



UNIVERSIDADE FEDERAL DE SANTA CATARINA
CENTRO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM BIOLOGIA
CELULAR E DO DESENVOLVIMENTO

ANDERSON TOGNI

TÍTULO: ESTUDO DOS EFEITOS ANTITUMORAIS DE
CHALCONAS SINTÉTICAS EM CÉLULAS DE GLIOBLASTOMA
HUMANO

FLORIANÓPOLIS

2019

Anderson Togni

Estudo dos Efeitos Antitumorais de Chalconas Sintéticas em Células de Glioblastoma Humano

Dissertação submetido(a) ao Programa de Pós Graduação em Biologia Celular e do Desenvolvimento da Universidade Federal de Santa Catarina para a obtenção do título de mestre em Biologia Celular e do Desenvolvimento.

Orientador: Prof. Dr. Claudia Beatriz Nedel Mendes de Águiar.

Florianópolis

2019

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

Togni, Anderson

Estudo dos Efeitos Antitumorais de Chalconas Sintéticas
em Células de Glioblastoma Humano / Anderson Togni ;
orientadora, Claudia Beatriz Nedel Mendes de Águiar, 2019.
61 p.

Dissertação (mestrado) - Universidade Federal de Santa
Catarina, , Programa de Pós-Graduação em Biologia Celular e
do Desenvolvimento, Florianópolis, 2019.

Inclui referências.

1. Biologia Celular e do Desenvolvimento. 2. Câncer. 3.
Glioblastoma. 4. Chalcona. I. Nedel Mendes de Águiar,
Claudia Beatriz . II. Universidade Federal de Santa
Catarina. Programa de Pós-Graduação em Biologia Celular e do
Desenvolvimento. III. Título.

Anderson Togni

Título: Estudo dos Efeitos Antitumorais de Chalconas Sintéticas em Células de Glioblastoma Humano

O presente trabalho em nível de mestrado foi avaliado e aprovado por banca examinadora composta pelos seguintes membros:

Dr^a. Karen Andrinéia de Oliveira

Doutora em Bioquímica pela Universidade Federal de Santa Catarina

Prof.(a) Yara Costa Netto Muniz, Dr^a.

Universidade Federal de Santa Catarina

Certificamos que esta é a **versão original e final** do trabalho de conclusão que foi julgado adequado para obtenção do título de mestre em Biologia Celular e do Desenvolvimento.

Prof. Dr. Geison de Souza Izídio

Coordenador(a) do Programa de Pós-Graduação em Biologia Celular e do Desenvolvimento

Prof. Dr.(a) Claudia Beatriz Nedel Mendes de Aguiar

Orientador(a)

Florianópolis, 05 de outubro de 2018.

Este trabalho é dedicado aos meus amigos e aos meus queridos pais.

Agradecimentos

Sempre falei que iria me agradecer em primeiro lugar, porém, é impossível. Dedico todo esse trabalho, desde antes do começo até depois do fim à minha mãe. Impossível não agradecer a Dani por ter me apoiado, me incentivado e nunca ter me deixado desanimar diante de cada desafio, e olha, não foram poucos. Quero agradecer por ser simplesmente a melhor mãe que alguém poderia ter. Te amo, e não é dessa vida e não acabará nessa vida.

Sou muito grato a minha orientadora, por ter me aceito na metade do processo, ter confiado em mim e na minha capacidade de realiza-lo. Quero agradecer também a Cláudia, visto que nossa relação sempre foi de orientador aluno nas horas de trabalho e de amigos nas horas de lazer, muito obrigado por me aceitar nessa jornada.

À Profa. Dra. Carla Inês Tasca, por me ter recebido e me acolhido na família Neuroquímica 4, por ter me deixado usar o seu Laboratório para realizar os meus experimentos, por sempre mostrar interesse nos meus resultados, me ajudar a interpreta-los e analisados. Sua ajuda foi muito importante para realização desse trabalho, eu sempre serei grato por sua generosidade.

No meio dessa jornada toda, muitas pessoas se tornaram extremamente importantes para mim. Me acompanharam e me ensinaram muito durante a jornada de estudos, durante as disciplinas e fora UFSC. Agradeço a todos os meus amigos do LIAA e do Nq4. Agradeço especialmente ao Cairé, Gabriel, Maiara e Natan por serem mais que meus amigos, serem meus friends. Agradeço a Clarissa em especial, pois foi meu espelho científico desde antes de eu escolher qual graduação irá cursar, sem contar que me atura desde 6 meses de vida. Sem contar da Flávinha, que mesmo no final do mestrado topou me ajudar a entender e estudar o maravilhoso universo dos GBMs.

Mesmo estando longe de casa, sempre tem os amigos que nunca nos abandonam, mesmo que o encontro pessoalmente ocorra uma vez ao ano, é a vida de adulto né Caroline e Thomas? Dedico também a minha grande amiga Pati, que desde o 3º semestre da graduação me escuta e acompanha o meu trabalho. Sem esquecer da minha amiga do coração, desse anjo, chamado Camila. Muito obrigado por sempre ter as palavras corretas nas horas mais essenciais. Te adoro. Sem deixar de lembrar e agradecer por cada cachorro quente e por cada conversa e momento compartilhado com você Luana, muito obrigado por estar presente e compartilhar a sua vida com a minha.

Agradeço também ao Lameb pela estrutura apresentada para que pudesse realizar meus ensaios. À CAPES pelo financiamento da bolsa auxílio. Ao Conselho Nacional de

Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) pelo financiamento da pesquisa. E a Universidade Federal de Santa Catarina (UFSC) por permitir o meu crescimento intelectual de forma gratuita e com extrema qualidade e humanidade.

Por fim, a todos que contribuíram para a realização deste trabalho, de forma direta ou indireta.

Resumo

Os gliomas são neoplasias do SNC que podem afetar tanto o cérebro quanto a medula espinhal. A OMS classifica os gliomas em diferentes graus (I-IV) conforme sua histopatologia, sendo o glioblastoma multiforme (GBM) a forma mais agressiva (IV), e o tumor primário mais comum entre os cerebrais. O tratamento padrão para pacientes com GBM recém diagnosticado é a cirurgia, seguida de radioterapia e quimioterapia concomitante e adjuvante com TMZ. Porém, apesar dos tratamentos existentes, os pacientes com GBM possuem uma sobrevida média de apenas aproximadamente 14 meses. O tratamento é ineficaz devido uma série de fatores, como por exemplo, altas taxas proliferativas, evasão da apoptose e capacidade de invasão em tecidos saudáveis. Deste modo é importante o estudo de opções alternativas de tratamentos mais eficientes para GBM e nessa busca estão as chalconas. As chalconas são compostos fenólicos que fazem parte da via de biossíntese de flavonoides em plantas e apresentam uma estrutura química simples e versátil. Três chalconas sintéticas (Q1VA, Q2VA e Q18VA) foram testadas em células de GBM provenientes de ressecção cirúrgica. Ensaios de viabilidade celular por MTT, morte celular (Anexina-PI), EROs (DCFDA), $\Delta\Psi_m$ (TMRE), ciclo celular (PI) e migração (*scratch wound healing*) foram realizados para verificar o efeito como uma possível substância antitumoral. Foi identificado que apenas uma chalcona (Q1VA) possui citotoxicidade, e que a mesma aumentou os níveis de apoptose sem aumentar os níveis de necrose. Nesse sentido, a morte celular poderia estar ocorrendo via mitocôndria, pois a Q1VA tem a capacidade de despolarizar a membrana mitocondrial. Essa perda do $\Delta\Psi_m$ poderia ser em decorrência do acréscimo nos níveis de EROs que foram observados nas 6 primeiras horas de tratamento. As células que permaneceram viáveis, apresentaram atraso no ciclo celular, na fase M, principalmente. Do mesmo modo, a Q1VA impediu as células de GBM de migrarem.

Palavras Chaves: Apoptose. Chalcona. Glioblastoma.

Abstract

Gliomas are neoplasms from central nervous system that affect both the brain and the spinal cord. The World Health Organization classified Gliomas into different grades (I-IV) according to their histopathological characteristics, being the glioblastoma multiforme (GBM) the most aggressive form (IV) and the most common malignant primary brain tumor. The standard treatment for patients with newly diagnosed GBM is surgery, followed by concomitant and adjuvant TMZ plus radiotherapy. Despite the treatments, the average survival time of patients with GBM is approximately 14 months. The treatment is feckless because of many factors such as high proliferative rates, evasion of apoptosis and ability invasion in healthy tissues. Thus, it is important to study alternative treatment options for GBM, such chalcones. Chalcones are natural compounds that are part of biosynthesis flavonoids pathway in plants and have a simple and versatile chemical structure. Therefore, the aim of this study was to determine the anticancer activities of chalcones on GBM cells. Three synthetic chalcones (Q1VA, Q2VA e Q18VA) were used against GBM cells from surgical resection. Viability assay by MTT, cell death (Anexine-PI), ROS (DCFDA), $\Delta\Psi_m$ (TMRE), cell cycle (PI) and scratch wound healing were investigated. It was identified that only one chalcone (Q1VA) has cytotoxicity and that has increased levels of apoptosis without increasing levels of necrosis. In this sense, GBM could be dying via mitochondria, since Q1VA has the ability to depolarize the mitochondrial membrane. This loss of $\Delta\Psi_m$ could be due to the increase in the levels of ROS that were observed in the first 6 hours of treatment. Cells that remained viable were delayed in the cell cycle, in phase M, mainly. Likewise, Q1VA prevented GBM cells from migrating.

Key Words: Apoptosis. Chalcone. Glioblastoma.

Lista de Figuras

Figura 1: Esquema representativo dos progenitores celulares de GBM.....	17
Figura 2: Esquema representativo da estrutura central das chalconas.....	23
Figura3: Esteroisômero das chalconas	23
Figura4:Estrutura química das chalconas.....	31
Figura 5: Ensaio de wound healing.....	33
Figura 6: Viabilidade celular.....	37
Figura 7: A chalcona Q1VA diminui a migração celular em GBM1.....	38
Figura 8: A chalcona Q1VA promove alteração na produção de EROs nas células de GBM1.....	39
Figura 9: A chalcona Q1VA promove alteração no $\Delta\Psi$	40
Figura 10: Chalcona induz à apoptose sem aumentar os níveis de necrose.....	42
Figura 11: A chalcona altera o ciclo celular das células de GBM1.....	44

Lista de Tabelas

Tabela 1: Graduação de gliomas e suas características segundo a OMS.....	18
Tabela 2: Identificação das chalconas e massa molecular.....	25
Tabela 3: Percentuais de redução do $\Delta\Psi$	41
Tabela 4: Porcentagens das visualizações das fases do ciclo celular.....	44

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

BAK *BCL2 Antagonist/Killer*

BAX *BCL2-associated X protein*

BHC *Barreira Hematoencefálica*

BH3 *BCL-2 homologous 3*

BID *BH3-interacting domain death agonist*

CASPASES *cysteine aspartylspecific proteases*

CDKs *quinases dependentes de ciclinas*

DCFH-DA *2'-7'-diacetado diclorofluoresceína*

DCFH *Diclorofluoresceína*

DMSO *Dimetil-Sufóxido*

EROs *Espécies Reativas de Oxigênio*

FCCP *Carbonyl cyanide 4-(trifluoromethoxy) phenylhydrazone*

H2O2 *Peróxido de Hidrogênio*

HUVEC *Células Endoteliais da Veia Umbilical Humana*

GBM *Glioblastoma Multiforme*

IAP *Proteínas Inibitórias-De-Apoptose*

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

OMS *Organização Mundial da Saúde*

PBS *Salina Tamponada por Fosfato*

PFA *Paraformaldeído*

PI *iodeto de propídeo*

SBF *Soro Bovino Fetal*

SNC *Sistema Nervoso Central*

TMRE *Trimetilrodamina Etil Éter*

VEGF *Fator de Crescimento Endotelial Vascular*

Sumário

1. Introdução.....	16
1.1 Gliomas	16
1.2 Glioblastoma Multiforme Humano	20
1.3 Chalconas	22
1.4 Morte Celular	25
1.5 Espécies Reativas de Oxigênio.....	26
1.6 Ciclo Celular.....	27
2. Objetivos.....	29
2.1 Objetivo Geral	29
2.2 Objetivos Específicos.....	29
3. Material e Métodos	30
3.1 Cultura Celular	30
3.2 Chalconas	30
3.3 Avaliação do efeito das chalconas na viabilidade celular.....	31
3.4 Análise do efeito das chalconas na migração celular	32
3.5 Análise de Apoptose e Necrose.....	33
3.6 Análise dos níveis de espécies reativas de oxigênio (EROS).....	33
3.7 Análise do potencial de membrana mitocondrial	34
3.8 Análise do Ciclo Celular	34
3.9 Análise Estatística.....	34
4. Resultados.....	36
4.1 Redução da Viabilidade Celular.....	36
4.2 A chalcona Q1VA impede a migração celular.....	37
4.3 A chalcona Q1VA promove alteração na produção de espécies reativas de oxigênio (EROS) nas células de GBM1.....	39
4.4 A Chalcona Q1VA altera o Potencial de Membrana Mitocondrial ($\Delta\Psi_m$).....	40
4.5 A chalcona Q1VA promove apoptose nas células de GBM1	41
4.6 A chalcona Q1VA altera o ciclo celular nas células de GBM1	43

5. Discussão	45
6. Conclusões.....	50
7. Referências	51

1. Introdução

1.1 Gliomas

Os gliomas são tumores cerebrais primários, com origem nas células do sistema nervoso central (SNC) e são responsáveis por 80 % dos tumores primários do SNC (BOUSSIOTIS; CHAREST, 2018; BUTOWSKI, 2015). A maioria dos pacientes diagnosticados com gliomas tem um prognóstico fatal, com sobrevida de apenas 12 a 15 meses após o diagnóstico, além desta doença ter impacto tanto na saúde (física e mental) do paciente quanto na da sua família (RASMUSSEN *et al.*, 2017). Os dados clínicos demonstram que os gliomas são mais recorrentes em homens – risco 1,5 vezes maior que no sexo oposto – e um risco duas vezes maior em pessoas caucasianas do que em afro-descendentes ou asiáticos (OSTROM; BAUCHET; *et al.*, 2014).

