demonstrado o efeito antitumoral dessas moléculas em variados tipos de câncer. Esse trabalho teve como objetivo avaliar o potencial citotóxico de dezessete chalconas sintéticas em células de glioblastoma multiforme. Constatamos que dentre as dezessete chalconas testadas a chalcona Ea2 foi a mais eficiente em reduzir a viabilidade celular. Posteriormente a Ea2 foi capaz de inibir a migração das células da linhagem GBM1. A análise de apoptose e necrose, por citometria de fluxo, demonstrou que a chalcona Ea2 parece aumentar levemente os níveis de apoptose, embora a análise estatística não indique um aumento significativo nestes níveis. Entretanto, os níveis de necrose também se mantiveram baixos. Sendo assim, mais experimentos são necessários para averiguar o potencial terapêutico da Ea2.

Palavras-chave: Glioblastoma; Tratamento; Chalcona.

ABSTRACT

Gliomas are the most common type of intracranial cancer, corresponding to 80% of the tumors to affect this region. Glioblastoma multiforme represents the most aggressive glioma, with a median survival of twelve months after the diagnosis. The treatment to this tumor of cancer usually includes surgical resection, chemotherapy and radiotherapy. However, even after more than four decades of research there has been little improvement in survival rates and life quality for the patients. Therefore, the need to look for alternative therapies to apply alongside the traditional ones is evident. In this regard, chalcones present a promising option. Chalcones are precursors in the flavonoids biosynthesis and are traditionally used for treating inflammatory and infectious diseases, even though in the last decade the antitumor properties of these molecules has been shown in various types of cancer. The objective of this study was to evaluate the cytotoxic potential of seventeen synthetic chalcones in glioblastoma cells. We observed that among all seventeen chalcones, Ea2 was the most efficient in reducing GBM1 cell viability. Later, Ea2 was able to inhibit cell migration as well. Regarding the apoptosis and necrosis analyses by flow cytometry, we verified that Ea2 seems to have slightly increase apoptotic levels, even though no statistical significance was found. However, necrosis levels were also low. To that aim, more experiments are necessary to investigate Ea2 therapeutic potential.

Keywords: Glioblastoma; Treatment; Chalcone.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Índice de sobrevivência de diferentes gliomas.	26
Figuras 2. Representação da morte celular por apoptose e necrose.	29
Figuras 3. Núcleo fundamental das chalconas.	32

LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Grau dos gliomas de acordo com a OMS.	
.....	24

LISTA DE SIGLAS

BCL-2 – Do inglês *B-cell lymphoma 2* (família de proteínas).

CEPSH – Comitê de ética de pesquisa com seres humanos.

CTDG - Células tronco derivadas de glioma.

CTN - Células tronco neurais.

DMEM-F12 – Do inglês *Dulbecco's Modified Eagle Medium Nutrient Mixture F-12*.

DMSO – Dimetilsulfóxido.

EROs – Espécies reativas de oxigênio.

GBM – Glioblastoma Multiforme.

INCA – Instituto Nacional de Câncer.

MDM2 – Do inglês *mouse double minute 2* (proteína).

MTT - ((3-(4,5-Dimetiltiazol-2-il)-2,5-Difeniltetrazol brometo).

OMS – Organização Mundial da Saúde.

PBS – Do inglês *phosphate-buffered saline*.

PMM – Potencial de membrana mitocondrial.

SBF – Soro bovino fetal.

SIS – Senescência induzida por *stress*

SNC – Sistema nervoso central.

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO.....	23
1.1	Gliomas.....	23
1.4	Migração celular.....	28
1.5	Gliomas e tratamentos alternativos.....	29
3	OBJETIVOS.....	35
3.1	Objetivo Geral.....	35
3.2	Objetivos específicos.....	35
4	MATERIAIS E MÉTODOS.....	37
4.1	Cultura de células de glioma humano GBM137	
4.2	Síntese das chalconas.....	37
4.3	Avaliação do efeito da chalcona Ea2 na viabilidade celular.....	37
4.4	Ensaio de análise da migração celular.....	38
4.5	Análise de apoptose e necrose: iodeto de propídeo e anexina.....	38
5	RESULTADOS.....	39
5.1	A Chalcona Ea2 foi a mais eficiente em reduzir a viabilidade das células GBM1.....	39
5.3	A chalcona Ea2 impede a migração das células de GBM1.....	41
5.4	A Ea2 tende a induzir apoptose sem induzir necrose.....	42
6	DISCUSSÃO.....	45
7	CONCLUSÕES.....	47
8	PERSPECTIVAS.....	49
9	REFERÊNCIAS.....	51

1 INTRODUÇÃO

1.1 Gliomas

Gliomas são as neoplasias intracranianas mais comuns a afetar o sistema nervoso central (SNC), compreendendo 80% dos tumores malignos a atingir essa região (MCKINSEY & GOODEMBERGER, 2012). A incidência de gliomas é mais comum em adultos acima de 55 anos, sendo raro em pessoas mais jovens (Figura 2). Entretanto, no Reino Unido, é o tipo de câncer que causa mais mortes em crianças e adolescentes (KATHARINE & MCNEIL, 2016). No Brasil, em 2008, 8.461 indivíduos foram acometidos com algum câncer do SNC, e a estimativa para esse tipo de tumor em 2016 é de 10.270 novos casos. Esse aumento nos índices é preocupante principalmente porque a razão entre incidência e mortalidade desse tipo de neoplasia é 92% (INCA, 2015).

A organização mundial da saúde (OMS) classifica os gliomas em diferentes graus, de acordo com o nível de agressividade do tumor e as diferentes características celulares e histológicas que eles apresentam (Tabela 1) (JONES & HOLLAND, 2011).

Tabela 1. Grau dos gliomas de acordo com a OMS.

Gradação tumoral de acordo com a OMS	Histologia tumoral	Subtipos de acordo com a histologia
Grau I	Gliomas benignos e bem definidos histologicamente.	Astrocitoma pilocítico.
Grau II	Gliomas com infiltração difusa e baixa proliferação celular.	Astrocitoma difuso, Oligodendroglioma, Oligoastrocitoma.
Grau III	Gliomas muito infiltrativos, com muita proliferação celular.	Astrocitoma anaplástico, Oligoastrocitoma anaplástico e Oligodendroglioma anaplástico.
Grau IV	Gliomas muito infiltrativos, com proliferação celular, angiogênese e necrose intensas.	Glioblastoma multiforme.

Adaptado de (Jones e Holland, 2011).

