

Universidade de Ribeirão Preto - UNAERP

Biotecnologia Aplicada à Saúde

VIVIANE SEBA SAMPAIO

**Atividade anticancerígena e antimetastática de chalconas
em linhagens celulares de osteossarcoma**

**Ribeirão Preto
2018**

Viviane Seba Sampaio

**Atividade anticancerígena e antimetastática de chalconas
em linhagens celulares de osteossarcoma**

Dissertação apresentada ao programa de pós-graduação em Biotecnologia da Universidade de Ribeirão Preto para obtenção do Título de Mestre em Biotecnologia aplicada à saúde.

Orientador: Prof. Dr. Mozart Marins

**Ribeirão Preto
2018**

Ficha catalográfica preparada pelo Centro de Processamento Técnico da
Biblioteca Central da UNAERP

- Universidade de Ribeirão Preto -

Sampaio, Viviane Seba, 1983-

S192a Atividade anticancerígena e antimetastática de chalconas em
linhagens celulares de osteossarcoma. / Viviane Seba Sampaio. --
Ribeirão Preto, 2018.

73 f.: il. color.

Orientador: Prof. Dr. Mozart de Azevedo Marins.

Dissertação (mestrado) - Universidade de Ribeirão Preto,
UNAERP, Biotecnologia. Ribeirão Preto, 2018.

VIVIANE SEBA SAMPAIO

**ATIVIDADE ANTICANCERÍGENA E ANTIMETASTÁTICA DE CHALCONAS EM
LINHAGENS CELULARES DE OSTEOSSARCOMA**

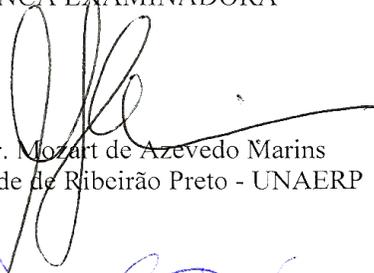
Dissertação de Mestrado apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia da Universidade de Ribeirão Preto, para obtenção do título de Mestrado em Biotecnologia.

Área de Concentração: Biotecnologia Aplicada à Saúde

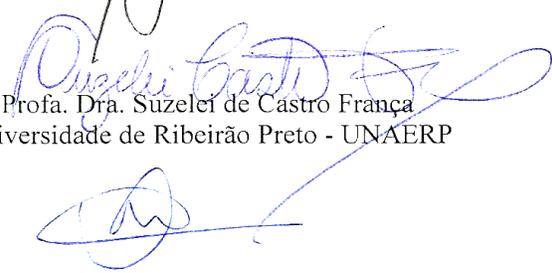
Data da defesa: 10 de agosto de 2018

Resultado: Aprovada

BANCA EXAMINADORA



Prof. Dr. Mozart de Azevedo Marins
Universidade de Ribeirão Preto - UNAERP



Prof. Dra. Suzelen de Castro França
Universidade de Ribeirão Preto - UNAERP



Prof. Dra. Larissa Moreira Spinola de Castro Raucci
Universidade de Ribeirão Preto – UNAERP

**RIBEIRÃO PRETO
2018**

AGRADECIMENTOS

- ✚ *A Deus, por me capacitar e amar apesar de quem sou.*
- ✚ *A minha família, por ser meu porto seguro e meu incentivo em todas as decisões, mesmo aquelas não tão sábias.*
- ✚ *Meu orientador, Prof. Dr. Mozart Marins, pela confiança mesmo quando eu estava tropeçando e principalmente pela paciência até eu me encontrar nessa jornada.*
- ✚ *Aos amigos tão queridos que fizeram parte dessa caminhada, Marianiiii, Brunaline, Fayná Rodrigues(rsrsrsr), Tatty, Gabi, Felipe e Gabriel, vocês moram no meu coração.*
- ✚ *Aos colegas de laboratório, Monize, Igor e Tati Cruz, pelos bons momentos.*
- ✚ *Ao amigo Gabriel da Silva, por sua generosidade em fazer sempre além do esperado, por ter me socorrido em todas as dúvidas, apoiado em cada crise, ter sido um alento em muitos momentos. Jamais terei como agradecer o suficiente.*
- ✚ *A Unaerp e aos demais colegas e professores da Unidade de Biotecnologia, em especial profa. Dra. Suzelei de Castro França.*
- ✚ *A CAPES pelo suporte financeiro.*

“Tenho a impressão de ter sido uma criança brincando à beira-mar, divertindo-me em descobrir uma pedrinha mais lisa ou uma concha mais bonita que as outras, enquanto o imenso oceano da verdade continua misterioso diante de meus olhos.”

Isaac Newton

Resumo

O osteossarcoma é um tumor ósseo relativamente raro quando comparado à outras neoplasias. Entretanto, este é um câncer com elevada capacidade de invadir e destruir tecidos moles, conferindo-lhe um caráter extremamente agressivo e metastático. A metástase está ligada principalmente com a transição epitélio mesenquimal (EMT) e degradação da matriz extracelular mediada por metaloproteinases (MMPs), pois esses processos aumentam a capacidade de migração e invasão celular, dois requisitos cruciais para que células tumorais provoquem metástase. A regulação de EMT e expressão de MMPs envolve a ação de diversos fatores transacionais, entre eles, a p53 e Sp1. A proteína supressora de tumor p53 é um regulador chave de importantes vias para a patogênese do osteossarcoma, incluindo metástase. A perda da função selvagem da p53 é um evento comum em osteossarcoma, bem como em outros tumores e está relacionada com proliferação celular, desenvolvimento de metástases e resistência à quimioterapia. Portanto, a busca por novas drogas antineoplásicas que levem em consideração o status da p53 pode melhorar o tratamento do osteossarcoma. Neste estudo, foi avaliado em linhagens celulares de osteossarcoma U2OS (p53 +/+), SAOS-2 (p53 -/-) e MG-63 (p53 mutante), o potencial citotóxico e antimigratório de 67 chalconas derivadas da trans-chalcona, uma molécula capaz de induzir p53. No ensaio colorimétrico de MTT foi observado que, em geral, as chalconas foram mais citotóxicas contra linhagens expressando p53 e a presença de substituintes contendo NO₂ ou átomos halogênicos (F, Br e Cl) contribuíram para a atividade das chalconas. No ensaio de *wound-healing*, para avaliar a atividade antimigratória, a maioria das chalconas foi mais ativa contra as linhagens com menor capacidade de migração (SAOS-2 e MG63), por outro lado, algumas chalconas demonstraram maior atividade antimigratória contra a linhagem expressando p53 selvagem (U2OS). Para estudar detalhadamente os mecanismos moleculares envolvidos na ação desses compostos, quatro chalconas foram selecionadas. Duas chalconas (G24 e G25) com significativa atividade citotóxica e antimigratória e duas chalconas (D14 e D15) com baixa citotoxicidade, mas elevada capacidade de inibir migração em células expressando p53. Análises de citometria de fluxo e Western Blot indicaram que a capacidade das chalconas G24 e G25 inibirem a viabilidade celular, está relacionada com a indução de apoptose dependente de caspases. Ensaio utilizando Transwell demonstraram o potencial das quatro

chalconas em inibirem a invasão celular e confirmaram a atividade antimigratória dependente de p53 das chalconas D14 e D15. Através da técnica de zimografia observou-se que a inibição da migração e invasão celular provocadas por D14, D15, G24 e G25 podem estar relacionadas com a diminuição da atividade das metaloproteinases MMP-2 e MMP-9. Por fim, ensaios de PCR e Western Blot evidenciaram a capacidade dessas moléculas, especialmente das chalconas D14 e D15, em induzir a expressão da proteína p53, além de regularem o processo de EMT através da indução de marcadores epiteliais (E-caderina) e repressão de marcadores mesenquimais (Vimentina, Slug, N-caderina e Beta-catenina) de forma dependente da p53. Assim, os resultados encontrados confirmam o potencial de chalconas como moléculas inibidoras de metástase e poderão auxiliar no desenho de chalconas com atividade antimetastática mais potentes e seletivas, que poderão ser utilizadas como modelo para o desenvolvimento de novos agentes quimioterapêuticos contra osteossarcoma.

Palavras chave: Osteossarcoma, Chalcona, p53, Metástase, EMT

Abstract

Osteosarcoma is a relatively rare bone tumor when compared to other neoplasms. However, this cancer has a high capacity to invade and destroy soft tissues, exhibiting an extremely aggressive and metastatic behavior. Metastasis is linked to activation of the epithelial-mesenchymal transition (EMT) and degradation of the extracellular matrix mediated by metalloproteinases (MMPs), as these processes increase the cell migration and invasion capacity, which are two crucial requirements for tumor cell to cause metastasis. The regulation of the EMT and MMPs expression involves the action of several transcriptional factors, such as p53 and Sp1. The p53 tumor suppressor protein is a key regulator of important pathways for the pathogenesis of osteosarcoma, including metastasis. Loss of wild-type p53 function is a common event in osteosarcoma as well as in other tumors and is related to cell proliferation, metastasis development, and resistance to chemotherapy. Therefore, the search for new anticancer drugs that accounts for p53 status may improve the treatment of osteosarcoma. In this study, the cytotoxic and antimigratory potential of 68 chalcones derived from trans-chalcone, which is a molecule capable of inducing p53, was evaluated in osteosarcoma cell lines U2OS (p53^{+/+}), SAOS-2 (p53^{-/-}) and MG-63 (p53 mutant). In the MTT colorimetric assay it was observed that chalcones were more cytotoxic against p53-expressing cells and the presence of NO₂-containing substituents or halogen atoms (F, Br, and Cl) contributed to chalcone's activity. In the wound-healing assay to evaluate anti-migratory activity, most chalcones were more active against the cell lines with lower migration capacity (SAOS-2 and MG-63), on the other hand, some chalcones showed greater anti-migratory activity against wild type p53-expressing cells (U2OS). To study in detail the molecular mechanisms involved in the action of these compounds, four chalcones were selected. Two chalcones (G24 and G25) with significant cytotoxic and anti-migratory activity, and two chalcones (D14 and D15) with low cytotoxicity, but high ability to inhibit migration in p53-expressing cells. Flow cytometry and Western Blot analysis indicated that the ability of chalcones G24 and G25 to inhibit cell viability is related to the induction of caspase-dependent apoptosis. Transwell assays demonstrated the potential of the four chalcones to inhibit cell invasion and confirmed the p53-dependent anti-migratory activity of chalcones D14 and D15. Through zymography it was noted that inhibition of cell

migration and invasion caused by D14, D15, G24 and G25 may be involved with decreased activity of MMP-2 and MMP-9. Finally, PCR and Western blot assays demonstrated the ability of these molecules, especially D14 and D15, to induce p53 protein expression, and to regulate the EMT process through the induction of epithelial markers (e-cadherin) and repression of mesenchymal markers (vimentin, slug, N-cadherin and beta-catenin) in a p53-dependent manner. Thus, the results confirm the potential of chalcones as metastasis inhibitory molecules and may assist in the design of more potent and selective anti-metastatic chalcones, which could be used as a model for further development of chalcone based chemotherapeutic agents against osteosarcoma.

KeyWords: Osteosarcoma, Chalcone, p53, Metastasis, EMT

LISTAS DE FIGURAS

Figura 1. Tumores benignos comparados à tumores malignos.....	1
Figura 2. Evolução de tumores.....	2
Figura 3. Mutações ativando oncogenes e inibindo genes supressor de tumor.....	4
Figura 4. Regulação da proteína p53.....	8
Figura 5. Processo metastático	13
Figura 6. Processo de transição epitélio mesenquimal (EMT).....	16
Figura 7. Estrutura geral das chalconas (1,3-difenil-2-en-1-ona).....	17
Figura 8. Síntese de chalcona por condensação de Claisen-Schmidt.....	18
Figura 9. Modificações estruturais de chalconas relacionadas com atividade antitumoral..	18
Figura 10. Inibição da migração celular das linhagens de osteossarcoma U2OS, SAOS-2 e SAOS-2 exp p53 provocada pelas chalconas D14 e D15 após 24 horas de tratamento.....	47
Figura 11. Inibição da migração celular das linhagens de osteossarcoma U2OS e SAOS provocada pelas chalconas G24 e G25 após 24 horas de tratamento.. ..	47
Figura 12. Inibição da invasão celular das linhagens de osteossarcoma U2OS e SAOS provocada pelas chalconas D14 e D15 após 24 horas de tratamento.	48
Figura 13. Inibição da invasão celular das linhagens de osteossarcoma U2OS e SAOS provocada pelas chalconas G24 e G25 após 24 horas de tratamento.. ..	49
Figura 14. Indução de apoptose em linhagens de osteossarcoma U2OS e SAOS provocada pelas chalconas G24 e G25 após 24 horas de tratamento.....	51
Figura 15. Efeito das chalconas D14, D15, (15 µg/mL), G24 e G25 (IC ₅₀) sobre a expressão de marcadores de transição epitélio-mesenquimal.	54
Figura 16. Inibição da atividade gelatinolíticas das MMPs 2 e 9 provocada pelas chalconas D14, D15, G24 e G25 após 24 horas de tratamento.	56
Figura 17. Efeito das chalconas D14, D15, (15 µg/mL), G24 e G25 (IC ₅₀) sobre a expressão dos fatores de transcrição Sp1 e p53	58
Figura 18. Efeito das chalconas sobre a expressão de proteínas relacionadas a apoptose e transição epitélio-mesenquimal na linhagem U2OS.	61

Figura 19. Efeito das chalconas sobre a expressão de proteínas relacionadas a apoptose e transição epitélio-mesenquimal na linhagem SAOS-2.	62
Figura 20. Efeito das chalconas sobre a expressão de proteínas relacionadas a apoptose e transição epitélio-mesenquimal na linhagem MG-63.....	62
Figura 21. Conclusão: um modelo para o mecanismo de ação das aminochalconas D14, D15, G24 e G25 em osteossarcoma.....	64

LISTAS DE TABELAS

Tabela 1. Características estruturais das 67 chalconas.	24
Tabela 2. Sequência dos iniciadores (primers) utilizados nas reações de PCR.	30
Tabela 3. Efeito das chalconas sobre a viabilidade celular das linhagens de osteossarcoma U2OS, SAOS-2 e MG63.	37
Tabela 4. Valores de IC_{50} das chalconas para as linhagens de osteossarcoma U2OS, SAOS-2 e MG-63 e para a linhagem normal HACAT.	40
Tabela 5. Efeito das chalconas sobre a migração celular das linhagens de osteossarcoma U2OS, SAOS-2 e MG63.	44

LISTA DE ABREVIACÕES

ATM – Ataxia Telangiectasia Mutated
ATR – Ataxia Telangiectasia and Rad3-Related Protein
BAD – Bcl-2-associated death promoter
BAK – Bcl-2 homologous antagonist/killer
BAX – BCL2-associated X
BCL-2 – B-cell lymphoma 2
BCL-W – BCL2 like 2
BCL-X – B-cell lymphoma-extra large
BCRJ – Banco de Células do Rio de Janeiro
cDNA – DNA complementar
CDK2 – Cyclin-dependent kinase 2
c-Myc – MYC proto-oncogene, bHLH transcription factor
CO₂ – Dióxido de carbono
Ct – Threshold cycle
CTCs – Células tumorais circulantes
DMEM – Dulbecco's Modified Eagle Medium
DMSO – Dimetilsulfóxido
DNA – Ácido desoxirribonucleico
DNA-PK – DNA-dependent protein kinase
DR5 – Death receptor 5
DR4 – Death receptor 5
EGF – Epidermal growth factor
ELISA – Enzyme-linked immunosorbent assay
E2F-1 – E2F transcription factor 1
EMT – Transição Epitélio Mesenquimal
FGF – Fibroblast growth factor
FITC – Fluorescein isothiocyanate
GAPDH – glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase
GOF – Ganho de nova função

HANKS – Hank's Balanced Salt Solution
HGF – Hepatocyte growth factor
HPLC – High performance liquid chromatography
HRAS – Harvey rat sarcoma viral oncogene homolog
HRP – Horseradish peroxidase
IC – Concentração inibitória
IMC – Inibição de migração celular
INCA – Instituto Nacional de Câncer
IVC – Inibição de invasão celular
KRAS – Kirsten rat sarcoma viral oncogene homolog
Mcl-1 – Induced myeloid leukemia cell differentiation protein
MDM2 – Murine double minute type 2
MEC – Matriz extracelular
ml – Mililitro
mm – Milímetro
MMPs – Metaloproteinases de Matriz
MTT – Brometo de 3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difeniltetrazolio
NF- κ B – Factor nuclear kappa B
nm – Nanômetro
nM – Nanomolar
NRAS – Neuroblastoma RAS viral oncogene homolog
p53 – Proteína 53
PARP – Poly(ADP-ribose) polymerase 1
PBS – Phosphate-buffered saline
PCR – Reação em cadeia da polimerase
PRIMA1 – p53 re-activation and induction of massive apoptosis
qPCR – Quantitative PCR
RAS – Rat sarcoma vírus
Rb – Retinoblastoma
RNA – Ácido ribonucleico
ROS – Espécies reativas de oxigênio

RPL30 – Ribosomal Protein L30
SDS-PAGE – Sodium dodecyl sulfate polyacrylamide gel electrophoresis
SIRT1 – Sirtuin 1
SLUG – SNAI2 snail family transcriptional repressor 2
SNAIL – SNAI1 snail family transcriptional repressor 1
Sp1 – Proteína de Especificidade 1
STAT-3 – Signal transducer and activator of transcription 3
TBST – Tris-buffered saline, 0.1% Tween 20
TGF β – Transforming growth factor beta
TIMPs – Tissue inhibitors of metalloproteinases
TNF – Tumor necrosis factor
TP53 – Tumor Protein P53
TRAIL – TNFSF10 TNF superfamily member 10
VEGF – Vascular endothelial growth factor
WNT – Wingless-type MMTV integration site family
XIAP – X-linked inhibitor of apoptosis protein
 μ M – Micromolar
 μ g – Micrograma

SUMÁRIO

LISTAS DE FIGURAS	i
LISTAS DE TABELAS	iii
LISTA DE ABREVIACÕES	iv
1. INTRODUÇÃO	1
1.1 CÂNCER.....	1
1.2 BASES MOLECULARES DO CÂNCER.....	3
1.3 OSTEOSSARCOMA	5
1.4 p53.....	7
1.5 SP1.....	9
1.6 PROCESSOS ENVOLVIDOS NA METÁSTASE.....	11
1.7 CHALCONAS	17
2. OBJETIVOS.....	22
2.1 OBJETIVOS ESPECÍFICOS	22
3. METODOLOGIA	23
3.1) LINHAGENS CELULARES	23
3.1.1) CULTIVO CELULAR	23
3.2 CHALCONAS	23
3.3 ATIVIDADE CITOTÓXICA.....	25
3.4 ENSAIO DE MIGRAÇÃO MÉTODO <i>WOUND-HEALING</i>.....	26
3.5 ENSAIOS DE MIGRAÇÃO COM <i>TRANSWELL</i>.....	27
3.6 ENSAIO DE INVASÃO.....	27
3.7 APOPTOSE	28
3.8 ZIMOGRAFIA.....	29
3.9 PCR.....	29
3.10 QPCR	31
3.11 WESTERN BLOT.....	33
3.12 VETOR DE EXPRESSÃO E TRANSFECCÃO.....	34
3.13 ANÁLISE ESTATÍSTICA	34
4. RESULTADOS E DISCUSSÃO	35
4.1 ANÁLISE DA CITOTOXICIDADE (INIBIÇÃO DA VIABILIDADE CELULAR) PELO ENSAIO DE MTT	35
4.2 ANÁLISE DA MIGRAÇÃO CELULAR PELO ENSAIO <i>WOUND-HEALING</i>	41

4.3	ANÁLISE DA MIGRAÇÃO CELULAR COM <i>TRANSWELL</i>	46
4.4	ANÁLISE DA INVASÃO CELULAR COM <i>TRANSWELL</i>	48
4.5	APOPTOSE	50
4.6	ANÁLISE DA EXPRESSÃO DE GENES RELACIONADOS AO PROCESSO DE EMT	51
4.7	ANÁLISE DA ATIVIDADE DAS MMPs COM ENSAIO DE ZIMOGRFIA	55
4.8	ANÁLISE DA EXPRESSÃO DE FATORES DE TRANSCRIÇÃO COM QPCR ...	57
4.9	ANÁLISE DA EXPRESSÃO DE PROTEÍNAS MARCADORAS DE APOPTOSE E EMT	59
5.	CONCLUSÃO	63
6.	REFERÊNCIAS	65

1. INTRODUÇÃO

1.1 CÂNCER

O Câncer é um nome genérico usado para denominar um conjunto de mais de cem doenças. A principal característica compartilhada por essas doenças é a multiplicação desordenada de células que não respondem aos sinais de controle da divisão e morte celular. Além disso, algumas dessas células possuem a habilidade de infiltrar tecidos adjacentes (Figura 1), se desprender de seu local de origem (tumor primário) e migrar pelos tecidos, podendo se instalar em locais distantes formando tumores secundários, denominados metástases [1].

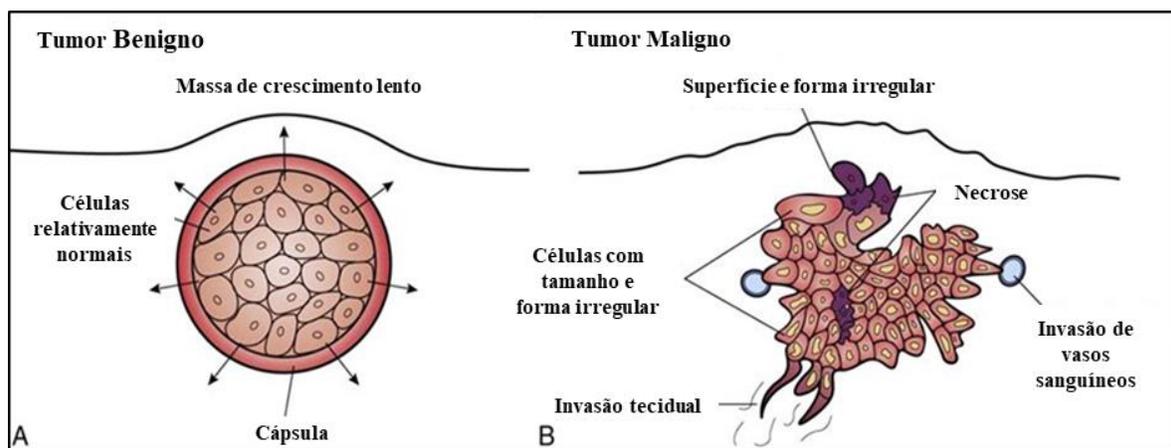


Figura 1. Tumores benignos comparados à tumores malignos. **(A)** Tumor benigno apresenta células similares às normais, crescimento lento, frequentemente é encapsulado permanecendo localizado. **(B)** Tumor maligno (câncer) apresenta células extremamente desdiferenciadas, com grande variedade morfológica, crescimento rápido, não é encapsulado e as células malignas podem invadir e danificar tecidos adjacentes ou metastizar em diferentes partes do corpo. **Fonte:** Copstead-Kirkhorn e Banasik, 2010.

O câncer é resultado de uma desordem genética e hereditária, mas também pode resultar do efeito de fatores externos, como estilo de vida, alimentação, entre outros. Esses fatores são responsáveis por aproximadamente 90% dos casos de câncer (INCA).

As bases genéticas do câncer normalmente estão associadas ao acúmulo de mutações no DNA e/ou de modificações epigenéticas, que conferem às células alteradas vantagens

seletivas em relação as células normais (Figura 2) [2]. Estas alterações genéticas e epigenéticas modificam a expressão ou função de genes responsáveis pela regulação de processos celulares primordiais, como crescimento, sobrevivência e senescência. A desregulação desses e de outros processos permitem que as células tumorais obtenham as características necessárias para sustentarem seu desenvolvimento. As mesmas são denominadas como “características do câncer” e são: autossuficiência dos sinais de crescimento; ausência de resposta aos sinais inibidores de crescimento; evasão da morte celular; potencial de replicação ilimitado; angiogênese; capacidade de invasão; reprogramação das vias metabólicas e capacidade de escapar do sistema imune [3].

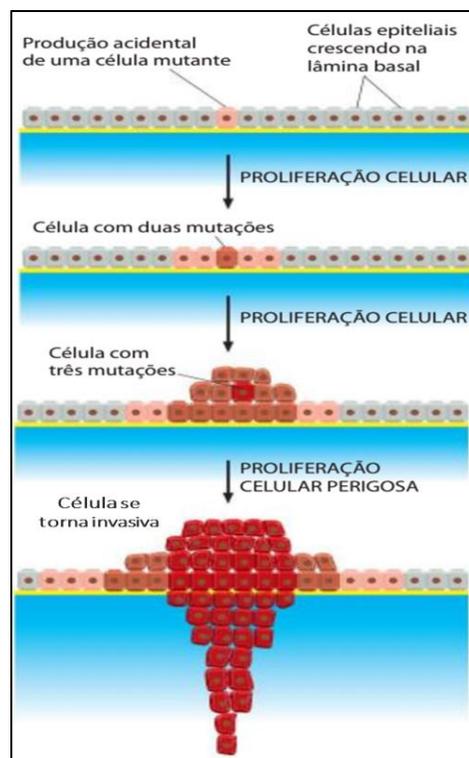


Figura 2. Evolução de tumores. Os tumores evoluem através de ciclos de mutação e multiplicação. Em cada ciclo uma célula sofre mutação aumentando a proliferação celular, resistência à morte celular ou ambos, de forma que suas células-filha tenham uma vantagem seletiva em relação às demais tornando-se o clone predominante no tumor. A propagação deste clone aumenta a quantidade de células malignas que podem sofrer novas mutações. Finalmente, após diversos ciclos de mutação e multiplicação, as células podem adquirir características que conferem a alta malignidade, ou seja, a capacidade de infiltrar e danificar tecidos próximos. Fonte: Alberts et al., 2010a.

A incidência do câncer varia com idade, raça, fatores geográficos, bem como com os antecedentes genéticos. A maioria é esporádica, mas existem aqueles que são familiares. Os cânceres familiares têm a tendência de se apresentar numa fase mais precoce da vida [3].

Estima-se que em 2012 surgiram cerca de 14,1 milhões de casos de câncer e 8,2 milhões de óbitos. De um modo geral, as maiores taxas de incidência dessa doença foram observadas em países desenvolvidos. No Brasil, a estimativa para 2018-2019 é que ocorram 600 mil novos casos de câncer. (INCA)

1.2 BASES MOLECULARES DO CÂNCER

No processo de carcinogênese, para que as células tumorais adquiram as chamadas “características do câncer”, é necessário que ocorra a desregulação (ativação ou inibição) de grupos específicos de genes, que são: os oncogenes, os supressores de tumor e genes de integridade do genoma [3].

Alguns genes conduzem a um fenótipo transformado quando superexpressos em células. Esses genes são chamados de oncogenes. Os oncogenes, majoritariamente, são versões mutadas ou superexpressas de genes celulares normais, os proto-oncogenes [3].

Os oncogenes são reguladores positivos da proliferação celular, por isso, devido a sua elevada ativação no câncer, estão diretamente relacionados com a multiplicação exacerbada de células tumorais. Eles codificam proteínas com diferentes funções, tais como, fatores de crescimento, receptores da superfície celular, transdutoras de sinal, reguladoras do ciclo celular e inibidoras de apoptose [3].

Os oncogenes normalmente resultam de mutações dominantes, ou seja, uma mutação em um único alelo de um proto-oncogene é suficiente para provocar a sua hiperativação (Figura 3) [4]. Entre os oncogenes, os mais frequentemente hiperativos no câncer por meio de mutação dominante, são os genes da família RAS (HRAS, KRAS e NRAS). Genes RAS (*Rat sarcoma viral oncogene*) codificam proteínas transdutoras de sinal envolvidas na superativação de receptores de crescimento e, conseqüentemente, na produção elevada de sinais mitógenos, que provocam a proliferação descontrolada de células tumorais [3].

Os genes supressores de tumor são aqueles que impedem o crescimento celular descontrolado quando, ao sofrer mutação, permitem o desenvolvimento de um fenótipo transformado. Mutações em genes supressores de tumor são recessivas e inativadoras, ou seja, mutações em ambos os alelos do gene são necessárias para que ele se torne hipotativo (Figura 3) [4].