Os gliomas são originados a partir das células da glia ou de seus progenitores, sendo a glia composta por astrócitos, oligodendrócitos, células microgliais e endoteliais. Os astrócitos são o grupo celular mais abundante da glia, sendo responsáveis pela manutenção e homeostase metabólica. Os oligodendrócitos produzem a bainha de mielina e as células microgliais atuam como células fagocitárias, enquanto, as células endoteliais revestem os ventrículos cerebrais e mantem a homeostase no cérebro e no meio extracelular da retina (BARRES, 2003; JIANG, Y.; UHRBOM, 2012).

Os precursores celulares dos gliomas ainda não foram elucidados, pois há evidências na literatura indicando semelhanças histológicas entre células diferenciadas funcionais da glia e as células do glioma, apontando que as células tumorais seriam o resultado de um acúmulo de alterações que ocorreram em células diferenciadas. Essas alterações promoveriam a dediferenciação das células da glia ao longo do processo tumorigênico (ALCANTARA LLAGUNO; PARADA, 2016; SINGH, N.; SARKAR; SASHIDHARA, 2014).

No entanto, o próprio processo tumorigênico poderia alterar diretamente as células tronco ou células indiferenciadas progenitoras multipotentes que são encontradas em diferentes tecidos: as células-tronco neurais ou células progenitoras da glia (Figura 1) (ALCANTARA LLAGUNO; PARADA, 2016; DIRKS, 2010; HEYWOOD *et al.*, 2012).

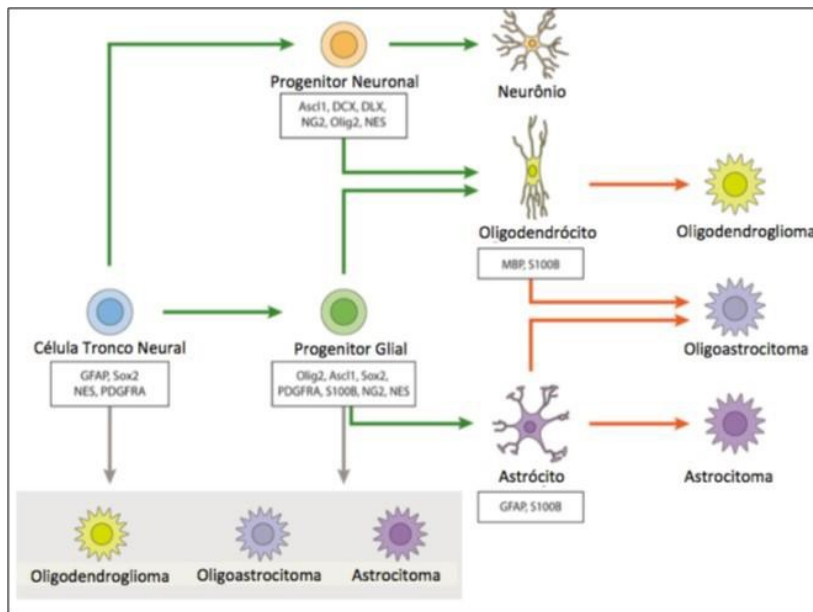


Figura 1: Representação esquemática do processo de diferenciação de células tronco neurais em diferentes linhagens celulares do SNC e células progenitoras dos gliomas

Os marcadores de proteínas para células tronco neurais, células progenitoras e células diferenciadas são indicados em caixas. A hipótese clássica sobre a origem das células de glioma é representada por setas laranjas. A hipótese mais recente é representada por setas cinzentas.

FONTE: Adaptado de Gonçalves *et al.* (2013).

Os gliomas são considerados tumores heterogêneos, pois variam consideravelmente na sua morfologia, localização e composição celular (KARSY; GUAN; HUANG, L. E., 2018; OSTROM; GITTLEMAN; *et al.*, 2014). Para padronizar a comunicação e o plano de tratamento dos tumores do tipo glioma, a Organização Mundial da Saúde (OMS) desenvolveu um sistema de classificação em quatro graus (I-IV), caracterizado no tipo celular mais semelhante à sua de origem, à sua agressividade e à sua taxa proliferativa, reconhecendo assim 7 tipos de gliomas (Tabela 1) (CAIRNCROSS *et al.*, 2006; D’HAENE *et al.*, 2014; DEMUTH; BERENS, 2004; LEVER; SHEER, 2010; LOUIS *et al.*, 2007; OHGAKI; KLEIHUES, 2009; ROUSSEAU; MOKHTARI; DUYCKAERTS, 2008; SANSON *et al.*, 2009; YANG *et al.*, 2016).

Gradação	Características Histopatológicas	Tipos de Tumores	Características do Tumor
Grau I	Lesões não infiltrativas, com baixo potencial proliferativo, sem atipias nucleares, mitoses, proliferação endotelial ou necrose.	Astrocitoma pilocítico, astrocitoma de células gigantes subependimais, xantoastrocitoma pleomórfico e subependimoma.	Apresentam células bem diferenciadas, biologicamente benignos, passíveis de cura por cirurgia.
Grau II	Lesões em geral infiltrativas, com atipias nucleares e baixo índice mitótico, sem proliferação endotelial ou necrose	Astrocitoma difuso, oligodendroma, ependimoma e oligoastrocitoma misto.	Considerados malignos, com infiltração precoce nos tecidos adjacentes, bem diferenciado, crescimento lento, pode progredir para astrocitoma anaplásico, incurável por cirurgia.

Grau III	Lesões infiltrativas, com atípias nucleares e alto índice mitótico.	Astrocitoma anaplásico, oligodendroma anaplásico, ependimoma anaplásico e oligoastrocitoma anaplásico.	Apresenta altas taxas de anaplasia e proliferação, com características histológicas malignas e prognósticos desfavoráveis.
Grau IV	Lesões infiltrativas, atípias nucleares, alto índice mitótico, células gigantes multinucleadas, necrose e proliferação endotelial.	Glioblastoma multiforme	Exibem muitas características de malignidade, alta ocorrência de angiogênese e necrose, elevada invasibilidade e baixos prognósticos.

Fonte: Adaptado LOUIS *et al.*, 2007

Conforme essa classificação, o glioblastoma multiforme humano (GBM) é o tipo mais agressivo de glioma, representando 55 % dos tumores do SNC (OSTROM; GITTLEMAN; *et al.*, 2014).

1.2 Glioblastoma Multiforme Humano

O GBM é o tipo de glioma mais comum e maligno em adultos. O prognóstico é desfavorável quase sempre, pois, somente 32 % dos pacientes tem uma sobrevida maior que 12 meses após o diagnóstico (OSTROM; GITTLEMAN; *et al.*, 2014).

As células desse tipo de gliomas são pequenas, caracterizadas por polimorfismo, formato poligonal, difuso, com citoplasma acidófilo e fronteiras celulares distintas. Possuem alta taxa mitótica e com mitose atípica (DEIMLING, 2009; REIFENBERGER *et al.*, 2012).

A via de formação de um GBM pode ser de duas formas, resultando em dois prognósticos distintos. A via de formação primária (*de novo*) se desenvolve a partir de precursores saudáveis, sem lesões anteriores e é mais comum em pacientes na faixa etária de 55 a 60 anos, apresentando baixas taxas de sobrevivência e sobrevida, raramente acima dos 15 meses (LOUIS *et al.*, 2016; REIFENBERGER *et al.*, 2012).

Os GBM secundários se desenvolvem a partir da progressão tumoral de astrocitomas difusos (Grau-II) e astrocitomas anaplásicos (Grau-III). Normalmente surgem em pacientes mais novos, em torno dos 44 anos e com uma taxa de sobrevida em torno de 31 meses (LOUIS *et al.*, 2016; REIFENBERGER *et al.*, 2012).

Sendo um tipo de glioma, os GBM também são considerados tumores heterogêneos, pois associados às células tumorais encontram-se monócitos e macrófagos, que liberam fatores pró-inflamatórios e angiogênicos, contribuindo diretamente para a progressão tumoral. No tumor também se encontram células tronco tumorais, células mesenquimais e células do estroma (REIFENBERGER *et al.*, 2012).

Uma característica histopatológica marcante do GBM são os focos necróticos. Esses focos são identificados tanto na área central do tumor como em regiões periféricas. O principal foco é identificado na área central do tumor devido às altas demandas energéticas das células. O outro foco é observado em outras partes da massa tumoral, sendo considerados com menor tamanho e de forma irregular (URBANSKA *et al.*, 2014).

Este tipo de tumor é difuso e as células de GBM invadem ativamente o tecido cerebral, atravessando dois tipos de espaços extracelulares: o espaço perivascular, que é encontrado ao redor dos vasos sanguíneos e o espaço entre os neurônios e as células da glia que compõem o parênquima cerebral e as fibras da massa branca. Apesar do alto potencial invasivo, as células de GBM raramente fazem metástase (PAW *et al.*, 2015).

Diferentes hipóteses discutem o baixo potencial metastático do GBM. Sugere-se que as células tumorais não fariam a metástase devido à presença da barreira hematoencefálica, pois a mesma impediria as células de GBM migrarem para fora do SNC e se propagarem em outros tecidos. Outra hipótese leva em consideração a agressividade do GBM, ou seja, o paciente iria a óbito antes mesmo das células migrarem e se estabelecerem em outros sistemas. Não obstante, o cérebro é desprovido de vasos linfáticos, acarretando em uma via a menos de escape do SNC (ROBERT; WASTIE, 2008; TYSNES; MAHESPARAN, 2001).

Contudo, existem casos descritos na literatura sobre metástase de GBM. Quando ocorrem, as células migram pelo líquido cefalorraquidiano ou sangue, alcançando o baço, pleura, linfonodos, pulmão, ossos, fígado, intestino delgado e pâncreas (AL-RIKABI *et al.*, 1997; BIRBILIS *et al.*, 2010; JAMJOOM, A. B. *et al.*, 1997; LUN *et al.*, 2011; ROBERT; WASTIE, 2008; URBANSKA *et al.*, 2014; WALLACE; FORSYTH; EDWARDS, 1996; WIDJAJA *et al.*, 2000).

O GBM é conhecido por ser um tumor com diversas alterações cromossômicas e genéticas que acabam por afetar uma variedade de genes supressores de tumor e proto-oncogenes, assim como alterações em toda sua biologia. Devido às anormalidades apresentadas, aliadas à expressão gênica, a OMS, em 2016, reorganizou a classificação dos tumores do SNC, classificando o GBM em dois tipos, GBM *IDH*-selvagem e GBM *IDH*-mutante (LOUIS *et al.*, 2016).

Essa classificação se baseia na enzima isocitrato desidrogenase (*IDH*) do ciclo do ácido cítrico. A enzima reduz o α -cetoglutarato a 2-hidroxioglutarato sem que ocorra a liberação de NADPH/NADH. Com isso, o GBM *IDH*-mutante corresponde a tumores secundários, que surgem em pacientes considerados mais jovens e representam cerca de 10 % dos casos de GBM. Por outro lado, o GBM *IDH*-selvagem corresponde aos casos mais frequentes de tumor primário (*de novo*) e acomete pacientes com mais de 55 anos de idade. Representa cerca de 90 % dos casos (LOUIS *et al.*, 2016).

Além dessa classificação, é possível agrupar o GBM em 4 subtipos quando levado em consideração as anormalidades gênicas apresentadas, alteração no número de cópias de cromossomos e no perfil da expressão gênica. Esses subtipos, Proneural, Neural, Clássico e Mesenquimal possuem semelhanças histológicas com suas possíveis origens. Com essas classificações mais refinadas, o diagnóstico fica mais preciso e a escolha do melhor

tratamento se torna mais eficaz pois trata o GBM em relação as suas características biológicas e não apenas como um tumor (FORD; MCVICAR, 2010).

Os tratamentos convencionais para GBM consistem em ressecção cirúrgica, quimioterapia e radioterapia (ABREY, 2005; LIN; KLEINBERG, 2008). Entretanto, ao realizar a ressecção cirúrgica, muitas células já invadiram o tecido adjacente contribuindo para a recidiva do GBM. Além disso, por ser um tumor heterogêneo, o GBM possui células indiferenciadas com alta resistência a fármacos e, devido à barreira hematoencefálica (BCH), diversos compostos se tornam ineficazes, pois não conseguem ultrapassá-la, reduzindo a possibilidade de escolha de agentes quimioterápicos (BITTENCOURT *et al.*, 2016a).

Atualmente o principal fármaco utilizado no combate a gliomas é a Temozolomida (TMZ). Esse fármaco é um agente alquilante de DNA, capaz de atravessar a barreira hematoencefálica e intracelularmente é capaz de formar adutos no DNA impedindo o mecanismo de reparo do DNA e por consequência levando as células a apoptose (FRIEDMAN, H. S.; KERBY; CALVERT, 2000). Entretanto, mesmo com todos os avanços na medicina, os atuais tratamentos para GBM não são totalmente eficazes, além de apresentarem efeitos colaterais bastante agressivos.

Assim, é primordial a busca por compostos antitumorais alternativos, visando não só a cura, mas também a melhora na qualidade de vida dos pacientes acometidos por GBM e outros tipos tumorais. Resultados recentes de nosso laboratório demonstraram que algumas chalconas aumentam a apoptose em células de GBM, sem aumentar a necrose, o que é desejável para uma substância anticâncer (BITTENCOURT *et al.*, 2016a).