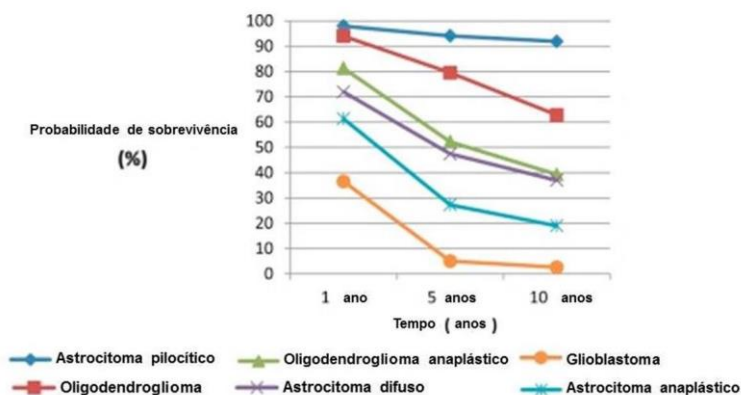
1.2 Glioblastoma Multiforme

O glioblastoma multiforme (GBM) representa o tumor mais agressivo a acometer o SNC (BRANDES *et al.*, 2008), sendo o tipo de câncer mais comum nessa região e representando 54% dos casos de glioma (OSTROM *et al.*, 2014). Esse tipo de câncer consiste em astrócitos neoplásicos pouco diferenciados e suas características histopatológicas incluem polimorfismos celulares, atipia nuclear, atividade mitótica, trombose vascular, proliferação microvascular proeminente, necrose e crescimento invasivo (KLEIHUES *et al.*, 2002).

Assim como outros tumores cerebrais, o GBM pode causar uma série de sintomas neurológicos, sendo eles focais ou generalizados. Os sintomas generalizados estão relacionados com o aumento da pressão

intracraniana, podendo ocasionar dor de cabeça, náusea e problemas no campo de visão. Sinais focais como afasia e tontura geralmente estão relacionados com a localização do tumor no SNC (NECKEL, 2011; SATHORNSUMETEE *et al.*, 2007). Apesar de mais de 40 anos de pesquisa houve pouca melhora na taxa de mortalidade. A sobrevida média após o diagnóstico é de 12 meses (JAIN, 2006) e apenas 5% dos pacientes sobrevivem mais do que cinco anos (Figura 1) (Ostrom *et al.*, 2014).

Figura 1. Índice de sobrevivência de diferentes gliomas.



Probabilidade de sobrevivência de pacientes para diferentes tipos de gliomas em 1, 5 e 10 anos pós diagnóstico. Para o GBM, a probabilidade de sobrevivência ao primeiro ano pós-diagnóstico é de menos de 40%, essa porcentagem cai para menos de 10% para 5 anos e aproximadamente 0% para 10 anos. Adaptado de (Ostrom *et al.*, 2014).

A intervenção cirúrgica é indicada em quase todos os casos de gliomas, normalmente precedida por radioterapia e quimioterapia. A cirurgia é importante para obtenção de diagnóstico histológico, além de reduzir drasticamente os sintomas da doença e diminuir a área ocupada pelo tumor, porém implica em sequelas na maioria dos casos. Apesar da diminuição do tumor realmente ocorrer, os tratamentos, na maioria das vezes, não resultam na cura da doença, pois os fármacos atuais tem dificuldade em atravessar a barreira hematoencefálica e dificilmente conseguem eliminar todas as células tumorais, assim as chances de ocorrerem recidivas são altas. Além dos tratamentos usuais não serem

eficazes, a saúde geral do paciente fica debilitada de forma crítica, e muitas vezes o organismo não suporta os efeitos colaterais dos tratamentos comuns, que são considerados extremamente invasivos. O progresso do tratamento de gliomas visando à cura total depende da implementação de terapias adjuvantes às conhecidas, e novas estratégias terapêuticas estão sendo estudadas, com o objetivo de diminuir os efeitos colaterais das terapias comuns (OTTO, 2002; SEYFRIED *et al.*, 2012).

Sabe-se que as células tronco neurais (CTN) contribuem para aumentar a resistência do tumor à rádio e quimioterapia (LIU *et al.*, 2006; BAO *et al.*, 2006), e isso talvez seja uma das razões para uma possível reincidência do tumor. As CTN são os principais candidatos para a origem do glioma, porém mais estudos são necessários para confirmação dessa hipótese. Evidências apontam para uma célula imatura como iniciadora, pois células tronco derivadas de glioma (CTDG) apresentam muitas propriedades das CTN, como expressão de marcadores de CTN (por exemplo, antígeno de superfície celular CD133, fator de transcrição da nestina e fator de crescimento de oligodendrócito-2), habilidade de autorrenovação estendida e a capacidade de se diferenciar em células que expressam marcadores gliais e neuronais. Entretanto, quando no desenvolvimento do tumor e como isso ocorre ainda é desconhecido (JIANG & UHRBOM, 2012; WANG *et al.*, 2014).

Considerando que os tratamentos convencionais para a maioria dos tumores, além de não serem eficazes exibem efeitos colaterais indesejáveis, o estudo dos mecanismos de morte celular acarretados por novas terapias é muito importante.

1.3 Morte celular

A morte celular tem um papel importante no desenvolvimento e na homeostase dos tecidos normais (BELLAMY *et al.*, 1995; LOCKSHINAND & ZAKERI, 2001), além de ter um efeito profundo nos mecanismos de crescimento e progressão do câncer (KERRAND & SEARLE, 1972; STEEL, 1967; IVERSEN, 1967; HANAHAN & WEINBER, 2011). Sabe-se que um desequilíbrio entre proliferação celular e morte celular está associado a doenças humanas como câncer, doenças autoimunes, doenças neurodegenerativas e infecções virais (GREEN & EVAN, 2002; HANAHAN & WEINBERG, 2000;

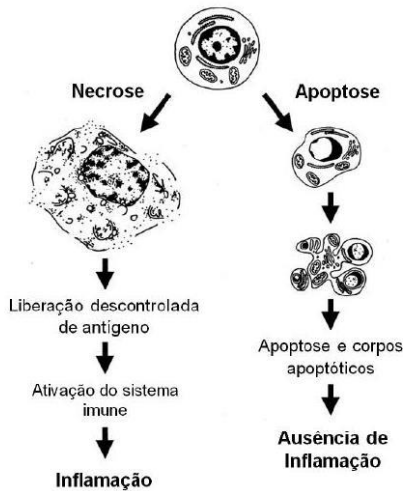
THOMPSON, 1995; VAUX & FLAVELL, 2000; YUAN & YANKNER, 2000).

A morte celular por necrose é comumente causada por um evento catastrófico, como um dano físico ou químico (Figura 2). É caracterizada pelo inchaço das organelas e a ruptura da membrana plasmática, ocasionado á liberação de componentes celulares e, tendo como consequência, o recrutamento de células do sistema imune bem como a ativação de uma resposta inflamatória (TOMASELLA *et al.*, 2014). A maior parte dos quimioterápicos atuais acaba por causar morte necrótica, matando células cancerígenas, bem como células saudáveis, e isso traz efeitos colaterais desconfortáveis, como náusea e vômito (SUGERMAN, 2013). Desta forma, não é desejável que uma droga antitumoral desencadeie morte celular por necrose.