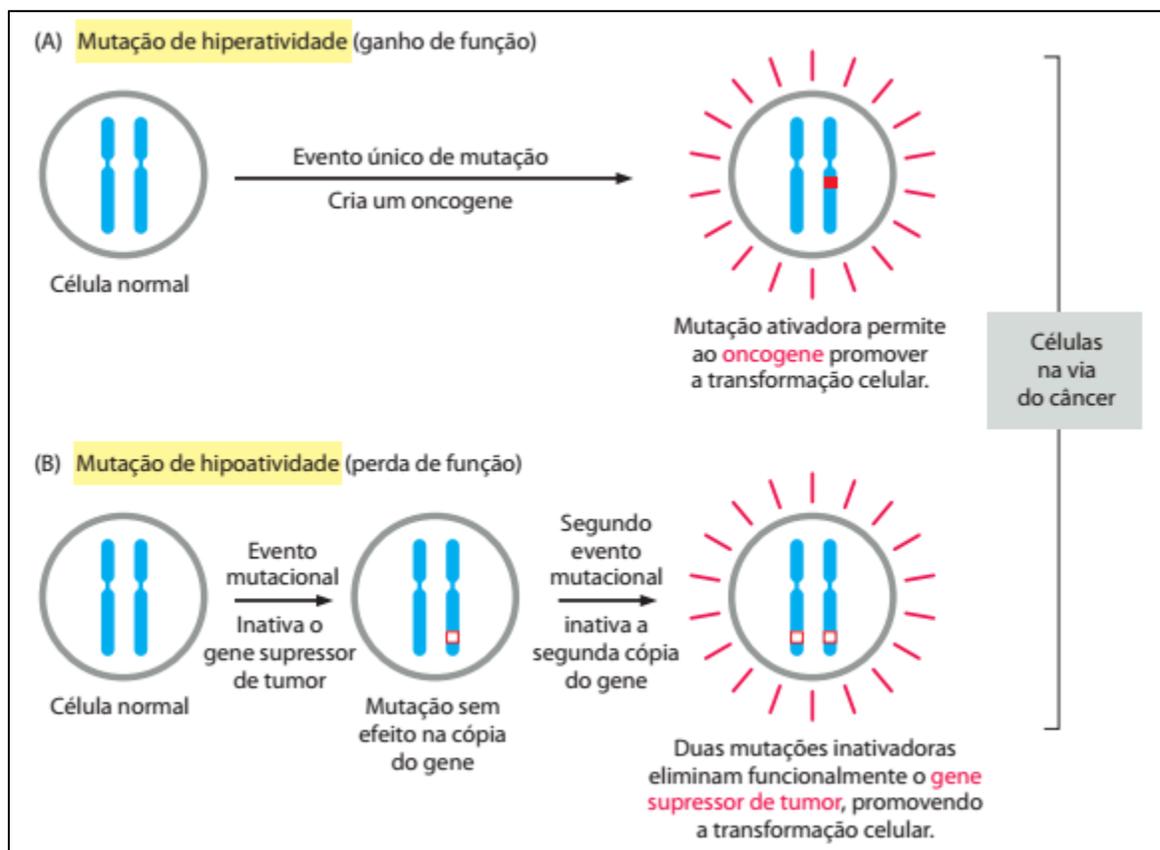


Figura 3. Mutações ativando oncogenes e inibindo genes supressores de tumor. Fonte: Alberts et al., 2010b.

O gene retinoblastoma (Rb) é considerado um gene “governante”, sendo o principal responsável pelo ponto de checagem G1/S do ciclo celular. A proteína RB interrompe o ciclo em G1, apenas permitindo a progressão para fase S após a checagem da integridade do DNA e confirmação de que a célula está totalmente apta para a divisão celular. Desta forma, ela evita a proliferação de células defeituosas. O gene RB é um dos supressores de tumor mais mutados no câncer, com taxas de mutação de: 10-30% (câncer de mama), 10-70% (câncer de

bexiga, 30-60% (câncer de próstata), >90% (câncer de pulmão de células pequenas), 35-40% fígado e 35-60% (osteossarcoma) [5, 6].

O gene TP53 é considerado um “guardião do genoma”, ele é o principal gene supressor de tumor. Age diretamente no reconhecimento e reparo de tipos específicos de dano ao DNA, evitando que células com o DNA danificado se propaguem. Entretanto, a perda da função desse gene permite e acelera a aquisição de mutação em oncogenes e genes supressores de tumor, podendo levar ao desenvolvimento do câncer [4].

Mutações no gene TP53 estão presentes em mais de 50% dos cânceres conhecidos e em alguns casos, elas ocorrem com elevada frequência, como no carcinoma de ovário com 95% de frequência, o carcinoma espinocelular com 84%, o carcinoma de cabeça e pescoço com 67% , o adenocarcinoma de esôfago com 65% e o osteossarcoma 40-60% [7, 8].

1.3 OSTEOSSARCOMA

O osteossarcoma é um tumor extremamente agressivo e apresenta alto potencial metastático. É classificado como uma neoplasia mesenquimal maligna, onde o tumor produz tecido osteóide defeituoso [9]. Comumente atinge crianças, adolescentes e adultos jovens, podendo incidir em pessoas com idade superior a 60 anos. Seu desenvolvimento se dá, em maior frequência, nas extremidades de ossos longos inferiores [10, 11], surgindo comumente em locais de rápido crescimento ósseo, como: o fêmur distal, a tíbia proximal e o úmero proximal. Esse fato reforça a relação entre crescimento ósseo e o surgimento do osteossarcoma [12]. Aproximadamente 80% dos casos de osteossarcoma em pacientes jovens tiveram sua origem nos ossos longos inferiores e 27-43% em pessoas de meia idade e idosos [11].

Por se tratar de um tumor com alta propensão para invasão local e metástase, a taxa de sobrevivência é afetada significativamente e a resistência à quimioterapia dificulta o sucesso do tratamento. Uma característica bem definida do osteossarcoma, que também é compartilhada com outras neoplasias mesenquimais, é o fato de que a metástase ocorre através da via hematogênica, ou seja, através das vias sanguíneas. Essa é a principal causa de morte por metástase pulmonar [9].

Apesar de ter havido tentativas de melhorias nas técnicas cirúrgicas, bem como na quimioterapia, estima-se que cerca de 30% dos pacientes acometidos por esse mal ainda venham a óbito em cinco anos, por metástase pulmonar [13].

As bases moleculares da patogênese do osteossarcoma melhor estabelecidas são alterações genéticas nos genes supressores de tumor RB e TP53. Pessoas carregando mutações no gene RB apresentam uma incidência de osteossarcoma 500 vezes maior do que pessoas sem essas mutações [14]. A perda da função de RB está presente em até 60% dos casos de osteossarcoma e está relacionada com a severidade da doença e resposta ineficiente aos tratamentos [6].

A frequência de mutações no gene TP53 é de 40-60% nos osteossarcomas mais agressivos e 1% nos osteossarcomas não agressivos. A proteína p53 também é inativada em osteossarcomas através da elevada expressão da proteína MDM2 (“mouse double murine 2”), que é a principal inibidora da p53. O gene MDM2 está amplificado em 17% dos casos de osteossarcoma e a superexpressão desse gene está diretamente ligada com a inativação de p53 e desenvolvimento de metástases [9].

O osteossarcoma, assim como outros tumores, são resistentes à apoptose. Entretanto, o osteossarcoma é especialmente resistente a um tipo especial de apoptose, chamado de *anoikis*. A *anoikis* é uma forma de apoptose que é impelida quando as células se encontram desprendidas da membrana ou matriz basal. O osteossarcoma é altamente metastático, pois as células se apresentam propensas a se separar dos componentes da matriz. Assim, a resistência a *anoikis* é fundamental para que essas células sobrevivam e possam metastizar [15, 16].

A propensão do osteossarcoma em causar metástases também está relacionada com a elevada capacidade de migração e invasão celular. Por sua vez, esses dois processos celulares estão ligados com a desregulação da transição epitélio mesenquimal (EMT) e expressão de metaloproteinases de matriz (MMPs). As MMPs promovem a degradação da matriz extracelular, permitindo que as células se desprendam da membrana basal e possam migrar e invadir outros tecidos [17, 18]. A EMT propicia que as células adquiram um fenótipo mesenquimal, ou seja, maior motilidade e invasividade. Por isso, tanto a expressão de metaloproteinases quanto o processo de EMT estão superativados em tumores metastáticos, incluindo osteossarcoma [17-19]. A regulação desses processos está fortemente associada à

expressão de fatores de transcrição desregulados no câncer, tais como, p53 e Sp1. A p53 regula negativamente a EMT e a expressão de metaloproteinases, portanto, a perda da função de p53 está envolvida com a ativação desses processos [20, 21]. Por outro lado, Sp1, um parceiro da p53 na regulação de muitos genes, atua induzindo o processo de EMT e a expressão de metaloproteinases e, diferentemente da p53, a proteína Sp1 encontra-se superativa em diferentes tipos de câncer, incluindo osteossarcoma [22-24].

1.4 p53

A proteína p53 é um fator de transcrição que tem como função primária manter a homeostase celular em resposta a sinais de estresse. Ela é regulada negativamente pela MDM2, uma ligase de ubiquitina E3 que ubiquitina a p53, sinalizando para que ela seja degradada pelo proteossoma. Da mesma forma, MDM2 é regulada transcricionalmente por p53. Em diversos tumores a MDM2 se apresenta superexpressa, conseqüentemente, a função da p53 é diminuída. Portanto, estudos corroboraram a ideia de que a diminuição dos níveis de MDM2 leva a um aumento na atividade da p53 [25]. Em células livres de stress, a p53 tem meia vida curta. Quando a célula sofre stress a p53 é ativada por diversas moléculas sensoras, que catalisam modificações pós-traducionais da p53, por exemplo, a fosforilação. Essas modificações inibem a interação entre p53 e MDM2, aumentando a estabilidade e a atividade transcricional da p53. Como consequência dessa ativação, a p53 passará a regular positivamente um conjunto de genes. Esses genes podem promover morte celular, apoptose, senescência ou parada do crescimento (Figura 4) [26]. Estudos têm demonstrado que a p53 pode reprimir a atividade promotora de vários genes antiapoptóticos e do ciclo celular promovendo apoptose. Do mesmo modo sua inativação pode causar uma diminuição da morte de células tumorais induzida por apoptose [25, 27].

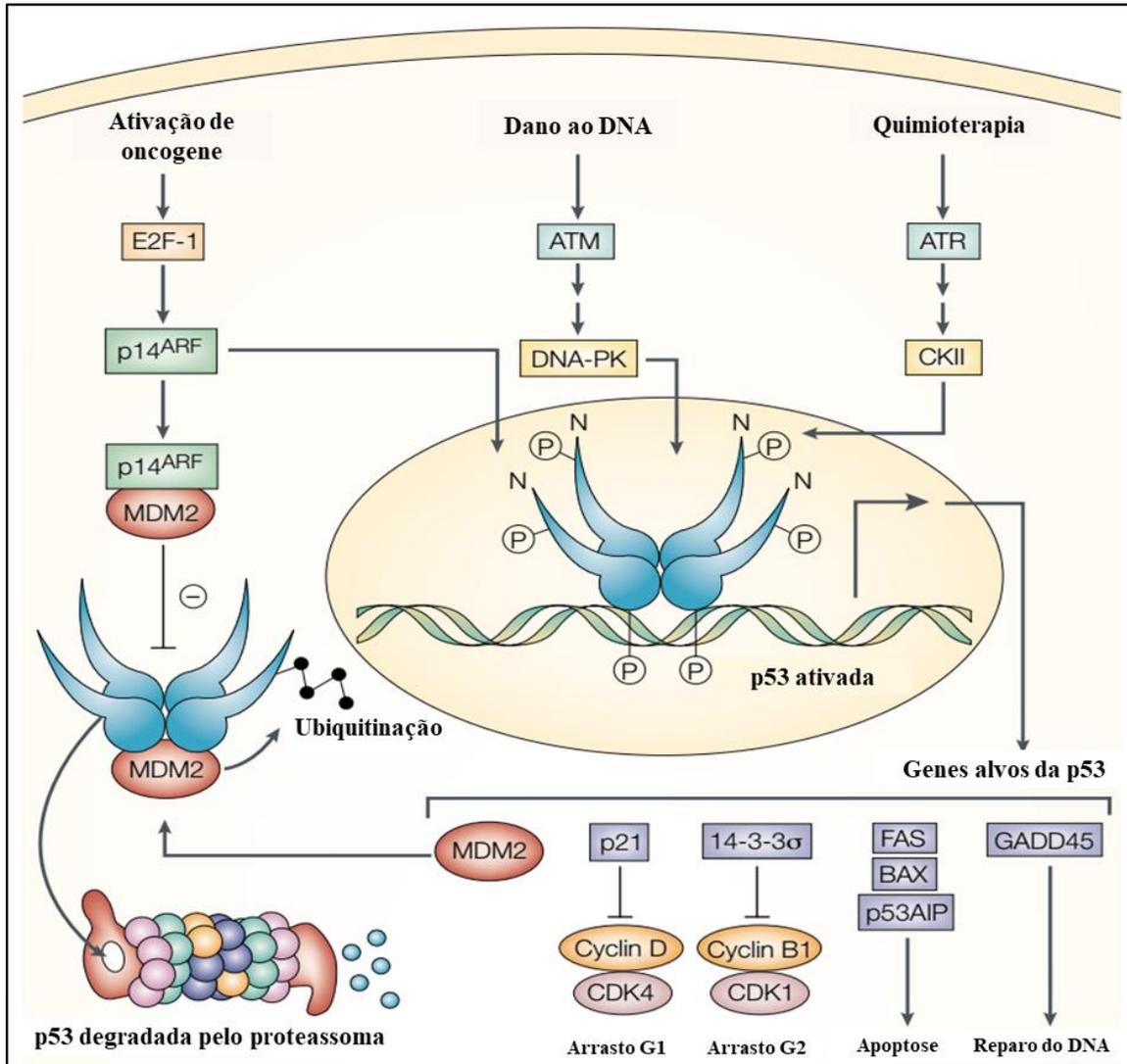


Figura 4. Regulação da proteína p53. Em condições normais, MDM2 promove a ubiquitinação e posterior degradação da p53. Estresses celulares como ativação de oncogenes, induzem a ação de p14^{arf} que impede a interação de MDM2 com a p53. Danos no DNA ou agentes quimioterápicos induzem proteínas quinases (ATM e ATR) que ativam proteína quinase dependente de DNA (DNA-PK) e caseína quinase II que, por sua vez, fosforilam a p53, diminuindo a ligação dela com a proteína MDM2. Esses processos aumentam os níveis da proteína p53 que, então, promove a transcrição de genes dependentes da p53. Fonte: Bullock e Fersht, 2001.

No câncer, em adição à superexpressão de MDM2, a p53 é inativada por diferentes tipos de mutação. Algumas mutações podem provocar alterações conformacionais na p53, reduzindo sua capacidade de se ligar ao DNA e regular a transcrição. Além disso, em alguns tumores ocorre a deleção completa do gene p53 e isso tem uma significativa implicação na origem e desenvolvimento do tumor [28].

As formas mutantes da p53 podem acumular-se na célula tumoral. Esse acúmulo tem sido atribuído à não indução da expressão de MDM2, dessa forma não acontece o ciclo regulatório entre p53 e MDM2. Esse alto nível de expressão da p53 mutante favorece o ganho de nova função (GOF), processo no qual a proteína p53 mutante não apenas perde a função supressora de tumor, mas também ganha novas atividades para promover tumorigênese [29].

Supõe-se que a p53 selvagem seja inibidora de metástase por regular transcricionalmente alvos que estão ligados às principais vias metastáticas, incluindo EMT, migração celular, entre outros. Por outro lado, proteínas p53 com mutações GOF estão envolvidas com o fenótipo metastático de tumores, indução de proliferação e resistência a apoptose [29, 30]. Algumas moléculas pequenas de baixo peso molecular, como PRIMA-1 e CP-31398, são capazes de recuperar a conformação ativa de p53 mutante, restaurando sua capacidade de ativar a transcrição de genes supressores de tumor [31, 32]. A restauração da função selvagem da p53 em tumores avançados pode levar à uma significativa regressão do tumor. Estudos já comprovam que o reparo da p53 em tumores é uma estratégia efetiva em pacientes [28].

A eficácia de tratamentos antitumorais prejudiciais ao DNA, como a doxorrubicina, a cisplatina e a irradiação gama, depende, mesmo que parcialmente, da resposta mediada pela p53 a esses danos. Portanto, mutações na p53 levam, com frequência, à resistência a esse tipo de tratamento. Daí a importância de se encontrar mecanismos capazes de aumentar a atividade da p53 [9].

1.5 SP1

Sp1 (proteína de especificidade 1) faz parte de uma família de fatores de transcrição que também inclui Sp2, Sp3 e Sp4. Esta família de genes está envolvida em uma extensa variedade de processos biológicos que são primordiais e se mostram significativos para o

crescimento celular, diferenciação, apoptose e carcinogênese. Sp1 é um fator de transcrição ubiquitadamente expresso, que reconhece a sequência consenso rica em CG 5' - (G / T) GGGCGG (G / A) (G / A) (C / T) -3' e interage com o DNA através de três dedos de zinco localizados no seu domínio C-terminal [33].

Sp1 é um dos ativadores transcricionais mais bem caracterizados. Ele atua se ligando a sequências ricas em CG. Tais sequências são necessárias para a expressão e regulação de uma variedade de genes. Sp1, bem como os outros membros de sua família, comumente encontram-se superexpressos em diversos cânceres humanos. Geralmente, Sp1 é considerado um fator prognóstico negativo correlacionando-se, ainda, com o estágio do tumor, bem como com o prognóstico ruim. Seus genes-alvo estão envolvidos, basicamente, com a proliferação celular e oncogênese. Esses genes alvo regulam as “características marcadoras do câncer”: autossuficiência em sinais de crescimento, insensibilidade a sinais anticrescimento, entre outras [33].

A proteína Sp1 passa por diversas modificações pós-transcricionais responsáveis por regular sua degradação e atividade transcricional, como: fosforilação, sumoilação, acetilação e glicosilação. Níveis alterados de fosforilação aparentemente resultam em mudanças nas atividades de ligação ao DNA. Ao que parece, a acetilação aumenta a ligação de Sp1 ao DNA, enquanto a sumoilação, supostamente, aumentaria sua degradação [34].

Sp1 ativa a transcrição de genes codificadores de ciclina quinases, tais como ciclinas do tipo D e E, Cdk2, assim como os genes E2F-1 e c-myc, que participam ativamente da progressão do ciclo celular da fase G1 para fase S [34]. Sp1 também atua na regulação da expressão do fator de crescimento endotelial vascular (VEGF). Altos níveis de expressão de Sp1 unido ao aumento da expressão de VEGF, acarretam baixa sobrevida em pacientes com câncer gástrico ressecado [35]. Sp1 também controla a expressão da proteína antiapoptótica survivina, gerando importantes consequências na terapia contra o câncer, como resistência à droga/radiação e recidiva do tumor [36].

Identificou-se que o Sp1 atua como um determinante na apoptose induzida por p53. A p53 ativada medeia a repressão transcricional proapoptótica via recrutamento de Sp1. Sem o recrutamento de Sp1, a p53 não poderia conferir a repressão transcricional pró-apoptótica e, embora genes pró-apoptóticos sejam induzidos, a apoptose eficiente não seria desencadeada [37]. Estudos demonstram que Sp1 pode induzir apoptose dependente da

ativação de p53 em linhagens tumorais de pulmão, cólon e mama. O efeito da superexpressão de Sp1 no crescimento celular foi testado em diversas linhagens celulares e, em todas as linhagens com p53 selvagem, a apoptose foi induzida. Entretanto, nas linhagens celulares com p53 mutante ou deletado isso não aconteceu, demonstrando o importante papel da ativação de p53 juntamente com Sp1 superexpressa [38].

Sp1 é um dos diversos fatores de transcrição que se ligam ao promotor do gene *MMP-9* com o intuito de induzir sua transcrição. Estudos demonstram que a inibição de *MMP-9* ocorre devido ao aumento da degradação de SP1, diminuindo dessa forma sua atividade transcricional [39].

Da mesma forma, a região reguladora do gene da *MMP-2* humana contém elementos para ligação de Sp1. Estudos demonstram que a Sp1 desempenha um papel fundamental no controle da expressão de *MMP-2* no câncer de pulmão, sugerindo uma provável ligação de Sp1 na regulação da transcrição do gene *MMP-2* e, como resultado, causando um fenótipo invasivo e angiogênico nas células [23, 40].

Em geral, a superexpressão de SP1 é apontada como uma das causas pela qual ocorre invasão de células cancerígenas via modulação de MMPs [41]. A redução da proteína Sp1 pode inibir tanto a expressão transcricional quanto a atividade enzimática de MMP-2 e MMP-9 e, conseqüentemente, diminuir a motilidade, invasividade e angiogênese de células tumorais [40, 42-44].

1.6 PROCESSOS ENVOLVIDOS NA METÁSTASE

Os tumores se apresentam, inicialmente, como lesões delimitadas ao órgão no qual se manifestam. Eventualmente essas lesões podem progredir e ocupar locais secundários distantes. Essa ocorrência é denominada metástase. As mesmas têm sido consideradas como responsáveis pela letalidade dos tumores. Os mecanismos pelos quais as células tumorais se soltam de seu sítio primário, adentram a corrente sanguínea, extravasam para os órgãos distantes e estabelecem crescimento em locais secundários ainda não são completamente assimilados. A transição epitélio mesenquimal e a ativação de proteases que degradam a membrana basal e a matriz extracelular (MEC) têm sido consideradas como facilitadoras

nesse processo metastático. As proteínas da MEC que compõem a membrana basal atuam como uma barreira contra a invasão celular [45].

A membrana basal é rica em colágeno IV, proporcionando um substrato para a adesão das células tumorais em migração. A degradação dessa membrana acarreta a ativação de diversos fatores de crescimento que são fundamentais para angiogênese, crescimento tumoral e metástase. Apesar desses processos atuarem contribuindo para a capacidade de uma célula tumoral sair de seu sítio primário e adentrar a circulação, genes responsáveis pela intervenção nesses passos iniciais, supostamente, não são os únicos responsáveis pela metástase. A célula para se mover em direção a um sítio secundário precisa sobreviver na circulação, extravasar a corrente sanguínea até o órgão secundário, crescer e se dividir (Figura 5). Portanto, a capacidade de uma célula tumoral em vencer esse processo metastático completo pode exigir uma abundância de mutações somáticas, alterações na expressão gênica e no metabolismo, permitindo a conclusão de cada uma das etapas necessárias [46, 47].

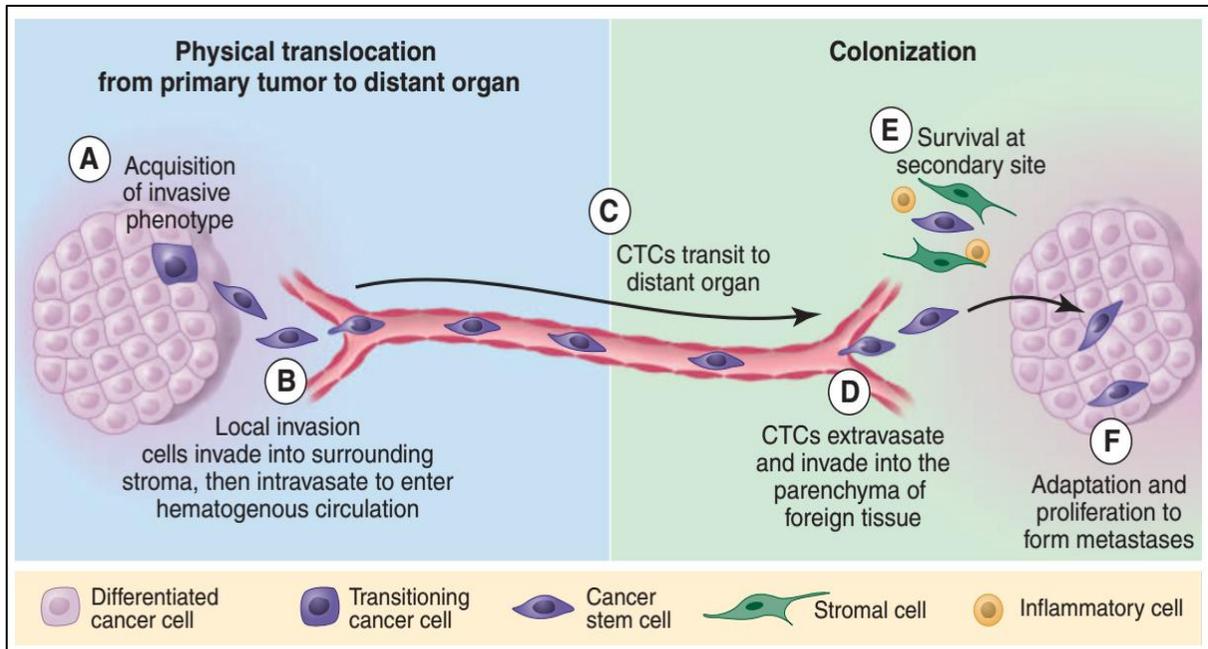


Figura 5. Processo metastático. (A) As células tumorais presentes no tumor primário adquirem um fenótipo invasivo. (B) Células tumorais invadem a matriz extracelular e migram em direção aos vasos sanguíneos, onde intravasam e entram na circulação para serem transportadas para órgãos distantes. Células tumorais viajando pela circulação são células tumorais circulantes (CTCs) e possuem sobrevivência independente de ancoragem. (D) No sítio secundário, as CTCs saem da circulação e invadem o tecido. (E) Nesse novo microambiente, as células tumorais devem evitar a resposta imune e sobreviver como célula única ou pequeno conjunto de células (micrometástase). (F) Após adaptação ao novo tecido, as células tumorais podem iniciar a sua proliferação, formando macrometástases. Fonte: Chaffer e Weinberg, 2011.

As metaloproteinases de matriz (MMPs) são uma família de endopeptidases dependentes de zinco. Elas se encontram envolvidas em uma série de processos fisiológicos incluindo inflamação, cicatrização de feridas, embriogênese e desempenham um importante papel na degradação da membrana basal. No osteossarcoma, as gelatinases MMP-2 e MMP-9 são de fundamental importância na progressão tumoral. Estudos demonstram que a deficiência combinada de MMP-2/MMP-9 em camundongos prejudicou significativamente a angiogênese e invasão tumoral [30]. Além disso, a metástase é inibida quando as MMP-2/MMP-9 são reguladas negativamente em algumas linhagens celulares e, em contrapartida, a indução de MMP-2/MMP-9 facilita a metástase nessas linhagens [48].

Atualmente, as MMPs têm sido consideradas como exercendo um papel mais diversificado em diversas etapas da progressão tumoral, incluindo angiogênese, crescimento e diferenciação celular, apoptose, migração e invasão [49]. A proteína p53 é capaz de regular a expressão de MMPs [50]. A inativação da p53 está estreitamente relacionada à regulação positiva de MMPs 1, 2 e 9, bem como com a dissociação da membrana basal, demonstrando a complexidade da regulação das MMPs pela p53 [51].

Os TIMPs (*tissue inhibitors of metalloproteinases*) são inibidores naturais da atividade de MMPs, portanto, existe a possibilidade de que um desequilíbrio nas concentrações de MMPs possa ocorrer quando há decréscimo simultâneo na produção de TIMP, levando a um consequente remodelamento da MEC dependente de MMPs, em locais de invasão tumoral. Durante a metástase, as células tumorais encontram-se comprometidas com inúmeras interações, tanto com a própria MEC quanto com proteínas, fatores de crescimento e citocinas relacionadas à MEC. Comumente a invasão, a migração de células cancerígenas e a remodelação tecidual mediada por células cancerígenas são os processos que se relacionam positivamente e mais amplamente com os níveis de MMPs [52].

As MMPs geralmente são encontradas superexpressas em tumores metastáticos e essa superexpressão pode resultar em tumores invasivos por meio da indução da transição epitélio mesenquimal [53].

O processo de EMT está diretamente envolvido com a perda de adesão celular e morfologia epitelial. Dessa forma, a célula epitelial diminui a expressão de proteínas juncionais, como E-caderina e tem um aumento de marcadores mesenquimais, como N-caderina e Vimentina. A perda de E-caderina e ganho de N-caderina é a principal característica da EMT, tem sido observada em diversos tipos de câncer e o entendimento é de que essa troca pode ser a responsável por propriedades invasivas e móveis das células cancerosas, já que tais alterações nas moléculas de adesão celular causam grande impacto nos processos de adesão célula-célula e adesão célula-matriz e, conseqüentemente, em seu potencial metastático (Figura 6) [30, 46, 54].