1.3 Chalconas

Compostos fenólicos, como os flavonoides, são largamente encontrados na natureza. Dentre as várias atividades atribuídas a eles podemos citar a habilidade de reduzir a invasão e adesão celular, inibição da proliferação celular e o aumento da apoptose (KIEKOW *et al.*, 2016). Os flavonoides podem ser classificados como flavonas, antocianinas, isoflavonoides e chalconas (AGGARWAL *et al.*, 2012).

As chalconas são encontradas em diversas partes das plantas como folhas, raízes, caules e sementes de gêneros como *Angelicana*, *Glycyrrhiza*, *Humulus* e *Scutellaria*, que são usadas

tradicionalmente para o tratamento de várias doenças, sendo as atividades biológicas atribuídas às chalconas, incluindo propriedades anti-inflamatórias e bactericidas (LOCHNECKEL *et al.*, 2015).

As chalconas pertencem ao grupo das cetonas α,β - insaturadas, nas quais um anel aromático está ligado à carbonila e o outro carbono β da função olefinica (Figura 2). Pertencem a família das fitoalexinas produzidas durante a biossíntese de flavonoides de pigmentação amarela (SASAYAMA *et al.*, 2007). Seus dois estereoisômeros – Z e E – são precursores mais comuns na biossíntese de flavonoides e isoflavonóides (Figura 3) (NOWAKOWSKA, 2007; SANTANA *et al.*, 2015).

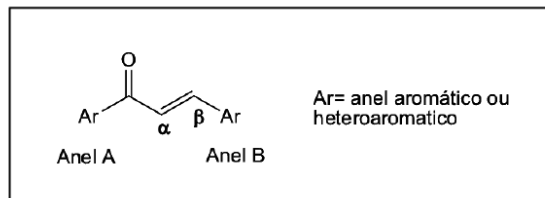


Figura 2: Esquema representativo da estrutura central das chalconas

Estrutura comum a todos os grupos de chalconas.

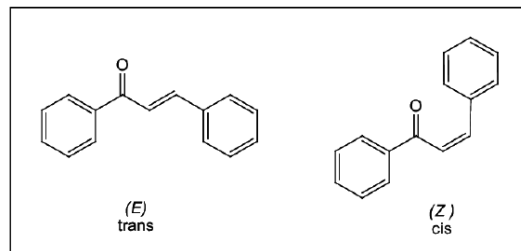


Figura 3: Estereoisômero das chalconas

Esquema representativo demonstrando as faces cis e trans encontradas nas chalconas

Como as chalconas são facilmente sintetizadas quimicamente, é possível fazer alterações na sua estrutura, tornando-as compostos interessantes para o estudo de estrutura/atividade. Com isso, diversos trabalhos envolvendo diferentes formas de chalconas estão sendo

investigados. Diversas propriedades farmacológicas estão sendo descritas, como ação anti-inflamatória, atipirética, analgésica, antimalárica e antibacteriana (KONTOGIORGIS; MANTZANIDOU; HADJIPAVLOU-LITINA, 2008; LEON-GONZALEZ *et al.*, 2015).

Estudos envolvendo a ação antitumoral das chalconas demonstraram que seu efeito citotóxico pode ocorrer no controle do ciclo celular. Essas moléculas têm a capacidade de bloquear as fases do ciclo G1 e G2/M, causando um atraso e por consequência uma diminuição da taxa proliferativa. Também ocorre alteração nos níveis de óxido nítrico, conhecido por ser uma molécula sinalizadora assim como a interferência na expressão da óxido nítrico sintase induzível (iNOS), aumento da produção de fator de necrose tumoral α (TNF – α) além da ação citotóxica e antioxidante (BITTENCOURT *et al.*, 2016a; LOA; CHOW; ZHANG, K., 2009; SHEN *et al.*, 2007).

O poder de ação das chalconas não se limita ao ciclo celular. Efeitos sobre a polimerização da tubulina, proteínas que compõem os microtúbulos, já foram descritos assim como seu poder na inibição de quinases e na modulação das proteínas da família dos transportadores ABC (*ATP-binding cassette transporter*), envolvidas na resistência a fármacos, pois bombeiam ativamente compostos xenobióticos que venham a atravessar a membrana plasmática (CHAMPELOVIER *et al.*, 2013; TING *et al.*, 2017).

Em linhagem celular de glioma humano U87MG, testes revelaram que uma chalcona híbrida (chalcona-quinoxalina) inibiu a proliferação e induziu a morte celular. Foram também observadas perdas no potencial de membrana mitocondrial, aumento de EROs e ativação de caspase-9, conhecida por ser efetora de apoptose. Efeitos semelhantes foram observados com um híbrido chalcona-prenilada (LOCH-NECKEL *et al.*, 2015; TENG; SZE; LIAO, W. C., 2014).

A flavocavaina B (FKB) é uma chalcona que demonstrou atividade anti-angiogênica *in vitro* em linhagem HUVECs (*human umbilical vein endothelial cells*) e robusta atividade anti-angiogênica *in vivo* no modelo animal *zebrafish*. A chalcona isobavachalcona demonstrou que sua citotoxicidade é tanto em células tumorais normais quanto em linhagens resistentes a múltiplas drogas, e que a morte celular ocorre através da ativação de caspases, altos níveis de EROs, alteração no potencial de membrana mitocondrial em células de leucemia (KUETE *et al.*, 2015; ROSSETTE *et al.*, 2017).

Além dessas características, as chalconas possuem um importante característica, que é sua capacidade de atravessar a barreira hematoencefálica (FUCHIGAMI *et al.*, 2014). Em

trabalho recente do grupo foi demonstrado que a chalcona sintética C31, promoveu redução da viabilidade de células de glioma humano A172 e de GBM1. Esse efeito foi acompanhado de aumento na apoptose e produção de EROS nessas células, com alteração no ciclo celular (Bittencourt et al, 2016). É importante assinalar que uma substância antitumoral deve apresentar ação apoptótica, sem efeitos na morte celular por necrose (DUCKI, 2007).

1.4 Morte Celular

Dentre os tipos conhecidos de morte celular, as mais ocorrentes são a morte por apoptose ou morte por necrose, sendo promovidos por eventos endógenos ou exógenos. A morte por necrose é caracterizada pelo rompimento da membrana plasmática com o extravasamento do conteúdo celular, acarretando no aumento de EROs, depleção de adenosina trifosfato (ATP), desregulação do equilíbrio de cálcio, ativação de proteases, recrutamento de células do sistema imune, além de iniciação de processos inflamatórios, entre outros. Esse tipo de morte normalmente advém de fatores físicos externos, como ferimentos, infecções, radiação, fármacos e agentes químicos (GOLSTEIN; KROEMER, 2007), e, devido a essas características, não é desejável que uma substância antitumoral promova morte celular por necrose.

A morte celular programada, ou apoptose, é finamente controlada por diversas proteínas que reduzem o tamanho celular, condensam a cromatina e fragmentam o núcleo em pequenos corpos apoptóticos, que são fagocitados por células competentes (COTTER, 2009).

A apoptose pode ser desencadeada através de três vias alternativas: via extrínseca, via intrínseca e da via Granzima B. A via extrínseca se inicia pela ativação das caspases (*cysteine aspartylspecific proteases*) envolvendo uma ligação de ligantes extracelulares de morte a um receptor transmembrana de morte, culminando na ativação das caspases que promovem a proteólise do substrato e a morte celular (CREAGH; CONROY; MARTIN, 2003).

Na via intrínseca a própria célula sinaliza e ativa proteínas da família BH3 (BCL-2 homologous 3), permitindo a montagem dos oligômeros BAK (BCL2 *Antagonist/Killer*), BAX (BCL2-associated X protein) nas membranas externas mitocondriais. Os oligômeros permitem que o citocromo *c* vá para o citosol onde promove a montagem do apoptossomo que culmina com a ativação da Caspase-9, resultando na cascata proteolítica (CREAGH; CONROY; MARTIN, 2003; TAYLOR; CULLEN; MARTIN, 2008).

A granzima B é uma protease secretada pelos linfócitos T citotóxicos (CTL) e pelas células *natural killer* (NK) que entra na célula através de grânulos especializados e que de forma semelhante às caspases, também cliva os seus substratos e pode também ativar a BID (*BH3-interacting domain death agonist*), caspases-3 e 7 para iniciar a apoptose (BROWNE *et al.*, 2000).

Semelhantes a outros tipos de tumores, em GBM ocorre um aumento na expressão das proteínas antiapoptóticas (BCL-2), baixa expressão de proteínas pró-apoptóticas (BAX) além de elevados níveis de expressão de proteínas inibitórias de apoptose (IAP). Não obstante, o GBM se utiliza da necrose, pois nesse tipo de morte, fatores de inflamação são liberados e contribuem diretamente para a progressão tumoral (CHEN, G. *et al.*, 2017; KRAJEWSKI *et al.*, 1997).

Diversos trabalhos vêm demonstrando a ação pró-apoptótica das chalconas em diferentes tumores (MAIORAL *et al.*, 2013; SINGH, N.; SARKAR; SASHIDHARA, 2014). Recentemente, foi demonstrado em um trabalho do nosso grupo, que a chalcona sintética C31 promoveu apoptose em células de glioma humano A172 e GBM, provavelmente induzida por aumento na produção de EROs e consequente parada no ciclo celular (Bittencourt *et al.*, 2016). De fato, EROs em excesso, bem como altos níveis de óxido nítrico (NO) são descritos como indutores de apoptose em células tumorais (JEONG *et al.*, 2010).

1.5 Espécies Reativas de Oxigênio

As espécies reativas de oxigênio (EROs) são subprodutos de radicais livres altamente reativos. Dentre eles podemos citar o radical ânion superóxido (O_2^-) e o peróxido de hidrogênio (H_2O_2), provenientes do consumo de oxigênio na fosforilação oxidativa da cadeia transportadora de elétrons. Essas moléculas são conhecidas por serem citotóxicas e por terem uma relação etiológica com uma variedade de doenças humanas, incluindo o câncer. As EROs são considerados como potenciais carcinogênicos, pois facilitam a mutagênese e a progressão tumoral (MANDA; NECHIFOR; NEAGU, 2009).

A geração de EROs ocorre em um estado controlado em células saudáveis de organismos aeróbicos, porém o acúmulo dessas moléculas pode causar danos oxidativos nas membranas de organelas e celulares e também em macromoléculas (lipídeos, proteínas, ácidos nucleicos e carboidratos) (HRYCAY; BANDIERA, 2015).

Entre as principais consequências celulares da produção de EROs em gliomas, podemos destacar a indução da apoptose diretamente na mitocôndria e/ou na superfície celular, ativando receptores proapoptóticos (JEONG *et al.*, 2010; USHIO-FUKAI, 2006), e desta forma, interferindo no ciclo celular destes tumores.

1.6 Ciclo Celular

Em um tecido tumoral, o ciclo celular encontra-se altamente desregulado levando as células tumorais à uma intensa proliferação celular. Em GBM, os mecanismos de controle do ciclo celular através da proteína p53 assim como pelas CDKs (quinases dependentes de ciclinas) (STEINBACH; WELLER, 2004), são perdidos, tendo como consequência uma intensa taxa proliferativa.

O ciclo celular pode ser definido como a reprodução celular, na qual a célula segue uma sequência de eventos que permite à mesma duplicar seu material genético e então dividir-se em duas. As células eucarióticas possuem um ciclo celular dividido em duas grandes fases: a intérfase e divisão celular (fase M). Dentro da intérfase, encontram-se as fases G0, G1, S, G2 (HOCHEGGER; TAKEDA; HUNT, 2008).

A fase G0 é conhecida com uma fase de pausa no ciclo celular. A fase G1 é a fase de preparo, onde ocorre intensa síntese de proteínas e aumento do tamanho celular. A fase S é devido a síntese do DNA, onde todo o material genético é duplicado, ocorrendo a passagem rápida na fase G2. Logo após ocorre a fase M, culminando com duas células filhas (HOCHEGGER; TAKEDA; HUNT, 2008).

Porém, o ciclo celular é um movimento extremamente orquestrado, possuindo *check point* em cada fase. Essa verificação é importante, pois evita qualquer tipo de erro seja propagado para as células filhas. As principais proteínas de controle direto do ciclo celular são as CDKs, pois cada vez que ocorre ou não a fosforilação de um treonina é um sinal para o ciclo celular progredir ou estacionar (GREENALL *et al.*, 2017). O controle destas CDKs já está estabelecido com uma maneira eficiente de controlar a proliferação celular descontrolada observada nos tumores (CHANG, Y. C. *et al.*, 2004).

Em gliomas o ciclo celular é altamente desregulado, tornando-o um importante alvo para estudos com novos compostos. A bibliografia relacionando gliomas com ciclo celular é escassa. Estudos demonstraram que as chalconas tem a capacidade de causar um atraso no

ciclo celular em alguma fase e problemas na síntese/polimerização do citoesqueleto (BITTENCOURT *et al.*, 2016b; ZOLDAKOVA *et al.*, 2010).

Desta forma, o presente trabalho tem como objetivo estudar os efeitos de chalconas sintéticas no tratamento de células de GBM humano, avaliando diversos processos celulares importantes na progressão tumoral, como migração e proliferação celular, além de estudar as possíveis alterações no ciclo celular e apoptose destas células.

2. Objetivos

2.1 Objetivo Geral

O presente estudo tem como objetivo geral avaliar o efeito citotóxico de três chalconas sintéticas (Q1VA, Q2VA e Q18VA) em células de glioblastoma multiforme humanas (GBM1).

2.2 Objetivos Específicos

- Comparar a viabilidade das células de GBM1 após o tratamento com as chalconas Q1VA, Q2VA e Q18VA;
- Avaliar a migração e proliferação das células GBM1 após o tratamento com a chalcona Q1VA;
- Analisar o efeito da chalcona Q1VA no ciclo celular das células GBM1, determinando o potencial pró-apoptótico induzido por essa chalcona;
- Quantificar os níveis de espécies reativas de oxigênio em células GBM1 após tratamento com a chalcona Q1VA, avaliando também uma possível alteração no potencial de membrana mitocondrial das células GBM1.