Fisiologicamente a apoptose é um processo controlado (Figura 2) no qual as células morrem com conservação dos componentes moleculares, caracterizada por mudanças

morfológicas e encolhimento da célula causada pela alta condensação da cromatina, preservação das organelas celulares, formação de corpos apoptóticos e de “bolhas” de membrana celular. A apoptose envolve processos de ativação de cascatas de caspases pró-apoptóticas, a exposição da fosfatidilserina na face externa da membrana celular e a fragmentação do DNA nuclear (WONG, 2011). As mitocôndrias participam diretamente dos eventos de ativação da apoptose. Por exemplo, quando as células recebem um sinal para iniciar o processo apoptótico, uma das consequências é o aumento da permeabilidade da membrana externa mitocondrial, ocasionando a liberação de citocromo c, que ativa uma das enzimas proteolíticas (caspase 9) responsável pela degradação proteica durante a apoptose (NELSON & COX, 2012).

Figura 2. Representação da morte celular por apoptose e necrose.



A necrose é caracterizada pelo inchaço da célula, perda da integridade da membrana celular e extravasamento do conteúdo celular. As Células apoptóticas encolhem e a membrana celular se mantém íntegra até os estágios finais do processo, quando a célula é por fim fagocitada. Adaptado de (Leist e Jäättelä, 2001).

Alterações na expressão de fatores de regulação chave na cascata apoptótica podem desencadear um desbalanço no crescimento celular, originando tumores. Dessa maneira, há uma relação próxima entre a homeostase da apoptose e o surgimento do câncer. Além disto, essa regulação é muito importante para o desenvolvimento de novas terapias para o tratamento deste e de outros tipos de neoplasias, principalmente porque as terapias atuais para tumores agressivos, como o GBM, além de gerarem consequências sérias para o paciente, frequentemente mostram-se infrutíferas. Um dos principais motivos dessa ineficácia se dá pela capacidade invasiva das células tumorais (HANAHAN & WEINBER, 2011).

1.4 Migração Celular

Quando um tumor não é detectado em estágios iniciais, sua progressão e desenvolvimento passam por múltiplas etapas, incluindo proliferação, evasão do sistema imune, evasão da morte celular programada, replicação contínua, indução da angiogênese e migração ativa para outros tecidos (WANG *et al.*, 2015) (HANAHAN & WEINBER, 2011).

A capacidade de uma subpopulação de células de migrar e invadir tecidos, causando metástase, é frequentemente usada como característica para diferenciar neoplasias malignas de tumores benignos (HANAHAN & WEINBER, 2011). Esse processo de migração está associado a aproximadamente 90% dos casos de morte em câncer, representando uma grande dificuldade terapêutica (WEIGELT *et al.*, 2005; MEHLEN & PUISIEUX, 2006; ROMAN *et al.*, 2015). Células que migram, deixando o tumor primário, podem seguir em direção a tecidos adjacentes. Esse tipo de movimento, pode permitir que as células entrem em contato com um vaso sanguíneo ou linfático e sejam transportadas para outras partes do corpo, possivelmente dando formação a um tumor secundário (FRIEDL & ALEXANDER, 2011; FERRARA & KERBEL, 2005; WANG *et al.*, 2015).

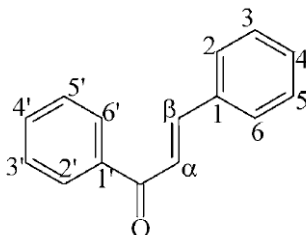
Dessa forma é interessante que uma droga antitumoral, além de reduzir a viabilidade, seja capaz de impedir a migração de células cancerígenas, um dos processos celulares iniciais para a formação de metástases. Como nenhuma droga atual apresenta tais características, a procura por tratamentos alternativos torna-se evidente.

1.5 Gliomas e tratamentos alternativos

Cirurgia de ressecção, radioterapia e quimioterapia são os tratamentos utilizados na clínica para aumentar o tempo de sobrevivência dos pacientes. Entretanto, não há um tratamento atual que consiga prolongar significativamente a vida dos pacientes e garantir sua qualidade de vida. Desta forma, a pesquisa contínua em busca de novas drogas, com efeito citotóxico e capazes de impedir a proliferação celular, se faz necessária, e dentro desses aspectos, um grupo de cetonas aromáticas conhecidas como chalconas são uma opção promissora.

Compostos polifenólicos costumam desempenhar um importante papel na homeostasia das plantas, protegendo contra o estresse fotossintético, espécies reativas de oxigênio, invasões por microrganismos e herbivoria. Dentre esses compostos, um dos mais abundantes na alimentação humana são os flavonoides (LAMBERT *et al.*, 2005). Estudos clínicos demonstraram que os flavonoides estão associados a uma menor toxicidade ao paciente e que seus derivados, dentre eles as chalconas, são capazes de atravessar a barreira hematoencefálica (YOUDIM *et al.*, 2004; SAIF *et al.*, 2009). As chalconas (1,3-diaril-2-propen-1-onas) (Figura 3) são compostos precursores da biossíntese de flavonoides, sendo abundantes em partes variadas como caule, folhas, raízes e sementes de gêneros bem conhecidos, como *Angelica*, *Glycyrrhiza*, *Humulus* e *Scutellaria*, todos estes gêneros possuem plantas utilizadas tradicionalmente para o tratamento de diversas doenças infecciosas ou inflamatórias (SASAYAMA *et al.*, 2007).

Figura 3. Núcleo fundamental das chalconas.



Núcleo fundamental das chalconas. Devido à sua estrutura química, as chalconas são capazes de atravessar a barreira hematoencefálica, um desafio para os tratamentos tradicionais. Adaptado de (BOUMENDJEL *et al.*, 2008).

Atualmente, sabe-se que uma dieta rica em chalconas provenientes de vegetais está relacionada a uma menor prevalência de câncer (STONER & MUKHTAR, 1995; YANG *et al.*, 2001) e o núcleo estrutural das chalconas é capaz de inibir a proliferação de células de câncer de mama *in vitro* e *in vivo* (HSU *et al.*, 2006). Essas substâncias são facilmente sintetizadas e, devido a isso, vários substituintes dos radicais têm sido testados visando elucidar o mecanismo de ação das chalconas em diferentes linhagens tumorais. Diversos estudos demonstram que as chalconas tem efeito inibitório no crescimento tumoral em ratos, induzem apoptose em câncer de bexiga (ZI *et al.*,

2005), leucemia, neuroblastoma (TABATA *et al.*, 2005), carcinoma pulmonar (KIMURA & BABA, 2003) e gliomas (SASAYAMA *et al.*, 2007).

