

CHALCONA HIDROXILADA A3 SUPRIME MIGRAÇÃO CELULAR EM CÉLULAS DE CARCINOMA ESCAMOSO ORAL HUMANO (HSC-3) *IN VITRO*

¹ Benedito dos Santos Alves ; ² Naiane dos Santos da Penha; ³ Rodrigo Elísio de Sá; ⁴ Caridad Noda Pérez; ⁵ José Delano Barreto Marinho Filho ⁶ Ana Jérsia Araújo.

^{1, 2, 3, 5, 6} Laboratório de Cultura de Células do Delta (LCC Delta) da Universidade Federal do Delta do Parnaíba - UFDPAr.

⁴ Laboratório de Química Sintética e Aplicada do Instituto de Química da Universidade Federal de Goiás - UFG.

Área temática: Biomedicina e Inovações em Pesquisas

Modalidade: Comunicação Oral Presencial

E-mail dos autores: alvesbeneditosa@gmail.com¹; naianepenha@ufpi.edu.br²; rodrigosa238@gmail.com³; carynoda@gmail.com⁴; delanomarinho@gmail.com⁵; anajersia@ufdpar.edu.br⁶.

RESUMO

INTRODUÇÃO: O carcinoma escamocelular oral é um câncer altamente invasivo e que frequentemente ocasiona metástase, principal responsável pela alta letalidade desta condição patológica. Nesse âmbito, a química medicinal surge como alternativa promissora para descoberta de novas moléculas capazes de impedir a progressão tumoral. Entre os compostos mais estudados, as chalconas destacam-se devido ao seu potencial biológico, em especial por sua atividade anticâncer. **OBJETIVO:** Avaliar o potencial citotóxico e antimigratório de uma chalcona hidroxilada (A3) em células de carcinoma escamoso oral humano. **MÉTODOS:** O potencial citotóxico da chalcona A3 foi determinado pelo ensaio do MTT nos tempos de 24, 48 e 72 horas. Para o ensaio de migração foi empregado o método *Scratch assay* em concentrações subcitotóxicas confirmadas pelo método de exclusão por azul de Tripán. **RESULTADOS:** O ensaio do MTT demonstrou que o composto avaliado exibiu efeito citotóxico, com valores de CI_{50} de 8,7 μ M e 4,3 μ M nos tempos de 48 e 72 horas, respectivamente. Não foi possível definir CI_{50} para o período de 24 horas. Para o ensaio de migração, as concentrações escolhidas foram testadas pelo ensaio de exclusão por azul de tripan para confirmar seu perfil subcitotóxico. Os dados revelaram que, no período de 24 horas, as concentrações utilizadas não interferiram na viabilidade das células HSC-3 quando comparadas ao controle negativo. O percentual de migração foi de 19,64% para o controle negativo. Por outro lado, nas concentrações de 0,25 μ M, 0,5 μ M e 1 μ M os percentuais de migração foram de 11,90%, 9,91% e 8,63%, respectivamente. **CONCLUSÃO:** Em suma, os resultados obtidos destacam a Chalcona A3 como uma molécula com potencial citotóxico e antimigratório que podem contribuir no contexto terapêutico contra carcinoma de células escamosas.

Palavras-chave: Chalcona, Carcinoma de células escamosas, Atividade antimigratória.

1 INTRODUÇÃO

O carcinoma escamoso da cavidade oral (CECO) é o tumor maligno mais comum da cabeça e pescoço, e mais de 300.000 pacientes são diagnosticados com a doença todos os anos em todo o mundo (Feller *et al.*, 2023). Apesar do tratamento multidisciplinar com cirurgia, radioterapia e quimioterapia, esta condição patológica ainda apresenta uma baixa taxa de sobrevida em 5 anos, de 50 a 60% (Arimoto *et al.*, 2018). Durante o processo de progressão tumoral, a metástase, que é a principal causa de morte por câncer, é um evento crítico. As células tumorais precisam adquirir fenótipos malignos para se separarem da massa tumoral primária. Essas células então atravessam a membrana basal, penetram a matriz extracelular e penetram na circulação (Zhang; Weinberg, 2018).