3. Material e Métodos

3.1 Cultura Celular

A amostra de GBM foi obtida através de ressecção cirúrgica realizada em paciente do hospital Celso Ramos, em Florianópolis, Santa Catarina. A amostra foi coletada por cirurgiões, colocada em tubos cônicos de 15 ml contendo DMEM-F12 e 10 % de soro bovino fetal (SBF) e transportada para a Universidade Federal de Santa Catarina (UFSC). Em fluxo laminar, o fragmento de tumor foi dissecado com remoção das meninges cerebrais e vasos sanguíneos. O tecido foi dissociado mecanicamente com tripsina e auxílio de uma pipeta Pasteur. As células foram lavadas com salina tamponada por fosfato (PBS) e plaqueadas em garrafas de cultura celular de 25 cm² com meio de cultura DMEM-F12 suplementado com acrescido de glicose (0,6 %), glutamina (2 mM), bicarbonato de sódio (0,06 %) e penicilina/estreptomicina (1 U/1µg) e suplementado com 10 % de SBF. 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).

3.2 Chalconas

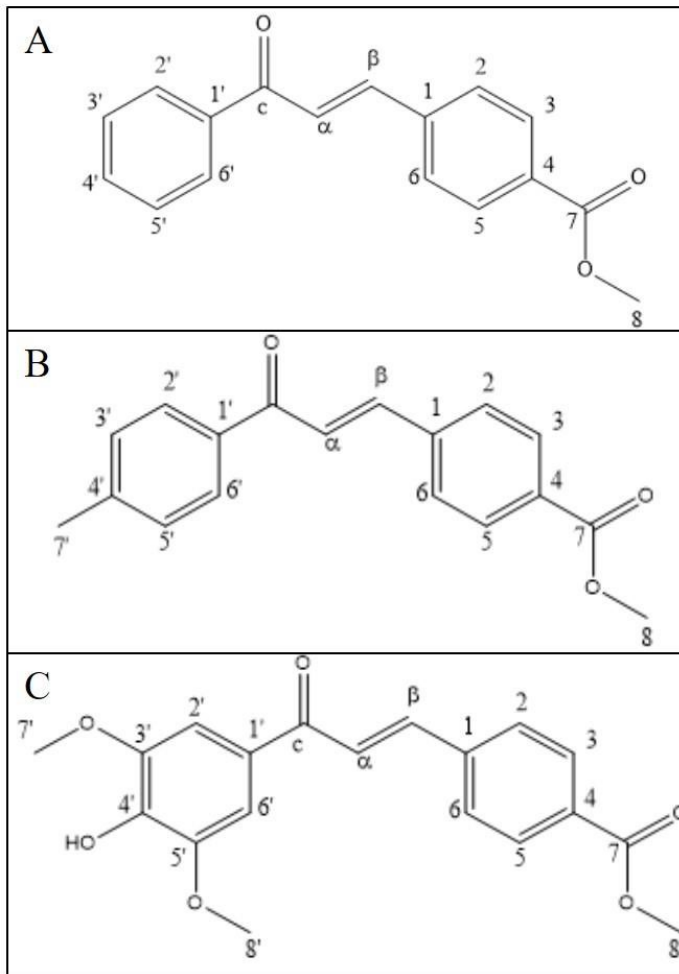
As chalconas (Tabela 2) foram obtidas de forma sintética no Laboratório de Estrutura e Atividade, LEAT, pelo doutorando Luiz Felipe Schimitz de Souza sob a orientação do professor Dr. Ricardo José Nunes. Na figura 4 (A,B,C), são encontradas as estruturas moleculares.

Tabela 2: Chalconas sintéticas com sua massa molecular

Chalcona	Massa Molecular (G/MOL)
Q1VA	226,29
Q2VA	280,32
Q18VA	342,34

Figura 4: Estrutura Química das Chalconas

Estrutura química das chalconas utilizadas neste trabalho: Q1VA (A), da Q2VA (B) e da (C) Q18VA



3.3 Avaliação do efeito das chalconas na viabilidade celular

A avaliação do potencial citotóxico das chalconas foi realizado através da redução do MTT (3-(4,5-Dimetiltiazol-2-il)-2,5-Difeniltetrazol brometo). O MTT é um sal de tetrazólio

solúvel em água que, por ação de desidrogenases mitocondriais é clivado em um anel de formazana púrpura insolúvel (JACOBSSON; FOWLER, 1999).

Células de GBM foram plaquadas em placas de 96 poços (1 x 10⁵ células/poço) até atingirem a confluência necessária. Após o meio foi substituído pelo tratamento com as chalconas nas concentrações de 50 µM, 100 µM, 150 µM e 200 µM por 24 horas.

Com o fim do tratamento, o meio removido e substituído por PBS/MTT (0,2 mg/mL) e incubado por duas horas a 37°C. Então o MTT foi removido e os cristais de formazana reduzidos foram solubilizados pela adição de dimetil-sufóxido (DMSO). A leitura foi realizada em espectrofotômetro (Multimode Reader Infinite M200 TECAN) no comprimento de onda de 550 nm e a viabilidade celular foi proporcional a absorbância.

3.4 Análise do efeito das chalconas na migração celular

A análise foi realizada através do ensaio do *scratch/woundhealing* (DECAESTECKER *et al.*, 2007).

As células de GBM foram plaqueadas em placas de 24 poços (2 x 10⁵ células/poço) até formarem uma monocamada confluenta. Com o auxílio de uma ponteira estéril de 200 µL um risco (*scratch*) foi feito na monocamada celular (conforme Figura 5) e o tratamento foi realizado nas concentrações descritas anteriormente, por 24 horas. Os poços foram fotografados no Microscópio Invertido Olympus IX83, no tempo 0 e 24 horas após o risco (5 fotos por poço). No programa ImageJ® a largura de cada arranhão foi mensurada (horizontalmente).

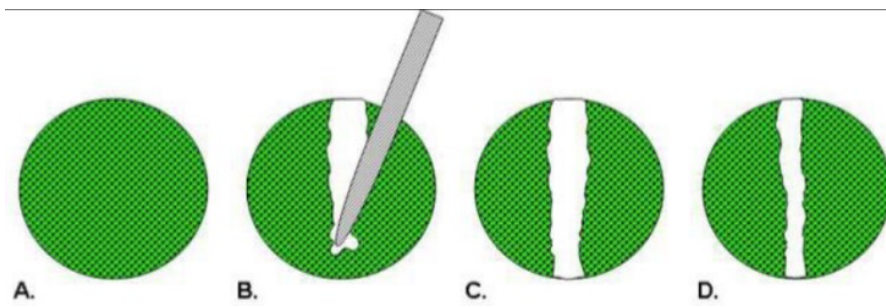


Figura 5: Ensaio de *wound healing*

Um risco é feito em em uma monocamada confluyente de células (A) com auxílio de uma ponteira (B). A área sem células é utilizada para medir a largura do risco na pré-migração 0H (C) e também para após a migração das células ao longo do risco(D).

Fonte: adaptado de Hulkover e Herber (2011)

3.5 *Análise de Apoptose e Necrose*

Células de GBM (2×10^5) foram plaqueadas em placas de 24 poços até a obtenção da confluência necessária. O tratamento foi realizado e após 24 horas, as células foram descoladas da placa, centrifugadas (1500 rpm x 5 min) e ressuspensas em PBS gelado, centrifugadas novamente e ressuspensas em tampão de ligação 1 x. Então foi adicionado Anexina V-FITC e Iodeto de Propídeo. As amostras foram incubadas por 10 minutos em temperatura ambiente no escuro e as a leitura foi realizada no citômetro de fluxo FACS Canto II (10.000 eventos) e os dados foram analisados no *Flowing Software*.

3.6 *Análise dos níveis de espécies reativas de oxigênio (EROS)*

Os níveis de EROS foram determinados através do composto DCFH-DA (2'-7'-diacetato diclorofluoresceína). Após a confluência, o tratamento foi realizado nas concentrações determinadas anteriormente e os EROS foram mensurados em 6, 12 e 24 horas.

A sonda DCFH-DA foi adicionada na concentração de $10 \mu\text{M}$ e a cultura foi incubada por 30 minutos a 37°C . Decorrido o tempo, as células foram lavadas com PBS e a fluorescência

foi mensurada em espectrofotômetro (Multimode Reader Infinite M200 TECAN) com excitação de comprimento de onda de 485 nm e emissão 520 nm.

3.7 Análise do potencial de membrana mitocondrial

A sonda trimetil rodamina etil éter (TMRE) serve para verificar mitocôndrias ativas, pois as mesmas mantêm a capacidade de sequestrar e acumular o composto no seu interior. Com o fim do tratamento o meio de cultura foi removido, as células foram incubadas por 20 minutos a 37°C com TMRE (50 nM em PBS). Após as células foram lavadas uma vez com PBS e a fluorescência foi mensurada em espectrofotômetro (Multimode Reader Infinite M200 TECAN) com excitação de comprimento de onda de 550 nm e emissão 590 nm. O controle positivo da sonda foi através do FCCP (*Carbonyl cyanide 4-(trifluoromethoxy) phenylhydrazone*), um despolarizador de membrana mitocondrial. O número de fluorescência foi dividido pelo número de células correspondente a cada grupo.

3.8 Análise do Ciclo Celular

O ciclo celular foi analisado nas células de GBM com e sem tratamento, para isso, as células foram cultivadas em placas de 24 poços. Após o tratamento com 50 µM de chalcona, as mesmas foram lavadas com PBS, tripsinizadas, centrifugadas (7 min 1800 g) e fixadas com etanol-PBS 70 % (4 ° C por 30 minutos). As amostras foram incubadas com uma solução contendo 0,002 mg/mL de RNase A e 0,007 de Triton 1 % por 30 minutos no gelo. Decorrido o tempo, adicionou-se 0,6 mg/mL de IP em cada amostra, incubando novamente por 30 minutos, no gelo protegidos da luz. Os dados foram obtidos em citômetro de fluxo FACSCanto II com obtenção de 10 mil eventos por experimento e os dados foram analisados no *Flowing Software*.

3.9 Análise Estatística

A análise estatística foi realizada por análise de variância de uma via (ANOVA), seguido teste t ou de Newman-Keuls, conforme o caso. Os dados foram expressos como

média e desvio padrão. Foi utilizado o software GraphPad Prism 4.0 e valores com $p < 0,05$ considerados significantes.

4. Resultados

4.1 Redução da Viabilidade Celular

Três chalconas sintéticas (Q1VA, Q2VA e Q18VA) foram testadas para verificar o seu efeito citotóxico em células de GBM. O tratamento foi realizado por 24 horas nas concentrações de 50 μM , 100 μM , 150 μM e 200 μM e as culturas foram submetidas ao ensaio de MTT.

Pode-se observar, na Figura 6, que a chalcona Q1VA promoveu redução da viabilidade celular nas concentrações de 100, 150 e 200 μM em 76, 90 e 92 %, respectivamente. A concentração de 50 μM da chalcona não promoveu redução significativa da viabilidade celular.

A chalcona Q2VA não reduziu a viabilidade das células de GBM de forma significativa. A concentração de 50 μM reduziu a viabilidade em 15 % e as concentrações de 100 μM , 150 μM e 200 μM se comportaram de forma semelhante, reduzindo a viabilidade celular em torno de 20 % em relação ao controle (Figura 6).

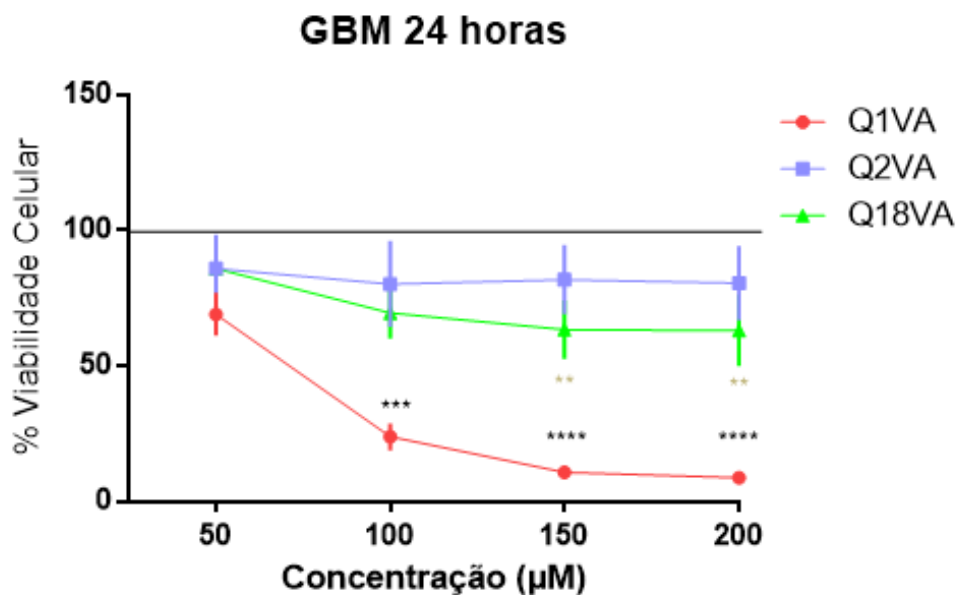
A chalcona Q18VA apresentou citotoxicidade significativa, contudo, esse efeito só foi observado nas concentrações mais elevadas. A redução da viabilidade foi de 15 % para 50 μM , 31 % para 100 μM e 37 % para as concentrações de 150 μM e 200 μM (Figura 6).

As chalconas foram diluídas no veículo DMSO, e para verificar se o efeito observado é induzido pelo veículo ou pela chalcona, os ensaios de MTT foram conduzidos com um controle de DMSO, onde se utilizou o mesmo volume de DMSO para atingir a maior concentração de chalcona testada (200 μM). Para todos os experimentos testados, o DMSO não reduziu a viabilidade das células de GBM, mantendo-a em 99 % em relação ao controle para todas as chalconas (dados não mostrados).