Recentemente, demonstrou-se que a chalcona sintética C31 pode agir expressivamente na redução da viabilidade de células de GBM, aumentando a taxa de apoptose, sem aumentar a necrose de células tumorais e sem diminuir a viabilidade de astrócitos murinos (BITTENCOURT, 2016). Além disso, outros estudos com chalconas sintéticas apontam para a capacidade de reduzir, não somente a viabilidade celular, mas também a taxa de migração celular e a formação de colônias (NECKEL, 2011). Acredita-se que o efeito antitumoral das chalconas tenha relação com a interrupção do ciclo celular e inibição da angiogênese. Trabalhos anteriores também demonstraram que o efeito citotóxico de certas chalconas envolve a regulação de proteínas anti-apoptóticas da família BCL-2 (*B-cell lymphoma 2*) (GO *et al.*, 2005).

Experimentos bioquímicos mostraram que derivados de chalconas conseguem romper o complexo P53/MDM2, aumentando os níveis da proteína p53 (STOLL *et al.*, 2001). Essa proteína é um fator de transcrição nuclear que desempenha um papel importante na regulação do ciclo celular, morte celular, e na síntese e reparo do DNA, atuando como uma das principais supressoras de tumor. A inibição ou mutação da p53 é um evento inicial importante no desenvolvimento de tumores e é observada em aproximadamente 65% dos astrocitomas de alto grau (NUPPONEN & JOENSUU, 2006). A oncoproteína *mouse double minute 2* (MDM2) inibe a proteína p53, de forma que a alta expressão de MDM2 inativa a p53 e isso permite que o ciclo celular prossiga, mesmo em células defeituosas, evento que pode ocasionar o surgimento de tumores (STOLL *et al.*, 2001).

A literatura disponível, com estudos utilizando células de gliomas testadas com chalconas, ainda é modesta. Entretanto, os trabalhos existentes indicam que estas moléculas apresentam um grande potencial antitumoral. Portanto, o estudo de novas chalconas pode, não somente ajudar a elucidar questões sobre a própria biologia do câncer, como pode ser um elemento-chave na busca por tratamentos alternativos para neoplasias agressivas, como o GBM e outros tipos de câncer.

2 JUSTIFICATIVA

O Glioblastoma Multiforme está entre os tumores mais letais dentre os diferentes tipos de câncer, com a média de sobrevida após o diagnóstico de 12 meses. Embora as pesquisas para novos tratamentos de gliomas durem mais de quatro décadas, houve pouca melhora nos índices de mortalidade e no ganho de qualidade de vida de pacientes diagnosticados com essa neoplasia.

Mediante isso, a procura por tratamentos alternativos é imprescindível, e neste aspecto as chalconas apresentam uma opção promissora. Estudos prévios com chalconas sintéticas demonstraram que essas moléculas apresentam capacidade de interferir no ciclo celular e induzir apoptose em células tumorais, sem induzir danos a astrócitos murinos normais. Além disso, devido a sua estrutura química, as chalconas são capazes de atravessar a barreira hematoencefálica, um desafio para os tratamentos usuais. Desta forma, o estudo de outras chalconas pode contribuir de forma significativa na terapia de gliomas e de outros tipos de tumores.

3 OBJETIVOS

3.1 Objetivo Geral

Avaliar a ação citotóxica, e suas consequências, de 17 chalconas sintéticas em células de glioblastoma multiforme, visando encontrar entre elas uma possível substância antitumoral.

3.2 Objetivos específicos

- Avaliar os efeitos das chalconas sintéticas na viabilidade de células GBM1, selecionando a mais eficiente entre elas;
- Analisar o processo de migração das células GBM1 após o tratamento com a chalcona;
- Caracterizar os possíveis tipos de morte acarretados pela chalcona nas células GBM1.

4 MATERIAIS E MÉTODOS

4.1 Cultura de células de glioma humano GBM1

A amostra de glioblastoma multiforme (GBM1) 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 soro fetal bovino (SFB), em seguida foi transportada para a Universidade Federal de Santa Catarina (UFSC) para posterior processamento. Uma vez em fluxo laminar, o fragmento de tumor foi dissecado com remoção dos 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 colocadas em garrafas de cultura de 25 cm², contendo DMEM-F12 acrescido de glicose (0,6%), glutamina (2 mM), bicarbonato de sódio (0,06%), penicilina/estreptomicina (1U/1 mg) e suplementado com 10% de SFB. As células foram mantidas em estufa de atmosfera úmida contendo 5% de CO₂ a 37°C. Todos os procedimentos e formulários de autorização para obtenção das amostras foram aprovados pelo comitê de ética de pesquisa com seres humanos da UFSC (CEPSH – 108.286).

4.2 Síntese das chalconas

A chalcona Ea2 foi sintetizada pela equipe do Professor Dr. Ricardo José Nunes, do Departamento de Química da UFSC conforme previamente descrito (CHIARADIA *et al.*, 2011; BORCHHARDT *et al.*, 2009).

4.3 Avaliação do efeito da chalcona Ea2 na viabilidade celular

Foi realizada uma curva de tempo e concentração da chalcona Ea2. Após confluência de 80% (3-4 dias), as células foram tratadas com 5,6,7,8,9,10,15, 20 e 25 µM. O mesmo volume final de DMSO foi utilizado como controle do veículo. Após os tratamentos, as células foram submetidas ao teste de viabilidade por MTT ((3-(4,5-Dimetiltiazol-2-il)-2,5-Difeniltetrazol brometo). O MTT é um sal de tetrazólio solúvel em água, que é convertido a um formazana púrpura insolúvel após clivagem do anel de tetrazólio por desidrogenases mitocondriais (JACOBSSON & FOWLER, 1999).

A viabilidade celular é proporcional à leitura da absorbância, obtida em espectrofotômetro (Multimode Reader Infinite M200 TECAN) em comprimento de onda de 550 nm.

4.4 Ensaio de análise da migração celular

A análise de migração celular foi obtida através da realização do ensaio *wound healing*. As células foram semeadas em placas de 24 poços, após atingirem a confluência de 100% um risco foi feito no meio do poço utilizando uma ponteira de 200 μ L. Após isso, as células foram expostas a chalcona Ea2 durante 24 horas. Decorrido o tempo de tratamento, fotos foram tiradas dos poços em microscópio óptico de contraste de fase *Axiocvert 40 CFL - Carl Zeiss*[®], com um aumento de 50 vezes. A área de migração das células foi medida utilizando o software *Image J*[®] 1.48V. O ensaio de *wound healing* foi baseado no protocolo de Liang e colaboradores, 2007.