A E-caderina, em conjunto com outros membros do complexo adesivo como a β -catenina, regula a adesão celular, sinalização e transcrição, controlando a progressão metastática. Quando a β -catenina se desloca da estrutura adesiva para o núcleo, ocorre a ativação transcricional de diversos genes-alvo que também estão relacionados com a

propagação de um fenótipo mesenquimal [55]. Entende-se que sinais de iniciação, como HGF, EGF e fator de crescimento transformador β (TGF- β), dão início ao processo de EMT, acarretando uma regulação positiva dos fatores de transcrição indutores de EMT, como Snail, Slug e Twist. Esses fatores têm sido considerados como causadores da expressão das proteínas envolvidas na EMT e estão, portanto, ligados à metástase [56]. Snail e Slug estão comprometidos com a regulação negativa da E-caderina e a expressão entre o Snail e E-caderina, é inversamente proporcional em diversos tipos de câncer [57]. Snail e Slug também foram encontrados atuando na regulação positiva de MMP-2 e MMP-9 e subsequente iniciação e manutenção prolongada da EMT [58, 59].

A ativação da proteína p53 é capaz de reduzir os níveis de Snail e Slug regulando negativamente a EMT [60]. Além disso, essa proteína regula a expressão do MDM2 que, por sua vez, degrada Slug com conseqüente aumento da expressão de E-caderina [61]. Como Snail e Slug são os principais reguladores da EMT, a capacidade da p53 de se opor à função desses genes destaca a importância da p53 para manutenção de um fenótipo epitelial. Observou-se, ainda, que Twist é capaz de se opor à função da p53, demonstrando que a perda de p53 é de fundamental importância para a capacidade das células de se submeterem a EMT [62].

Estudos demonstram que a superexpressão de p53 em células epiteliais que sofreram EMT resultaram na sua reversão para um fenótipo epitelial [63-65]. Acredita-se que a p53 inibe a metástase pela regulação transcricional de alvos que estão implicados nas principais vias de metástase, incluindo migração celular, EMT, stemness, interações de ECM e anoikis [66]. Sendo a EMT tão importante no processo metastático, a eficácia da p53 em regular negativamente a EMT pode auxiliar no entendimento da razão dos tumores deficientes em p53 terem um prognóstico ruim [67].

Sabe-se que a EMT confere um fenótipo migratório às células tumorais, entretanto, tem sido considerado que células epiteliais também podem obter a capacidade de migração e invasão de tecidos circundantes, sem que o processo de EMT seja iniciado completamente. Dessa forma, apenas um ou alguns marcadores de EMT estariam ativados. Além do controle da expressão das proteínas de EMT, a proteína p53 tem a capacidade, ainda, de atuar nas vias de sinalização (WNT, TGF-beta, adesão célula-matriz) que modulam a MEC, a migração celular e as respostas que participam da invasão e metástase [68].

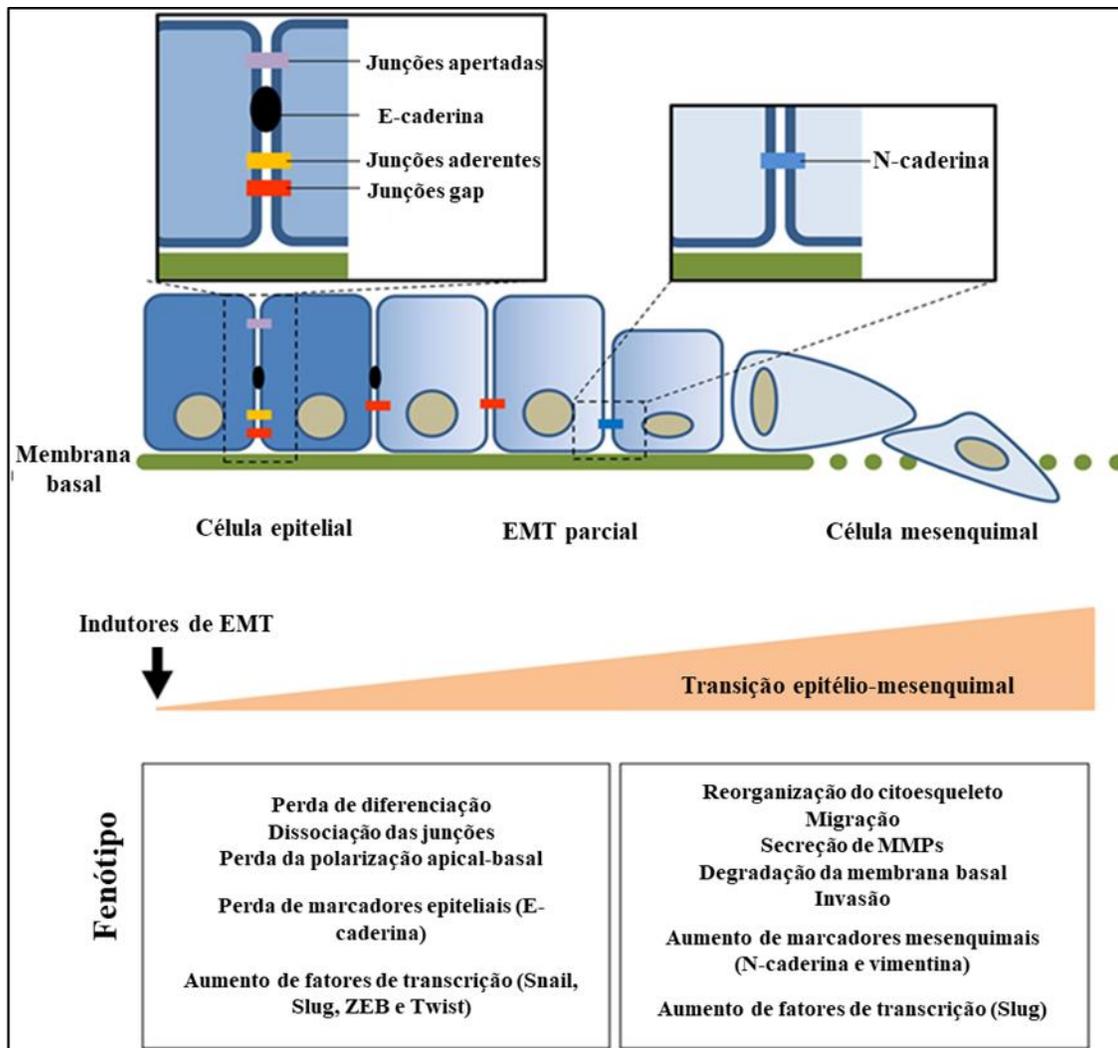


Figura 6. Processo de transição epitélio mesenquimal (EMT). Durante o processo de EMT ocorre a perda do contato célula-célula e polaridade celular, o que direciona a célula epitelial em direção a um fenótipo mesenquimal, conferindo às células maior potencial de migração e invasão. A perda do marcador epitelial E-caderina, mediada pela elevada expressão de seus repressores transcricionais (Snail, Slug, Twist e Zeb) é um evento iniciador da EMT, enquanto a concomitante superexpressão de N-caderina e Vimentina ajuda a estabilizar o fenótipo mesenquimal adquirido. Fonte: Morandi et al., 2017.

1.7 CHALCONAS

Chalconas, um grupo de enonas aromáticas, compõem o núcleo central de importantes compostos biológicos que são encontrados em plantas. Esses compostos fenólicos apresentam a estrutura de 1,3-difenil-2-en-1-ona (Figura 7) e são pertencentes à família dos flavonoides, comumente originadores da pigmentação amarela em plantas. Por outro lado, também podem ser encontrados em caules, raízes, folhas, frutos e sementes [69, 70].

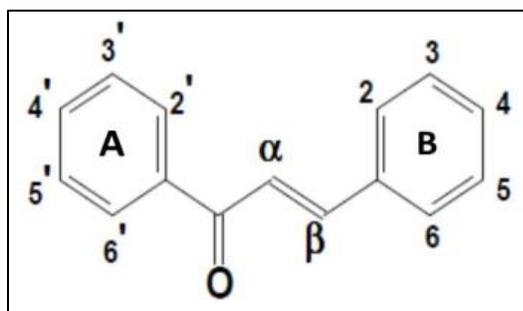


Figura 7. Estrutura geral das chalconas (1,3-difenil-2-en-1-ona). As chalconas são formadas pelos anéis aromáticos A e B unidos entre si por um grupo cetona α , β -insaturado.

Fonte: Go et al., 2005

As chalconas são originárias da via biossintética dos flavonoides, ou seja, são precursores comuns da biossíntese de outros flavonoides e isoflavonoides. Por sua ampla disponibilidade, bem como estrutura simples e variedade, esses compostos vêm sendo considerados na busca de moléculas que apresentam potencial terapêutico. Embora as chalconas surjam naturalmente, elas também podem ser disponibilizadas em maior quantidade através de sua síntese química e apresentam uma grande variedade sintética. A síntese por condensação de Claisen-Schmidt é o método mais empregado e consiste na condensação de um aldeído aromático e uma cetona apropriada em um solvente polar (metanol ou etanol), utilizando-se uma base (NaOH ou KOH) como catalisador (Figura 8) [71].

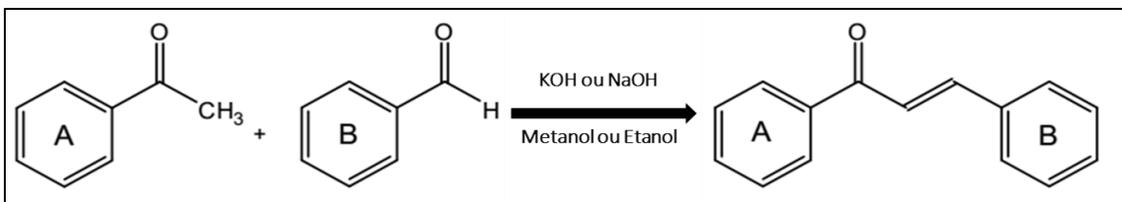


Figura 8. Síntese de chalcona por condensação de Claisen-Schmidt. Fonte: Go et al., 2005.

As chalconas são detentoras de uma ampla variedade de propriedades biológicas, como: analgésica, antioxidante, antifúngica, antibacteriana, antiprotozoária, “protetora gástrica”, antimutagênica, antitumorígenica, anti-inflamatória e anticancerígena [72].

Suas atividades biológicas, especialmente anticancerígena, são comumente atribuídas ao grupo cetona α, β -insaturado, que pode reagir com grupos tióis, tais como aqueles presentes em resíduos de cisteína de proteínas envolvidas em vias desreguladas na carcinogênese [73]. Contudo, modificações estruturais dos anéis aromáticos A e B com grupos halogênicos, hidroxilas, carboxílicos, entre outros, proporcionam a obtenção de derivados sintéticos, aumentando assim sua bioatividade e potencializando as suas aplicações terapêuticas contra o câncer (Figura 9) [74, 75].

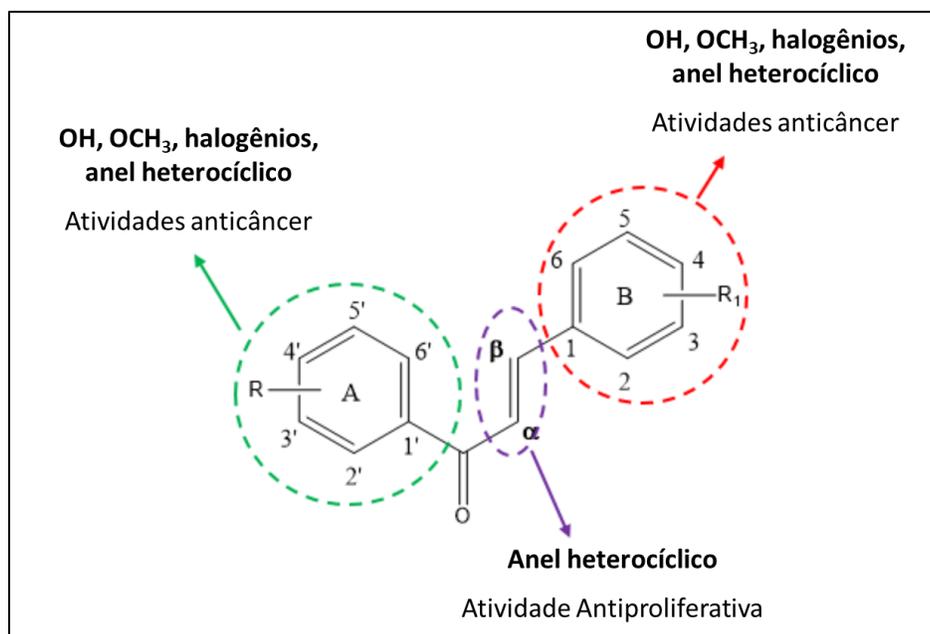


Figura 9. Modificações estruturais de chalconas relacionadas com atividade antitumoral. Fonte: Karthikeyan et al., 2015.

As chalconas vêm demonstrando atuar em cada um dos processos envolvidos na carcinogênese. Desde a iniciação do tumor, onde elas apresentam propriedades anti-iniciação devido às suas atividades antioxidantes através da captura de espécies reativas de oxigênio (ROS); bem como na promoção do tumor, inibindo a constituição e estimulação de promotores tumorais endógenos como as prostaglandinas e, ainda, na progressão do tumor, devido às suas propriedades citotóxicas, antiproliferativas e apoptóticas [76-78]. Além disso, algumas chalconas podem reduzir a motilidade e invasividade de células tumorais. As mesmas apresentam, ainda, capacidade de inibir a angiogênese do tumor, demonstrando potencial para regulação da metástase, uma vez que o crescimento de tumores e desenvolvimento de metástases necessitam da formação de novos vasos sanguíneos. Esses vasos aumentam o crescimento do tumor por fornecerem oxigênio e nutrição. Também auxiliam as células tumorais a migrar, invadir e metastizar [5].

Estudos recentes mostram que as chalconas possuem potenciais atividades inibitórias contra várias células cancerígenas, incluindo próstata, rim, cólon, pulmão, mama, fígado, bexiga, leucemia e cânceres de pele, atuando na indução de apoptose bem como na parada do ciclo celular através da regulação de diversas moléculas de sinalização, como a proteína supressora de tumor p53 [79-81]. Chalconas contendo substituições de cloro no anel aromático A nas posições 3 e 4, podem atuar rompendo a ligação entre MDM2 e p53, evitando a degradação da p53 mediada por MDM2 e, conseqüentemente, recuperando a atividade inibidora de crescimento da p53 [82, 83]. Do mesmo modo, já foi demonstrado que as chalconas podem regular a p53 via inibição de SIRT1. SIRT1 interage com a p53 e provoca a sua desacetilação, facilitando a degradação da p53, acarretando, dessa forma, a proliferação do tumor. A inibição da SIRT1 pode levar à re-expressão de genes supressores de tumor regulados pela p53, provocando a supressão do crescimento de células tumorais [84].

Chalconas também ativam p53 através da inibição do proteossoma. O proteossoma é um complexo proteico multicatalítico que atua na degradação de proteínas intracelulares danificadas que se apresentam de forma incorreta e, até mesmo, aquelas inúteis para a célula. Chalconas que reprimem a atividade do proteossoma demonstraram elevada citotoxicidade contra linhagens de câncer de cólon mediada pela estabilização da p53 e de outras proteínas ubiquitinadas [85]. Através do seu grupo cetona α , β -insaturado algumas chalconas podem interagir com grupos sulfidrila de cisteínas no sítio ativo de enzimas deubiquitinantes,

diminuindo a quantidade de ubiquitina livre na célula e, assim, ocasionando uma rápida acumulação de proteínas poliubiquitinadas (p53) e repressão de proteínas que induzem progressão do ciclo celular (ciclina D1) [86]. As chalconas, ainda, através do grupo cetona α β -insaturado, podem interagir com resíduos de treonina N-terminal no sítio ativo do proteossoma, inibindo a atividade catalítica do mesmo [87].

As chalconas, devido à sua estrutura química variada, podem induzir apoptose atuando diretamente em duas vias: mitocondrial e/ou estimulando receptores de morte. A via mitocondrial da apoptose é regulada pelas proteínas da família Bcl-2. Proteínas pró-apoptóticas incluem Bak, Bad ou Bax, enquanto as antiapoptóticas, incluem Bcl-2, Bcl-xL, Bcl-W, XIAP e survivina. Tais proteínas atuam regulando a permeabilidade da membrana mitocondrial, induzindo uma desestabilização da mesma, levando à liberação do citocromo C e, por fim, a ativação de caspases que disparam o processo apoptótico. A chalcona Flavokawain A, por exemplo, induz apoptose pela via mitocondrial em células de câncer de bexiga através da ativação de BAX e repressão de Bcl-X [88]. A via de apoptose mediada por receptor de morte apresenta uma citocina denominada TRAIL (ligante indutor de apoptose relacionado ao TNF) que se liga a receptores de morte específicos, DR-5 e DR-4, ativando o processo de apoptose. Estudos demonstraram que as chalconas flavokawain B, pandaturina A e cardamonina induziram apoptose por regulação positiva de receptores de morte DR-5 e DR-4 e do ligante TRAIL em linhagens de células de câncer de próstata, leucemia e colorretal [74, 89].

Em adição ao efeito pró-apoptótico, a atividade antimigração e anti-invasão das chalconas mediada por regulação de metaloproteinases e EMT, também vem sendo relatada em alguns estudos. Por exemplo, a buteína 3,4,2',4'-tetrahidroxichalcona reduz a migração e invasão celular em câncer de próstata, fígado e bexiga através da atenuação da atividade de MMPs mediada pelo bloqueio da atividade transcricional do NF- κ B [90, 91]. Além disso, a buteína, assim como as chalconas cardamonina e licochalcona A, também pode reprimir a migração, invasão, angiogênese e atividade de MMPs através da regulação do transdutor de sinal e ativador da transcrição 3 (STAT3), que é um fator de transcrição capaz de exercer um papel fundamental na transformação maligna, crescimento celular, migração, invasão, inflamação e angiogênese, levando ao aumento da expressão de vários genes, como MMP-2, MMP-9, Bcl-xL, Bcl-2, ciclina D1, Mcl-1 e VEGF [92-94].

A cardamonina também se mostra capaz de inibir a via de sinalização WNT/beta-catenina, frequentemente ativada de forma descontrolada em tumores, contribuindo para a progressão tumoral e processo de EMT [95]. Essa chalcona promove a degradação da beta-catenina intracelular e, conseqüentemente, reduz a expressão de oncogenes dependentes de beta-catenina [95, 96]. O bloqueio da via WNT em células de osteossarcoma pode levar a reversão da EMT através da indução de E-caderina e repressão de N-caderina, MMP-2 e MMP-14 [97]. A chalcona xanthohumol, a principal prenilchalcona do lúpulo, já demonstrou potencial em regular EMT e reprimir invasão celular através da indução de E-caderina [98].

Como descrito anteriormente, as chalconas demonstram potencial antitumoral devido a capacidade destas moléculas de induzirem apoptose, inibirem migração e invasão celular, regularem a expressão de metaloproteinases e genes envolvidos com EMT, processos cruciais para o desenvolvimento tumoral e que são regulados por diversos fatores, entre eles, a proteína supressora de tumor p53. A reativação de p53 em células tumorais é considerada uma estratégia terapêutica relevante para o tratamento do câncer. Algumas chalconas já demonstraram potencial de ativar a p53 em diversas células tumorais [80, 81, 99], inclusive em osteossarcoma humano, no qual a trans-chalcona, que é a mais simples das chalconas, foi capaz de exercer efeito antitumoral através da indução da proteína p53 e repressão da Sp1 [100].

Alguns relatos têm sugerido que diversas chalconas podem exibir, com frequência, uma inibição preferencial por células de câncer que possuem p53 selvagem do que em células de câncer que possuem p53 mutante ou nula, tendo suas atividades inibitórias dependentes da ativação da p53. A maioria destas chalconas seletivas para p53, contudo, exerceram uma atividade limitada, demonstrando a necessidade de desenvolver derivados de chalconas mais potentes [79].

Desta forma, neste trabalho foi avaliado o potencial citotóxico e antimigração de 67 chalconas (derivadas da trans-chalcona), com substituições em seus anéis aromáticos, em linhagens de osteossarcoma humano com diferentes status de p53 (selvagem, mutante, nula). Objetivou-se identificar novos agentes para o tratamento do osteossarcoma por triagem de atividade envolvendo p53, o que se justifica pelo potencial de moléculas que modulam p53 induzirem a regressão de tumores sem afetar, significativamente, tecidos normais.

2. OBJETIVOS

O objetivo geral deste projeto foi avaliar o efeito antimetastático de chalconas em linhagens celulares de osteossarcoma com diferentes status de p53. Nesse sentido, os objetivos específicos foram:

2.1 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

Determinar o IC50 de chalconas nas linhagens de osteossarcoma U2OS (p53+/+), SAOS-2 (p53-/-) e MG63 (p53 mutante).

Avaliar o efeito de chalconas selecionadas sobre a atividade da MMP2 e MMP9 nas linhagens de osteossarcoma.

Avaliar a capacidade de migração e invasão de linhagens de osteossarcoma tratadas com chalconas selecionadas.

Analisar o perfil de expressão de Sp1, p53, MMP-9, MMP-2 e genes relacionados com EMT em células de osteossarcoma tratadas com chalconas selecionadas.

3. METODOLOGIA

3.1) LINHAGENS CELULARES

Para ensaios in vitro, foram utilizadas as linhagens celulares de osteossarcoma U2OS (p53 selvagem), SAOS-2 (p53 -/-) e MG63 (p53 mutante), adquiridas do Banco de Células do Rio de Janeiro (BCRJ).

3.1.1) CULTIVO CELULAR

O cultivo das linhagens foi feito em monocamada confluyente em garrafas de cultura de 75 cm², mantidas a 37°C sob uma atmosfera umidificada com 5% de CO₂. As linhagens U2OS e SAOS-2 foram cultivadas em meio de cultura McCoy's 5A (Sigma-Aldrich®) suplementado com 10% e 15% de soro fetal bovino, respectivamente. Para a linhagem MG63 foi utilizado meio de cultura DMEM (Sigma-Aldrich®) de baixa concentração de glicose contendo 10% de soro fetal bovino. A linhagem HCAT foi cultivada em meio RPMI-1640 com 10% de soro. Todos os meios foram suplementados com 100 µg/mL de penicilina e 100 µg/mL de estreptomicina.

3.2 CHALCONAS

Para a realização dos experimentos foi utilizado um total de 67 chalconas sintéticas, com grau de pureza verificado por Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (HPLC), sendo obtidos compostos com pureza acima de 95%. Tais moléculas foram cedidas pelo Prof. Dr. Luís Octávio Regasini do Instituto de Biociências, Letras e Ciências Exatas da UNESP-SJRP e Prof. Dr. Valdir Cechinel Filho, do Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas e Núcleo de Investigações Químico Farmacêuticas da Universidade do Vale do Itajaí, SC. As chalconas foram dissolvidas em DMSO (Dimetilsulfóxido), obtido da Sigma-Aldrich®. A diluição das chalconas sintéticas foi padronizada de tal maneira que a concentração final do solvente permanecesse inferior ou igual a 0,5%, no intuito de que o mesmo não interferisse nos resultados dos ensaios de citotoxicidade.

Tabela 1. Características estruturais das 67 chalconas.

Chalcona	Anel A					Anel B				
	R'₂	R'₃	R'₄	R'₅	R'₆	R₂	R₃	R₄	R₅	R₆
T10	H	H	H	H	H	H	OH	H	H	H
T33	H	H	H	H	H	H	OH	OH	H	H
T37	H	H	H	H	H	OH	H	H	F	H
T38	H	H	H	H	H	OH	H	H	CH₃	H
G2	NH₂	H	H	H	H	H	H	CH₃	H	H
G3	NH₂	H	H	H	H	H	H	F	H	H
G4	NH₂	H	H	H	H	H	H	Cl	H	H
G5	NH₂	H	H	H	H	H	H	Br	H	H
G6	NH₂	H	H	H	H	H	H	OCH₃	H	H
G14	NH₂	H	H	H	H	Phenyl		H	H	H
G15	NH₂	H	H	H	H	Phenyl		CH₃	H	H
G18	NH₂	H	H	H	H	H	H	C-F₃	H	H
G19	NH₂	H	H	H	H	H	Phenyl	H	H	H
G20	NH₂	H	H	H	H		Thiophene			
G21	NH₂	H	H	H	H		Furan			
G23	NH₂	H	H	H	H	H	H	CN	H	H
G24	NH₂	H	H	H	H	H	H	NO₂	H	H
G25	NH₂	H	H	H	H	H	NO₂	H	H	H
D1	H	H	NH₂	H	H	H	H	H	H	H
D2	H	H	NH₂	H	H	H	H	CH₃	H	H
D3	H	H	NH₂	H	H	H	H	F	H	H
D4	H	H	NH₂	H	H	H	H	Cl	H	H
D5	H	H	NH₂	H	H	H	H	BR	H	H
D6	H	H	NH₂	H	H	H	H	OCH₃	H	H
D14	H	H	NH₂	H	H	Phenyl		H	H	H
D15	H	H	NH₂	H	H	Phenyl		CH₃	H	H
D18	H	H	NH₂	H	H	H	H	CF₃	H	H
D19	H	H	NH₂	H	H	H	Phenyl		H	H
D20	H	H	NH₂	H	H		Thiophene			
D21	H	H	NH₂	H	H		Furan			
D23	H	H	NH₂	H	H	H	H	CN	H	H
D24	H	H	NH₂	H	H	H	H	NO₂	H	H
D25	H	H	NH₂	H	H	H	NO₂	H	H	H
A1	H	OCH₃	OH	H	H	H	H	NO₂	H	H
A2	H	OCH₃	OH	H	H	H	H	H	H	H
A3	H	OCH₃	OH	H	H		Furan			
A4	H	OCH₃	OH	H	H		Thiophene			
A5	H	OCH₃	OH	H	H	H	N	H	H	H

A6	H	OCH ₃	OH	H	H	H	Phenyl		H	H
A8	H	OCH ₃	OH	H	H	H	NO ₂	H	H	H
A9	H	OCH ₃	OH	H	H	H	H	CH ₃	H	H
A10	H	OCH ₃	OH	H	H	H	H	F	H	H
A11	H	OCH ₃	OH	H	H	H	OH	H	H	H
A12	H	OCH ₃	OH	H	H	H	H	OH	H	H
A14	H	OCH ₃	OH	H	H	H	H	Cl	H	H
A15	H	OCH ₃	OH	H	H	H	H	OCH ₃	H	H
A17	H	OCH ₃	OH	H	H	H	H	C-F ₃	H	H
A19	H	OCH ₃	OH	H	H	H	NO ₂	H	H	OH
A20	H	OCH ₃	OH	H	H	Phenyl		H	H	OH
M1		Furan-2-il				OH	H	CH ₃	H	H
M2		Furan-2-il				H	OCH ₃	OCH ₃	H	H
M3		Furan-2-il				H	H	H	H	H
M4		Furan-2-il				H	H	Morfolino	H	H
M7		Furan-2-il				H	H	CH ₃	H	H
M8		Furan-2-il				H	H	OCH ₃	H	H
M9		Furan-2-il				H	H	Cl	H	H
M10		Furan-2-il				H	Cl	Cl	H	H
M12		Furan-2-il				H	H	Imidazol	H	H
M13		Furan-2-il				H	benzodioxol		H	H
F1		Furan-3-il				OH	H	CH ₃	H	H
F2		Furan-3-il				H	OCH ₃	OCH ₃	H	H
F3		Furan-3-il				H	H	H	H	H
F4		Furan-3-il				H	H	Morfolino	H	H
F7		Furan-3-il				H	H	CH ₃	H	H
F8		Furan-3-il				H	H	OCH ₃	H	H
F9		Furan-3-il				H	H	Cl	H	H
F10		Furan-3-il				H	Cl	Cl	H	H

3.3 ATIVIDADE CITOTÓXICA

Para o screening de citotoxicidade dos 67 análogos sintéticos de chalcona foi utilizado o ensaio de MTT ((3-(4,5-Dimethylthiazol-2-yl) -2,5-Diphenyltetrazolium Bromide). Primeiramente, as células foram cultivadas em placas de 96 poços, em uma concentração de 1×10^4 células por poço durante um período de 24h, aclimatadas a temperatura de 37°C e a 5% de CO₂, para aderência. Após este período, as células foram submetidas ao tratamento por 24 horas com os análogos de chalconas na concentração de 15 µg/mL. As chalconas foram dissolvidas em DMSO, por isso, esse solvente foi utilizado como controle negativo

(DMSO 0,5%), enquanto que a doxorrubicina (2,5 µg/mL), um quimioterápico padrão, foi utilizada como controle positivo.