Como foi observado, a chalcona Q1VA apresentou os melhores resultados em relação à redução da viabilidade celular, sendo por esse motivo escolhida para os ensaios subsequentes.

Figura 6: Viabilidade celular

As células de GBM, após a confluência, foram tratadas com as concentrações de 50 μM , 100 μM , 150 μM e 200 μM de cada chalcona por 24 horas e em seguida as células foram submetidas ao ensaio do MTT. Os dados foram expressos como média \pm SEM (erro padrão) de quatro experimentos independentes. * $P < 0,05$, ** $P < 0,01$, *** $P < 0,001$. Diferenças significativas são relativas ao grupo controle (CT- linha).



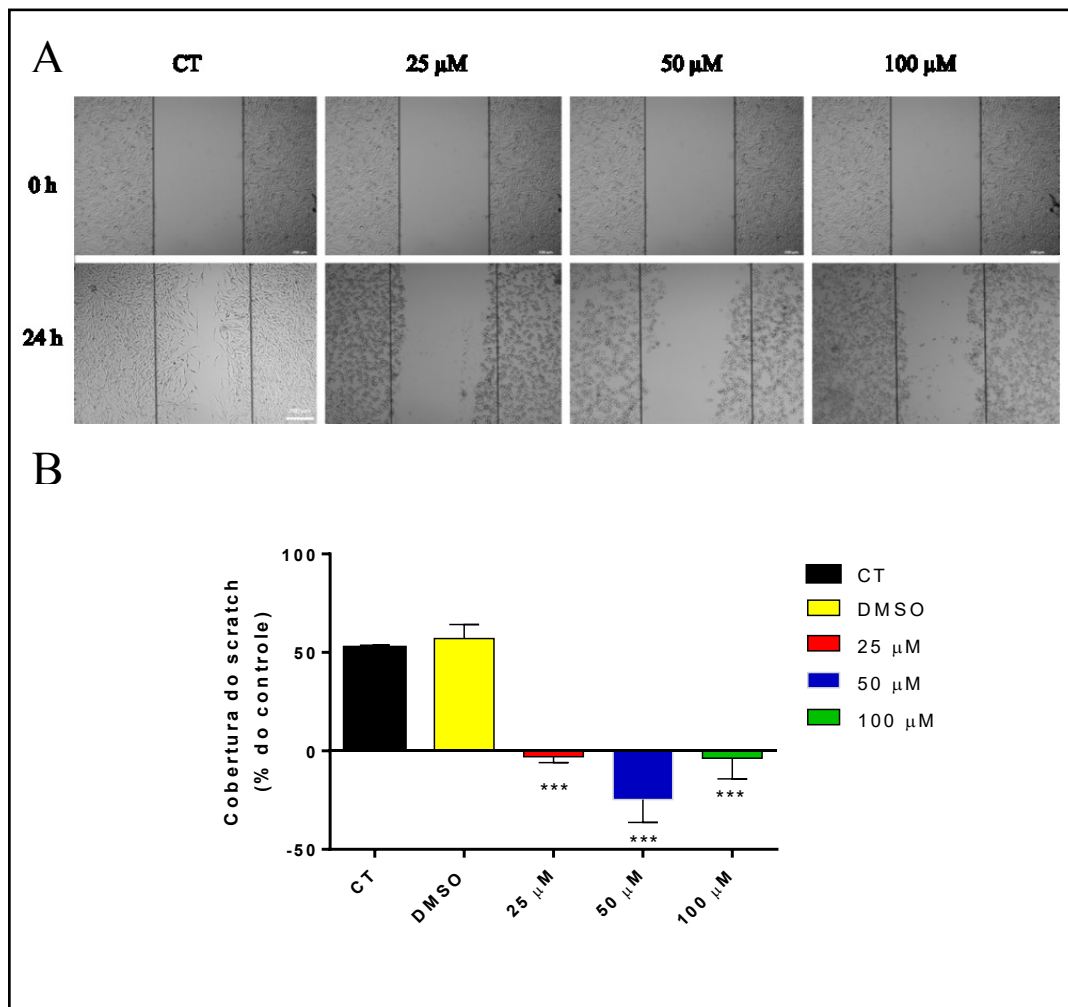
4.2 A chalcona Q1VA impede a migração celular

Para avaliar o efeito da chalcona Q1VA na migração das células de GBM1, foi realizado o ensaio de *Wound Healing (scratch)*.

A chalcona Q1VA foi testada nas concentrações de 25 μM , 50 μM e 100 μM , sendo que todas as concentrações impediram totalmente a migração das células de GBM1, após 24 horas de tratamento. No controle (meio de cultura) as células fecharam a ranhura em torno de 50 % e o controle com DMSO em 43 % (Figuras 7 A e B). Esses resultados indicam que a chalcona Q1VA interfere na capacidade das células de GBM1 migrarem.

Figura 7: A chalcona Q1VA diminui a migração celular em GBM1

Após a confluência, foi feito um risco nos poços com uma ponteira de 200 μL nas células de GBM1 e tratou-se por 24 horas nas concentrações de 25 μM , 50 μM e 100 μM . (A) Imagem representativa do *scratch* nos tempos de 0 e 24 horas. (B) Quantificação gráfica do ensaio de *scratch*. Dados foram expressos com média \pm desvio padrão de três experimentos independentes. *** $p < 0,001$; * $p < 0,05$ representando diferença significativa em comparação ao grupo controle (ANOVA de uma via seguida pelo teste de Newman Keuls).



4.3 A chalcona Q1VA promove alteração na produção de espécies reativas de oxigênio (EROS) nas células de GBM1

As EROs foram quantificadas através da incorporação da sonda DCFH-DA, nos tempos de 6, 12 e 24 horas após o tratamento com a chalcona Q1VA, nas concentrações de 50 μM , 100 μM , 150 μM e 200 μM (Figura 8).

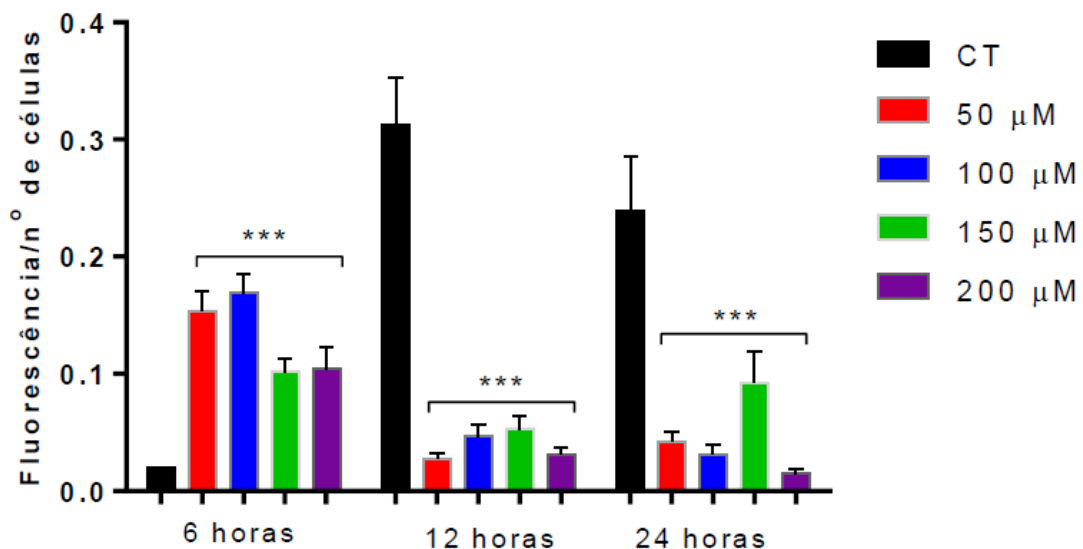
Com 6 horas de tratamento, os níveis de EROs para a concentração de 50 μM 7,4 vezes maior que o controle. Para 100 μM os níveis aumentaram em 8,2 vezes, em 150 μM 4,9 vezes maior e para 200 μM os níveis de EROS foram aumentados em 5,1 vezes.

Para o tempo de 12 horas, observou-se diminuição dos níveis de EROs em relação ao controle em 11,2, 6,7, 5,9 e 9,9 vezes para as concentrações de 50 μM , 100 μM , 150 μM e 200 μM , respectivamente.

Com 24 horas após o início do tratamento, os níveis de EROs também foram reduzidos em 5,6, 7,5, 2,6 e 15,8 vezes em relação ao controle, para as concentrações de 50 μM , 100 μM , 150 μM e 200 μM , respectivamente.

Figura 8: A chalcona Q1VA promove alteração na produção de EROs nas células de GBM1.

Quantificação gráfica dos valores de fluorescência da sonda DCF-DA após o tratamento por com a chalcona por 6, 12 e 24 horas. Dados foram expressos como média \pm erro padrão de três experimentos independentes. *** $p < 0,001$; representando diferença significativa em comparação ao grupo controle (ANOVA de duas vias).



4.4 A Chalcona Q1VA altera o Potencial de Membrana Mitocondrial ($\Delta\Psi_m$)

As mitocôndrias são importantes desencadeadoras da cascata apoptótica. Desta forma foi estudado o efeito da chalcona Q1VA no potencial de membrana mitocondrial ($\Delta\Psi$). Ao investigar a funcionalidade das mitocôndrias ($\Delta\Psi$), através do ensaio de incorporação de TMRE, identificou-se a fluorescência máxima nas células do controle, refletindo a funcionalidade das mitocôndrias nestas células.

O tratamento com a chalcona Q1VA nas concentrações de 50 μM , 100 μM , 150 μM e 200 μM por 24 horas resultou numa redução do $\Delta\Psi_m$ (Figura 9) em todas as concentrações da chalcona. Os resultados indicam que mesmo com o aumento da concentração da chalcona, o $\Delta\Psi_m$ permanece semelhante, aparentemente sem ser um efeito dose dependente.

Figura 9: A chalcona Q1VA promove alteração no $\Delta\Psi_m$.

Após a confluência, as células de GBM1 foram tratadas com a chalcona Q1VA e após 24 horas foi realizado o ensaio TMRE. FCCP foi utilizado como controle positivo da sonda. Os controles foram incubados com meio de cultura pelo mesmo período do tratamento. Os valores de fluorescência foram divididos pelo número total de células correspondente a cada grupo. Dados expressos como média desvio padrão de três experimentos independentes. *** $p < 0,0001$ representando diferença significativa em comparação ao grupo controle (ANOVA de uma via seguida pelo teste de Newman Keuls).

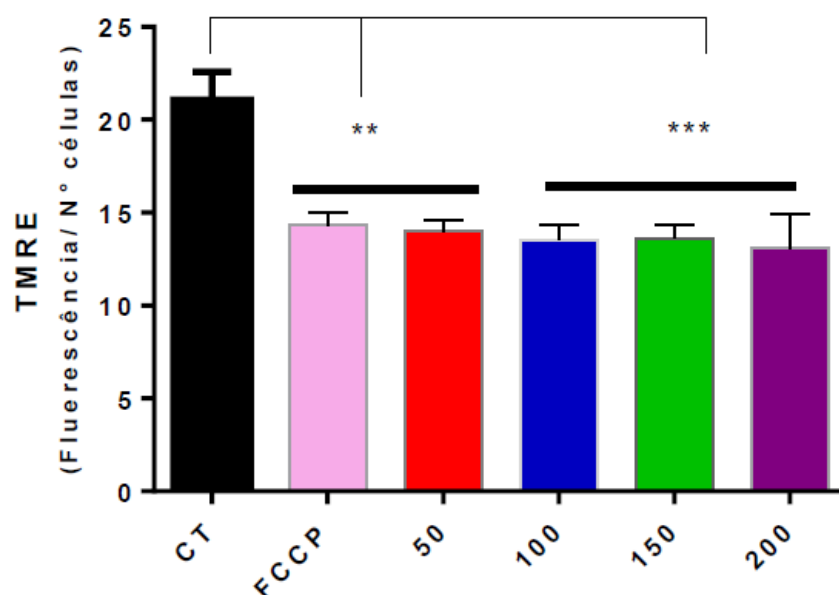


Tabela 3: Percentuais de redução do $\Delta\Psi_m$ após o tratamento com a chalcona Q1VA por 24 horas.