4.5 Análise de apoptose e necrose: iodeto de propídeo e anexina

Para avaliação da ocorrência de necrose e apoptose celular utilizamos o ensaio Anexina-V FITC em citometria de fluxo. Após os tratamentos as células GBM1 foram tripsinizadas, centrifugadas e ressuspensas em PBS gelado, então centrifugadas novamente e ressuspensas em tampão de ligação 1x. As células foram separadas em 5 grupos; positivo para necrose, positivo para apoptose, tratado com a chalcona Ea2, controle e branco. As células foram marcadas com Anexina V e/ou iodeto de propídeo para a quantificação dos eventos positivos para necrose e/ou apoptose. 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.

4.6 Análise estatística

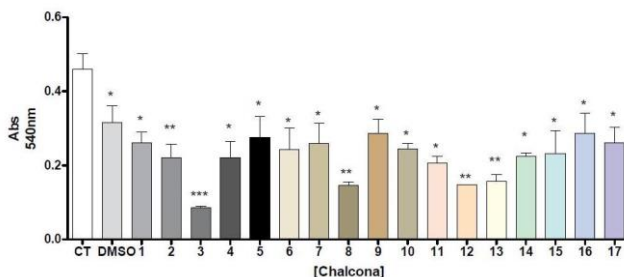
Os dados foram analisados estatisticamente pelos testes de ANOVA de uma e duas vias, conforme a necessidade, seguido pelo teste t-Student; Newman-Keuls. Resultados foram considerados estatisticamente diferentes quando $p < 0,05$.

5 RESULTADOS

5.1 A Chalcona Ea2 foi a mais eficiente em reduzir a viabilidade das células GBM1.

Com o intuito de verificar quais chalconas teriam um efeito citotóxico mais proeminente nas células GBM1, uma curva inicial com 17 chalconas foi realizada. Após o tratamento com as diferentes chalconas em 24 horas, com uma concentração de 50 μM , o ensaio de viabilidade por MTT foi realizado. De acordo com a Figura 7, a Ea2 (chalcona 3) foi a que demonstrou menor viabilidade celular, comparando com outras 16 chalconas, em 50 μM . Baseando-se nessa curva inicial, a chalcona Ea2 foi selecionada para os experimentos seguintes

Figura 7. A Chalcona Ea2 foi a mais eficiente em reduzir a viabilidade das células GBM1.

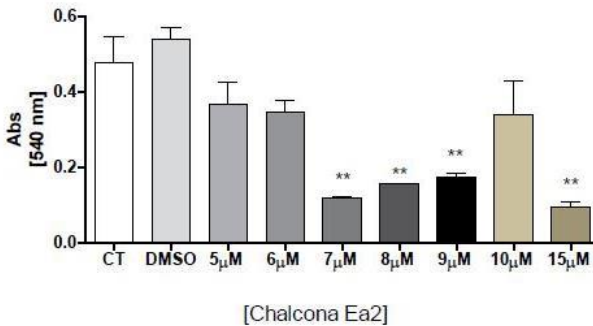


Após as células GBM1 atingirem a confluência foram tratadas com diferentes chalconas, todas na concentração de 50 μM . Após 24 horas o ensaio de viabilidade (MTT) foi realizado. A chalcona 3 (Ea2) foi a mais eficiente em reduzir a viabilidade celular. As células de controle foram incubadas em meio de cultura pelos mesmos períodos. Dados foram expressos como média \pm desvio padrão de três experimentos independentes. * $P < 0,05$, ** $P < 0,01$, *** $P < 0,001$ representam diferença significativa em relação ao grupo controle.

5.2 A chalcona Ea2 reduz a viabilidade das células GBM1 mesmo em baixas concentrações.

Com o intuito de verificar a citotoxicidade da chalcona Ea2 em células GBM1, foi realizada uma curva de concentração (5 a 15 μM) por 24 horas através do ensaio de MTT (Figura 8). As concentrações de 5, 6 e 10 μM não reduziram a viabilidade das células, enquanto a concentrações de 7, 8, 9 e 15 μM , diminuíram significativamente a viabilidade celular das células GBM1.

Figura 8. A chalcona Ea2 reduz a viabilidade das células GBM1 mesmo em baixas concentrações.



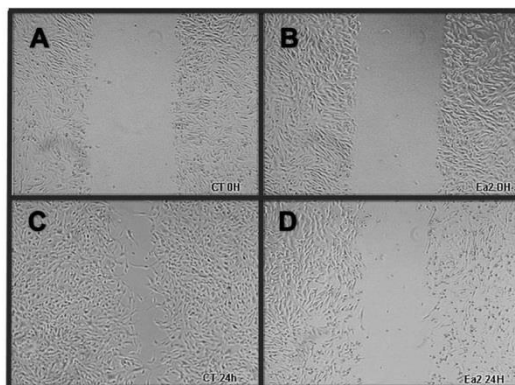
Após a confluência, as células de GBM1 foram tratadas com diferentes concentrações da Ea2 (de 5 a 15 μM) por 24 horas, após esse período o ensaio de viabilidade (MTT) foi realizado. As células do controle foram incubadas com meio de cultura pelo mesmo período de tempo do tratamento. Dados foram expressos como média \pm desvio padrão de três experimentos independentes. ** $P < 0,01$ representa diferença significativa em relação ao grupo controle.

Com base nos resultados obtidos com o ensaio de viabilidade, a concentração de 9 μM foi escolhida para os demais experimentos, devido à sua eficácia em reduzir aproximadamente 50 % da viabilidade celular das células GBM1, quando comparada ao grupo controle. As demais concentrações, não foram consideradas porque reduzem mais que 50 % da viabilidade da GBM1, o que poderia interferir nos resultados.

5.3 A chalcona Ea2 inibe a migração das células de GBM1.

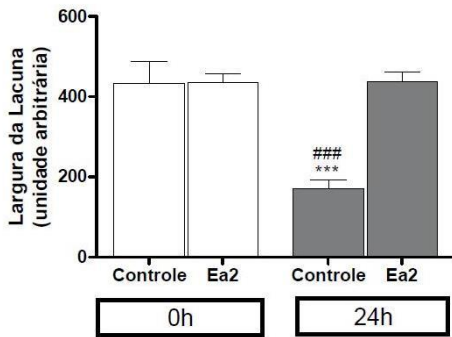
Para analisar a migração celular da GBM1, após o tratamento com a chalcona Ea2, foi realizado o ensaio *wound healing*. As figuras 9 e 10 demonstram que a chalcona Ea2 inibe a migração das células GBM1. A Figura 9C demonstra a migração das células em 24 horas no grupo controle. Esta migração é inibida após o tratamento com a chalcona Ea2 (Figura 9D), permanecendo semelhante ao tempo zero no controle e tratado. A Figura 10 mostra a quantificação das análises de medição realizadas neste ensaio.

Figura 9. A chalcona Ea2 impede a migração das células de GBM1.



A figura 9 A e B representa as células controle e as tratadas com Ea2, respectivamente, em um tempo de zero horas. C e D mostram as mesmas células 24 horas depois. As células controle tem o risco quase fechado, enquanto o grupo tratado permanece similar ao tempo de 0h. As fotos foram tiradas com um aumento de 50x.