Após o período de tratamento, o meio foi retirado e adicionado 200 µL de meio novo juntamente com 20 µL de MTT (5 mg/ml) por poço, diluído em Hanks previamente aquecido a 37°C, por um período de 3h, com o intuito de que ocorresse uma reação catalisada por desidrogenases mitocondriais que converte (nas células viáveis) o substrato (MTT) em cristais de formazan. Após o período de incubação, as placas foram centrifugadas a 4000 rpm por 5 minutos, para sedimentação dos cristais. O sobrenadante foi descartado e adicionado 200 µl de DMSO para dissolução dos cristais de formazan e, em seguida, foram reincubadas por 1 hora. A leitura da absorbância foi feita em leitor de microplacas ELISA (Thermo Plate reader) num comprimento de onda de 550 nm. Os ensaios foram realizados em três experimentos independentes. A citotoxicidade dos compostos foi determinada pelo cálculo:

$$\% \text{ de inibição da viabilidade celular} = [1 - (\text{absorbância do poço experimental} / \text{absorbância do poço controle negativo})] \times 100.$$

3.4 ENSAIO DE MIGRAÇÃO MÉTODO *WOUND-HEALING*

As atividades de migração, das três linhagens celulares de interesse, foram observadas através do ensaio de migração em monocamada *in vitro*. As células foram semeadas em placas de 24 poços na concentração de 3×10^5 por poço, utilizando meio de cultura com soro e aclimatadas a temperatura de 37°C e a 5% de CO₂ por 24h (ou até adquirirem confluência necessária). Após esse período, com auxílio de uma ponteira de 10 µL, foi feita uma “ferida” na monocamada, criando uma área livre de células. O meio de cultura foi retirado e os poços foram lavados com Hanks aquecido previamente em banho maria a 37° C. Os poços foram tratados com 67 análogos de chalconas diluídas em meio de cultura, exceto os controles que receberam apenas o meio, e permaneceram na estufa por 24 horas. Foi utilizada a concentração de 7,5 µg/mL para todas as chalconas. Os poços foram fotografados no tempo 0 h e 24 h. O índice de migração celular foi determinado pela diferença da área da “ferida” na comparação do tempo 0h com o tempo 24h, utilizando-se o programa Image J.

Taxa de migração (%) = [(área da ferida no tempo 0 h - área da ferida no tempo 24 h) / área da ferida no tempo 0 h] × 100%.

3.5 ENSAIOS DE MIGRAÇÃO COM *TRANSWELL*

Para este ensaio foram usadas 4 chalconas, escolhidas a partir dos dados de *Wound Healing* e valores de IC₅₀. Utilizou-se, ainda, placas do tipo *Transwell*® (Costar) contendo poros de 8µm de diâmetro. As células U2OS e SAOS-2, numa concentração de 2 x 10⁵ células por *Transwell*, foram semeadas em meio isento de soro fetal bovino na câmara superior do *Transwell* e a câmara inferior foi preenchida com 850 µL de meio contendo 10% de soro fetal bovino. As 4 chalconas, em diferentes concentrações, foram adicionadas tanto na parte superior quanto inferior do *Transwell*. As placas permaneceram em estufa aclimatada a temperatura de 37°C e a 5% de CO₂ por 24 horas. Decorrido o período de migração, os insertos foram lavados em PBS e as células fixadas em 3,7% formaldeído e incubadas por 2 minutos. Após o processo de fixação, os insertos foram lavados em PBS e incubados por 20 minutos em metanol. Em seguida, as células foram lavadas em PBS e coradas com Giemsa, incubadas por 15 minutos com a placa coberta. Por fim, as células que não foram capazes de atravessar a membrana porosa (parte superior do inserto), foram removidas com o auxílio de hastes flexíveis de algodão. Para se obter a porcentagem de células que migraram, as membranas foram descoradas com 100 µL de ácido acético 33%. Após a solubilização do corante, a absorbância foi mensurada em leitor de microplacas num comprimento de onda de 492 nm. A inibição da migração celular (IMC) foi determinada pelo cálculo:

% de IMC = [1-(absorbância do poço experimental/absorbância do poço controle negativo)] x 100.

3.6 ENSAIO DE INVASÃO

Este ensaio foi realizado utilizando placas do tipo *Transwell*® (Costar) contendo poros de 8 µm de diâmetro revestidas com 1 mm de Matrigel. No compartimento inferior de cada poço, foi adicionado 850 µL de meio contendo 10% de soro fetal bovino. No

compartimento superior de cada *Transwell* adicionou-se 2×10^5 células tratadas com as chalconas escolhidas, em meio sem soro, sobre as membranas porosas. As placas foram incubadas em estufa a 37°C a 5% CO_2 por um período de 24 horas para permitir a invasão das células para a face inferior da membrana. Decorrido o período de invasão, os insertos foram lavados em PBS e as células fixadas em 3,7% formaldeído e incubadas por 2 minutos. Após o processo de fixação, os insertos foram lavados em PBS e incubados por 20 minutos em metanol. Em seguida, as células foram lavadas em PBS e coradas com Giemsa, incubadas por 15 minutos com a placa coberta. Por fim, as células que não foram capazes de atravessar a membrana porosa revestida com Matrigel (parte superior do inserto), foram removidas com o auxílio de hastes flexíveis de algodão. Para se obter a porcentagem de células que invadiram as membranas foram descoradas com 100 μL de ácido acético 33%. Após a solubilização do corante a absorbância foi mensurada em leitor de microplacas, num comprimento de onda de 492 nm. A inibição da invasão celular (IVC) foi determinada pelo cálculo:

% de IVC = $[1 - (\text{absorbância do poço experimental} / \text{absorbância do poço controle negativo})] \times 100$.

3.7 APOPTOSE

A atividade apoptótica das chalconas sobre as linhagens celulares foi analisada por citometria de fluxo, utilizando-se o Kit BD Pharmingen™ FITC Annexin V Apoptosis Detection Kit I. Para esse ensaio foram utilizadas as linhagens U2OS e SAOS-2. As células foram semeadas em placas de seis poços (5×10^5 células por poço) e deixadas em estufa para aderência. Os poços, exceto controle, foram tratados com as chalconas desejadas, G24 e G25, utilizando-se os valores encontrados no cálculo do IC_{50} . As placas permaneceram na estufa por 24h. Após esse tratamento, as células flutuantes e aderentes foram coletadas e centrifugadas. Em seguida, foram lavadas com PBS e ressuspensas com tampão. Transferiu-se o coletado para tubo de ensaio, adicionou-se 5 μL de anexina-FITC e incubou-se por 15 minutos. Após o período, adicionou-se 5 μL de iodeto de propídio (PI) e feita a leitura em citômetro de fluxo BD FACSCalibur™ Flow Cytometer (BD Biosciences).

3.8 ZIMOGRAFIA

Para verificação do efeito das chalconas sobre a atividade de metaloproteinases da matriz (MMPs 2 e 9) foi realizado o ensaio de zimografia. Com essa finalidade, foram utilizadas as linhagens celulares U2OS e SAOS-2. As células foram semeadas em placas de seis poços e incubadas em estufa até aderência. Em seguida, realizou-se o tratamento com as chalconas D14, D15 (concentração 27 μ M e 54 μ M para ambas) e com as chalconas G24 e G25 (valor encontrado no cálculo de IC₅₀ e metade do valor de IC₅₀), diluídas em meio sem soro fetal bovino. As células permaneceram na estufa por 24 horas. Após o período, o meio celular foi recolhido. À quantidade desejada da amostra adicionou-se tampão e os tubos foram deixados no banho por 10 minutos (50° C). Em seguida, as amostras foram centrifugadas e separadas por eletroforese em gel SDS-PAGE 7% contendo 0,1% de gelatina. Após o tempo de corrida, o gel passou pela etapa de renaturação com solução de Triton 2,5% e, posteriormente, foi incubado com tampão Tris-CaCl₂ e mantido *overnight* em estufa a 37°C. Após o tempo determinado, o tampão foi substituído por corante Coomassie Blue e o gel permaneceu em agitação constante até ser corado. Em seguida, o corante foi substituído pelo descorante e o gel foi digitalizado em *scanner* e as atividades gelatinolíticas das MMPs foram mensuradas usando o software ImageJ.

3.9 PCR

Nesse experimento, as células (U2OS; SAOS-2) foram semeadas em placas de seis poços, tratadas com as chalconas D14, D15, G24 e G25 em diferentes concentrações (D14 e D15 54 μ M e G24 e G25 valores obtidos no IC₅₀). Após o período necessário, as células foram colhidas e o RNA extraído seguindo o protocolo do Kit Reliaprep (Promega). Em seguida, realizou-se a síntese de cDNA utilizando-se o protocolo do Kit GoScript RT Mix (Promega), e as seguintes condições de ciclo térmico:

Componentes Síntese cDNA	Volume
--------------------------	--------

Nuclease-Free Water	4µl
GoScript™ Reaction Buffer, Random Primer	4µl
GoScript™ Enzyme Mix	2µl
Volume Final	10µl

25°C	10 minutos
37°C	120 minutos
85°C	5 minutos
4°C	Armazenamento

As reações de PCR foram realizadas utilizando GoTaq® Green Master Mix (Promega) com os iniciadores (*primers*) descritos na tabela abaixo:

Componentes	Volume
Master Mix	12,5 µl
Primer F (10 µM)	1 µl
Primer R (10 µM)	1 µl
H ₂ O	9,5 µl
cDNA	1 µl
Total	25 µl

Tabela 2. Sequência dos iniciadores (primers) utilizados nas reações de PCR.

Gene	Sequência	Fragmento
MMP2-F	5'- TTCCCCTTCTTGTTCAATGG -3'	376 pb
MMP2-R	5'- ATTTGTTGCCAGGAAAGTG -3'	
MMP9-F	5'- TTGACAGCGACAAGAAGTGG-3'	179 pb
MMP9-R	5'- GCCATTCACGTCGTCCTTAT-3'	
Vimentina-F	5'- TGTCCAAATCGATGTGGATGTTTC -3'	117 pb
Vimentina-R	5'- TTGTACCATTCTTCTGCCTCCTG -3'	
E-caderina-F	5'- TGCCCAGAAAATGAAAAAGG-3'	200 pb

E-caderina-R	5'- GTGTATGTGGCAATGCGTTC-3'	
N-caderina-F	5'- GACAATGCCCCTCAAGTGTT-3'	179 pb
N-caderina-R	5'- CCATTAAGCCGAGTGATGGT-3'	
Slug-F	5'- GAGCATACAGCCCCATCACT-3'	208 pb
Slug R	5'- GGGTCTGAAAGCTTGGACTG-3'	
Snail-F	5'- TTTACCTTCCAGCAGCCCTA-3'	207 pb
Snail-R	5'- CCCACTGTCCTCATCTGACA-3'	
β -catenina-F	5'- GAAACGGCTTTCAGTTGAGC-3'	166 pb
β -catenina-R	5'- CTGGCCATATCCACCAGAGT-3'	
GAPDH-F	5'-GACCACAGTCCATGCCATCACT-3'	
GAPDH-R	5'- TCCACCACCCTGTTGCTGTAG -3'	453 pb

As condições de ciclo térmico foram as seguintes:

1º Ciclo 94°C 2 minutos	1 ciclo
2º Ciclo 94°C 30 segundos	40 ciclos
3º Ciclo 60°C 30 segundos	
4º Ciclo 72°C 30 segundos	
5º Ciclo 72°C 5 minutos	1 ciclo

Os produtos de PCR foram submetidos a eletroforese em gel de agarose 1,5% (contendo 1 μ g/ml de brometo de etídeo) e fotografados sob luz UV.

3.10 QPCR

As células U2OS e SAOS-2 foram semeadas em placas de seis poços, tratadas com as chalconas D14, D15, G24 e G25 em diferentes concentrações (54 μ M para D14 e D15 e o IC₅₀ para as G24 e G25), diluídas em meio sem soro fetal bovino. Após o período necessário, as células foram colhidas e o RNA extraído seguindo o protocolo do Kit Reliaprep. Em seguida, realizou-se a síntese de cDNA utilizando-se o protocolo do Kit GoScript RT Mix.

PCR quantitativo foi realizado utilizando o sistema TaqMan Gene Expression Assay para os genes TP53, Sp1 e RPL30 (gene constitutivo).

Gene	ID (Gene Expression Assay)	Refseq(NCBI)	Fragmento (pb)
TP53	Hs01034249_m1	NM_000546.5	108
Sp1	Hs00916521_m1	NM_001251825.1	72
RPL30	Hs00265497_m1	NM_000989.3	149

As reações de PCR em tempo real foram realizadas de acordo com o protocolo do Kit Taqman Universal Master Mix II.

Reagentes	Volumes
TaqMan® Gene Expression Assay 20X	1,0 µL
TaqMan® Gene Expression Assay Master Mix 2X	10 µL
Água livre de RNase	8 µL
cDNA	1,0 µL
Volume Final	20 µL

Após o preparo das reações, os tubos foram colocados no termociclador Mx3005P® (Agilent Stratagene) com as seguintes condições de ciclo térmico:

1º Ciclo 95°C 10 minutos	1 ciclo
2º Ciclo 95°C 15 segundos	40 ciclos
3º Ciclo 60°C 1 minuto	

Para a análise do padrão de expressão dos genes TP53 e Sp1, após os tratamentos com as chalconas D14, D15, G24 e G25, foi usado o método de quantificação relativa, no qual a amostra não tratada funciona como calibrador do ensaio (valor base da expressão do gene alvo) e o gene constitutivo RPL30 (expressão constante nas células tratadas e não tratadas) como normalizador. Assim, a diferença no valor do Ct (*threshold cycle* ou limiar de fluorescência) entre os tratamentos e o calibrador (amostra não tratada) é expressa como *fold change*, ou seja, regulação negativa ou positiva do gene em relação ao calibrador. Os valores

de *fold change* foram calculados automaticamente a partir da equação de Quantificação Relativa: $2^{-(\Delta\Delta Ct)}$

$$\Delta\Delta Ct = (\text{Ct gene alvo} - \text{Ct normalizador})_{\text{tratamento}} - (\text{Ct gene alvo} - \text{Ct normalizador})_{\text{calibrador}}$$

3.11 WESTERN BLOT

As linhagens celulares U2OS e SAOS-2 foram semeadas em placas de 6 poços até aderência. Em seguida, foram tratadas com as chalconas desejadas utilizando meio sem soro fetal bovino e permaneceram em estufa por 24 horas. Após o período, as células foram lisadas utilizando RIPA Buffer contendo inibidores de protease (1 mM de fluoreto de fenilmetilsulfonilo, 153 nM de aprotinina, 2,3 μ M de leupeptina, 0,1 nM de ortovanadato de sódio e 25 mM de fluoreto de sódio). As células foram transferidas para tubos de 1,5 ml e colocadas imediatamente no gelo. Após as amostras serem agitadas por 30 minutos elas foram centrifugadas. O sobrenadante foi transferido para novo tubo e quantificado. As amostras de proteína foram então colocadas no banho (95° C) por cinco minutos, centrifugadas e submetidas a eletroforese em gel SDS-PAGE 10% por 1 hora (100 volts, 360 mAmp). Após o período fez-se a transferência das proteínas do gel para membrana de nitrocelulose (AmershamTMProtranTM 0,45 μ m NC – GE Healthcare) por 1 hora (100 volts, 360 mAmp) a 4°C. Por fim, a membrana foi corada com solução Biebrich Scarlet por cerca de 30 segundos, lavada com água destilada para remoção do excesso de corante e deixado sob agitação contínua com tampão TBST (25mM Tris, 3mM KCl, 0.14M NaCl, 0.1% Tween 20) por cinco minutos. Em seguida, adicionou-se solução de bloqueio (TBST contendo 5% de leite sem gordura), para neutralização de sítios inespecíficos, pelo período de uma hora sob agitação contínua e em temperatura ambiente. Após tempo indispensável, a solução foi removida e adicionou-se os anticorpos primários anti-p53 (1:500), anti-Sp1 (1:500), anti-Vimentina (1:1000), anti-E-caderina (1:250), anti-PARP (1:250), anti-Caspase 3 (1:250) e anti- β -actina (1:100) (Santa Cruz Biotechnology) diluídos em solução de bloqueio, permanecendo sob agitação contínua overnight a 4° C. Passado o tempo necessário, a solução foi removida e a membrana lavada com TBST 3 vezes por 10 minutos sob agitação contínua, à temperatura ambiente, para retirada do anticorpo primário que não se ligou à membrana.

Em seguida, adicionou-se anticorpo secundário conjugado a HRP (*horseradish-peroxidase*) diluído em solução de bloqueio (1:10000), que permaneceu em agitação contínua à temperatura ambiente por uma hora. Lavou-se novamente a membrana com TBST 4 vezes por 10 minutos para retirada do anticorpo secundário não ligado e adicionou-se o reagente revelador ECL Prime WB Detection Reagent (GE Healthcare). A leitura foi realizada no Image Quant LAS 500 (GE Healthcare).

3.12 VETOR DE EXPRESSÃO E TRANSFECCÃO

O vetor de expressão de p53 foi generosamente cedido pelo Dr. Seung Baek (Seoul National University, Korea). A transfecção foi realizada utilizando Lipofectamine 3000 Reagent (Thermo Scientific, Rockford, IL, USA), de acordo com as instruções do fabricante. Basicamente, células SAOS-2 (p53 nula) foram crescidas em placas de 6 poços e transfectadas por 48h com 5 µg do vetor expressando p53. Após a transfecção um clone estável de SAOS-2 expressando p53 (SAOS-2 exp p53) foi selecionado em meio de cultura suplementado com 500 µg/ml G418 (antibiótico) por duas semanas.

3.13 ANÁLISE ESTATÍSTICA

Os resultados obtidos foram submetidos a análise de variância (ANOVA). Os dados são expressos como média ± desvio padrão, de no mínimo três experimentos independentes. Os resultados foram considerados estaticamente significativos para $p < 0,05$, $p < 0,01$ e $p < 0,001$.

Os valores de IC_{50} foram calculados a partir das curvas dose-resposta (concentração x inibição da viabilidade) obtidas nos experimentos de MTT. Os cálculos foram executados com o programa *GraphPad Prism 6*, utilizando-se o método de regressão não linear.

4. RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1 ANÁLISE DA CITOTOXICIDADE (INIBIÇÃO DA VIABILIDADE CELULAR) PELO ENSAIO DE MTT

A citotoxicidade das 67 chalconas contra as linhagens de osteossarcoma U2OS (p53 selvagem), SAOS-2 (p53 nula) e MG63 (p53 mutante) foi avaliada numa concentração inicial de 15 µg/ml.

Dentre as 67 chalconas testadas, quatro apresentavam a estrutura básica das chalconas e hidroxilação no anel B e, portanto, são denominadas hidroxichalconas. As hidroxichalconas T10, T37 e T38 que possuem apenas uma hidroxila (na posição 2 ou 3) apresentaram elevada citotoxicidade (64,9-82,6% de inibição celular) contra as 3 linhagens de osteossarcoma. Por sua vez, a chalcona T33 que apresenta uma dihidroxilação nas posições 3 e 4, apresentou menor citotoxicidade contra todas as linhagens testadas, sugerindo que a adição de uma hidroxila na posição 4 do anel B teve um efeito negativo na atividade citotóxica. Resultado semelhante foi encontrado em estudo anterior, no qual uma chalcona portando um substituinte 4-OH apresentou menor potencial para induzir citotoxicidade e apoptose em células de câncer de próstata [101].

Dentre as chalconas testadas, 14 possuíam um grupo NH₂ na posição 2' do anel A e, portanto, foram denominadas de 2'-aminochalconas. As 2'-aminochalconas G4 e G18 que possuem como substituintes, na posição 4 do anel B, os grupos captadores de elétrons Cl e CF₃, respectivamente, foram as mais eficientes em reduzir a viabilidade das 3 linhagens de osteossarcoma (74-82% de inibição). Chalconas que possuem átomos halogênicos como substituintes no anel B, seja na forma de um único átomo de Cl ou trifluorometil (CF₃), têm demonstrado melhor atividade citotóxica contra diferentes linhagens tumorais [102, 103]. A presença de halogênio pode aumentar a lipofilicidade das chalconas e, assim, facilitar a passagem através da membrana de células tumorais [103]. Além disso, em alguns casos, como na presença de flúor, as fortes ligações entre C-F resistem à oxidação metabólica, aumentando a estabilidade da molécula e, portanto, prolongando sua atividade [104].

A presença de grupos fenil, metila e metoxila no anel B reduziu a atividade citotóxica das 2'-aminochalconas. A presença conjunta de fenil e metila como substituintes no anel B

reduziu de forma ainda mais acentuada a citotoxicidade, como observado para a chalcona G15, que reduziu a viabilidade das linhagens de osteossarcoma em apenas 30-32%. Já foi reportado que esses tipos de substituições no anel B podem reduzir a atividade citotóxica de aminochalconas contra linhagens de câncer de mama, pulmão, cólon, ovário e cervical [105, 106]. Assim, o presente estudo reforça essa ideia para o osteossarcoma.

A substituição do anel B por um anel heterocíclico de 5 membros contendo um átomo de oxigênio (anel furano) ou enxofre (anel tiofeno), reduziu consideravelmente a atividade citotóxica contra as 3 linhagens de osteossarcoma, como observado para as chalconas G20 e G21. Efeito similar foi reportado por Reddy et al. 2008, no qual a substituição do anel B por furano ou tiofeno afetou negativamente a atividade de chalconas contra linhagens de câncer de próstata, mama e carcinoma nasofaríngeo [107]. Entretanto, quando o anel furano é fusionado ao anel A de chalconas, ele pode aumentar a atividade antiproliferativa contra células de leucemia promielocítica humana [108]. Por sua vez, o grupo tiofeno aumenta a atividade citotóxica de chalconas em que o anel A consiste de um grupo fenotiazina [109].

Também foi avaliado o efeito de 15 chalconas com um grupo NH₂ na posição 4' do anel A que foram denominadas de 4'-aminochalconas. Assim como observado para as 2'-aminochalconas, a presença de Cl e CF₃ na posição 4 do anel B contribuiu para o aumento da citotoxicidade das 4'-aminochalconas. Por outro lado, a presença de CH₃, fenil, furano e tiofeno reduziu a atividade citotóxica. As 4'-aminochalconas mais efetivas foram a D4 e D18 que reduziram a viabilidade das células de osteossarcoma em 52-82%.

Em geral, a presença de grupo amino aumenta a efetividade de chalconas como "Michael acceptors" e conseqüentemente sua atividade citotóxica contra células tumorais, pois em pH mais ácidos (como em tumores), a função de amônio protonado aumentaria o efeito de remoção de elétrons [110]. Isso pode explicar, em parte, porque a presença de halogênios captadores de elétrons influenciou positivamente na atividade das aminochalconas.

Testou-se, ainda, chalconas derivadas de apocinina, que apresentam como característica estrutural um grupo metoxila (OCH₃) na posição R3 do anel A. A presença de N, na posição R3' do anel B, contribuiu para o aumento da atividade contra as linhagens U2OS e SAOS-2, como observado na chalcona A5. Diferentemente do observado para as aminochalconas, a presença dos grupos Cl ou CF₃ não contribuiu significativamente para o aumento da atividade, pelo contrário, no caso específico do CF₃ houve uma drástica redução

na atividade citotóxica, como observado para a chalcona A17. A presença de grupo furano e tiofeno também diminuiu a atividade citotóxica das chalconas derivadas de apocinina.

Também foi avaliada a atividade citotóxica de 11 chalconas furano-2-il. A substituição de um grupo metil na posição 4 do anel A aumentou levemente a atividade da chalcona M7, enquanto a presença de substituintes NH₂ ou morfolino diminuiu a atividade das chalconas, especialmente na linhagem SAOS-2.

Outra classe avaliada foi de chalconas carregando o grupo furano-3-il. As chalconas mais citotóxicas dessa classe, contra as três linhagens celulares, foram as chalconas F7, F9 e F10, que apresentam 4-CH₃, 4-Cl e 3,4-Cl no anel A, respectivamente. A chalcona menos eficiente dessa classe foi a F4 que apresenta um grupo morfolino.

Tabela 3. Efeito das chalconas sobre a viabilidade celular das linhagens de osteossarcoma U2OS, SAOS-2 e MG63.