Desse modo, tem-se buscado o desenvolvimento de novos medicamentos capazes de impedir a disseminação das células tumorais. Nesse cenário, a química medicinal tem surgido como uma área que busca a descoberta de novas moléculas baseada em processos bioquímicos e mecanismos celulares. A compreensão de propriedades estruturais e químicas de ligação de drogas com alvos em vias e eventos biológicos importantes possibilita o desenho de moléculas capazes de regular ou modular funções-alvo específicas (Andricopulo *et al.*, 2009).

Nesse sentido, uma das classes de compostos de maior relevância são as chalconas, substâncias que apresentam estrutura química simples e que podem ser utilizadas para a formação de um amplo número de moléculas derivadas com atividade biológica, incluindo atividade anticâncer (Constantinescu; Lungu, 2021). Dentre tais moléculas, têm-se as chalconas hidroxiladas, um tipo de chalcona ainda pouco explorado que recebe grupos hidroxila em sua estrutura básica (Kim; Lee; Moon, 2013).

A chalcona A3 é uma molécula sintética, não havendo registros de sua utilização na literatura científica. Assim, este estudo busca avaliar o efeito antimigratório da chalcona hidroxilada A3 em células de carcinoma escamoso oral humano, visando sua utilização futura no bloqueio da progressão e disseminação tumoral.

2 MÉTODO

A Chalcona hidroxilada A3 ($C_{15}H_{11}O_2Cl$ / peso molecular: 258,17) utilizada neste estudo foi sintetizada e gentilmente cedida pela equipe da Prof^ª. Dr^ª. Caridad Noda Pérez, do Laboratório de Química Sintética e Aplicada do Instituto de Química da Universidade Federal de Goiás (UFG) para

os testes biológicos. Para determinação da concentração mínima do composto necessária para eliminar 50% das células expostas à A3 (CI_{50}), utilizou-se do teste do MTT, como descrito por Mosmann (1983), no qual células HSC-3 foram expostas a diferentes concentrações de A3 (1,56-100 μM) e doxorubicina (0,13-8,5 μM) por 24, 48 e 72 horas. Para avaliar se as concentrações definidas abaixo da CI_{50} não iriam interferir na viabilidade celular, utilizou-se do ensaio de exclusão do azul de tripan, como relatado por Adan, Kiraz e Baran (2016), no qual células HSC-3 foram expostas a A3 (0,25, 0,5, e 1 μM) e doxorubicina (0,1 μM) por 24 horas. Para determinação da inibição da migração celular utilizou-se do ensaio de migração - Scratch assay, como descrito por Liang, Park e Guan (2007), em que células HSC-3 foram expostas à 0,25 μM ; 0,5 μM e 1 μM de A3 por 24 horas.

3 RESULTADOS

A partir da análise pelo método do MTT, foram obtidos os níveis de viabilidade celular evidenciados na Tabela 1. A amostra apresentou efeito citotóxico com valores de CI_{50} de 8,7 μM e 4,3 μM nos tempos de 48 e 72 horas, respectivamente. No tempo de 24 horas não foi possível definir a CI_{50} da amostra, uma vez que a concentração de A3 utilizada foi inferior à necessária para eliminar metade das células durante esse período de tempo.

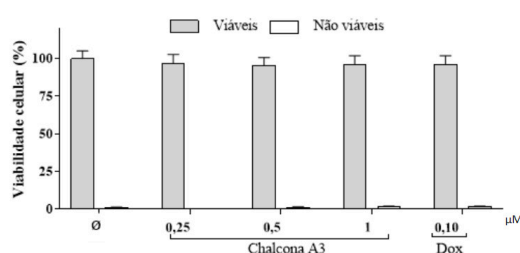
Tabela 1: Determinação da CI_{50} da Chalcona Hidroxilada A3 em células HSC-3 após 24, 48 e 72 horas de tratamento.

Amostras	CI_{50} (μM) Intervalo de confiança (95%)		
	24 horas	48 horas	72 horas
A3	>100	8,7 (7,8 - 9,6)	4,3 (1,9 - 9,5)
DOX	0,29 (0,21 - 0,38)	0,25 (0,21 - 0,30)	0,21 (0,20 - 0,29)

Os valores de CI_{50} estão apresentados em μM e foram calculados a partir de regressão não linear utilizando o programa GraphPad Prism Software versão 8.0. Os intervalos de confiança (IC 95%) foram obtidos por meio de pelo menos três experimentos independentes realizados em quadruplicata, sendo mostrados entre parênteses. Doxorubicina foi utilizada como controle positivo. Fonte: Acervo do autor, 2024.