Figura 10. A chalcona Ea2 impede a migração das células de GBM1

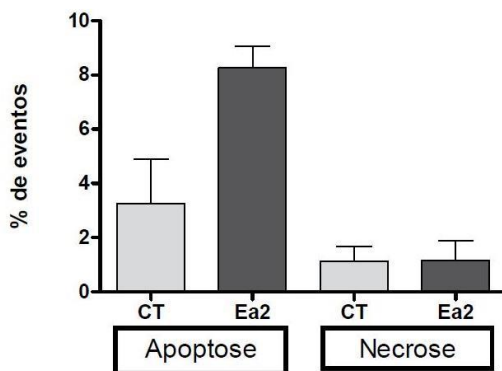


Após a confluência as células de GBM1 foram semeadas em placas de 24 poços, um risco foi feito com uma ponteira de 200 μ l e as células foram tratadas com Ea2 por um período de 24 horas. O grupo controle foi incubado com meio de cultura pelo mesmo período. Dados foram expressos como média \pm desvio padrão de três experimentos independentes. *** $P < 0,001$ representa diferença significativa em relação ao grupo controle. ### $P < 0,001$ representa diferença significativa em relação ao grupo tratado no tempo de 24 horas.

5.4 A Ea2 tende a induzir apoptose sem induzir necrose.

Com a intenção de verificar qual tipo morte celular a chalcona Ea2 acarreta nas células de GBM1, realizamos o ensaio de morte celular com o *kit* Anexina V-FITC. Na Figura 11 pode-se observar que a chalcona Ea2 não interfere no número de células marcadas para apoptose, nem naquelas marcadas para necrose, embora exista uma tendência ao aumento de apoptose nos grupos tratados. Desta forma, outras repetições deste experimento deverão ser realizadas, a fim de se confirmar ou não esta tendência.

Figura 11. A Ea2 não aumenta os níveis de necrose.



A Ea2 tem aumento aparente de duas vezes na taxa de apoptose quando comparada ao grupo controle, enquanto a taxa de necrose permanece igual nos dois grupos. A análise estatística, entretanto, não mostrou diferenças significativas entre o grupo tratado e o grupo controle. Dados foram expressos como média \pm desvio padrão de quatro experimentos independentes.

6 DISCUSSÃO

Ao analisarmos os resultados do ensaio de viabilidade, podemos confirmar que algumas das 17 chalconas selecionadas apresentam potencial terapêutico, sendo capazes de reduzir a viabilidade das células de GBM1. A Ea2 se destacou nesse quesito, sendo a chalcona que promoveu maior redução na viabilidade celular entre as demais chalconas. No ensaio subsequente, utilizamos apenas a Ea2 em diferentes concentrações. Observamos que este composto consegue reduzir a viabilidade das células de glioblastoma mesmo em concentrações relativamente baixas, o que indica um alto potencial citotóxico desse composto. Essa redução na viabilidade parece acontecer de maneira concentração dependente. O mecanismo de ação de chalconas, como a Ea2, ainda não está elucidado, porém outros trabalhos demonstram o potencial citotóxico dessas moléculas (SABZEVARI *et al.*, 2004; MIRZAEI & EMAMI, 2016; BITTENCOURT, 2016; CHAMPELOVIER *et al.*, 2011).

Além do efeito citotóxico, é interessante que uma droga antitumoral possa inibir a migração de células cancerígenas. A migração celular é altamente importante para a homeostasia de tecidos saudáveis, especialmente para regeneração tecidual, com a movimentação de células do sistema imune e células tronco progenitoras das novas células somáticas. Entretanto, normalmente isso acontece no tecido local e essas células raramente migram para outros lugares (WANG *et al.*, 2016). Em contraste, nas células cancerígenas essa capacidade de migração frequentemente é usada como marco diferencial entre neoplasias benignas e malignas (HANAHAN & WEINBER, 2011). Não somente no GBM, mas na maioria dos tumores, a capacidade migratória das células está associada a 90% dos casos de morte em câncer, representando um grande desafio terapêutico (WEIGELT *et al.*, 2005; MEHLEN & PUISIEUX, 2006; ROMAN *et al.*, 2015).

Ao analisarmos os resultados obtidos no ensaio de migração celular, percebemos que a chalcona Ea2 é capaz de inibir a migração de células de GBM1, o que é favorável a uma droga antitumoral. Após 24 horas o grupo controle foi capaz de fechar a maior parte da lacuna, enquanto o grupo tratado com Ea2 permaneceu semelhante ao tempo zero. Esse achado parece corroborar os dados encontrados na literatura que demonstram o efeito antimigratório das chalconas em diferentes

tipos de células de câncer, como câncer de cólon (XU *et al.*, 2015), ovário (RAO & PAGIDAS, 2010), próstata (KWON *et al.*, 2009), gástrico (LIN & SHIH, 2014) e gliomas (KU *et al.*, 2010).

Ainda não existem muitos estudos que expliquem como as chalconas são capazes de inibir a migração dessas células. Lee e colaboradores (2016) relataram que a chalcona DK-139 é capaz de interferir no rearranjo da actina, componente importante do citoesqueleto, reduzindo a mobilidade e capacidade migratória de células de câncer de mama. Isso poderia ser uma explicação para o modo como as chalconas interferem na migração celular, mas a literatura carece de mais experimentos como esse que expliquem os mecanismos.

É necessário considerar, entretanto, que durante o ensaio de migração não utilizamos nenhum tipo de marcador de proliferação. Desse modo, não sabemos se a Ea2 tem algum efeito inibitório na proliferação dessas células. Dessa forma, é possível que, pelo menos em parte, a chalcona Ea2 tenha efeito no ciclo celular das células GBM1, diminuindo ou causando parada no ciclo, e assim interferindo diretamente no resultado do ensaio de *would healing*.

Com relação ao tipo de morte celular acarretada por uma droga antitumoral, não é interessante que esta cause necrose. A morte celular por necrose tem como consequência o recrutamento de células do sistema imune e uma resposta inflamatória (TOMASELLA *et al.*, 2014). Um quimioterápico, que cause morte necrótica, pode induzir sintomas indesejáveis como náusea e vômito (SUGERMAN, 2013).

Ao analisarmos o ensaio de morte celular, averiguamos que a chalcona Ea2 não ocasionou aumento nos níveis de necrose, quando comparada ao grupo controle, o que é favorável a uma droga antitumoral. Entretanto, os níveis de apoptose das células tratadas com Ea2 tiveram apenas um aumento moderado. A chalcona Ea2 foi capaz de aumentar duas vezes os níveis de apoptose, em comparação ao grupo controle. Porém, a análise estatística não apontou diferenças significativas entre os grupos, sendo necessárias outras repetições deste ensaio, para confirmar, ou não, este efeito.