Chalcona	Inibição (%)	Inibição (%)	Inibição (%)
	U2OS (p53 selvagem)	SAOS-2 (p53 nula)	MG63 (p53 mutante)
T10	64,95 ± 3,5 (h)	70,11 ± 3,3 (i)	82,65 ± 4,61 (l)
T33	53,88 ± 0,49 (g)	50,57 ± 3,21 (g)	55,45 ± 6,7 (g)
T37	72,27 ± 2,59 (i)	69,22 ± 6,9 (i)	74,52 ± 3,27 (j)
T38	75,69 ± 3,09 (j)	69,26 ± 5,01 (i)	72,7 ± 2,31 (i)
G2	38,81 ± 1,31 (f)	43,92 ± 1,07 (f)	64,19 ± 3,66 (h)
G3	63,27 ± 3,78 (h)	51,37 ± 3,83 (g)	71,28 ± 1,93 (i)
G4	78,13 ± 2,34 (j)	74,09 ± 5,40 (i)	82,38 ± 0,97 (l)
G5	78,6 ± 2,43 (l)	67,85 ± 3,16 (i)	52,49 ± 7,85 (g)
G6	26,69 ± 2,35 (d)	35,45 ± 3,93 (e)	63,81 ± 5,19 (h)
G14	44,78 ± 0,99 (f)	38,64 ± 3,55 (e)	68,28 ± 1,91 (i)
G15	30,25 ± 1,92 (e)	32,29 ± 6,37 (e)	28,76 ± 0,7 (d)
G18	80,47 ± 2,66 (l)	75,95 ± 3,95 (j)	80,6 ± 6,06 (l)
G19	30,96 ± 0,96 (e)	32,56 ± 2,86 (e)	57,32 ± 1,51 (h)
G20	32,41 ± 4,59 (e)	33,88 ± 6,12 (e)	45,51 ± 2,7 (f)

G21	18,61 ± 4,85 (c)	21,84 ± 5,65 (c)	36,86 ± 6,49 (e)
G23	56,17 ± 0,68 (h)	53,61 ± 5,24 (g)	67,52 ± 6,15 (i)
G24	60,43 ± 2,30 (h)	50,41 ± 5,85 (g)	69,47 ± 4,15 (i)
G25	61,14 ± 1,92 (h)	59,74 ± 5,27 (h)	75,07 ± 6,39 (j)
D1	26,41 ± 3,51 (d)	47,52 ± 6,98 (g)	64,70 ± 5,88 (h)
D2	13,69 ± 2,57 (c)	44,19 ± 3,94 (f)	49,43 ± 7,13 (g)
D3	25,27 ± 4,94 (d)	53,32 ± 2,06 (g)	58,42 ± 5,93 (h)
D4	52,08 ± 5,61 (g)	50,56 ± 5,41 (g)	73,75 ± 4,29 (i)
D5	46,26 ± 2,14 (f)	55,08 ± 4,62 (g)	75,06 ± 0,88 (j)
D6	28,02 ± 2,11 (d)	36,7 ± 3,36 (e)	34,38 ± 4,17 (e)
D14	0.0 ± 4,43 (b)	16,21 ± 5,5 (c)	60.23 ± 5.5 (h)
D15	16,48 ± 2,46 (c)	4.18 ± 2,95 (b)	56.64 ± 7,85 (h)
D18	63,64 ± 1,53 (h)	68,24 ± 1,39 (i)	82,28 ± 2,72
D19	2,32 ± 1,79 (b)	21,32 ± 8,11 (c)	56,9 ± 6,1 (h)
D20	34,99 ± 0,93 (e)	15,67 ± 1,83 (c)	50,15 ± 3,82 (g)
D21	19,57 ± 0,82 (c)	25,36 ± 1,11 (d)	35,58 ± 7,54 (e)
D23	52,91 ± 2,43 (g)	32,93 ± 3,93 (e)	57,03 ± 2,23 (h)
D24	37,63 ± 5,24 (e)	40,04 ± 3,29 (f)	49,10 ± 3,54
D25	34,15 ± 1,19 (e)	29,8 ± 3,65 (d)	50,90 ± 3,18 (g)
A1	41,37 ± 5,9 (f)	30,95 ± 5,94 (e)	41,16 ± 3,86 (f)
A2	45,78 ± 4,15 (f)	38,86 ± 3,48 (f)	41,70 ± 7,18 (f)
A3	7,04 ± 1,90 (b)	17,45 ± 0,11 (c)	27,54 ± 6,18 (d)
A4	8,71 ± 3,99 (b)	5,73 ± 0,83 (b)	11,05 ± 0,05 (c)
A5	74,41 ± 7,56 (i)	79,97 ± 5,60 (l)	34,33 ± 5,96 (e)
A6	27,17 ± 4,44 (d)	19,46 ± 3,44 (c)	47,18 ± 4,64 (g)
A8	54,14 ± 3,44 (g)	52,34 ± 5,33 (g)	58,08 ± 7,29 (h)
A9	42,73 ± 3,10 (f)	25,35 ± 6,95 (d)	44,84 ± 3,02 (f)
A10	49,17 ± 4,58 (g)	30,42 ± 6,23 (e)	54,34 ± 7,35 (g)
A11	54,06 ± 6,06 (g)	30,92 ± 5,65 (e)	49,61 ± 5,90 (g)

A12	29,15 ± 0,37 (d)	20,54 ± 1,39 (c)	35,19 ± 3,94 (e)
A14	39,87 ± 3,59 (f)	20,62 ± 6,07 (c)	62,01 ± 7,52 (h)
A15	18,66 ± 3,62 (c)	52,30 ± 7,23 (g)	40,97 ± 6,10 (f)
A17	-13,22 ± 4,79 (a)	8,22 ± 2,96 (b)	0,53 ± 5,75 (b)
A19	47,22 ± 4,15 (g)	20,39 ± 8,22 (c)	40,46 ± 5,63 (f)
A20	29,52 ± 3,79 (d)	34,59 ± 1,51 (e)	61,21 ± 3,45 (h)
F1	57,39 ± 7,9 (h)	42,94 ± 2,93 (f)	49,25 ± 2,74 (g)
F2	56,22 ± 8,58 (h)	39,23 ± 1,42 (f)	63,57 ± 2,15 (h)
F3	75,3 ± 5,2 (j)	54,69 ± 4,20 (g)	62,82 ± 4,72 (h)
F4	49,93 ± 6,13 (g)	25,23 ± 3,57 (d)	31,70 ± 6,17 (e)
F7	78,10 ± 5,68 (j)	80,02 ± 2,20 (l)	71,01 ± 3,47 (i)
F8	76,47 ± 4,95 (j)	52,45 ± 5,95 (g)	69,06 ± 5,37 (i)
F9	81,21 ± 4,83 (l)	65,72 ± 5,98 (h)	75,65 ± 3,10 (j)
F10	88,33 ± 0,80 (l)	74,85 ± 1,90 (j)	79,05 ± 2,94 (l)
M1	63,05 ± 5,52 (h)	42,34 ± 2,98 (f)	64,83 ± 3,88 (h)
M2	67,71 ± 5,96 (i)	48,78 ± 4,91 (g)	65,80 ± 2,79 (i)
M3	58,88 ± 6,48 (h)	50,54 ± 3,26 (g)	69,78 ± 1,17 (i)
M4	52,51 ± 5,84 (g)	32,49 ± 5,93 (e)	53,81 ± 2,06 (g)
M7	74,05 ± 6,21 (i)	69,52 ± 1,10 (i)	77,79 ± 0,82 (j)
M8	67,44 ± 2,98 (i)	44,63 ± 3,44 (f)	58,71 ± 4,77 (h)
M9	56,99 ± 0,40 (h)	50,45 ± 2,81 (g)	66,25 ± 1,94 (i)
M10	60,4 ± 5,60 (h)	31,20 ± 4,10 (e)	44,31 ± 3,70 (f)
M12	55,79 ± 7,10 (h)	49,17 ± 4,86 (g)	71,42 ± 1,35 (i)
M13	44,71 ± 3,84 (f)	43,19 ± 4,27 (f)	57,86 ± 3,12 (h)
DOXO	63,1 ± 11,03 (h)	50,27 ± 1,40 (g)	69,67 ± 0,35 (i)
DMSO	1,47 ± 0,95 (b)	0,016 ± 3,85 (b)	2,15 ± 1,33 (b)

ANOVA - Scott-Knott (p < 0,05)

Das 67 chalconas testadas na triagem inicial, 16 foram selecionadas para determinação dos valores de IC₅₀ (concentração que inibe 50% da viabilidade celular). A

partir das curvas dose-resposta, obteve-se os valores de IC₅₀ apresentados na tabela 4, onde observa-se que, a maioria das chalconas apresentaram valores de IC₅₀ menores para as linhagens expressando p53 (U2OS e MG63) do que para a linhagem p53 nula (SAOS-2), indicando uma possível participação da expressão de p53 no efeito dessas chalconas. Entretanto, não se pode descartar que isto ocorreu apenas por uma maior resistência intrínseca, independente de p53, da linhagem SAOS-2. A tabela 4 também contém os valores de IC₅₀ das chalconas para a linhagem normal de queratinócito humano (HACAT). Em diversos casos, os valores de IC₅₀ para essa linhagem foram superiores aos encontrados para as linhagens de osteossarcoma, o que indica uma certa seletividade das chalconas testadas contra células tumorais. Conforme demonstrado na tabela 4, as chalconas que apresentaram os menores valores de IC₅₀ foram as 2'-aminochalconas G18 e G24 e as hidroxichalconas T10, T37 e T38. Comparando-se os valores de IC₅₀ para as linhagens U2OS e HACAT, as chalconas G18 e G24 foram as mais seletivas, pois apresentaram um IC₅₀ quase 3 vezes menor para a linhagem tumoral U2OS. Estes resultados indicam o potencial dos grupos substituintes 4-CF₃ e 4-NO₂ de aumentar tanto a atividade citotóxica quanto a seletividade das 2'-aminochalconas. Um aspecto interessante observado foi que a chalcona G24 demonstrou maior citotoxicidade e seletividade que a chalcona G25, estas chalconas apresentam o mesmo grupo substituinte (NO₂), mas em posições diferentes no anel B, o que indica que a presença do grupo NO₂ na posição 4 é mais efetiva do que na posição 3.

Tabela 4. Valores de IC₅₀ das chalconas para as linhagens de osteossarcoma U2OS, SAOS-2 e MG-63 e para a linhagem normal HACAT.

Chalconas	IC ₅₀ (µM)			
	U2OS	SAOS-2	MG-63	HACAT
F7	25,44 ± 1,68 (d)	44,49 ± 2,14 (g)	22,93 ± 0,56 (c)	47,96 ± 0,97 (g)
M9	43,26 ± 9,79 (f)	64,11 ± 1,46 (i)	40,58 ± 0,21 (f)	49,23 ± 0,86 (h)
M10	41,08 ± 5,19 (f)	76,00 ± 4,26 (j)	61,99 ± 1,93 (i)	90,33 ± 5,92 (l)
M11	36,10 ± 1,39 (e)	72,52 ± 3,41 (j)	37,40 ± 3,00 (e)	63,17 ± 6,59 (i)
D23	34,73 ± 4,70 (e)	> 60	26,63 ± 0,74 (d)	> 60

A5	51,29 ± 1,53 (h)	46,44 ± 1,47 (g)	> 60	> 60
G4	17,02 ± 1,70 (b)	21,76 ± 3,05 (c)	12,97 ± 0,23 (b)	28,70 ± 1,11 (d)
G18	8,63 ± 0,84 (a)	15,99 ± 0,41 (b)	14,89 ± 2,09 (b)	23,03 ± 0,63 (c)
D14	> 100	>100	52,33 ± 0,65 (h)	>100
D15	> 100	> 100	46,79 ± 0,99 (g)	> 100
G23	17,73 ± 2,49 (b)	35,10 ± 5,81 (e)	10,25 ± 2,16 (a)	29,97 ± 3,54 (d)
G24	7,24 ± 1,21 (a)	17,79 ± 2,02 (b)	10,84 ± 0,63 (a)	19,46 ± 0,68 (c)
G25	16,77 ± 1,32 (b)	34,51 ± 1,10 (e)	14,51 ± 0,86 (b)	22,14 ± 1,16 (c)
T10	8,93 ± 0,75 (a)	29,67 ± 3,58 (d)	11,37 ± 0,65 (a)	20,25 ± 2,20 (c)
T37	7,54 ± 0,20 (a)	8,64 ± 0,34 (a)	8,37 ± 0,23 (a)	13,37 ± 0,54 (b)
T38	8,23 ± 0,45 (a)	8,81 ± 0,34 (a)	7,66 ± 0,63 (a)	12,34 ± 1,67 (b)

ANOVA - Scott-Knott (p < 0,05)

OBS: Nesse estudo, citotoxicidade e inibição da viabilidade celular, estão sendo empregadas como sinônimo, por motivo de didática. Há ciência da diferença pontual entre ambos.

4.2 ANÁLISE DA MIGRAÇÃO CELULAR PELO ENSAIO *WOUND-HEALING*

Células tumorais necessitam se dissociar do tumor primário para migrar e invadir a membrana basal, invadir o sistema vascular e viajar através dele até atingir sítios distantes, onde poderão aderir e crescer formando metástases. Ou seja, a migração e invasão celular são duas etapas fundamentais para o processo de metástase e, assim, são consideradas alvos promissores para bloquear o processo metastático. Por isso, realizou-se a avaliação do efeito inibitório das 67 chalconas sobre a migração celular através da técnica da ferida (Tabela 5).

Em geral, todas as hidroxichalconas foram extremamente eficazes em reprimir a migração nas três linhagens celulares, exceto a chalcona T33. Essa chalcona é a única que possui um grupo 4-OH no anel B, o que sugere que essa substituição atuou de forma negativa no efeito dessa chalcona. Entretanto, estudos mostram que a 4- hidroxichalcona tem grande potencial de inibir migração celular e angiogênese através da regulação de VEGF e FGF

[111, 112]. Assim, é provável que o efeito negativo do grupo 4-OH dependa da presença de outra hidroxila na molécula, como ocorre na chalcona T33.

A chalcona T38 foi extremamente eficaz nas duas linhagens que carregam p53 selvagem ou mutante. Por outro lado, seu efeito sobre a linhagem p53 nula decaiu cerca de dezessete vezes, demonstrando a possível participação da p53 na inibição da migração promovida por esta chalcona.

Entre as chalconas do grupo 2'-aminochalconas, as chalconas G3 e G5 inibiram fortemente a migração na linhagem U2OS (mais de 90%). No entanto, este efeito foi reduzido em mais de dez vezes na linhagem SAOS-2, indicando a possível participação da p53 no efeito inibitório dessas chalconas. A p53 também pode estar envolvida no efeito da chalcona G24, uma vez que ela provocou uma inibição 2,7 vezes maior na migração da U2OS do que na SAOS-2. A presença de grupos halogênicos 4-F e 4-Br no anel B contribuíram para o aumento da atividade das chalconas, como observado para as chalconas G3 e G5, demonstrando que a adição de grupos halogênicos no anel B das 2'-aminochalconas pode contribuir tanto para o aumento da atividade citotóxica quanto no aumento da capacidade de inibir migração celular. Chalconas contendo o grupo 4-F no anel B já demonstraram grande potencial antimetastático [113], o que confirma o potencial desse grupo substituinte em melhorar a atividade antimigratória de chalconas.

Entre as aminochalconas da classe G, a mais efetiva, considerando o efeito sobre as três linhagens, foi a chalcona G25, que possui um grupo NO₂ na posição R3 no anel B. Em geral, todas as aminochalconas inibiram significativamente a migração da linhagem MG63, entretanto, as chalconas com substituições de 4-CH₃, 1-tiofeno e 1-furano, apresentaram reduzido efeito sobre a migração dessa linhagem. Estas substituições também prejudicaram a atividade contra as linhagens U2OS e SAOS-2.

De forma geral, as 4'-aminochalconas com adição dos grupos 4-Cl e 4-CF₃ no anel B (D4 e D18) foram as mais eficientes em inibir a migração celular, demonstrando que esses substituintes contribuem tanto para a atividade citotóxica quanto antimigratória destas aminochalconas. Chalconas carregando Cl e CF₃ como grupos substituintes no anel B vêm demonstrando potencial em inibir a atividade da MMP-2 [114]. Esta metaloproteinase desempenha um papel fundamental na indução de invasão e migração celular. Portanto, os resultados aqui encontrados confirmam o potencial destes substituintes em incrementar a

atividade antimetastática de chalconas. O efeito das chalconas D4 e D18 sobre a migração celular parece dependente da presença de p53, uma vez que a inibição sobre a linhagem U2OS foi consideravelmente maior (6-10 vezes) do que sobre a linhagem SAOS-2. Estudos vêm demonstrando a capacidade de chalconas, contendo o grupo substituinte 4-Cl, em induzir a acumulação de p53 [115], o que reforça o resultado aqui encontrado.

A presença do grupo 3-fenil na 4'-aminochalcona D14 e dos grupos 3-fenil e 4-CH₃ na chalcona D15, reduziu a atividade citotóxica contra as linhagens U2OS e SAOS-2, mas aumentou de forma dependente da p53 a capacidade destas chalconas inibirem a migração celular, como observado pela significativa inibição sobre a migração da linhagem U2OS (> 75%).

Outra característica interessante observada, comparando-se as 4'-aminochalconas (D3, D5, D24 e D25) com as 2'-aminochalconas (G3, G5, G24 e G25) que possuem os mesmos grupos substituintes no anel B, foi notar que a presença do grupo amino na posição 2' do anel A aumentou de forma drástica o efeito das chalconas G3, G5, G24 e G25 sobre a migração da linhagem U2OS. Este efeito não foi observado na linhagem SAOS-2, exceto para a chalcona G25.

Dentre o grupo das 3'-metoxichalconas derivadas de apocininas, a adição dos grupos contendo nitrogênio, 4-NO₂ (A1), 3-NO₂ (A8) e 3-N (A5), aumentou a atividade antimigratória, sendo que a chalcona A5 foi a mais eficiente e inibiu a migração celular das três linhagens testadas em mais de 90%. A presença de 4-NO₂ ou 3-NO₂ parece aumentar a atividade das chalconas de forma dependente da p53.

A adição de grupos halogênicos (F e Cl) no anel B, que em geral aumentou a atividade citotóxica e antimigratória das aminochalconas, prejudicou a atividade das 3'-metoxichalconas (A10 e A14), especialmente sobre a linhagem U2OS. A presença de 4-OH também reduziu a capacidade de inibir a migração das células U2OS, como o observado para 3'-metoxichalcona A12. Este efeito prejudicial do grupo 4-OH foi semelhante ao encontrado para a classe das hidroxichalconas, como demonstrado pelo menor efeito da chalcona T33 em relação as demais hidroxichalconas.

Também foi avaliada a atividade antimigratória de chalconas furano-3-il. Em geral, esta classe de chalconas demonstrou baixo potencial em reduzir a migração celular, exceto em alguns casos na linhagem MG63. Entretanto, a chalcona F10, que possui um grupo 3,4-

diclorofenil, apresentou elevada capacidade em inibir a migração celular de forma dependente da p53.

As chalconas furano-2-il também apresentaram baixa capacidade de reduzir a migração celular, exceto pela chalcona M7, que possui um grupo metil na posição 4 do anel A e demonstrou forte atividade antimigratória contra as linhagens U2OS e MG63 e, portanto, dependente de p53.

Tabela 5. Efeito das chalconas sobre a migração celular das linhagens de osteossarcoma U2OS, SAOS-2 e MG63.

	% Migração		
	U2OS	SAOS-2	MG63
A1	8,2 ± 3,5 (b)	41,9 ± 3,7 (f)	38,5 ± 0,6 (f)
A2	91,1 ± 2,2 (m)	41,3 ± 7,6 (f)	39,9 ± 7,2 (f)
A3	84,9 ± 2,9 (l)	58,9 ± 5,6 (i)	67,4 ± 0,7 (i)
A4	100,0 ± 0,0 (m)	59,1 ± 2,8 (i)	65,9 ± 4,6 (j)
A5	6,1 ± 0,05 (a)	3,2 ± 0,7 (a)	5,8 ± 2,0 (a)
A6	35,3 ± 2,8 (f)	16,9 ± 2,3 (c)	16,5 ± 4,9 (c)
A8	12,9 ± 0,6 (b)	33,8 ± 1,4 (e)	0,8 ± 0,8 (a)
A9	97,3 ± 2,7 (m)	47,7 ± 3,5 (g)	58,7 ± 2,1 (i)
A10	94,1 ± 5,85 (m)	72,4 ± 5,9 (l)	53,8 ± 5,9 (h)
A11	60,9 ± 1,9 (i)	46,1 ± 5,9 (g)	16,5 ± 4,5 (c)
A12	83,9 ± 0,62 (l)	50,5 ± 3,9 (h)	30,5 ± 4,3 (e)
A14	86,5 ± 1,9 (l)	45,5 ± 5,9 (g)	39,4 ± 5,7 (f)
A15	56,5 ± 2,8 (i)	61,2 ± 1,4 (i)	27,2 ± 5,8 (e)
A17	87,8 ± 2,9 (l)	63,7 ± 5,0 (j)	59,8 ± 2,7 (i)
A19	44,5 ± 4,0 (g)	47,6 ± 2,5 (g)	42,5 ± 5,6 (g)
A20	51,2 ± 4,4 (h)	44,7 ± 1,7 (g)	22,7 ± 4,7 (d)
D1	65,7 ± 2,1 (j)	36,9 ± 5,4 (f)	17,3 ± 4,4 (c)
D2	43,8 ± 4,8 (g)	39,1 ± 5,7 (f)	25,6 ± 4,9 (d)
D3	51,7 ± 3,1 (i)	38,7 ± 5,3 (f)	20,5 ± 2,3 (d)
D4	4,8 ± 0,5 (a)	49,9 ± 7,2 (h)	15,0 ± 2,7 (c)
D5	30,1 ± 1,6 (e)	29,7 ± 4,6 (e)	23,1 ± 4,2 (d)
D6	61,3 ± 5,7 (i)	50,6 ± 5,8 (h)	24,4 ± 3,9 (d)

D14	14,7 ± 4,46 (c)	65,9 ± 2,2 (j)	6,8 ± 2,2 (a)
D15	14,8 ± 1,0 (c)	58,9 ± 3,8 (i)	51,3 ± 3,1 (h)
D18	6,2 ± 2,7 (a)	38,3 ± 3,4 (f)	4,1 ± 0,9 (a)
D19	57,3 ± 3,7 (i)	54,3 ± 1,25 (h)	44,9 ± 1,9 (g)
D20	60,5 ± 1,41 (i)	58,8 ± 3,7 (i)	19,8 ± 3,6 (d)
D21	96,8 ± 4,5 (m)	56,9 ± 5,6 (i)	51,8 ± 1,7 (h)
D23	52,5 ± 5,2 (h)	37,1 ± 6,1 (f)	11,9 ± 4,4 (b)
D24	67,6 ± 4,47 (j)	39,4 ± 1,8 (f)	6,3 ± 1,15 (a)
D25	70,5 ± 3,5 (l)	53,6 ± 4,0 (h)	22,4 ± 0,19 (d)
F1	62,7 ± 4,0 (i)	54,4 ± 5,4 (h)	13,4 ± 2,8 (b)
F2	75,4 ± 3,25 (l)	62,0 ± 3,1 (i)	16,1 ± 5,2 (c)
F3	49,9 ± 5,36 (g)	47,1 ± 4,9 (g)	42,6 ± 2,5 (g)
F4	84,3 ± 4,39 (l)	35,9 ± 0,8 (f)	51,9 ± 6,3 (h)
F7	36,8 ± 5,31 (f)	19,7 ± 5,9 (d)	3,8 ± 3,8 (a)
F8	58,5 ± 4,5 (i)	44,9 ± 4,39 (g)	21,8 ± 1,8 (d)
F9	55,4 ± 2,88 (i)	51,7 ± 5,9 (h)	12,4 ± 2,8 (b)
F10	6,3 ± 1,64 (a)	46,7 ± 4,94 (g)	0,8 ± 0,3 (a)
G2	54,4 ± 3,4 (h)	40,9 ± 1,7 (f)	16,9 ± 4,2 (c)
G3	3,2 ± 2,4 (a)	37,5 ± 3,5 (f)	4,4 ± 4,4 (a)
G4	44,5 ± 5,3 (g)	27,6 ± 2,6 (e)	20,6 ± 0,6 (d)
G5	3,2 ± 1,0 (a)	45,7 ± 3,3 (g)	15,2 ± 0,6 (c)
G6	47,6 ± 0,8 (g)	48,2 ± 3,1 (g)	20,2 ± 4,2 (d)
G14	47,3 ± 0,9 (g)	38,8 ± 4,4 (f)	2,2 ± 3,0 (a)
G15	48,6 ± 2,1 (g)	65,5 ± 4,4 (i)	52,6 ± 1,9 (h)
G18	27,1 ± 5,5 (e)	20,6 ± 1,4 (d)	12,0 ± 1,3 (b)
G19	40,4 ± 3,5 (f)	60,5 ± 0,9 (i)	22,3 ± 3,7 (d)
G20	55,9 ± 3,3 (i)	41,9 ± 1,6 (g)	38,7 ± 2,2 (f)
G21	62,9 ± 5,1 (i)	58,1 ± 5,2 (i)	65,6 ± 0,6 (i)
G23	25,0 ± 5,1 (d)	42,3 ± 4,1 (g)	0,3 ± 0,3 (a)
G24	11,8 ± 2,1 (b)	31,5 ± 3,1 (e)	1,1 ± 1,0 (a)
G25	13,1 ± 1,8 (b)	15,2 ± 1,7 (c)	0,0 ± 0,0 (a)
M1	35,4 ± 3,6 (f)	56,8 ± 7,5 (i)	45,0 ± 1,9 (g)
M2	50,4 ± 3,3 (h)	42,6 ± 1,9 (g)	16,5 ± 5,4 (c)
M3	46,2 ± 9,5 (g)	32,2 ± 0,5 (e)	23,4 ± 3,4 (d)
M4	56,4 ± 4,9 (i)	49,8 ± 1,7 (g)	38,5 ± 2,5 (f)
M7	12,4 ± 3,0 (b)	36,4 ± 2,2 (f)	17,2 ± 2,4 (c)

M8	41,7 ± 1,0 (f)	44,0 ± 3,5 (g)	30,5 ± 4,6 (e)
M9	63,3 ± 2,0 (j)	46,3 ± 3,1 (g)	44,7 ± 2,9 (g)
M10	51,2 ± 4,8 (h)	54,7 ± 0,2 (h)	25,4 ± 5,1 (d)
M12	48,2 ± 4,0 (g)	32,4 ± 2,8 (e)	18,4 ± 4,3 (c)
M13	66,7 ± 1,7 (j)	49,0 ± 5,9 (g)	34,5 ± 2,7 (e)
T10	7,9 ± 3,3 (b)	10,7 ± 1,5 (b)	3,9 ± 0,4 (a)
T33	40,9 ± 2,5 (f)	33,2 ± 3,1 (e)	16,3 ± 5,1 (c)
T37	2,1 ± 2,0 (a)	8,9 ± 1,6 (b)	3,1 ± 0,3 (a)
T38	1,7 ± 0,6 (a)	30,1 ± 1,2 (e)	0,0 ± 0,0 (a)

ANOVA - Scott-Knott (p < 0,05)

4.3 ANÁLISE DA MIGRAÇÃO CELULAR COM *TRANSWELL*

A partir do resultado de migração com a técnica *Wound-healing*, assim como IC₅₀, 4 chalconas foram escolhidas para os testes de migração e invasão celular utilizando *Transwell*. As chalconas D14 e D15, apesar de não terem apresentado uma atividade citotóxica elevada, foram capazes de inibir a migração de forma acentuada. As chalconas G24 e G25 apresentaram bons resultados nos dois experimentos realizados.

As 4 chalconas demonstraram a capacidade de inibir migração, entretanto, novamente, as chalconas D14 e D15 inibiram a migração celular de forma significativa apenas nas linhagens expressando p53 U2OS e SAOS-2 exp p53, conforme apresentado na Figura 10.

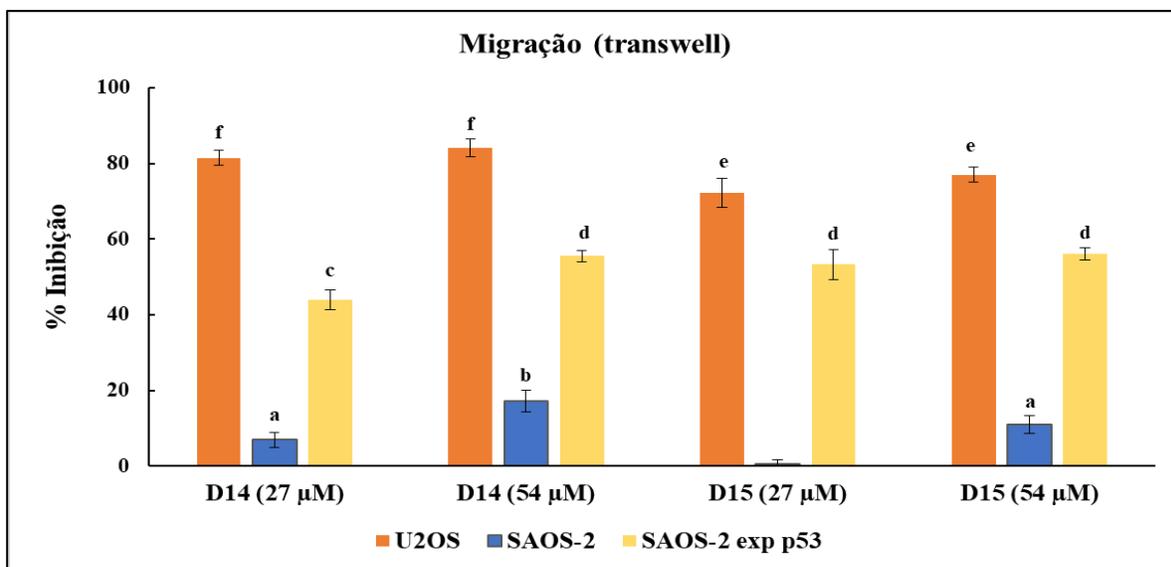


Figura 10. Inibição da migração celular das linhagens de osteossarcoma U2OS, SAOS-2 e SAOS-2 exp p53, provocada pelas chalconas D14 e D15 após 24 horas de tratamento.

Por outro lado, as chalconas G24 e G25 inibiram a migração celular tanto na linhagem U2OS quanto na SAOS-2, conforme Figura 11.

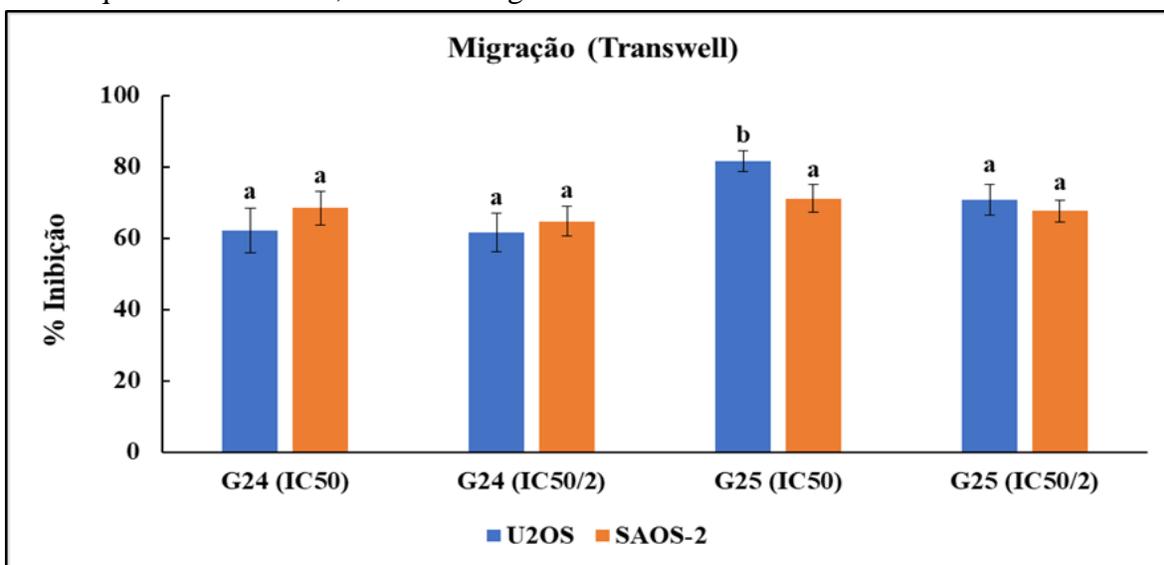


Figura 11. Inibição da migração celular das linhagens de osteossarcoma U2OS e SAOS-2 provocada pelas chalconas G24 e G25 após 24 horas de tratamento. Valores de IC₅₀ em μM da chalcona G24 na linhagem U2OS (IC₅₀ = 7,24; IC_{50/2} = 3,62) e SAOS-2 ((IC₅₀ = 17,79; IC_{50/2} = 8,89) e da chalcona G25 U2OS (IC₅₀ = 16,77; IC_{50/2} = 8,39) e SAOS-2 ((IC₅₀ = 34,51; IC_{50/2} = 17,55).