FCCP	50 μM	100 μM	150 μM	200 μM
68 %	66 %	64 %	64 %	61 %

4.5 A chalcona Q1VA promove apoptose nas células de GBM1

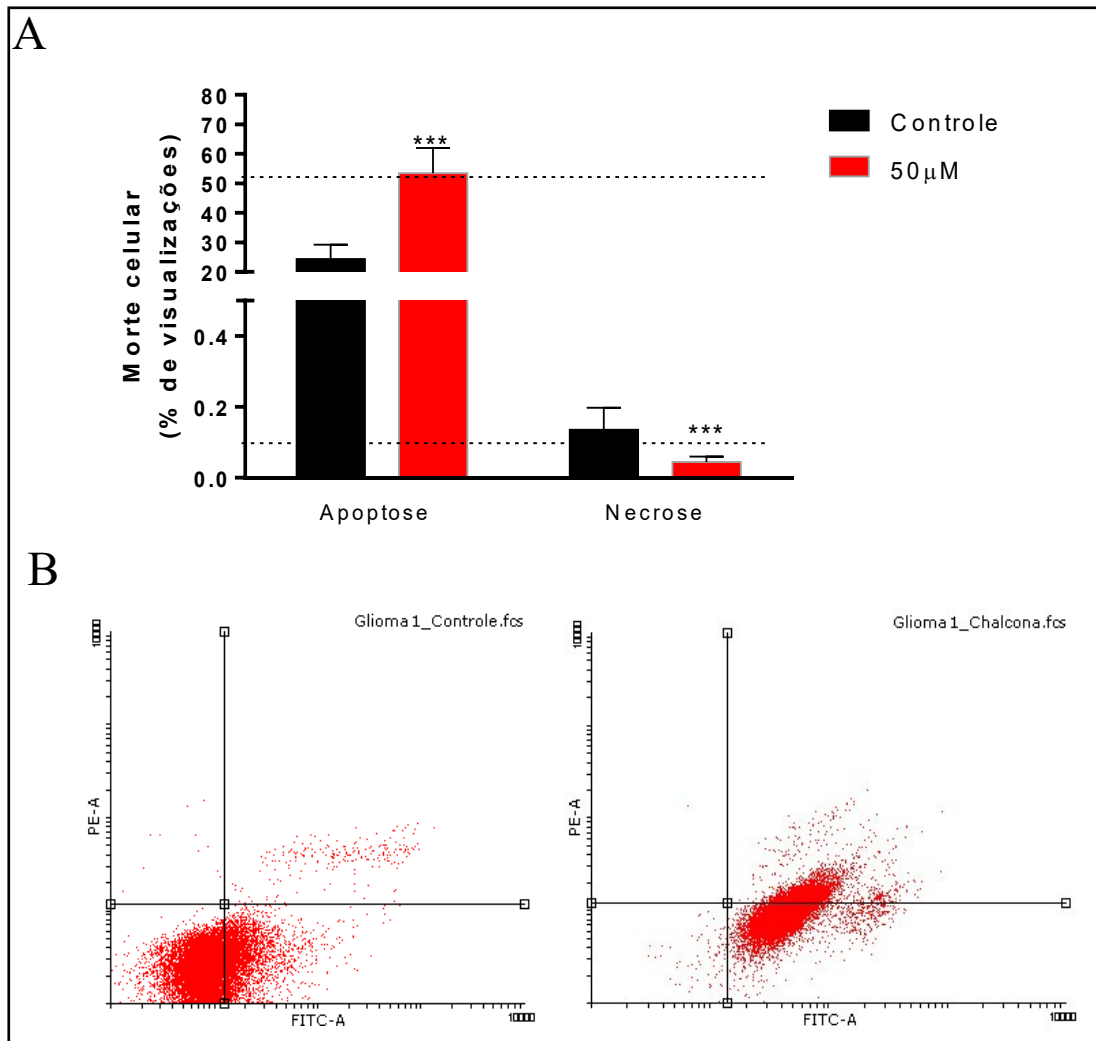
Para avaliar se o efeito citotóxico da Q1VA nas células de GBM1 estavam relacionados à morte celular apoptótica ou necrótica, as mesmas foram tratadas com 50 μM da chalcona por 24 horas e depois analisadas por citometria de fluxo utilizando o *kit* Anexina V-FITC.

Conforme a figura 10A, o tratamento aumentou significativamente o número de células apoptóticas. A morte por apoptose no controle representou 24 %, enquanto no grupo tratado observou-se uma taxa de 53 % na apoptose dessas células.

Os níveis de morte por necrose não diferiram entre o grupo tratado em comparação ao grupo controle, ficando com um valor de p de 0,2011. Porém conforme o gráfico c, os níveis de morte por necrose ficou menor no grupo tratado em relação ao grupo controle.

Figura 10: Chalcona induz a morte por apoptose sem aumentar os níveis de necrose.

A) As células GBM1 foram semeadas em placas de 24 poços; após a confluência foram tratadas com 50 μ M de chalcona Q1VA; decorrido o tempo de 24 horas, foi realizado o ensaio de citometria de fluxo. Gráfico de % de visualizações de apoptose e necrose no controle e no grupo tratado. B) Imagem dos *Dot Plots* obtidos através da análise dos resultados para a apoptose. Dados expressos como média \pm desvio padrão de três experimentos independentes.



4.6 A chalcona Q1VA altera o ciclo celular nas células de GBM1

Para análise da influência da chalcona Q1VA no ciclo celular, as células de GBM1 foram tratadas com 50 μM e 100 μM da chalcona. Foi observado que houve uma redução no número de células na fase G0/G1 em relação ao controle (Figura 11). No grupo controle 81 % das visualizações correspondem à fase G0/G1. Com o tratamento com 50 μM da Q1VA essa taxa é reduzida para 64 % e com 100 μM em 67 % das visualizações.

Com relação à fase M, o tratamento com 50 μM representou a maior taxa visualizada, correspondendo a 33 %, enquanto o tratamento com 100 μM ficou em 23 % e o controle em 10 % das visualizações, conforme tabela 4.

Na fase S, não foram observadas diferenças entre os tratamentos e o controle.

Figura 11: A chalcona altera o ciclo celular das células de GBM1.

As células GBM1 foram semeadas em placas de 24 poços e após a confluência foram tratadas com 50 μM e 100 μM da chalcona Q1VA. Após 24 horas de tratamento, foi realizado o ensaio de ciclo celular por incorporação de iodeto de propídeo. (A) Quantificação gráfica de % de visualizações das fases do ciclo celular no controle e no grupo tratado. (B) Sobreposição dos picos do ciclo celular com o grupo controle e o grupo tratado com 50 μM de Q1VA. Dados expressos com média \pm desvio padrão de três experimentos independentes. *** $p < 0,0001$.

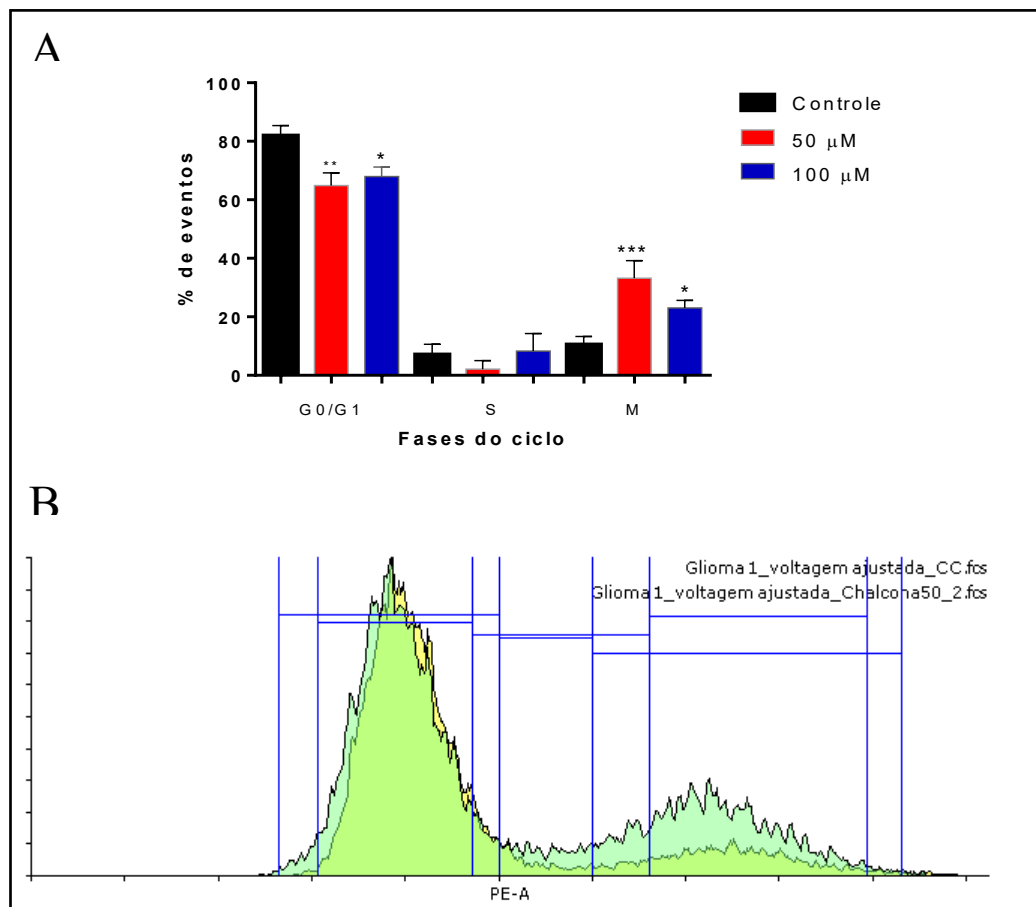


Tabela 4: Porcentagens das visualizações das fases do ciclo celular

	<i>G0/G1</i>	<i>S</i>	<i>M</i>
<i>Controle</i>	81 %	7 %	10 %
<i>Q1VA 50 μM</i>	64 %	2 %	33 %
<i>Q1VA 100 μM</i>	67 %	8 %	23 %

5. Discussão

Os gliomas representam um desafio para a pesquisa atual. Avanços no estudo desse tipo de tumor nas abordagens molecular, genética e celular cresceram nos últimos anos. Foram identificados mecanismos de escape, de reincidência, de alterações de vias metabólicas, entre outras. Contudo, a letalidade dos gliomas continua elevada, pois nenhum avanço promissor foi encontrado no âmbito terapêutico (DAVIS, M. E., 2016). Deste modo, estudos envolvendo atividade antitumoral por compostos alternativos deve ser investigada principalmente na busca de fármacos naturais que aumentem a qualidade e a sobrevida destes pacientes acometidos por este tumor.

Com isto, esse trabalho buscou investigar a atividade antitumoral das chalconas sintéticas, visto que diversos trabalhos na literatura correlacionam atividade antitumoral de chalconas em linhagem de carcinoma, em linhagens de câncer de mama, na linhagem de glioblastoma U87, assim como em GBM1 (BITTENCOURT *et al.*, 2016b; KHAN, N. S. *et al.*, 2018; MAKHDOUMI *et al.*, 2017).

Neste trabalho, foi verificado que a chalcona Q1VA possui efeito citotóxico a partir de 50 μM , diferente do que encontramos na literatura, pois estudos com outras chalconas demonstraram que elas conseguiram reduzir a viabilidade celular com concentrações abaixo de 50 μM . Em células de GBM1 foi descrito concentrações de 10 μM (BITTENCOURT *et al.*, 2016b), enquanto que em células HEK-293 (*human embryonic kidney*) e em células de câncer de fígado (*HepG2*), foram descritas concentrações abaixo de 20 μM (KHAN, N. S. *et al.*, 2018; MAKHDOUMI *et al.*, 2017). As diferenças nas concentrações podem ser explicadas pelas diferentes estruturas químicas das chalconas estudadas. Após comprovar a atividade citotóxica da chalcona, investigamos qual seria a via de morte induzida, assim como as alterações celulares promovidas após o tratamento com a Q1VA.

Foi identificado que a chalcona Q1VA dobra os níveis de morte celular por apoptose sem causar aumento significativo na morte por necrose, sendo essa taxa menor que a taxa identificado no grupo controle. Esse efeito é considerado positivo, visto que a morte por necrose em GBM é considerada com um fator de progressão tumoral, pois a necrose causa a liberação de fatores de crescimento tumoral e fatores angiogênicos, além de outros. Em um estudo que avaliou a extensão da necrose em diversos pacientes com GBM, foi mostrado uma correlação inversamente proporcional do grau de necrose com a sobrevivência do paciente (LACROIX *et al.*, 2001).

Bittencourt *et al.* (2016b) identificaram que as taxas de apoptose das células de GBM1 após o tratamento com chalconas aumentam significativamente, o que é um fator desejável para a diminuição da progressão tumoral. A apoptose pode ser desencadeada por 3 vias: a via intrínseca, a via extrínseca e a via Granzima B. Estudos anteriores demonstraram que as chalconas têm a capacidade de induzir um aumento nos níveis de Bcl-2 e Bcl-XL, ativando a via apoptótica mitocondrial. Além disso, a apoptose pode ser também desencadeada pela perda do potencial de membrana e como consequência ocorre a liberação de citocromo *c* (NISHIMURA *et al.*, 2007). Levando em consideração a importância das mitocôndrias, foi investigado os efeitos da Q1VA sobre o potencial de membrana mitocondrial.

Ao testar os efeitos da Q1VA no potencial da membrana mitocondrial interna ($\Delta\psi$), foi identificado que a chalcona ocasionou a despolarização da membrana em mais de 60 % nas células de GBM1 em todas as concentrações testadas, sendo um indicativo da possível via de ativação de apoptose desse composto nas células GBM1, porém mais estudos serão necessários para confirmar essa via. Resultados semelhantes foram observados com o composto fenólico (*xanthohumol*) em células de GBM (*T98G*), onde a apoptose foi mediada pela via mitocondrial, pois o composto causou uma despolarização da mitocôndria, liberação de citocromo *c* e supressão das proteínas antiapoptóticas Bcl-2 (FESTA *et al.*, 2011).

Sabe-se que as mitocôndrias desempenham um papel importante na regulação da morte por apoptose, pois a perda do $\Delta\psi$ induzido por algum composto acarreta na transição da permeabilidade mitocondrial (TPM) (LOEFFLER; KROEMER, 2000). Essa transição na permeabilidade permite que a água do espaço entre as membranas passe para a matriz mitocondrial, rompendo a organela e liberando por consequência proteínas pró-apoptóticas como o citocromo *c* e AIF (fator indutor de apoptose) para o citoplasma, iniciando assim a cascata apoptótica. Não obstante, a perda do $\Delta\psi$ e TPM acarretam na perda da homeostasia celular, pois interrompem a síntese de ATP e aumentam a produção de EROs. Esse aumento nos níveis de EROs leva à oxidação de lipídeos, proteínas e ácidos nucléicos, aumentando o colapso do $\Delta\psi$ (GOTTLIEB; HEIDEN, VANDER; THOMPSON, C. B., 2000; GREEN; KROEMER, 2004). Foi reportado também que algumas chalconas são capazes de induzir a apoptose em linhagens de glioblastoma (*T98G* e *U87MG*), por promover mudanças no $\Delta\psi$, na fosforilação de MAPKs (*mitogen-activated protein kinase*) e pelo aumento dos níveis de EROs (FESTA *et al.*, 2011).