7 CONCLUSÕES

- Dentre as 17 chalconas, a chalcona Ea2 demonstra maior potencial citotóxico nas células de GBM1.
- Ea2 é capaz de reduzir a viabilidade das células de GBM1 mesmo em baixas concentrações.
- Ea2 é eficaz em inibir a migração celular após 24 horas de tratamento.
- Ea2 não aumenta os níveis de apoptose e necrose de maneira significativa, embora haja uma tendência de aumento dos níveis de apoptose, o que pode sugerir uma indução de apoptose.
- Experimentos suplementares são necessários para confirmar o potencial terapêutico da Ea2.

8 PERSPECTIVAS

- Confirmação dos resultados de migração celular através de ensaios de migração e invasão utilizando câmara de Boyden do tipo *Transwell*.
- Repetições do ensaio de citometria de fluxo para verificação do tipo de morte celular ocasionada pela chalcona Ea2.
- Realização do ensaio de proliferação celular, utilizando o marcador de proliferação celular KI-67.
- Análise dos efeitos da chalcona Ea2 no citoesqueleto de β -actina nas células GBM1, por imunocitoquímica.
- Avaliação dos efeitos da chalcona Ea2 no ciclo celular de GBM1, por citometria de fluxo.

9 REFERÊNCIAS

BAO, S. *et al.* Glioma stem cells promote radioresistance by preferential activation of the DNA damage response. **Nature**, v. 444, n. 7120, p. 756–760, 2006.

BELLAMY, C.O. *et al.* Cell death in health and disease: the biology and regulation of apoptosis. **Seminars in Cancer Biology**, v. 6, n. 1, p. 3–16, 1995.

BITTENCOURT, L. F. F. Avaliação *in vitro* do efeito citotóxico de chalconas sintéticas em glioblastoma multiforme humano. 2014. 75 f. **Dissertação de Mestrado, Universidade Federal de Santa Catarina, Florianópolis.** 2014.

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, 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, 2008.

BRANDES, A. A. *et al.* Glioblastoma in adults. **Critical Reviews in Oncology/Hematology**, v. 67, n. 2, p. 139–152, 2008.

CHAMPELOVIER, P. Cytotoxicity of Chalcone Derivatives towards Glioblastoma. **Anticancer Research**, v. 31, p. 3213-3218, 2011.

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, 2011.

FERRARA, N.; KERBEL, R.S. Angiogenesis as a therapeutic target. **Nature**, v. 438, p. 967-974, 2005.

FRIEDL, P.; ALEXANDER, S. Cancer Invasion and the Microenvironment: Plasticity and Reciprocity. **Cell**, v. 147, n. 5, p. 992–1009, 2011.

GO, M.L. *et al.* Chalcones: an update on cytotoxic and chemoprotective properties. ***Current Medicinal Chemistry***, v. 12, n. 4, p. 481–499, 2005.

GREEN, D.R.; EVAN, G.I. A matter of life and death. ***Cancer Cell***, v. 1, n. 1, p. 19–30, 2002.

HANAHAH, D.; WEINBERG, R. A. Hallmarks of câncer: the next generation. ***Cell***, v. 144, p. 646-647, 2011.

HANAHAH, D.; WEINBERG, R.A. The hallmarks of cancer. ***Cell***, v. 100, n. 1, p. 57–70, 2000.

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

INSTITUTO NACIONAL DE CÂNCER JOSÉ ALENCAR GOMES DA SILVA. Estimativa 2016: incidência de câncer no Brasil. Rio de Janeiro: **Coordenação de prevenção e vigilância**, 126 p, 2015.

IVERSEN, O.H. Kinetics of cellular proliferation and cell loss in human carcinomas, a discussion of methods available for in vivo studies. ***European Journal of Cancer***, v. 3, n. 4, p. 389–94, 1967.

JACOBSSON, S.O.; FOWLER, C.J. Dopamine and glutamate neurotoxicity in cultured chick telencephalic cells: effects of NMDA antagonists, antioxidants and MAO inhibitors. ***Neurochemistry International***, v. 34, n. 1, p. 49–62, 1999.

JAIN, K.K. Future prospects for the cure of brain câncer. ***Technology in Cancer Research and Treatment***, v. 5, p. 183-184, 2006.

JIANG, Y.; UHRBOM, L. On the origin of glioma. ***Upsala Journal of Medical Sciences***, v. 117, n. 2, p. 113–121, 2012.

JONES, T.S.; HOLLAND, E. C. Molecular Pathogenesis of Malignant Glial Tumors. ***Toxicologic Pathology***, v. 39, n. 1, p. 158-166, 2011.

KATHARINE, A.; MCNEILL, M.D. Epidemiology of Brain Tumors. ***Neurologic Clinics***, v. 34, n. 4, p. 981–998, 2016.

KERRAND, J.F.; SEARLE, J. A. Suggested explanation for the paradoxically slow growth rate of basal-cell carcinomas that contain numerous mitotic figures. **The Journal of Pathology**, v. 107, n. 1, p. 41–4, 1972.

KIMURA, Y.; BABA, K. Antitumor and antimetastatic activities of *Angelica keiskei* roots, part 1: isolation of an active substance, xanthoangelol. **International Journal of Cancer**, v. 106, n. 3, p. 429–437, 2003.

KLEIHUES, P. *et al.* The WHO classification of tumors of the nervous system. **Journal of Neuropathology & Experimental Neurology**, v. 61, n. 3, p. 215-225, 2002.

KU, B. M. *et al.* 4'-Acetoamido-4-hydroxychalcone, a chalcone derivative, inhibits glioma growth and invasion through regulation of the tropomyosin 1 gene. **Biochemical and Biophysical Research Communications**, v. 402, n. 3, p. 525-530, 2010.

KWON, G. T. *et al.* Isoliquiritigenin inhibits migration and invasion of prostate cancer cells: possible mediation by decreased JNK/AP-1 signaling. **The Journal of Nutritional Biochemistry**, v. 20, n. 9, p. 663-663 2009.

LAMBERT, J. D. *et al.* Inhibition of carcinogenesis by polyphenols: evidence from laboratory investigations. **The american journal of clinical nutrition**, v. 81, n. 1, p. 284-291, 2005.

LEE, D. Y. *et al.* A synthetic chalcone derivative, 2-hydroxy-3',5,5'-trimethoxychalcone (DK-139), suppresses the TNF α -induced invasive capability of MDA-MB-231 human breast cancer cells by inhibiting NF- κ B-mediated GRO α expression. **Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters**, v. 26, n. 1, p. 203-208, 2016.

LEIST, M.; JÄÄTTELÄ, M. **Four deaths and a funeral: From caspases to alternative mechanisms.** *Nature Reviews Molecular Cell Biology*, v. 2, p 1-10, 2001.