4.4 ANÁLISE DA INVASÃO CELULAR COM *TRANSWELL*

Após avaliar a capacidade das chalconas em inibir migração celular, mensurou-se a inibição do processo de invasão. As chalconas inibiram a invasão celular de forma significativa, como apresentado nas figuras 12 e 13 e, diferente do observado para a migração, as chalconas D14 e D15 inibiram a invasão celular de forma considerável, tanto na linhagem U2OS quanto na SAOS-2, entretanto, a inibição sobre as células U2OS foi mais proeminente.

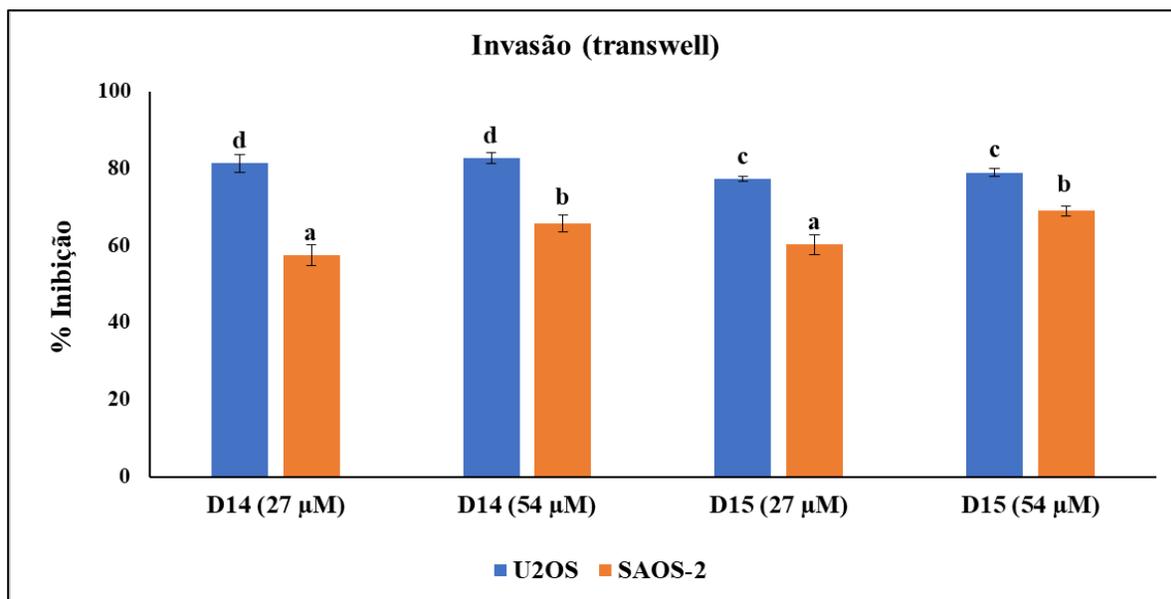


Figura 12. Inibição da invasão celular das linhagens de osteossarcoma U2OS e SAOS-2 provocada pelas chalconas D14 e D15 após 24 horas de tratamento.

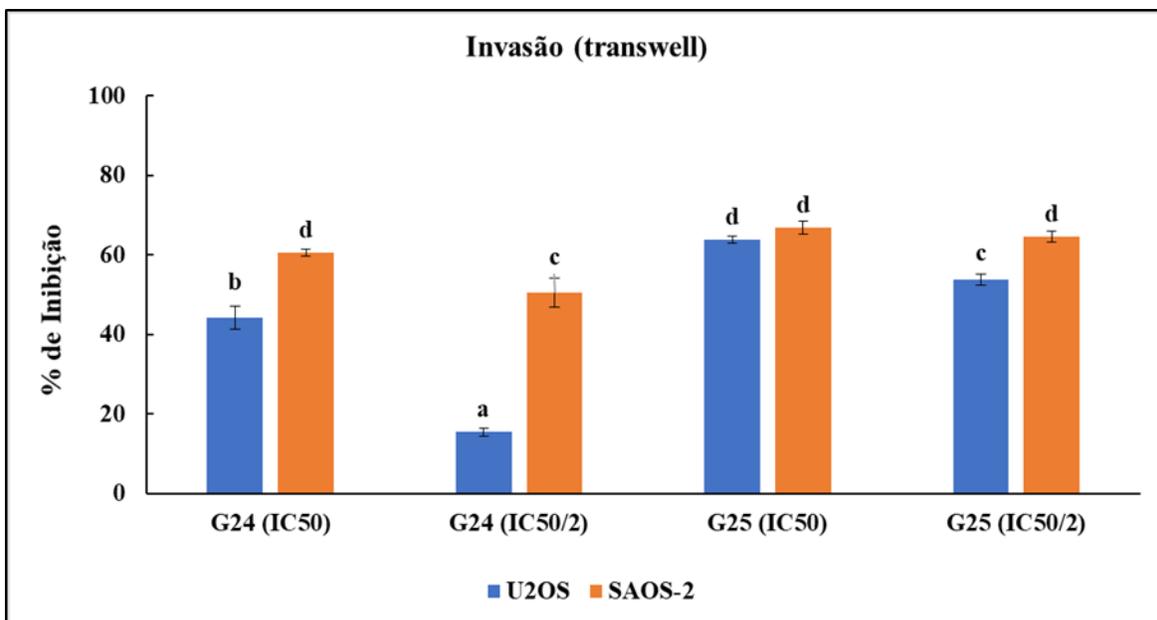


Figura 13. Inibição da invasão celular das linhagens de osteossarcoma U2OS e SAOS-2 provocada pelas chalconas G24 e G25 após 24 horas de tratamento. Valores de IC em μM da chalcona G24 na linhagem U2OS ($\text{IC}_{50} = 7,2$, $\text{IC}_{50/2} = 3,6$) e SAOS-2 ($\text{IC}_{50} = 17,8$; $\text{IC}_{50/2} = 8,9$) e da chalcona G25 U2OS ($\text{IC}_{50} = 16,8$; $\text{IC}_{50/2} = 8,4$) e SAOS-2 ($\text{IC}_{50} = 34,6$; $\text{IC}_{50/2} = 17,3$).

As chalconas D14 e D15 não reduziram significativamente a migração da célula SAOS-2, tanto nos experimentos de *Wound-healing* quanto nos experimentos com *Transwell*, entretanto, as mesmas reduziram significativamente a migração da linhagem celular U2OS. Isto sugere que, possivelmente, a inibição da migração celular provocada por essas duas chalconas é dependente da presença de p53, uma vez que a linhagem U2OS expressa a proteína p53 enquanto a linhagem SAOS-2 não. Este resultado foi confirmado utilizando-se uma linhagem de SAOS-2 expressando p53 (SAOS-2 exp p53), que se mostrou susceptível à inibição da migração provocada pelas chalconas D14 e D15 (Figura 10). Recentemente, a expressão de p53 em adição ao controle do ciclo celular e apoptose, tem sido relacionada com a inibição da metástase, através da regulação negativa do processo de transição-epitélio mesenquimal e diminuição da capacidade de migração de células tumorais [66].

As chalconas D14 e D15 não inibiram de forma considerável a migração na linhagem SAOS-2, porém, reduziram significativamente a capacidade de invasão dessas células. Embora os ensaios de migração e invasão usando *Transwell* sejam bem similares, não é

novidade que diferentes tratamentos tenham maior efeito sobre a invasão do que sobre a migração celular [116, 117]. Em células de câncer de pâncreas, por exemplo, a inibição de MMPs não influenciou a migração, mas reduziu a capacidade de invasão dessas células em até 60 % [116].

Algumas chalconas, como a isoliquiritigenina e licochalcona A, já demonstraram inibir a migração e invasão celular em diferentes células tumorais, através de diferentes mecanismos de ação, entre eles a inibição da atividade de metaloproteinases [118, 119]. Desta forma, os resultados encontrados confirmam o potencial antimetastático das chalconas, evidenciando o potencial antitumoral desses compostos, uma vez que a metástase é a principal causa de morte em pessoas com câncer.

4.5 APOPTOSE

No intuito de avaliar se a inibição da proliferação celular, das células U2OS e SAOS-2, provocada pelas chalconas G24 e G25 estava relacionada com a indução de apoptose, foi utilizada a técnica de citometria de fluxo. Conforme demonstrado na Figura 14, as chalconas induziram significativamente a apoptose. A chalcona G24, nas concentrações de 22 e 44 μM , aumentou o número de células apoptóticas em 4,08 e 5,35 vezes, respectivamente, na linhagem U2OS. Por sua vez, na linhagem SAOS-2, a chalcona G24 aumentou a apoptose em 2,35 e 2,68 vezes, nas concentrações de 22 e 44 μM , respectivamente.

A chalcona G25 demonstrou uma diferença na indução de apoptose nas linhagens U2OS e SAOS-2 ainda mais acentuada do que a provocada pela chalcona G24. Nas concentrações 22 e 44 μM houve uma indução de apoptose de 3,86 e 7,08 vezes respectivamente, na linhagem U2OS. Por sua vez, na linhagem SAOS-2, a chalcona G25 aumentou a apoptose em 1,73 e 2,3 vezes, nas concentrações de 22 e 44 μM , respectivamente.

Esses resultados sugerem que a indução de apoptose provocada pelas chalconas G24 e G25, provavelmente é dependente da expressão da proteína p53, uma vez que as mesmas induziram apoptose de forma mais significativa na linhagem que expressa p53 (U2OS), do que na linhagem p53 nula (SAOS-2). A p53 tem um papel fundamental para desencadear o processo de apoptose nas células, a perda da expressão da proteína p53 aumenta a resistência

de células tumorais, incluindo osteossarcoma, à indução de apoptose provocada por agentes antineoplásicos [120-122], o que corrobora com os resultados aqui encontrados.

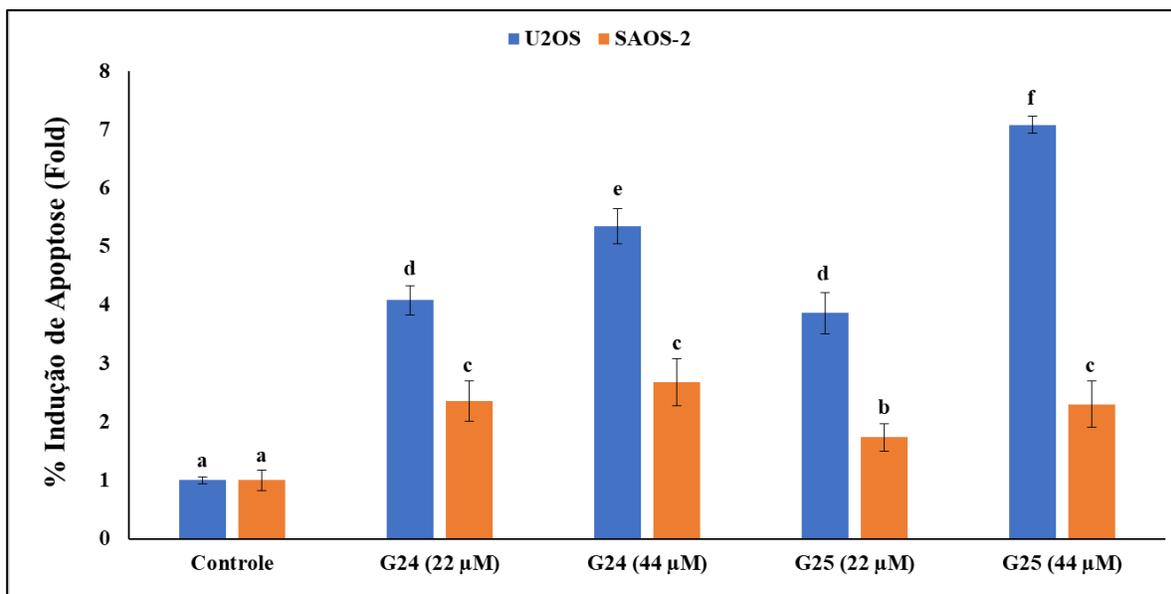


Figura 14. Indução de apoptose em linhagens de osteossarcoma U2OS e SAOS-2 provocada pelas chalconas G24 e G25 após 24 horas de tratamento.

4.6 ANÁLISE DA EXPRESSÃO DE GENES RELACIONADOS AO PROCESSO DE EMT

Com o objetivo de compreender melhor os efeitos moleculares das chalconas, utilizamos a técnica de PCR para avaliar o efeito de inibição e/ou indução das mesmas sobre a expressão gênica dos principais marcadores de transição epitélio-mesenquimal (EMT). A EMT é um processo importante para que células tumorais adquiram maior capacidade de migração e invasão e, portanto, maior potencial de causar metástase. Esse processo é caracterizado pela redução de marcadores epiteliais (ex: E-caderina) e indução de marcadores mesenquimais (ex: Vimentina e N-caderina) [123].

Como mostra a Figura 15, as chalconas D14, D15 e G25 inibiram significativamente a transcrição da Vimentina na linhagem celular U2OS. Por outro lado, o mesmo efeito não foi observado na linhagem SAOS-2, sugerindo uma atuação da p53 na repressão transcricional da Vimentina.

As chalconas D14 e D15 induziram significativamente a expressão da E-caderina na linhagem celular U2OS. Na linhagem SAOS-2 pode-se observar uma leve indução pela chalcona D15, mas o melhor efeito foi visto nas chalconas G24 e G25. Esses resultados são relevantes, pois é importante que a E-caderina, como marcadora de células epiteliais, tenha sua expressão aumentada, assim como a Vimentina tenha sua expressão diminuída, pois estas alterações poderão resultar na diminuição da capacidade de migração e invasão de células tumorais [124, 125].

O gene Slug tem sido apontado como um repressor transcricional da E-caderina, conferindo às células cancerígenas uma maior predisposição metastática [126]. Portanto, é importante encontrar compostos capazes de inibir esse gene. As chalconas D14 e D15, na linhagem U2OS, inibiram transcionalmente a expressão de Slug e a chalcona G25 conferiu uma inibição ainda mais acentuada. Já na linhagem SAOS-2, a chalcona G25 teve efeito contrário, induzindo esse gene. Pode-se inferir, que a p53 teve papel na inibição transcricional do gene Slug. Ainda na SAOS-2, as chalconas D15 e G24 tiveram capacidade considerável de inibição desse gene. Deste modo, é provável que a repressão de Slug desempenhe um papel na indução transcricional de E-caderina provocada pelas chalconas.

O gene Snail representa papel crítico na progressão do câncer por estar envolvido ativamente na transição epitélio mesenquimal (EMT). Estudos apontam o envolvimento desse gene atuando de forma a conferir, às células tumorais, características de célula tronco, acarretando, dessa forma, recorrência tumoral, bem como metástase e, ainda, promovendo resistência a drogas [127]. Não foi possível notar grande efeito repressor das chalconas sobre a expressão desse gene. Na linhagem U2OS, a chalcona G25 induziu fortemente a expressão de Snail. Na linhagem SAOS-2, observou-se pequena indução tanto para a chalcona D14, quanto para a chalcona D15 e forte indução nas demais chalconas. Uma das funções de Snail é inibir transcionalmente a E-caderina, portanto, a indução de Snail na linhagem SAOS-2 provocada pelas chalconas D14 e D15 pode estar relacionada com a incapacidade dessas chalconas de induzirem a transcrição de E-caderina nessa linhagem celular. Entretanto, considerando-se que as chalconas G24 e G25 induziram Snail e E-caderina na linhagem SAOS-2, é possível que o efeito sobre a transcrição de Snail não resulte em alteração dos níveis da proteína Snail.

O aumento da motilidade celular, proveniente da perda de adesão, é um dos principais fatores que confere às células cancerígenas capacidade de invasão. A N-caderina é considerada um dos principais marcadores de transição epitélio mesenquimal [128]. Na linhagem U2OS, as chalconas D14 e D15 foram capazes de inibir consideravelmente esse marcador e a chalcona G25 apresentou capacidade ainda mais elevada nessa inibição. Na linhagem SAOS-2 a chalcona D14 não teve essa mesma capacidade. Dessa forma, pode-se inferir que a p53 teve participação na inibição da N-caderina pela chalcona. As chalconas D15 e G25 também foram capazes de inibir a N-caderina, mas foi a chalcona G24 que apresentou o melhor resultado nessa linhagem.

A elevada expressão de N-caderina está associada com a formação de metástase [129], enquanto o seu silenciamento resulta na diminuição do potencial metastático de células tumorais [130]. Portanto, a repressão de N-caderina pode estar envolvida no efeito inibitório das chalconas sobre a migração e invasão das células de osteossarcoma.

A β -catenina tem papel fundamental, junto com a E-caderina, na formação de complexos adesivos intercelulares essenciais para manutenção da integridade tecidual. Entretanto, o acúmulo e fosforilação da β -catenina pode induzir a degradação e consequente quebra do complexo de adesão da E-caderina, impulsionando o processo de EMT [131]. Na linhagem U2OS as chalconas D14 e D15 foram capazes de reprimir significativamente a β -catenina, enquanto na linhagem SAOS-2 apenas a chalcona D15 foi capaz de reprimir levemente a β -catenina. Pode-se inferir, então, a importante atuação da p53 na repressão transcricional de β -catenina promovida pelas chalconas D14 e D15.

As metaloproteinases da matriz, especificamente a MMP-2 e MMP-9, são da família das gelatinases, capazes de degradar colágeno IV, que é o principal componente da lâmina basal. Essa degradação promove a capacidade de invasividade de células cancerígenas e, a perda da membrana basal, tem sido considerada como um dos sinais mais confiáveis de mau prognóstico em pessoas acometidas pelo câncer [132, 133]. Na linhagem U2OS, todas as chalconas foram eficientes na inibição da MMP-2, enquanto para MMP-9 as chalconas D14, D15 e G24 foram as que inibiram de forma significativa essa MMP. Da mesma forma, na linhagem SAOS-2 todas as chalconas inibiram significativamente a MMP-2, mas não foi possível detectar a MMP-9 nessa linhagem, possivelmente por causa da sua baixa expressão,

o que condiz com o reduzido potencial de migração dessa linhagem celular comparada com a linhagem U2OS.

A alta expressão da N-caderina aumenta fortemente a atividade transcricional da β -catenina e regula positivamente a expressão da MMP-9 em células do carcinoma escamoso oral [134]. O *knockdown* de β -catenina inibe drasticamente a invasão pela regulação negativa da atividade de MMP-2 e MMP-9 [135]. Estes dados sugerem que a inibição das MMPs causadas por D14 e D15 pode estar relacionada com a repressão da β -catenina, enquanto o efeito inibitório sobre a expressão β -catenina pode ser mediado pela inibição da N-caderina induzida por estas chalconas (Figura 15).

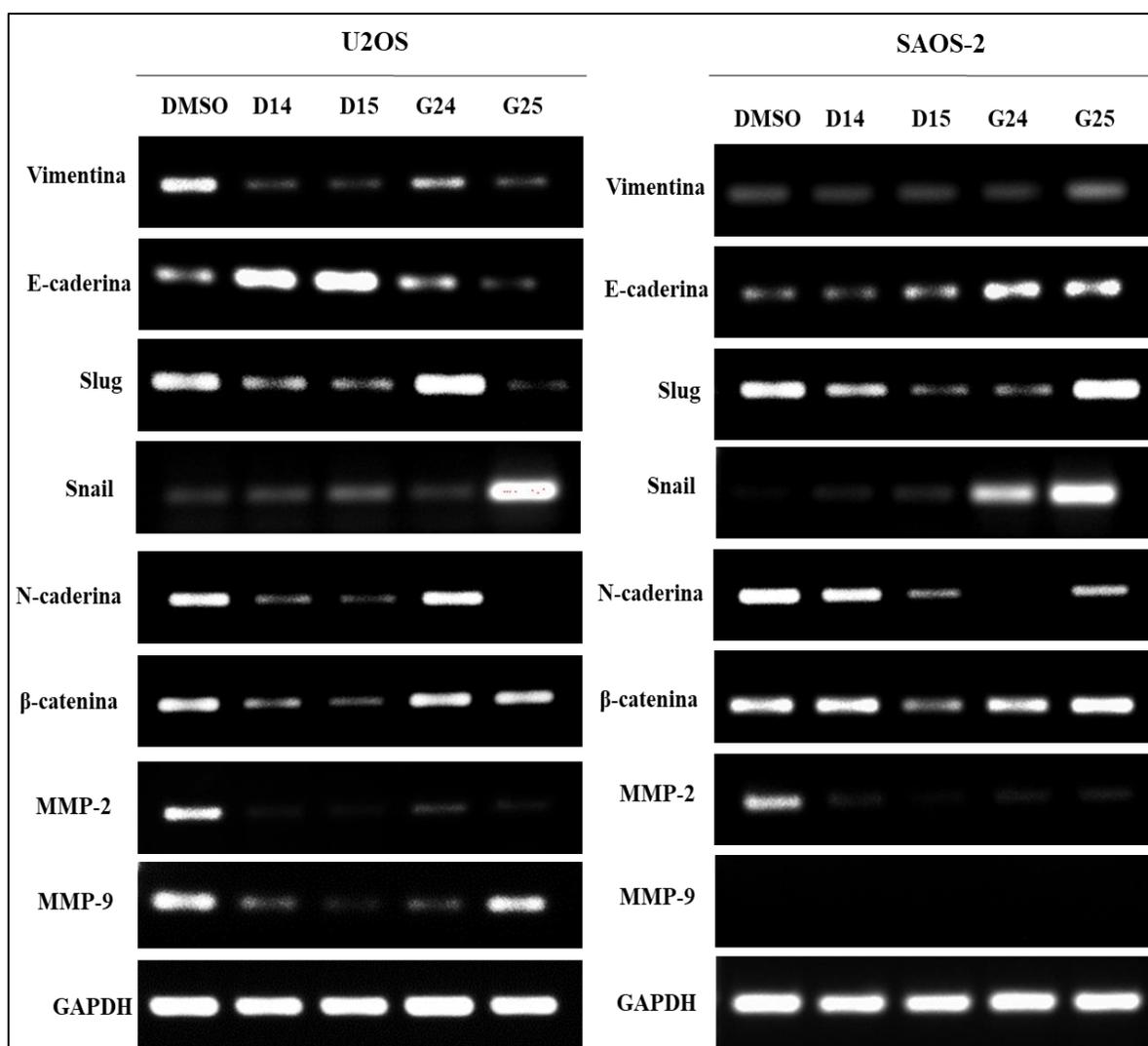


Figura 15. Efeito das chalconas D14, D15, (54 μ M), G24 e G25 (IC_{50}) sobre a expressão de marcadores de transição epitélio-mesenquimal.

4.7 ANÁLISE DA ATIVIDADE DAS MMPs COM ENSAIO DE ZIMOGRÁFIA

A análise da atividade das MMPs tem sido alvo de pesquisa. Estudos demonstram que a migração e invasão de tumores é possível através da degradação de diferentes componentes da matriz e da membrana basal. As metaloproteinases de matriz (MMPs) são responsáveis pela degradação de vários componentes da matriz extracelular (MEC). Existem mais de 20 MMPs reconhecidas e cada uma delas possui seus requisitos específicos de substrato e domínios estruturais. Entre elas, duas têm sido apontadas por suas associações com a disseminação do tumor e invasividade: MMP-2 e MMP-9 [136]. Portanto, através da técnica de zimografia, foi avaliada a capacidade das chalconas modularem a atividade da MMP-2 e MMP-9.

Conforme demonstrado na Figura 16, as chalconas D14 e D15 tiveram efeito inibitório da MMP-9 na célula U2OS, mas a chalcona G25 foi quem inibiu fortemente essa enzima. A MMP-2 foi inibida por todas as chalconas. Tem sido observado que maior produção de MMP-2 e MMP-9 acarreta aumento da migração e invasão de células tumorais [137]. Portanto, é provável que as chalconas reduzam, mesmo que parcialmente, a migração e invasão celular em células de osteossarcoma através da repressão da atividade da MMP-2 e MMP-9. De fato, estudos mostram que a inibição de MMP-2 e MMP-9 está envolvida com o mecanismo de ação de diversos compostos que inibem migração/invasão celular [138-141]. Além disso, a inibição de MMP-2 e MMP-9 pode levar à redução da expressão de Vimentina e aumento de E-caderina [142, 143], portanto, é mais um mecanismo pelo qual as chalconas podem reverter ou atrasar o processo de EMT e, conseqüentemente, diminuir o potencial metastático de células tumorais.

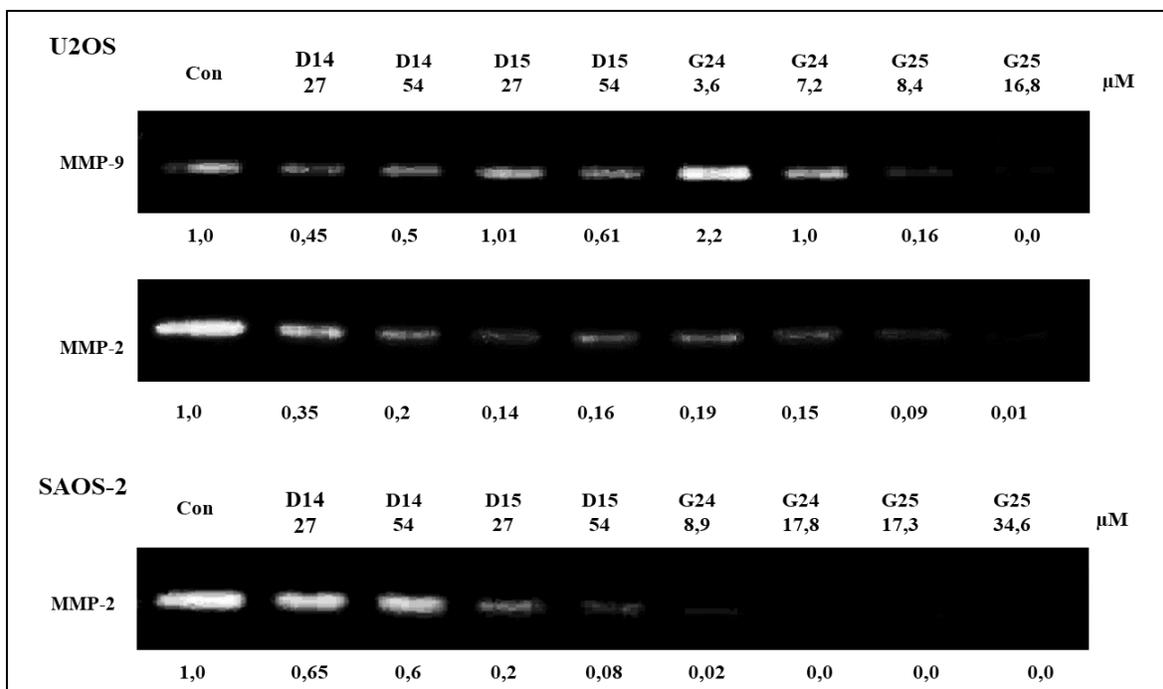


Figura 16. Inibição da atividade gelatinolítica das MMPs 2 e 9 provocada pelas chalconas D14, D15, G24 e G25 após 24 horas de tratamento.