Visto que as EROs podem estar envolvidas com a perda do $\Delta\psi$, estudamos os efeitos da Q1VA sobre a produção de EROs em células de GBM1. Estudos demonstraram que algumas chalconas e flavonoides conseguem desencadear a apoptose por meio da modulação de vias de transdução de sinal, como a do fosfatidilinositol-3-quinase/serina treonina quinase/ fosfatidilinositol-3-quinase/ proteína kinase B (PI3K/AKT) e alterando as funções celulares por fosforilação de proteínas e/ou regulações gênicas (RAMOS, 2008).

O aumento na produção de EROs pode ainda levar a um fenômeno conhecido como liberação de EROs induzida por EROs – RIRR (*ROS-induced ROS release*), ou seja, uma cascata de produção de EROs. Este fenômeno ocorre quando há um pico na produção de EROs desencadeado por diversos fatores, como por exemplo, estresse celular, injúria, isquemia, substâncias tóxicas ou no presente caso, substância citotóxica (chalcona), acarretando a abertura de canais mitocondriais, como o TPM e o canal de ânion da membrana interna da mitocôndria – IMAC (*inner membrane anion channel*). Estas levam a um colapso do $\Delta\psi$, causando um aumento transitório de EROs no citosol. No citosol, as EROs agem como um segundo mensageiro para causar RIRR em mitocôndrias próximas, causando um efeito em cadeia positivo com injúrias mitocondriais e celulares significativas (ZOROV; JUHASZOVA; SOLLITT, 2006).

Outra hipótese para o aumento dos níveis de apoptose poderia ser que compostos naturais ao induzir aumento de EROS, provocam um estresse oxidativo no retículo endoplasmático rugoso (RER), desencadeando assim a apoptose (FAROOQI *et al.*, 2015). Contudo, os mecanismos bioquímicos e moleculares da ação pró-apoptótica da Q1VA em células de cultura primária de GBM devem ser investigados mais a fundo.

Nesse sentido, foi observado que a Q1VA induz aumento das EROs nas 6 primeiras horas, decaindo nas 12 e 24 horas após o tratamento com diferentes concentrações. Sabendo-se que as EROs são fatores extremamente controlados intracelularmente e que seus altos níveis no citosol podem estimular a apoptose (RAE *et al.*, 2013), verificamos que as chalconas utilizadas são capazes de causar aumento no nível de EROs, podendo causar apoptose em células GBM1.

Investigamos também o efeito da chalcona Q1VA sobre as taxas de proliferação celular. Esta chalcona demonstrou ter capacidade de diminuir o número de células na fase G0/G1 e aumentar na fase G2/M, sem interferir na fase S. Isso pode acontecer por vários motivos, como por exemplo: dano no DNA causado pela chalcona, que não permite que a célula passe

no *check point* da fase G/2M (YOON, J.-T. *et al.*, 2002). Bittencourt *et al.* (2016b) também identificaram que outro tipo de chalcona causava um atraso no ciclo celular, deixando as células paradas na fase G/2M. Boumendjel *et al.* (2009) identificaram que estas moléculas derivadas de chalconas são capazes de bloquear a despolimerização dos microtúbulos das fibras do fuso, impedindo assim a proliferação celular (BOUMENDJEL, Ahcene *et al.*, 2009).

Estudos anteriores demonstraram também que as chalconas modulam o atraso no ciclo celular por diferentes mecanismos, sendo um destes por regulação negativa de CKD2 que induz parada nas fases S e G2/M (BITTENCOURT *et al.*, 2016b; LEON-GONZALEZ *et al.*, 2015). Esses efeitos causados pela chalconas poderiam afetar a capacidade dessas células de migrarem.

Reduções no comportamento de migração celular de qualquer tipo de câncer também é um importante alvo no estudo de compostos para atividade antitumoral. Estudos demonstrando a ação das chalconas sobre a capacidade migratória já foram publicados por outros grupos de estudos, onde ocorre uma inibição a transição epitélio-mesenquimal (TEM) através da redução da expressão de metaloproteases e N-caderina (HAFEEZ, B. Bin *et al.*, 2017; LIMA *et al.*, 2012).

Ao investigar o poder da Q1VA na capacidade de migração das células de GBM1, foi observado que as células não migraram pela ferida causada na monocamada celular após o tratamento, concluindo que o tratamento com a Q1VA ocasionou a imobilidade dessas células. Em trabalhos avaliando a capacidade anti-migratória das chalconas, foi demonstrado que um híbrido de chalcona causa o mesmo efeito em células de câncer de mama (KHAN, N. S. *et al.*, 2018). Um composto sintético análogo à chalcona, teve um efeito semelhante na migração de células HUVECs. Foi observado que essa molécula é capaz de impedir a migração e reduzir a expressão de metaloproteases e, por consequência, diminuir o poder de invasão (PILATOVA *et al.*, 2010). Porém, outros experimentos são necessários para elucidar o poder anti-invasivo da chalcona em GBM1.

Neste trabalho foi estudada a ação citotóxica de três chalconas sintéticas (Q1VA, Q2VA e Q18VA) em células de glioblastoma. Observamos que a chalcona Q1VA foi a que demonstrou melhores resultados na redução da viabilidade destas células e por essa razão, os tratamentos subsequentes foram realizados com esta substância. A chalcona Q1VA reduziu a migração das células de GBM1, aumentou os níveis de EROs, alterando o potencial de membrana mitocondrial e também o ciclo celular, o que pode explicar o aumento nos níveis

de apoptose causado nestas células. Apesar destes resultados positivos, outros estudos são necessários a fim de se compreender os mecanismos moleculares envolvidos no efeito citotóxico da chalcona Q1VA sobre as células de GBM1.

6. Conclusões

Através dos resultados obtidos neste trabalho, concluímos que:

- O tratamento com a chalcona Q1VA diminuiu a viabilidade das células de GBM1;
- A Q1VA induziu um aumento nos níveis de apoptose, sem aumentar os de necrose;
- A Q1VA causou despolarização da membrana mitocondrial;
- A Q1VA aumentou os níveis de EROs nas primeiras horas de tratamento;
- O tratamento alterou o ciclo celular, com atraso na proliferação das células de GBM1;
- Após o tratamento, a Q1VA impediu a migração.

Com base nesses resultados, observamos que a Q1VA tem influência nos processos básicos celulares. Porém, estudos adicionais se fazem necessário para elucidar os mecanismos de ação, moleculares e bioquímicos da chalcona nas células de GBM1.

7. Referências

ABREY, L. E. Concomitant chemoradiotherapy followed by adjuvant temozolomide improves survival in glioblastoma multiforme. **Curr Neurol Neurosci Rep**, 2005. v. 5, n. 3, p. 167–168. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15865881>>.

AGGARWAL, B. B. *et al.* Targeting inflammatory pathways by dietary agents for prevention and therapy of cancer. **Journal of Food and Drug Analysis**, 2012. v. 20, n. SUPPL.1, p. 231–236. Disponível em: <<http://ovidsp.ovid.com?T=JS&CSC=Y&NEWS=N&PAGE=fulltext&D=emed10&AN=2012400406%5Cnhttp://library.newcastle.edu.au:4550/resserv?sid=OVID:embase&id=pmid:&id=&issn=1021-9498&isbn=&volume=20&issue=SUPPL.1&spage=231&pages=231-236&date=2012&title=Journal+of+Foo>>.

AL-RIKABI, A C. *et al.* Metastatic deposits of a high-grade malignant glioma in cervical lymph nodes diagnosed by fine needle aspiration (FNA) cytology--case report and literature review. **Cytopathology : official journal of the British Society for Clinical Cytology**, 1997. v. 8, n. 6, p. 421–7. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9439895>>.

ALCANTARA LLAGUNO, S. R.; PARADA, L. F. Cell of origin of glioma: biological and clinical implications. **British Journal of Cancer**, 2016. v. 115, n. 12, p. 1445–1450. Disponível em: <<http://www.nature.com/doi/10.1038/bjc.2016.354>>.

BARRES, B. A. What is a glial cell? **Glia**, 2003. v. 43, n. 1, p. 4–5.

BIRBILIS, T. A. *et al.* Spinal metastasis of glioblastoma multiforme: An uncommon suspect? **Spine**, 2010. v. 35, n. 7, p. 43–45.

BITTENCOURT, L. F. F. *et al.* Novel synthetic chalcones induces apoptosis in human glioblastoma cells. **Chemico-Biological Interactions**, 2016a. v. 252, p. 74–81. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.cbi.2016.03.022>>.

_____ *et al.* Novel synthetic chalcones induces apoptosis in human glioblastoma cells. **Chemico-Biological Interactions**, 2016b. v. 252, p. 74–81.

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**, 2009. v. 9, p. 1–11.

BOUSSIOTIS, V. A.; CHAREST, A. Immunotherapies for malignant glioma. **Oncogene**, 2018. v. 37, n. 9, p. 1121–1141. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1038/s41388-017-0024-z>>.

BROWNE, K. A. *et al.* Filamin (280-kDa actin-binding protein) is a caspase substrate and is also cleaved directly by the cytotoxic T lymphocyte protease granzyme B during apoptosis. **Journal of Biological Chemistry**, 2000. v. 275, n. 50, p. 39262–39266.

BUTOWSKI, N. A. Epidemiology and diagnosis of brain tumors. **CONTINUUM Lifelong Learning in Neurology**, 2015. v. 21, n. 2, p. 301–313. Disponível em: <<http://www.scopus.com/inward/record.url?eid=2-s2.0-84926511460&partnerID=40&md5=9c22cd201d8432f4205f62cf9aa319f6>>

CAIRNCROSS, G. *et al.* Phase III trial of chemotherapy plus radiotherapy compared with radiotherapy alone for pure and mixed anaplastic oligodendroglioma: Intergroup Radiation Therapy Oncology Group trial 9402. **Journal of Clinical Oncology**, 2006. v. 24, n. 18, p. 2707–2714.

CHAMPELOVIER, P. *et al.* Cellular and molecular mechanisms activating the cell death processes by chalcones: Critical structural effects. **Toxicology in Vitro**, 2013. v. 27, n. 8, p. 2305–2315. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.tiv.2013.09.021>>.

CHANG, Y. C. *et al.* Inhibition of cell cycle progression by penta-acetyl geniposide in rat C6 glioma cells. **Toxicology and Applied Pharmacology**, 2004. v. 198, n. 1, p. 11–20.

CHEN, G. *et al.* A natural chalcone induces apoptosis in lung cancer cells: 3D-QSAR, docking and an in vivo/vitro assay. **Scientific Reports**, 2017. v. 7, n. 1, p. 10729. Disponível em: <<http://www.nature.com/articles/s41598-017-11369-9>>.

COTTER, T. G. Apoptosis and cancer: the genesis of a research field. **Nature Reviews Cancer**, 2009. v. 9, n. 7, p. 501–507. Disponível em: <<http://www.nature.com/doifinder/10.1038/nrc2663>>.

CREAGH, E. M.; CONROY, H.; MARTIN, S. J. Caspase-activation pathways in apoptosis and immunity. **Immunological reviews**, 2003. v. 193, p. 10–21. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12752666>>.

D'HAENE, N. *et al.* Galectins and neovascularization in central nervous system tumors. **Glycobiology**, 2014. v. 24, n. 10, p. 892–898.

DAVIS, M. E. HHS Public Access. **Clin J Oncol Nurs**, 2016. v. 20, n. 5, p. 1–14.

DECAESTECKER, C. *et al.* Can anti-migratory drugs be screened in vitro? A review of 2D and 3D assays for the quantitative analysis of cell migration. **Medicinal Research Reviews**, 2007. v. 27, n. 2, p. 149–176.

DEIMLING, A. Von. **Gliomas**. [S.l.]: [s.n.], 2009.

DEMUTH, T.; BERENS, M. E. Molecular mechanisms of glioma cell migration and invasion. **Journal of Neuro-Oncology**, 2004. v. 70, n. 2, p. 217–228.

DIRKS, P. B. Brain tumor stem cells: The cancer stem cell hypothesis writ large. **Molecular Oncology**, 2010. v. 4, n. 5, p. 420–430.

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

FAROOQI, A. A. *et al.* Anticancer drugs for the modulation of endoplasmic reticulum stress and oxidative stress. **Tumor Biology**, 2015. v. 36, n. 8, p. 5743–5752. Disponível em: <<http://link.springer.com/10.1007/s13277-015-3797-0>>.

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**, 2011. v. 74, n. 12, p. 2505–2513.

FORD, J. W.; MCVICAR, D. W. NIH Public Access. **Cancer**, 2010. v. 19, n. 1, p. 38–46. Disponível em:

<http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=2886992&tool=pmcentrez&render_type=abstract>.

FRIEDMAN, H. S.; KERBY, T.; CALVERT, H. Temozolomide and Treatment of Malignant Glioma. *Journal of Neuro-Oncology*, 2000. v. 6, n. July, p. 2585–2597.

FUCHIGAMI, T. *et al.* Synthesis and evaluation of ethyleneoxylated and allyloxylated chalcone derivatives for imaging of amyloid β plaques by SPECT. **Bioorganic and Medicinal Chemistry**, 2014. v. 22, n. 9, p. 2622–2628.

Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.bmc.2014.03.032>>.

GOLSTEIN, P.; KROEMER, G. Cell death by necrosis: towards a molecular definition. **Trends in Biochemical Sciences**, 2007. v. 32, n. 1, p. 37–43.

GOTTLIEB, E.; HEIDEN, M. G. VANDER; THOMPSON, C. B. Bcl-x(L) prevents the initial decrease in mitochondrial membrane potential and subsequent reactive oxygen species production during tumor necrosis factor alpha-induced apoptosis. **Molecular and cellular biology**, 2000. v. 20, n. 15, p. 5680–5689.

GREEN, D. R.; KROEMER, G. The pathophysiology of mitochondrial cell death. **Science**, 2004. v. 305, n. 5684, p. 626–629.