LIANG, C. *et al.* In vitro scratch assay: a convenient and inexpensive method for analysis of cell migration in vitro. **Nature Protocols**, v. 2, n. 2, p. 329-33, 2007.

LIN, S.; SHIH, Y. Antitumor effects of the flavone chalcone: inhibition of invasion and migration through the FAK/JNK signaling pathway in human gastric adenocarcinoma AGS cells. **Molecular and Cellular Biochemistry**, v. 391, n. 1, p. 47-58, 2014.

LIU, G. *et al.* Analysis of gene expression and chemoresistance of CD133+ cancer stem cells in glioblastoma. **Molecular Cancer**, v. 5, p. 67, 2006.

LOCKSHINAND, R.A.; ZAKERI, Z. Programmed cell death and apoptosis: origins of the theory. **Nature Reviews Molecular Cell Biology**, v. 2, n. 7, p. 545-50, 2001.

MCKINSEY, L.; GOODENBERGER, R.; JENKINS, B. Genetics of adult glioma. **Cancer Genetics**, v. 205, n. 12, p. 613-621, 2012.

MEHLEN, P.; PUISIEUX, A. Metastasis: a question of life or death. **Nature Reviews Cancer**, v. 6, p. 449-458, 2006.

MIRZAEI, H.; EMAMI, S. Recent advances of cytotoxic chalconoids targeting tubulin polymerization: Synthesis and biological activity. **European Journal of Medicinal Chemistry**, v. 121, n. 4, p. 610-639, 2016.

NECKEL, G. L. Atividade antineoplásica in vitro e in vivo da chalcona n9 e seu possível mecanismo de ação. 2011. 144 f. **Tese de Doutorado, Universidade Federal de Santa Catarina, Florianópolis.** 2011.

NELSON, D.L.; COX, M.M. **Lehninger Principles of Biochemistry**. 12^a edition. W. H. Freeman, 2012. ISBN-10: 1429234148.

NICHOLAS, M.K. Glioblastoma multiforme: evidence-based approach to therapy. **Expert Review of Anticancer Therapy**, v. 7, p. 23-27, 2007.

NUPPONEN, N.N.; JOENSUU, H. Molecular pathology of gliomas. **Current Diagnostic Pathology**, v. 12, p. 394-402, 2006.

OSTROM, Q. T. *et al.* CBTRUS statistical report: Primary brain and central nervous system tumors diagnosed in the United States in 2007-2011. **Neuro-oncology**, v. 16, n. 4, p. 1-63, 2014.

OTTO, W. R. Lung epithelial stem cells. **Journal of Pathology**, v. 197, n. 4, p. 527–535, 2002.

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.

ROMAN, B. I. *et al.* Further studies on anti-invasive chemotypes: An excursion from chalcones to curcuminoids. **Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters**, v. 25, n. 5, p. 1021-1025, 2015.

SAIF, M. W. *et al.* Flavonoids, phenoxodiol, and a novel agent, triphendiol, for the treatment of pancreaticobiliary cancers. **Expert opinion on investigational drugs**, v. 18, p. 469-479, 2009.

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, 2007.

SATHORNSUMETEE, S. *et al.* Diagnosis and treatment of high-grade astrocytoma. **Neurologic Clinics**, v. 25, p. 1111-1139, 2007.

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

SEYFRIED, T. N. *et al.* Is the restricted ketogenic diet a viable alternative to the standard of care for managing malignant brain cancer? **Epilepsy Research**, v. 100, n. 3, p. 310-326, 2012.

STEEL, G.G. Cell loss as a factor in the growth rate of human tumours. **European Journal of Cancer**, v. 3, n. 4, p. 381–7, 1967.

STOLL, R. *et al.* Chalcone derivatives antagonize interactions between the human oncoprotein MDM2 and p53. **Biochemistry**, v. 40, n. 2, p. 336–344, 2001.

STONER, G.D.; MUKHTAR, H. Polyphenols as cancer chemopreventive agents. **Journal of cell biochemistry**, v. 22, p. 169–180, 1995.

SUGERMAN, D. Chemotherapy. **JAMA patient page**, v. 310, n. 2, p. 218, 2013.

TABATA, K. *et al.* Xanthoangelol, a major chalcone constituent of *Angelica keiskei*, induces apoptosis in neuroblastoma and leukemia cells. **Biol Pharm Bull**, v. 28, n. 8, p. 1404–1407, 2005.

THOMPSON, C.B. Apoptosis in the pathogenesis and treatment of disease. **Science**, v. 267, n. 5203, p. 1456–62, 1995.

TOMASELLA, A. *et al.* A Receptor-interacting Protein 1 (RIP1)-independent Necrotic Death under the Control of Protein Phosphatase PP2A That Involves the Reorganization of Actin Cytoskeleton and the Action of Cofilin-1*. **The Journal of Biological Chemistry**, v. 289, n. 37, p. 25699–25710, 2014.

VAUX, D.L.; FLAVELL, R.A. Apoptosis genes and autoimmunity. **Current Opinion in Immunology**, v. 12, n. 6, p. 719–24, 2000.

WANG, H. *et al.* miR-33a promotes glioma-initiating cell self-renewal via PKA and NOTCH pathways. **Journal of Clinical Investigation**, v. 124, n. 10, p. 4489–4502, 2014.

WANG, L. Novel chalcone derivatives as hypoxia-inducible factor (HIF)-1 inhibitor: Synthesis, anti-invasive and anti-angiogenic properties. **European Journal of Medicinal Chemistry**, v. 89. P. 88-97, 2015.

WANG, X. Collective invasion of cancer: Perspectives from pathology and development. **Pathology international**, v. 66, n. 4, p. 183-190, 2016.

WEIGELT, B. *et al.* Breast cancer metastasis: markers and models. **Nature Reviews Cancer**, v. 5, p. 591-602, 2005.

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

YANG, C.S. *et al.* Inhibition of carcinogenesis by dietary polyphenolic compounds. **Annual Review of Nutrition**, v. 21, p. 381–406, 2001.

YUAN, J.; YANKNER, B.A. Apoptosis in the nervous system. **Nature**, v. 407, n. 6805, p. 802–9, 2000.

YOUDIM, K. A. *et al.* Flavonoid permeability across an in situ model of the blood-brain barrier. **Biology and Medicine**, v. 36, p. 592-604, 2004.

XU, S. Chemopreventive effect of chalcone derivative, L2H17, in colon cancer development. **BMC Cancer**, v. 15, p. 870, 2015.

ZI, X. *et al.* A novel chalcone from kava extract induces apoptosis in bladder cancer cells by involvement of Bax protein-dependent and mitochondria-dependent apoptotic pathway and suppresses tumor growth in mice. **Cancer Research**, v. 65, n. 8, p. 3479–3486, 2005.