Na célula SAOS-2 não foi possível detectar a atividade da MMP-9, provavelmente devido à baixa expressão dessa metaloproteínase nesta linhagem celular, o que condiz com o seu baixo potencial para causar metástase. Com relação a atividade da MMP-2, pode-se observar uma inibição provocada pelas 4 chalconas testadas, mas a chalcona G25 foi quem demonstrou capacidade inibitória superior.

Vale destacar que a chalcona D14, na célula U2OS, reduziu a atividade da MMP-2 em 5 vezes, enquanto que na linhagem SAOS-2 a redução foi de 1,66 vezes. Este resultado indica um possível envolvimento da expressão da proteína p53 no efeito inibitório da chalcona D14 sobre a atividade da MMP-2. Embora a p53 possa atuar como um ativador transcricional de MMP-2, ela pode ativar genes responsáveis por reprimir a expressão de MMP-2 ou induzir a sua degradação, tais como os genes ATF-3 e ERG1 [144-146]. Além disso, a p53 é capaz de reduzir os níveis da proteína MMP-14 [147], que é responsável por ativar metaloproteínases solúveis como a MMP-2 [148]. Dados do nosso grupo de pesquisa demonstram que chalconas e seus derivados podem atuar sobre esses genes regulados pela

p53 [149, 150], o que reforça a possível participação da p53 na ação da chalcona D14 sobre MMP-2.

4.8 ANÁLISE DA EXPRESSÃO DE FATORES DE TRANSCRIÇÃO COM QPCR

A técnica de PCR quantitativo foi empregada a fim de verificar a ação das chalconas na expressão dos fatores de transcrição Sp1 e p53. Estes fatores estão envolvidos com o potencial metastático de células tumorais através da regulação de metaloproteinases e marcadores de EMT [151].

Como demonstrado na Figura 17, todas as chalconas selecionadas reprimiram a transcrição de Sp1 e p53, exceto a chalcona D14 que induziu a p53. Nosso grupo de pesquisa tem observado que chalconas agem apenas marginalmente sobre a transcrição de p53, porém têm um forte efeito estabilizador sobre a proteína p53, o que pode explicar a redução nos níveis de RNAm de p53 provocada pelas chalconas. Portanto, essa repressão transcricional provavelmente não resultará na redução dos níveis da proteína p53. Por outro lado, chalconas têm demonstrado o potencial tanto de reduzir os níveis de RNAm de Sp1 quanto da proteína [100].

Tem sido demonstrado que a inibição de Sp1 reduz a expressão de metaloproteinases e marcadores mesenquimais e, conseqüentemente, diminui a capacidade migratória e a invasividade de células tumorais [23, 44]. Contrariamente, a perda da expressão de p53 leva ao aumento do potencial metastático de células tumorais através da indução de EMT [21], enquanto que a superexpressão de p53 reverte o processo de EMT através da indução de marcadores epiteliais (E-caderina) e repressão de marcadores mesenquimais (Vimentina) [30].

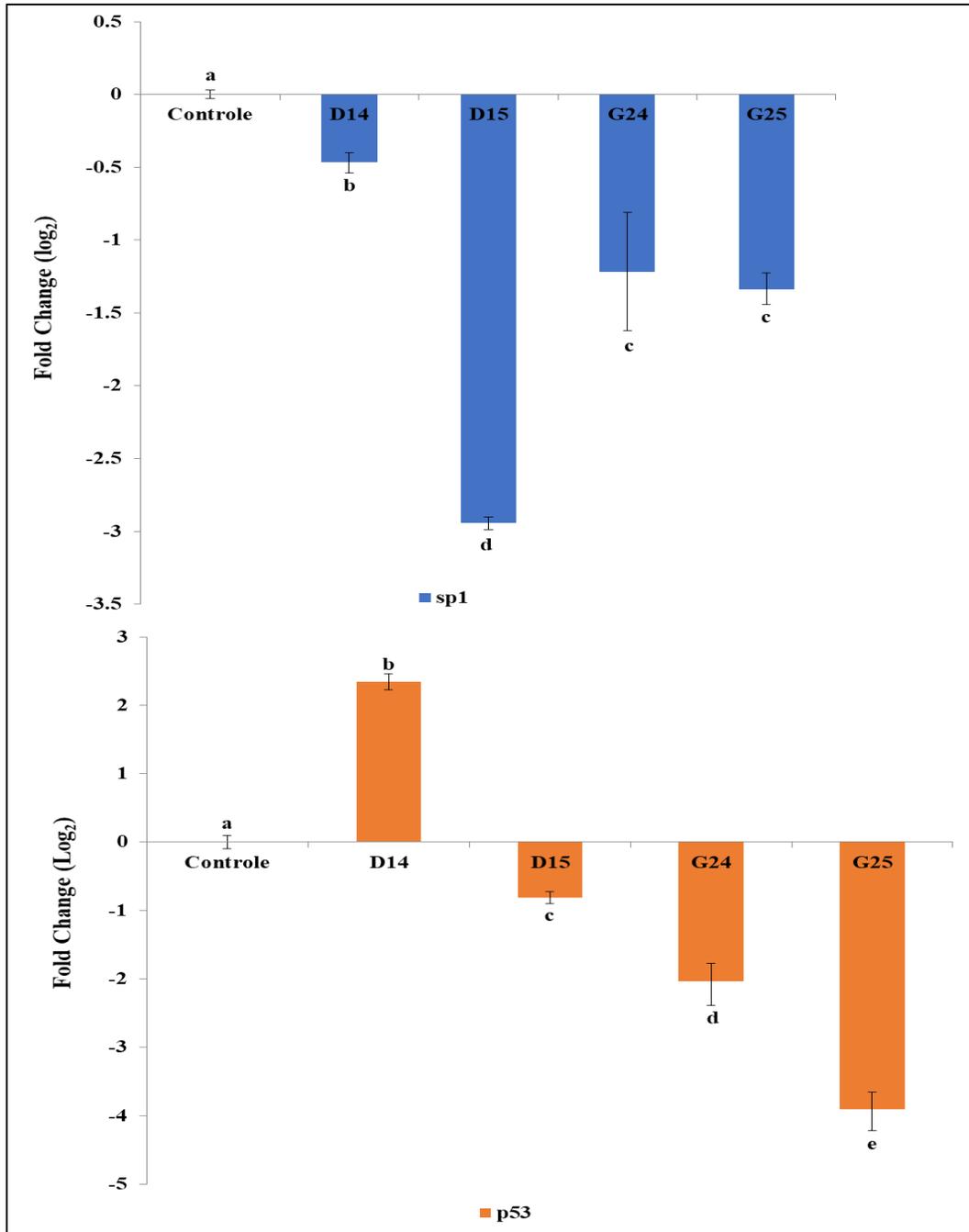


Figura 17. Efeito das chalconas D14, D15, (54 μ M), G24 e G25 (IC_{50}) sobre a expressão dos fatores de transcrição Sp1 e p53

4.9 ANÁLISE DA EXPRESSÃO DE PROTEÍNAS MARCADORAS DE APOPTOSE E EMT

A fim de verificar a ação das chalconas sobre a expressão de proteínas marcadoras de apoptose e EMT, foi utilizada a técnica de Western Blot. A proteína supressora de tumor p53 está relacionada à transição epitélio mesenquimal (EMT), desempenhando um papel na regulação celular. A perda da p53 nas células epiteliais ativa a EMT e sua ativação reverte o fenótipo mesenquimal [63]. Conforme demonstrado na Figura 18, na linhagem celular U2OS, as chalconas D14 e D15 induziram fortemente a expressão da p53, enquanto as chalconas G24 e G25 tiveram efeito indutor menos acentuado. Esses resultados indicam que a indução de p53 pode ser um dos mecanismos pelos quais as chalconas, especialmente D14 e D15, modularam genes ligados a EMT e inibiram a migração e invasão celular. De fato, estudos mostram que a ativação da p53 pode promover a regulação positiva da E-caderina e a regulação negativa de β -catenina, Slug, Vimentina e N-caderina, consequentemente, suprimindo o crescimento e a metástase de células tumorais [20, 152-156].

A ativação da p53 provada pelas chalconas G24 e G25, ainda que discreta, reforça a provável participação dessa proteína na indução de apoptose desencadeada por essas chalconas, uma vez que elas demonstraram induzir uma maior taxa de apoptose em células que expressam p53 (U2OS) do que em células deficientes de p53 (SAOS-2).

A superexpressão da Vimentina tem sido relacionada, em casos de câncer, ao aumento da rigidez celular, capacidade de motilidade celular e migração. As chalconas D14, D15 e G25 apresentaram forte inibição da proteína Vimentina nas células U2OS. Isso pode estar relacionado ao fato da linhagem celular U2OS expressar p53 selvagem, gerando uma melhor resposta, uma vez que a p53 tem potencial para reprimir a Vimentina [157].

Na linhagem celular SAOS-2 foi possível observar uma repressão da Vimentina provocada pelas chalconas D14 e G24 na maior concentração e pela chalcona G25 em ambas as concentrações. Por outro lado, diferente do observado na linhagem U2OS, a chalcona D15 não inibiu a expressão de Vimentina na linhagem SAOS-2 (p53 nula), o que indica um forte papel da p53 na repressão de Vimentina provocada pela chalcona D15 (Figura 19). Na linhagem MG63 também foi possível observar uma inibição de Vimentina provocada pelas

chalconas, especialmente pela chalcona D14, que reprimiu a Vimentina nas duas concentrações testadas (Figura 20).

O fator de transcrição Sp1 está ligado à indução de EMT. Ele atua como um mecanismo de ativação do gene mesenquimal no decorrer da transição epitélio mesenquimal, podendo estar envolvido na regulação transcricional da EMT e invasão [158]. Estudos recentes vêm demonstrando que o Sp1 pode atuar aumentando ou reprimindo a atividade promotora de genes que estão envolvidos na progressão, diferenciação e oncogênese do ciclo celular. Portanto, seria interessante encontrar compostos capazes de atuar diretamente na inibição do Sp1, dada sua atuação oncogênica [159]. Entretanto, as chalconas testadas não diminuíram a expressão da proteína Sp1 nas linhagens U2OS e SAOS-2 (Figuras 18 e 19), demonstrando que a inibição transcricional de Sp1 observada na linhagem U2OS não resulta em redução dos níveis da proteína Sp1. Por sua vez, na linhagem MG63, as chalconas D15 e G25 provocaram forte inibição da proteína Sp1 (Figura 20). Isso pode estar relacionado ao fato de que, a linhagem MG63, carrega uma mutação na p53 ainda pouco conhecida que pode alterar a função da proteína p53 de maneira que interfira na relação da p53 com expressão de Sp1. Além disso, tal efeito pode ter ocorrido devido a maior sensibilidade da linhagem MG63 à ação das chalconas.

O processo de apoptose é disparado em grande parte pela ação das caspases efetoras 3 e 7. Essas caspases são expressas em uma forma inativa (procaspase) e, após ativação por meio de clivagem, elas podem clivar diversas proteínas celulares, causando a condensação da cromatina, fragmentação do DNA, desestabilização do citoesqueleto celular e, por fim, apoptose [160]. Entre os muitos alvos clivados pelas caspases, está a proteína PARP, que desempenha papel importante em processos celulares, tais como, replicação e reparo de DNA [161]. Durante a apoptose, a PARP é clivada e inativada pela ação das caspases 3 e 7, essa inativação da PARP é capaz de direcionar as células que tiveram seu DNA danificado, à apoptose, ao invés de degradação necrótica. Por isso, a clivagem da PARP é considerada um marcador de apoptose [162].

Como demonstrado na Figura 18, as chalconas G24 e G25 provocaram um aumento das formas clivadas das proteínas Caspase-3 e PARP na linhagem U2OS, confirmando o potencial dessas chalconas induzirem apoptose nessas linhagens e indicando que essa ação é

mediada por ativação de Caspase. Estes resultados estão de acordo com a literatura, pois diversos estudos sugerem que indução de apoptose, mediada por caspases, é um mecanismo clássico de ação de diferentes chalconas [100, 163-165]. O mesmo não foi observado nas chalconas D14 e D15, que apresentaram uma clivagem fraca da PARP, isso condiz com a baixa citotoxicidade e capacidade de induzir apoptose dessas chalconas.

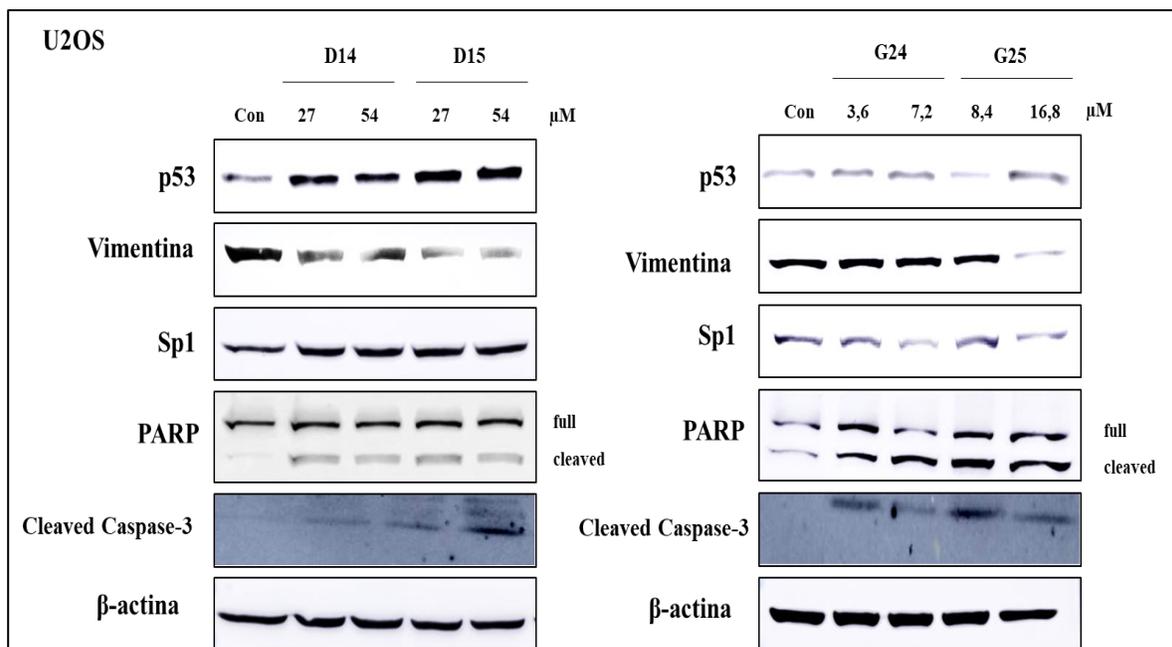


Figura 18. Efeito das chalconas sobre a expressão de proteínas relacionadas a apoptose e transição epitélio-mesenquimal na linhagem U2OS.

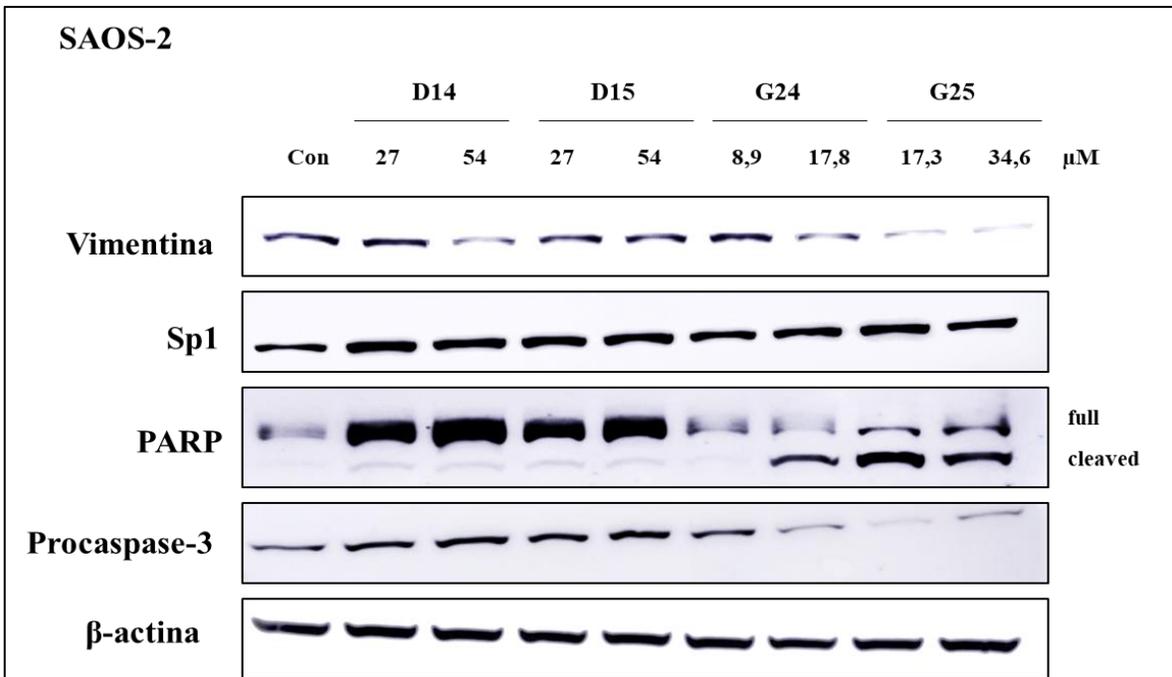


Figura 20. Efeito das chalconas sobre a expressão de proteínas relacionadas a apoptose e transição epitélio-mesenquimal na linhagem SAOS-2.

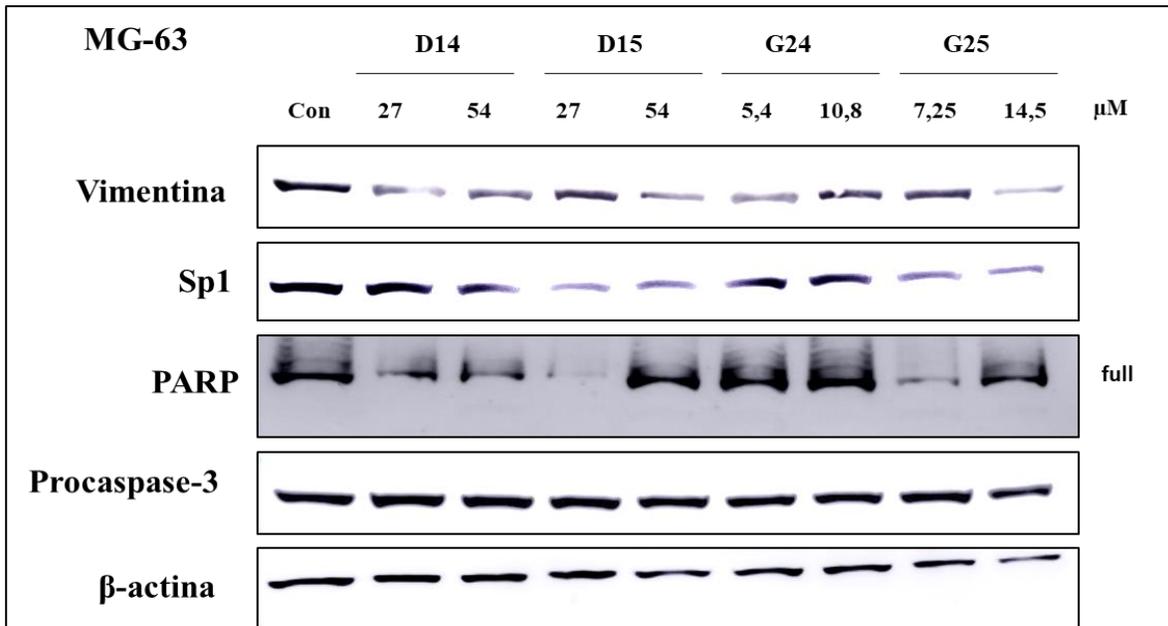


Figura 19. Efeito das chalconas sobre a expressão de proteínas relacionadas a apoptose e transição epitélio-mesenquimal na linhagem MG-63.

5. CONCLUSÃO

Neste estudo, uma biblioteca de 67 derivados de chalconas sintéticas foram utilizadas e tiveram sua atividade citotóxica e antimigração celular avaliadas contra linhagens de osteossarcoma humano U2OS (p53 selvagem), SAOS-2 (p53 nula) e MG63 (p53 mutante).

A presença de grupos substituintes halogênicos captadores de elétrons no anel B, como Cl, F e Br, aumentou a atividade citotóxica e antimigratória das chalconas, especialmente daquelas carregando grupo amino no anel A.

Em chalconas contendo um grupo 3'-metoxi, a presença de grupos substituintes no anel B contendo átomos de nitrogênio, foi mais eficiente em melhorar tanto a citotoxicidade quanto o efeito antimigração celular exibidos por essas chalconas.

A substituição do anel B por um anel heterocíclico furano ou tiofeno afetou negativamente a atividade citotóxica e antimigratória das chalconas.

A análise dos efeitos moleculares de 4 chalconas selecionadas (D14, D15, G24 e G25) sobre células de osteossarcoma demonstraram que:

- A redução da migração e invasão celular provocada por essas 4 chalconas pode estar relacionada com a inibição da expressão e atividade das metaloproteinases MMP-2 e MMP-9.
- A atividade antimigratória e anti-invasão, especialmente das chalconas D14 e D15, parece associada com a regulação de genes do processo de EMT através da indução de marcadores epiteliais (E-caderina) e repressão de marcadores mesenquimais (Vimentina, N-caderina e Slug).
- As chalconas G24 e G25 induzem discretamente a expressão da proteína p53. Por outro lado, D14 e D15 provocam uma elevada indução da p53.
- A inibição da migração e regulação de genes associados ao processo de EMT provocada pelas chalconas D14 e D15 são, pelo menos parcialmente, dependentes da ativação da p53.
- As chalconas G24 e G25 induzem apoptose, especialmente em célula expressando p53 (U2OS), através da ativação de Caspase 3.

Em geral, a presença da p53 foi importante para atividade biológica das chalconas aqui estudadas, como demonstrado pelo maior efeito citotóxico, apoptótico e antimigração contra as linhagens expressando p53.

REFERÊNCIAS

1. Copstead-Kirkhorn, L.-E.C. and J.L. Banasik, *Pathophysiology*. 2010, Philadelphia Saunders. 1392.
2. Alberts, B., et al., *Essential Cell Biology* 2010, New York: Garland Science.
3. Lee, E.Y.H.P. and W.J. Muller, *Oncogenes and Tumor Suppressor Genes*. Cold Spring Harbor Perspectives in Biology, 2010. **2**(10): p. a003236.
4. Alberts, B., et al., *Biologia molecular da célula*. 2010, Porto Alegre: Artmed. 1727.
5. Knudsen, E.S. and K.E. Knudsen, *Tailoring to RB: tumour suppressor status and therapeutic response*. Nature reviews. Cancer, 2008. **8**(9): p. 714-724.
6. Feugeas, O., et al., *Loss of heterozygosity of the RB gene is a poor prognostic factor in patients with osteosarcoma*. J Clin Oncol, 1996. **14**(2): p. 467-72.
7. Olivier, M., M. Hollstein, and P. Hainaut, *TP53 Mutations in Human Cancers: Origins, Consequences, and Clinical Use*. Cold Spring Harbor Perspectives in Biology, 2010. **2**(1): p. a001008.
8. Bouaoun, L., et al., *TP53 Variations in Human Cancers: New Lessons from the IARC TP53 Database and Genomics Data*. Hum Mutat, 2016. **37**(9): p. 865-76.
9. Kansara, M. and D.M. Thomas, *Molecular pathogenesis of osteosarcoma*. DNA Cell Biol, 2007. **26**(1): p. 1-18.
10. Ottaviani, G. and N. Jaffe, *The epidemiology of osteosarcoma*. Cancer Treat Res, 2009. **152**: p. 3-13.
11. Savage, S.A. and L. Mirabello, *Using epidemiology and genomics to understand osteosarcoma etiology*. Sarcoma, 2011. **2011**: p. 548151.
12. Durfee, R.A., M. Mohammed, and H.H. Luu, *Review of Osteosarcoma and Current Management*. Rheumatology and Therapy, 2016. **3**(2): p. 221-243.
13. Rasalkar, D.D., et al., *Pulmonary metastases in children with osteosarcoma: characteristics and impact on patient survival*. Pediatr Radiol, 2011. **41**(2): p. 227-36.
14. Geller, D.S. and R. Gorlick, *Osteosarcoma: a review of diagnosis, management, and treatment strategies*. Clin Adv Hematol Oncol, 2010. **8**(10): p. 705-18.
15. Diaz-Montero, C.M. and B.W. McIntyre, *Acquisition of anoikis resistance in human osteosarcoma cells*. Eur J Cancer, 2003. **39**(16): p. 2395-402.
16. Strauss, S.J., et al., *Understanding micrometastatic disease and Anoikis resistance in ewing family of tumors and osteosarcoma*. Oncologist, 2010. **15**(6): p. 627-35.
17. Jin, J., et al., *miRNA-218 inhibits osteosarcoma cell migration and invasion by down-regulating of TIAM1, MMP2 and MMP9*. Asian Pac J Cancer Prev, 2013. **14**(6): p. 3681-4.
18. Bjornland, K., et al., *Matrix metalloproteinases participate in osteosarcoma invasion*. J Surg Res, 2005. **127**(2): p. 151-6.
19. Yang, G., J. Yuan, and K. Li, *EMT transcription factors: implication in osteosarcoma*. Med Oncol, 2013. **30**(4): p. 697.
20. Ren, D., et al., *Wild-type p53 suppresses the epithelial-mesenchymal transition and stemness in PC-3 prostate cancer cells by modulating miR145*. Int J Oncol, 2013. **42**(4): p. 1473-81.
21. Wang, Y., et al., *Loss of P53 facilitates invasion and metastasis of prostate cancer cells*. Mol Cell Biochem, 2013. **384**(1-2): p. 121-7.
22. Wilson, H., et al., *Effect of Tolfenamic Acid on Canine Cancer Cell Proliferation, Specificity Protein (Sp) Transcription Factors, and Sp-Regulated Proteins in Canine Osteosarcoma, Mammary Carcinoma, and Melanoma Cells*. Journal of veterinary internal medicine / American College of Veterinary Internal Medicine, 2012. **26**(4): p. 977-986.

23. Guan, H., et al., *Sp1 is upregulated in human glioma, promotes MMP-2-mediated cell invasion and predicts poor clinical outcome*. Int J Cancer, 2012. **130**(3): p. 593-601.
24. Jungert, K., et al., *Sp1 is required for transforming growth factor-beta-induced mesenchymal transition and migration in pancreatic cancer cells*. Cancer Res, 2007. **67**(4): p. 1563-70.
25. Yu, X., et al., *Small molecule compounds targeting the p53 pathway: are we finally making progress?* Apoptosis, 2014. **19**(7): p. 1055-68.
26. Bullock, A.N. and A.R. Fersht, *Rescuing the function of mutant p53*. Nat Rev Cancer, 2001. **1**(1): p. 68-76.
27. Golubovskaya, V.M. and W.G. Cance, *Targeting the p53 Pathway*. Surgical oncology clinics of North America, 2013. **22**(4): p. 10.1016/j.soc.2013.06.003.
28. Zawacka-Pankau, J. and G. Selivanova, *Pharmacological reactivation of p53 as a strategy to treat cancer*. J Intern Med, 2015. **277**(2): p. 248-59.
29. Yue, X., et al., *Mutant p53 in Cancer: Accumulation, Gain-of-Function, and Therapy*. J Mol Biol, 2017. **429**(11): p. 1595-1606.
30. Powell, E., D. Piwnica-Worms, and H. Piwnica-Worms, *Contribution of p53 to metastasis*. Cancer Discov, 2014. **4**(4): p. 405-14.
31. Tang, X., et al., *CP-31398 restores mutant p53 tumor suppressor function and inhibits UVB-induced skin carcinogenesis in mice*. The Journal of Clinical Investigation, 2007. **117**(12): p. 3753-3764.
32. Bykov, V.J., et al., *Restoration of the tumor suppressor function to mutant p53 by a low-molecular-weight compound*. Nat Med, 2002. **8**(3): p. 282-8.
33. Vizcaino, C., S. Mansilla, and J. Portugal, *Sp1 transcription factor: A long-standing target in cancer chemotherapy*. Pharmacol Ther, 2015. **152**: p. 111-24.
34. Beishline, K. and J. Azizkhan-Clifford, *Sp1 and the 'hallmarks of cancer'*. Febs j, 2015. **282**(2): p. 224-58.
35. Kieran, M.W., R. Kalluri, and Y.-J. Cho, *The VEGF Pathway in Cancer and Disease: Responses, Resistance, and the Path Forward*. Cold Spring Harbor Perspectives in Medicine, 2012. **2**(12): p. a006593.
36. Cheng, Q., et al., *Suppression of survivin promoter activity by YM155 involves disruption of Sp1-DNA interaction in the survivin core promoter*. International Journal of Biochemistry and Molecular Biology, 2012. **3**(2): p. 179-197.
37. Li, H., et al., *Integrated high-throughput analysis identifies Sp1 as a crucial determinant of p53-mediated apoptosis*. Cell Death Differ, 2014. **21**(9): p. 1493-502.
38. Chuang, J.Y., et al., *Overexpression of Sp1 leads to p53-dependent apoptosis in cancer cells*. Int J Cancer, 2009. **125**(9): p. 2066-76.
39. Murthy, S., A.J. Ryan, and A.B. Carter, *SP-1 regulation of MMP-9 expression requires serine-586 in the PEST domain*. The Biochemical journal, 2012. **445**(2): p. 229-236.
40. Pan, M.R. and W.C. Hung, *Nonsteroidal anti-inflammatory drugs inhibit matrix metalloproteinase-2 via suppression of the ERK/Sp1-mediated transcription*. J Biol Chem, 2002. **277**(36): p. 32775-80.
41. Cao, L., et al., *MiR-324-5p Suppresses Hepatocellular Carcinoma Cell Invasion by Counteracting ECM Degradation through Post-Transcriptionally Downregulating ETS1 and SP1*. PLoS ONE, 2015. **10**(7): p. e0133074.
42. Yamada, S., et al., *Skp2 Regulates the Expression of MMP-2 and MMP-9, and Enhances the Invasion Potential of Oral Squamous Cell Carcinoma*. Pathol Oncol Res, 2016. **22**(3): p. 625-32.