GREENALL, S. A. *et al.* Cyclin-dependent kinase 7 is a therapeutic target in high-grade glioma. **Oncogenesis**, 2017. v. 6, n. 5, p. e336-13. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1038/oncsis.2017.33>>.

HAFEEZ, B. Bin *et al.* Ormeloxifene Suppresses Prostate Tumor Growth and Metastatic Phenotypes via Inhibition of Oncogenic β -catenin Signaling and EMT Progression. **Molecular Cancer Therapeutics**, 2017. v. 16, n. 10, p. 2267–2280. Disponível em: <<http://mct.aacrjournals.org/lookup/doi/10.1158/1535-7163.MCT-17-0157>>.

HEYWOOD, R. M. *et al.* A review of the role of stem cells in the development and treatment of glioma. **Acta Neurochirurgica**, 2012. v. 154, n. 6, p. 951–969. Disponível em: <<http://link.springer.com/10.1007/s00701-012-1338-9>>.

HOCHEGGER, H.; TAKEDA, S.; HUNT, T. Cyclin-dependent kinases and cell-cycle transitions: Does one fit all? **Nature Reviews Molecular Cell Biology**, 2008. v. 9, n. 11, p. 910–916.

HRYCAY, E. G.; BANDIERA, S. M. **Involvement of Cytochrome P450 in Reactive Oxygen Species Formation and Cancer**. 1. ed. [S.l.]: Elsevier Inc., 2015.

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

JAMJOOM, A. B. *et al.* Cervical lymph node metastasis from a glioblastoma multiforme in a child: Report of a case and a review of the literature. **Annals of Saudi Medicine**, 1997. v. 17, n. 3, p. 340–343.

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**, 2010. v. 62, n. 3, p. 402–412.

JIANG, Y.; UHRBOM, L. On the origin of glioma. **Upsala Journal of Medical Sciences**, 2012. v. 117, n. 2, p. 113–121. Disponível em: <<http://www.tandfonline.com/doi/full/10.3109/03009734.2012.658976>>.

KARSY, M.; GUAN, J.; HUANG, L. E. Prognostic role of mitochondrial pyruvate carrier in isocitrate dehydrogenase–mutant glioma. **Journal of Neurosurgery**, 2018. p. 1–11. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/29547090>> <<http://thejns.org/doi/10.3171/2017.9.JNS172036>>.

KHAN, N. S. *et al.* Thienopyrimidine–Chalcone Hybrid Molecules Inhibit Fas-Activated Serine/Threonine Kinase: An Approach To Ameliorate Antiproliferation in Human Breast Cancer Cells. **Molecular Pharmaceutics**, 2018. p. acs.molpharmaceut.8b00566. Disponível em: <<http://pubs.acs.org/doi/10.1021/acs.molpharmaceut.8b00566>>.

KIEKOW, C. J. *et al.* Quercetin derivative induces cell death in glioma cells by modulating NF- κ B nuclear translocation and caspase-3 activation. **European Journal of Pharmaceutical**

Sciences, 2016. v. 84, p. 116–122. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.ejps.2016.01.019>>.

KONTOGIORGIS, C.; MANTZANIDOU, M.; HADJIPAVLOU-LITINA, D. Chalcones and their potential role in inflammation. **Mini reviews in medicinal chemistry**, 2008. v. 8, n. 12, p. 1224–1242.

KRAJEWSKI, S. *et al.* Immunohistochemical analysis of Bcl-2, Bcl-X, Mcl-1, and Bax in tumors of central and peripheral nervous system origin. **The American journal of pathology**, 1997. v. 150, n. 3, p. 805–814.

KUETE, V. *et al.* Cytotoxicity of three naturally occurring flavonoid derived compounds (artocarpesin, cycloartocarpesin and isobavachalcone) towards multi-factorial drug-resistant cancer cells. **Phytomedicine**, 2015. v. 22, n. 12, p. 1096–1102. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.phymed.2015.07.006>>.

LACROIX, M. *et al.* A multivariate analysis of 416 patients with glioblastoma multiforme: prognosis, extent of resection, and survival. **Journal of Neurosurgery**, 2001. v. 95, n. 2, p. 190–198. Disponível em: <<http://thejns.org/doi/10.3171/jns.2001.95.2.0190>>.

LEON-GONZALEZ, A. *et al.* Chalcones as Promising Lead Compounds on Cancer Therapy. **Current Medicinal Chemistry**, 2015. v. 22, n. 30, p. 3407–3425. Disponível em: <<http://www.eurekaselect.com/openurl/content.php?genre=article&issn=0929-8673&volume=22&issue=30&spage=3407>>.

LEVER, E.; SHEER, D. The role of nuclear organization in cancer. **The Journal of pathology**, 2010. v. 220, n. September, p. 114–125.

LIMA, F. R. S. *et al.* Glioblastoma: Therapeutic challenges, what lies ahead. **Biochimica et Biophysica Acta - Reviews on Cancer**, 2012. v. 1826, n. 2, p. 338–349. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.bbcan.2012.05.004>>.

LIN, S. H.; KLEINBERG, L. R. Carmustine wafers: localized delivery of chemotherapeutic agents in CNS malignancies. **Expert Review of Anticancer Therapy**, 2008. v. 8, n. 3, p. 343–359. Disponível em: <<http://www.tandfonline.com/doi/full/10.1586/14737140.8.3.343>>.

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**, 2009. v. 63, n. 6, p. 1007–1016.

LOCH-NECKEL, G. *et al.* In vitro and in vivo anti-glioma activity of a chalcone-quinoxaline hybrid. **European Journal of Medicinal Chemistry**, 2015. v. 90, p. 93–100.

LOEFFLER, M.; KROEMER, G. The mitochondrion in cell death control: Certainties and incognita. **Experimental Cell Research**, 2000. v. 256, n. 1, p. 19–26.

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

_____ *et al.* The 2016 World Health Organization Classification of Tumors of the Central Nervous System: a summary. **Acta Neuropathologica**, 2016. v. 131, n. 6, p. 803–820.

LUN, M. *et al.* The natural history of extracranial metastasis from glioblastoma multiforme. **Journal of Neuro-Oncology**, 2011. v. 105, n. 2, p. 261–273.

MAIORAL, M. F. *et al.* Apoptotic events induced by synthetic naphthylchalcones in human acute leukemia cell lines. **Biochimie**, 2013. v. 95, n. 4, p. 866–874. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.biochi.2012.12.001>>.

MAKHDOUMI, P. *et al.* Evaluation of cytotoxicity effects of chalcone epoxide analogues as a selective COX-II inhibitor in the human liver carcinoma cell line. **Journal of Pharmacopuncture**, 2017. v. 20, n. 3, p. 207–212.

MANDA, G.; NECHIFOR, M. T.; NEAGU, T.-M. Reactive Oxygen Species, Cancer and Anti-Cancer Therapies. **Current Chemical Biology**, 2009. v. 3, n. 1, p. 342–366. Disponível em: <<http://openurl.ingenta.com/content/xref?genre=article&issn=1872-3136&volume=3&issue=1&spage=342>>.

NISHIMURA, R. *et al.* Isobavachalcone, a Chalcone Constituent of *Angelica keiskei*, Induces Apoptosis in Neuroblastoma. **Biological & Pharmaceutical Bulletin**, 2007. v. 30, n. 10, p. 1878–1883. Disponível em:
<<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17917255>%5Cn<http://joi.jlc.jst.go.jp/JST.JSTAGE/bpb/30.1878?from=CrossRef>>.

NOWAKOWSKA, Z. A review of anti-infective and anti-inflammatory chalcones. **European Journal of Medicinal Chemistry**, 2007. v. 42, n. 2, p. 125–137.

OHGAKI, H.; KLEIHUES, P. Genetic alterations and signaling pathways in the evolution of gliomas. **Cancer Science**, 2009. v. 100, n. 12, p. 2235–2241.

OSTROM, Q. T.; BAUCHET, L.; *et al.* The epidemiology of glioma in adults: A state of the science review. **Neuro-Oncology**, 2014. v. 16, n. 7, p. 896–913.

_____; GITTLEMAN, H.; *et al.* CBTRUS statistical report: primary brain and central nervous system tumors diagnosed in the United States in 2007-2011. **Neuro-oncology**, 2014. v. 16, p. iv1-iv63.

PAW, I. *et al.* Mechanisms regulating glioma invasion. **Cancer Letters**, 2015. v. 362, n. 1, p. 1–7.

PILATOVA, M. *et al.* In vitro antiproliferative and antiangiogenic effects of synthetic chalcone analogues.

Toxicology in Vitro, 2010. v. 24, n. 5, p. 1347–1355. Disponível em:
<<http://dx.doi.org/10.1016/j.tiv.2010.04.013>>.

RAE, C. *et al.* The Role of Copper in Disulfiram-Induced Toxicity and Radiosensitization of Cancer Cells. **Journal of Nuclear Medicine**, 2013. v. 54, n. 6, p. 953–960. Disponível em:
<<http://jnm.snmjournals.org/cgi/doi/10.2967/jnumed.112.113324>>.

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

RASMUSSEN, B. K. *et al.* Epidemiology of glioma: clinical characteristics, symptoms, and predictors of glioma patients grade I–IV in the the Danish Neuro-Oncology Registry. **Journal of Neuro-Oncology**, 2017. v. 135, n. 3, p. 571–579.

REIFENBERGER, G. *et al.* Predictive impact of MGMT promoter methylation in glioblastoma of the elderly. **International Journal of Cancer**, 2012. v. 131, n. 6, p. 1342–1350.

ROBERT, M. C.; WASTIE, M. E. Glioblastoma multiforme: A rare manifestation of extensive liver and bone metastases. **Biomedical Imaging and Intervention Journal**, 2008. v. 4, n. 1, p. 2–5.

ROSSETTE, M. C. *et al.* The In Vitro and In Vivo Antiangiogenic Effects of Flavokawain B. **Phytotherapy Research**, 2017. n. April.

ROUSSEAU, A.; MOKHTARI, K.; DUYCKAERTS, C. The 2007 WHO classification of tumors of the central nervous system - What has changed? **Current Opinion in Neurology**, 2008. v. 21, n. 6, p. 720–727.

SANSON, M. *et al.* Isocitrate dehydrogenase 1 codon 132 mutation is an important prognostic biomarker in gliomas. **Journal of Clinical Oncology**, 2009. v. 27, n. 25, p. 4150–4154.

SANTANA, D. P. *et al.* Ação de chalconas contra a formação de biofilme de *Candida albicans*. **Revista de Ciencias Farmaceuticas Basica e Aplicada**, 2015. v. 36, n. 1, p. 83–90.

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**, 2007. v. 85, n. 2, p. 123–132.

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

- SINGH, N.; SARKAR, J.; SASHIDHARA, K. V. Anti-tumour activity of a novel coumarin – chalcone hybrid is mediated through intrinsic apoptotic pathway by inducing PUMA and altering Bax / Bcl-2 ratio. 2014. p. 1017–1028.
- STEINBACH, J. P.; WELLER, M. Apoptosis in gliomas: Molecular mechanisms and therapeutic implications. **Journal of Neuro-Oncology**, 2004. v. 70, n. 2, p. 245–254.
- TAYLOR, R. C.; CULLEN, S. P.; MARTIN, S. J. Apoptosis: controlled demolition at the cellular level. **Nature Reviews Molecular Cell Biology**, 2008. v. 9, n. 3, p. 231–241. Disponível em: <<http://www.nature.com/doi/10.1038/nrm2312>>.
- TENG, C.-C.; SZE, C.-I.; LIAO, W. C. Induction of apoptosis of malignant glioma cells by a prenylated chalcone. **Pharmaceutical Biology**, 2014. v. 52, n. 4, p. 471–478. Disponível em: <<http://www.tandfonline.com/doi/full/10.3109/13880209.2013.843573>>.
- TING, C. *et al.* Chalcone flavokawain B induces autophagic-cell death via reactive oxygen species-mediated signaling pathways in human gastric carcinoma and suppresses tumor growth in nude mice. **Archives of Toxicology**, 2017. v. 91, n. 10, p. 3341–3364.
- TYSNES, B. B.; MAHESPARAN, R. Biological mechanisms of glioma invasion and potential therapeutic targets. **Journal of Neuro-Oncology**, 2001. v. 53, n. 2, p. 129–147.
- URBANSKA, K. *et al.* Glioblastoma multiforme - An overview. **Współczesna Onkologia**, 2014. v. 18, n. 5, p. 307–312.
- USHIO-FUKAI, M. Redox signaling in angiogenesis: Role of NADPH oxidase. **Cardiovascular Research**, 2006. v. 71, n. 2, p. 226–235.
- WALLACE, C. J.; FORSYTH, P. A.; EDWARDS, D. R. Lymph node metastases from glioblastoma multiforme. **AJNR American journal of neuroradiology**, 1996. v. 17, n. 10, p. 1929–1931. Disponível em: <<http://eutils.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/eutils/elink.fcgi?dbfrom=pubmed&id=8933881&retmode=ref&cmd=prlinks%5Cnpapers3://publication/uuid/366C5816-BFDE-40A9-91A1-F439BE00D4A3>>.

WIDJAJA, A. *et al.* Uncommon metastasis of a glioblastoma multiforme in liver and spleen. **Digestion**, 2000. v. 61, n. 3, p. 219–222.

YANG, P. *et al.* Clinicopathological factors predictive of postoperative seizures in patients with gliomas. **Seizure**, 2016. v. 35, p. 93–99. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.seizure.2015.12.013>>.

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**, 2002. v. 1, n. April, p. 393–404.

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**, 2010. v. 80, n. 10, p. 1487–1496.

ZOROV, D. B.; JUHASZOVA, M.; SOLLOTT, S. J. Mitochondrial ROS-induced ROS release: An update and review. **Biochimica et Biophysica Acta - Bioenergetics**, 2006. v. 1757, n. 5–6, p. 509