43. Chen, Y., et al., *JWA suppresses tumor angiogenesis via Sp1-activated matrix metalloproteinase-2 and its prognostic significance in human gastric cancer*. *Carcinogenesis*, 2014. **35**(2): p. 442-51.
44. Cui, F., et al., *miR-375 inhibits the invasion and metastasis of colorectal cancer via targeting SP1 and regulating EMT-associated genes*. *Oncol Rep*, 2016. **36**(1): p. 487-93.
45. Jacob, A. and R. Prekeris, *The regulation of MMP targeting to invadopodia during cancer metastasis*. *Frontiers in Cell and Developmental Biology*, 2015. **3**: p. 4.
46. De Craene, B. and G. Berx, *Regulatory networks defining EMT during cancer initiation and progression*. *Nat Rev Cancer*, 2013. **13**(2): p. 97-110.
47. Chaffer, C.L. and R.A. Weinberg, *A perspective on cancer cell metastasis*. *Science*, 2011. **331**(6024): p. 1559-64.
48. Lu, J., et al., *Quercetin Inhibits the Migration and Invasion of HCCLM3 Cells by Suppressing the Expression of p-Akt1, Matrix Metalloproteinase (MMP) MMP-2, and MMP-9*. *Med Sci Monit*, 2018. **24**: p. 2583-2589.
49. Remacle, A.G., et al., *Assay of matrix metalloproteinases types 1, 2, 3 and 9 in breast cancer*. *Br J Cancer*, 1998. **77**(6): p. 926-31.
50. Bian, J. and Y. Sun, *Transcriptional activation by p53 of the human type IV collagenase (gelatinase A or matrix metalloproteinase 2) promoter*. *Mol Cell Biol*, 1997. **17**(11): p. 6330-8.
51. Ozdemir, E., et al., *Strong correlation of basement membrane degradation with p53 inactivation and/or MDM2 overexpression in superficial urothelial carcinomas*. *J Urol*, 1997. **158**(1): p. 206-11.
52. Chien, Y.-C., et al., *EZH2 promotes migration and invasion of triple-negative breast cancer cells via regulating TIMP2-MMP-2/-9 pathway*. *American Journal of Cancer Research*, 2018. **8**(3): p. 422-434.
53. Egeblad, M. and Z. Werb, *New functions for the matrix metalloproteinases in cancer progression*. *Nat Rev Cancer*, 2002. **2**(3): p. 161-74.
54. Morandi, A., et al., *Targeting the Metabolic Reprogramming That Controls Epithelial-to-Mesenchymal Transition in Aggressive Tumors*. *Frontiers in Oncology*, 2017. **7**: p. 40.
55. Gottardi, C.J., E. Wong, and B.M. Gumbiner, *E-cadherin suppresses cellular transformation by inhibiting beta-catenin signaling in an adhesion-independent manner*. *J Cell Biol*, 2001. **153**(5): p. 1049-60.
56. Jiang, W.G., et al., *Tissue invasion and metastasis: Molecular, biological and clinical perspectives*. *Semin Cancer Biol*, 2015. **35 Suppl**: p. S244-s275.
57. Blanco, M.J., et al., *Correlation of Snail expression with histological grade and lymph node status in breast carcinomas*. *Oncogene*, 2002. **21**(20): p. 3241-6.
58. Qiao, B., N.W. Johnson, and J. Gao, *Epithelial-mesenchymal transition in oral squamous cell carcinoma triggered by transforming growth factor-beta1 is Snail family-dependent and correlates with matrix metalloproteinase-2 and -9 expressions*. *Int J Oncol*, 2010. **37**(3): p. 663-8.
59. Joseph, M.J., et al., *Slug is a downstream mediator of transforming growth factor-beta1-induced matrix metalloproteinase-9 expression and invasion of oral cancer cells*. *J Cell Biochem*, 2009. **108**(3): p. 726-36.
60. Siemens, H., et al., *miR-34 and SNAIL form a double-negative feedback loop to regulate epithelial-mesenchymal transitions*. *Cell Cycle*, 2011. **10**(24): p. 4256-71.
61. Wang, S.-P., et al., *p53 controls cancer cell invasion by inducing the MDM2-mediated degradation of Slug*. *Nature Cell Biology*, 2009. **11**: p. 694.

62. Maestro, R., et al., *Twist is a potential oncogene that inhibits apoptosis*. Genes Dev, 1999. **13**(17): p. 2207-17.
63. Chang, C.-J., et al., *p53 regulates epithelial-mesenchymal transition (EMT) and stem cell properties through modulating miRNAs*. Nature cell biology, 2011. **13**(3): p. 317-323.
64. Meyer, K.M., et al., *Human mammary epithelial cells exhibit a differential p53-mediated response following exposure to ionizing radiation or UV light*. Oncogene, 1999. **18**(42): p. 5795-805.
65. Wei, C.L., et al., *A global map of p53 transcription-factor binding sites in the human genome*. Cell, 2006. **124**(1): p. 207-19.
66. Muller, P.A., K.H. Vousden, and J.C. Norman, *p53 and its mutants in tumor cell migration and invasion*. J Cell Biol, 2011. **192**(2): p. 209-18.
67. Brosh, R. and V. Rotter, *When mutants gain new powers: news from the mutant p53 field*. Nat Rev Cancer, 2009. **9**(10): p. 701-13.
68. Nieto, M.A. and A. Cano, *The epithelial-mesenchymal transition under control: global programs to regulate epithelial plasticity*. Semin Cancer Biol, 2012. **22**(5-6): p. 361-8.
69. Leon-Gonzalez, A.J., et al., *Chalcones as Promising Lead Compounds on Cancer Therapy*. Curr Med Chem, 2015. **22**(30): p. 3407-25.
70. Mahapatra, D.K., S.K. Bharti, and V. Asati, *Anti-cancer chalcones: Structural and molecular target perspectives*. Eur J Med Chem, 2015. **98**: p. 69-114.
71. Go, M.L., X. Wu, and X.L. Liu, *Chalcones: an update on cytotoxic and chemoprotective properties*. Curr Med Chem, 2005. **12**(4): p. 481-99.
72. Yadav, V.R., et al., *The Role of Chalcones in Suppression of NF- κ B-Mediated Inflammation and Cancer*. International immunopharmacology, 2011. **11**(3): p. 295-309.
73. Pandey, M.K., et al., *Butein, a tetrahydroxychalcone, inhibits nuclear factor (NF)- κ B and NF- κ B-regulated gene expression through direct inhibition of I κ B kinase beta on cysteine 179 residue*. J Biol Chem, 2007. **282**(24): p. 17340-50.
74. Jandial, D.D., et al., *Molecular targeted approaches to cancer therapy and prevention using chalcones*. Curr Cancer Drug Targets, 2014. **14**(2): p. 181-200.
75. Karthikeyan, C., et al., *Advances in chalcones with anticancer activities*. Recent Pat Anticancer Drug Discov, 2015. **10**(1): p. 97-115.
76. Cuendet, M., et al., *Cancer chemopreventive activity and metabolism of isoliquiritigenin, a compound found in licorice*. Cancer Prev Res (Phila), 2010. **3**(2): p. 221-32.
77. Gerhauser, C., *Beer constituents as potential cancer chemopreventive agents*. Eur J Cancer, 2005. **41**(13): p. 1941-54.
78. Maiti, A., et al., *Synthesis and biological evaluation of (+/-)-abyssinone II and its analogues as aromatase inhibitors for chemoprevention of breast cancer*. J Med Chem, 2007. **50**(12): p. 2799-806.
79. Zhang, Y., et al., *A new chalcone derivative (E)-3-(4-methoxyphenyl)-2-methyl-1-(3,4,5-trimethoxyphenyl)prop-2-en-1-one suppresses prostate cancer involving p53-mediated cell cycle arrests and apoptosis*. Anticancer Res, 2012. **32**(9): p. 3689-98.
80. Hsu, Y.L., P.L. Kuo, and C.C. Lin, *Isoliquiritigenin induces apoptosis and cell cycle arrest through p53-dependent pathway in Hep G2 cells*. Life Sci, 2005. **77**(3): p. 279-92.
81. Zhou, Y. and W.S. Ho, *Combination of liquiritin, isoliquiritin and isoliquiritigenin induce apoptotic cell death through upregulating p53 and p21 in the A549 non-small cell lung cancer cells*. Oncol Rep, 2014. **31**(1): p. 298-304.
82. Stoll, R., et al., *Chalcone derivatives antagonize interactions between the human oncoprotein MDM2 and p53*. Biochemistry, 2001. **40**(2): p. 336-44.

83. Buolamwini, J.K., et al., *Small molecule antagonists of the MDM2 oncoprotein as anticancer agents*. *Curr Cancer Drug Targets*, 2005. **5**(1): p. 57-68.
84. Kahyo, T., et al., *A novel chalcone polyphenol inhibits the deacetylase activity of SIRT1 and cell growth in HEK293T cells*. *J Pharmacol Sci*, 2008. **108**(3): p. 364-71.
85. Achanta, G., et al., *A boronic-chalcone derivative exhibits potent anticancer activity through inhibition of the proteasome*. *Mol Pharmacol*, 2006. **70**(1): p. 426-33.
86. Issaenko, O.A. and A.Y. Amerik, *Chalcone-based small-molecule inhibitors attenuate malignant phenotype via targeting deubiquitinating enzymes*. *Cell Cycle*, 2012. **11**(9): p. 1804-1817.
87. Bazzaro, M., et al., *alpha,beta-Unsaturated carbonyl system of chalcone-based derivatives is responsible for broad inhibition of proteasomal activity and preferential killing of human papilloma virus (HPV) positive cervical cancer cells*. *J Med Chem*, 2011. **54**(2): p. 449-56.
88. Zi, X. and A.R. Simoneau, *Flavokawain A, 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 Res*, 2005. **65**(8): p. 3479-86.
89. Szliszka, E. and W. Krol, *The role of dietary polyphenols in tumor necrosis factor-related apoptosis inducing ligand (TRAIL)-induced apoptosis for cancer chemoprevention*. *Eur J Cancer Prev*, 2011. **20**(1): p. 63-9.
90. Moon, D.O., et al., *Butein suppresses the expression of nuclear factor-kappa B-mediated matrix metalloproteinase-9 and vascular endothelial growth factor in prostate cancer cells*. *Toxicol In Vitro*, 2010. **24**(7): p. 1927-34.
91. Padmavathi, G., et al., *Potential of butein, a tetrahydroxychalcone to obliterate cancer*. *Phytomedicine*, 2015. **22**(13): p. 1163-71.
92. Funakoshi-Tago, M., et al., *Licochalcone A is a potent inhibitor of TEL-Jak2-mediated transformation through the specific inhibition of Stat3 activation*. *Biochem Pharmacol*, 2008. **76**(12): p. 1681-93.
93. Pandey, M.K., et al., *Butein suppresses constitutive and inducible signal transducer and activator of transcription (STAT) 3 activation and STAT3-regulated gene products through the induction of a protein tyrosine phosphatase SHP-1*. *Mol Pharmacol*, 2009. **75**(3): p. 525-33.
94. Takahashi, A., N. Yamamoto, and A. Murakami, *Cardamonin suppresses nitric oxide production via blocking the IFN-gamma/STAT pathway in endotoxin-challenged peritoneal macrophages of ICR mice*. *Life Sci*, 2011. **89**(9-10): p. 337-42.
95. Cho, M., et al., *Cardamonin suppresses melanogenesis by inhibition of Wnt/beta-catenin signaling*. *Biochem Biophys Res Commun*, 2009. **390**(3): p. 500-5.
96. Park, S., et al., *Cardamonin suppresses the proliferation of colon cancer cells by promoting beta-catenin degradation*. *Biol Pharm Bull*, 2013. **36**(6): p. 1040-4.
97. Guo, Y., et al., *Blocking Wnt/LRP5 signaling by a soluble receptor modulates the epithelial to mesenchymal transition and suppresses met and metalloproteinases in osteosarcoma Saos-2 cells*. *J Orthop Res*, 2007. **25**(7): p. 964-71.
98. Bracke, M.E., et al., *Plant polyphenolics as anti-invasive cancer agents*. *Anticancer Agents Med Chem*, 2008. **8**(2): p. 171-85.
99. Leao, M., et al., *Enhanced cytotoxicity of prenylated chalcone against tumour cells via disruption of the p53-MDM2 interaction*. *Life Sci*, 2015. **142**: p. 60-5.
100. Silva, G., et al., *Anti-cancer activity of trans-chalcone in osteosarcoma: Involvement of Sp1 and p53*. *Mol Carcinog*, 2016. **55**(10): p. 1438-48.

101. Szliszka, E., et al., *Chalcones and dihydrochalcones augment TRAIL-mediated apoptosis in prostate cancer cells*. *Molecules*, 2010. **15**(8): p. 5336-53.
102. Kamal, A., et al., *Design, synthesis and biological evaluation of imidazopyridine/pyrimidine-chalcone derivatives as potential anticancer agents*. *MedChemComm*, 2010. **1**(5): p. 355-360.
103. Dias, T.A., et al., *Superior anticancer activity of halogenated chalcones and flavonols over the natural flavonol quercetin*. *Eur J Med Chem*, 2013. **65**: p. 500-10.
104. Hagmann, W.K., *The many roles for fluorine in medicinal chemistry*. *J Med Chem*, 2008. **51**(15): p. 4359-69.
105. Mai, C.W., et al., *Chalcones with electron-withdrawing and electron-donating substituents: anticancer activity against TRAIL resistant cancer cells, structure-activity relationship analysis and regulation of apoptotic proteins*. *Eur J Med Chem*, 2014. **77**: p. 378-87.
106. Jha, A., et al., *Cytostatic activity of novel 4'-aminochalcone-based imides*. *Bioorg Med Chem Lett*, 2007. **17**(16): p. 4545-50.
107. Reddy, M.V., et al., *Design, synthesis, and biological evaluation of Mannich bases of heterocyclic chalcone analogs as cytotoxic agents*. *Bioorg Med Chem*, 2008. **16**(15): p. 7358-70.
108. Saito, Y., et al., *Synthesis and structure-activity relationship studies of furan-ring fused chalcones as antiproliferative agents*. *Anticancer Res*, 2015. **35**(2): p. 811-7.
109. Do, T.H., et al., *Synthesis and Selective Cytotoxic Activities on Rhabdomyosarcoma and Noncancerous Cells of Some Heterocyclic Chalcones*. *Molecules*, 2016. **21**(3): p. 329.
110. Sharma, V., V. Kumar, and P. Kumar, *Heterocyclic chalcone analogues as potential anticancer agents*. *Anticancer Agents Med Chem*, 2013. **13**(3): p. 422-32.
111. Mirossay, L., L. Varinska, and J. Mojzis, *Antiangiogenic Effect of Flavonoids and Chalcones: An Update*. *Int J Mol Sci*, 2017. **19**(1).
112. Varinska, L., et al., *Anti-angiogenic activity of the flavonoid precursor 4-hydroxychalcone*. *Eur J Pharmacol*, 2012. **691**(1-3): p. 125-33.
113. Roman, B.I., et al., *Exploration of the SAR of anti-invasive chalcones: synthesis and biological evaluation of conformationally restricted analogues*. *Bioorg Med Chem*, 2012. **20**(15): p. 4812-9.
114. Kolundzija, B., et al., *Novel anthraquinone based chalcone analogues containing an imine fragment: synthesis, cytotoxicity and anti-angiogenic activity*. *Bioorg Med Chem Lett*, 2014. **24**(1): p. 65-71.
115. Iftikhar, S., et al., *Synthesis and evaluation of modified chalcone based p53 stabilizing agents*. *Bioorg Med Chem Lett*, 2017. **27**(17): p. 4101-4106.
116. Tang, Z., et al., *Prognostic significance of tissue factor pathway inhibitor-2 in pancreatic carcinoma and its effect on tumor invasion and metastasis*. *Med Oncol*, 2010. **27**(3): p. 867-75.
117. Pasilliao, C.C., et al., *The involvement of insulin-like growth factor 2 binding protein 3 (IMP3) in pancreatic cancer cell migration, invasion, and adhesion*. *BMC Cancer*, 2015. **15**: p. 266.
118. Wang, K.L., et al., *Inhibitory effects of isoliquiritigenin on the migration and invasion of human breast cancer cells*. *Expert Opin Ther Targets*, 2013. **17**(4): p. 337-49.
119. Huang, H.C., et al., *Licochalcone A inhibits the migration and invasion of human lung cancer cells via inactivation of the Akt signaling pathway with downregulation of MMP-1/-3 expression*. *Tumour Biol*, 2014. **35**(12): p. 12139-49.
120. Chang, E., et al., *Loss of p53, rather than beta-catenin overexpression, induces survivin-mediated resistance to apoptosis in an esophageal cancer cell line*. *J Thorac Cardiovasc Surg*, 2010. **140**(1): p. 225-32.

121. Sun, Y., et al., *P53 is required for Doxorubicin-induced apoptosis via the TGF-beta signaling pathway in osteosarcoma-derived cells*. Am J Cancer Res, 2016. **6**(1): p. 114-25.
122. Harisi, R., et al., *Extracellular matrix induces doxorubicin-resistance in human osteosarcoma cells by suppression of p53 function*. Cancer Biol Ther, 2007. **6**(8): p. 1240-6.
123. Yeung, K.T. and J. Yang, *Epithelial-mesenchymal transition in tumor metastasis*. Mol Oncol, 2017. **11**(1): p. 28-39.
124. Nijkamp, M.M., et al., *Expression of E-cadherin and vimentin correlates with metastasis formation in head and neck squamous cell carcinoma patients*. Radiother Oncol, 2011. **99**(3): p. 344-8.
125. Techasen, A., et al., *Loss of E-cadherin promotes migration and invasion of cholangiocarcinoma cells and serves as a potential marker of metastasis*. Tumour Biol, 2014. **35**(9): p. 8645-52.
126. Fenouille, N., et al., *The epithelial-mesenchymal transition (EMT) regulatory factor SLUG (SNAI2) is a downstream target of SPARC and AKT in promoting melanoma cell invasion*. PLoS One, 2012. **7**(7): p. e40378.
127. Wang, Y., et al., *The Role of Snail in EMT and Tumorigenesis*. Current cancer drug targets, 2013. **13**(9): p. 963-972.
128. Nakajima, S., et al., *N-cadherin expression and epithelial-mesenchymal transition in pancreatic carcinoma*. Clin Cancer Res, 2004. **10**(12 Pt 1): p. 4125-33.
129. Luo, Y., et al., *Upregulated N-cadherin expression is associated with poor prognosis in epithelial-derived solid tumours: A meta-analysis*. Eur J Clin Invest, 2018. **48**(4).
130. Ciolczyk-Wierzbicka, D. and P. Laidler, *The inhibition of invasion of human melanoma cells through N-cadherin knock-down*. Med Oncol, 2018. **35**(4): p. 42.
131. Yilmaz, M. and G. Christofori, *Mechanisms of motility in metastasizing cells*. Mol Cancer Res, 2010. **8**(5): p. 629-42.
132. Toth, M. and R. Fridman, *Assessment of Gelatinases (MMP-2 and MMP-9) by Gelatin Zymography*. Methods Mol Med, 2001. **57**: p. 163-74.
133. Ricci, S., et al., *Substrate-zymography: a still worthwhile method for gelatinases analysis in biological samples*. Clin Chem Lab Med, 2016. **54**(8): p. 1281-90.
134. Walker, A., R. Frei, and K.R. Lawson, *The cytoplasmic domain of N-cadherin modulates MMP9 induction in oral squamous carcinoma cells*. Int J Oncol, 2014. **45**(4): p. 1699-706.
135. Zhao, C., et al., *beta-Catenin knockdown inhibits pituitary adenoma cell proliferation and invasion via interfering with AKT and gelatinases expression*. Int J Oncol, 2015. **46**(4): p. 1643-50.
136. Webb, A.H., et al., *Inhibition of MMP-2 and MMP-9 decreases cellular migration, and angiogenesis in in vitro models of retinoblastoma*. BMC Cancer, 2017. **17**: p. 434.
137. Luo, Y., F. Liang, and Z.-Y. Zhang, *PRL1 promotes cell migration and invasion by increasing MMP2 and MMP9 expression through Src and ERK1/2 pathways*. Biochemistry, 2009. **48**(8): p. 1838-1846.
138. Jiang, Y., et al., *Sinomenine Hydrochloride Inhibits the Metastasis of Human Glioblastoma Cells by Suppressing the Expression of Matrix Metalloproteinase-2/-9 and Reversing the Endogenous and Exogenous Epithelial-Mesenchymal Transition*. Int J Mol Sci, 2018. **19**(3).
139. Chuang, C.H., et al., *Quercetin metabolites inhibit MMP-2 expression in A549 lung cancer cells by PPAR-gamma associated mechanisms*. J Nutr Biochem, 2016. **33**: p. 45-53.
140. Liu, J., et al., *Diosmetin inhibits the metastasis of hepatocellular carcinoma cells by downregulating the expression levels of MMP-2 and MMP-9*. Mol Med Rep, 2016. **13**(3): p. 2401-8.

141. Chai, Y., J. Xu, and B. Yan, *The anti-metastatic effect of baicalein on colorectal cancer*. *Oncol Rep*, 2017. **37**(4): p. 2317-2323.
142. Moirangthem, A., et al., *Simultaneous knockdown of uPA and MMP9 can reduce breast cancer progression by increasing cell-cell adhesion and modulating EMT genes*. *Sci Rep*, 2016. **6**: p. 21903.
143. Ren, T., L. Zhu, and M. Cheng, *CXCL10 accelerates EMT and metastasis by MMP-2 in hepatocellular carcinoma*. *Am J Transl Res*, 2017. **9**(6): p. 2824-2837.
144. Chen, H.H. and D.L. Wang, *Nitric oxide inhibits matrix metalloproteinase-2 expression via the induction of activating transcription factor 3 in endothelial cells*. *Mol Pharmacol*, 2004. **65**(5): p. 1130-40.
145. Yan, C., H. Wang, and D.D. Boyd, *ATF3 represses 72-kDa type IV collagenase (MMP-2) expression by antagonizing p53-dependent trans-activation of the collagenase promoter*. *J Biol Chem*, 2002. **277**(13): p. 10804-12.
146. Zcharia, E., et al., *Inhibition of matrix metalloproteinase-2 by halofuginone is mediated by the Egr1 transcription factor*. *Anticancer Drugs*, 2012. **23**(10): p. 1022-31.
147. Cathcart, J.M., et al., *Interleukin-6 increases matrix metalloproteinase-14 (MMP-14) levels via down-regulation of p53 to drive cancer progression*. *Oncotarget*, 2016. **7**(38): p. 61107-61120.
148. Haage, A., et al., *Matrix metalloproteinase-14 is a mechanically regulated activator of secreted MMPs and invasion*. *Biochem Biophys Res Commun*, 2014. **450**(1): p. 213-8.
149. Park, J.H., et al., *Fisetin inhibits matrix metalloproteinases and reduces tumor cell invasiveness and endothelial cell tube formation*. *Nutr Cancer*, 2013. **65**(8): p. 1192-9.
150. Ise, R., et al., *Expression profiling of the estrogen responsive genes in response to phytoestrogens using a customized DNA microarray*. *FEBS Lett*, 2005. **579**(7): p. 1732-40.
151. Rao, M., et al., *Mithramycin Depletes Specificity Protein 1 and Activates p53 to Mediate Senescence and Apoptosis of Malignant Pleural Mesothelioma Cells*. *Clin Cancer Res*, 2016. **22**(5): p. 1197-210.
152. Kim, N.H., et al., *A p53/miRNA-34 axis regulates Snail1-dependent cancer cell epithelial-mesenchymal transition*. *J Cell Biol*, 2011. **195**(3): p. 417-33.
153. Tseng, R.C., et al., *Epigenetic silencing of AXIN2/betaTrCP and deregulation of p53-mediated control lead to wild-type beta-catenin nuclear accumulation in lung tumorigenesis*. *Oncogene*, 2008. **27**(32): p. 4488-96.
154. Levina, E., M. Oren, and A. Ben-Ze'ev, *Downregulation of beta-catenin by p53 involves changes in the rate of beta-catenin phosphorylation and Axin dynamics*. *Oncogene*, 2004. **23**(25): p. 4444-53.
155. Wang, C., et al., *Targeted p53 activation by saRNA suppresses human bladder cancer cells growth and metastasis*. *J Exp Clin Cancer Res*, 2016. **35**: p. 53.
156. Kim, J., et al., *Cooperative actions of p21WAF1 and p53 induce Slug protein degradation and suppress cell invasion*. *EMBO Rep*, 2014. **15**(10): p. 1062-8.
157. Wang, Z., et al., *Critical Roles of p53 in Epithelial-Mesenchymal Transition and Metastasis of Hepatocellular Carcinoma Cells*. *PLOS ONE*, 2013. **8**(9): p. e72846.
158. Nam, E.H., et al., *ZEB2 upregulates integrin alpha5 expression through cooperation with Sp1 to induce invasion during epithelial-mesenchymal transition of human cancer cells*. *Carcinogenesis*, 2012. **33**(3): p. 563-71.
159. Nam, E.H., et al., *ZEB2-Sp1 cooperation induces invasion by upregulating cadherin-11 and integrin alpha5 expression*. *Carcinogenesis*, 2014. **35**(2): p. 302-14.
160. Walsh, J.G., et al., *Executioner caspase-3 and caspase-7 are functionally distinct proteases*. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 2008. **105**(35): p. 12815.

161. Pu, H., et al., *PARP-1 regulates epithelial-mesenchymal transition (EMT) in prostate tumorigenesis*. *Carcinogenesis*, 2014. **35**(11): p. 2592-601.
162. Rodriguez-Hernandez, A., et al., *Nuclear caspase-3 and caspase-7 activation, and poly(ADP-ribose) polymerase cleavage are early events in camptothecin-induced apoptosis*. *Apoptosis*, 2006. **11**(1): p. 131-9.
163. Ramirez-Tagle, R., et al., *Chalcone-Induced Apoptosis through Caspase-Dependent Intrinsic Pathways in Human Hepatocellular Carcinoma Cells*. *Int J Mol Sci*, 2016. **17**(2): p. 260.
164. Ahmed, F.F., et al., *New 1,2,4-triazole-Chalcone hybrids induce Caspase-3 dependent apoptosis in A549 human lung adenocarcinoma cells*. *Eur J Med Chem*, 2018. **151**: p. 705-722.
165. Coskun, D., et al., *Novel 1-(7-ethoxy-1-benzofuran-2-yl) substituted chalcone derivatives: Synthesis, characterization and anticancer activity*. *Eur J Med Chem*, 2017. **136**: p. 212-222.