Como observado na Figura 2, no período de 24 horas, as concentrações escolhidas não interferiram na viabilidade das células HSC-3 quando comparadas ao controle negativo. Esses resultados eram esperados, haja vista que as concentrações utilizadas eram subcitotóxicas, incapazes de reduzir a viabilidade das células de modo significativo.

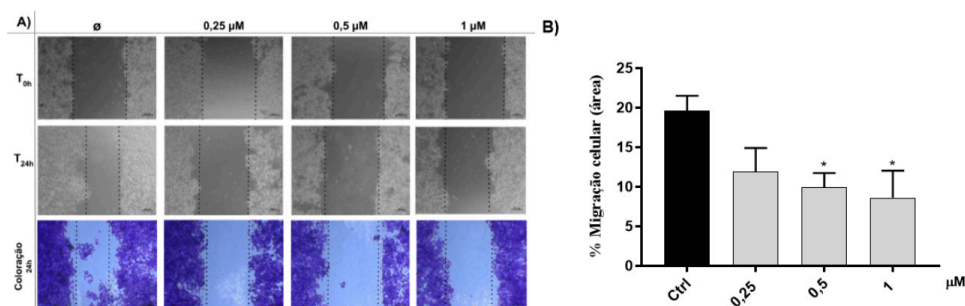
Figura 1: Efeito da Chalcona hidroxilada A3 na viabilidade de HSC-3 determinado pelo ensaio por exclusão do azul de Tripan após 24 horas de tratamento.



Os dados correspondem à média $\pm$ E.P.M. de no mínimo dois experimentos independentes. (* $p < 0,05$) comparado ao controle negativo por ANOVA. Fonte: Acervo do autor, 2024.

O efeito de A3 sobre o potencial migratório de células HSC-3 foi calculado com base na área do risco, realizado sobre a monocamada de células, no tempo zero e após 24 horas de exposição. A3 nas concentrações utilizadas (0,25 μ M; 0,5 μ M e 1 μ M) reduziu de modo significativo ($p < 0,05$) a porcentagem de migração quando comparado ao controle negativo na linhagem HSC-3 (Figura 4A). Os resultados possibilitam observar que após o tempo de incubação de 24 horas, o percentual de migração foi de 11,90% na concentração de 0,25 μ M, 9,91% na concentração de 0,5 μ M e 8,63% na concentração de 1 μ M. As células do controle negativo apresentaram percentual de migração celular de 19,64% (Figura 4B).

Figura 2: Efeito da Chalcona hidroxilada A3 sobre o potencial migratório de células HSC-3.



(A) Fotos representativas do fechamento do risco por microscopia óptica (10x) nos tempos 0 e 24 horas (B) Gráfico gerado através da área de cada risco dado em porcentagem. Os resultados foram expressos como média $\pm$ erro padrão da média (EPM) e um valor de $p < 0,05$ foi considerado estatisticamente significativo. Fonte: Autoria própria, 2024.

4 DISCUSSÃO

Os resultados obtidos através do teste do MTT são semelhantes aos encontrados por Zhang e colaboradores (2020), no qual os autores demonstraram que o tratamento de células de câncer de próstata e de células não tumorais com concentrações crescentes de uma chalcona modificada por períodos de 24, 48 e 72 horas reduziu a viabilidade celular de modo dependente da concentração e do tempo. Ademais, os dados obtidos a partir do ensaio de exclusão do azul de Tripán são semelhantes aos encontrados por Yu e colaboradores (2020), em que os autores conseguiram determinar concentrações subcitotóxicas de Vitaferina A em células de câncer oral Ca9-22. No estudo citado, as concentrações testadas também não exibiram citotoxicidade contra as células.

A literatura aponta o potencial antimigratório de chalconas e seus derivados na migração de células tumorais com regulação negativa de marcadores mesenquimais. Um exemplo disso é o estudo de Wang *et. al* (2019), em que um análogo de estradiol modificado com chalcona inibiu a migração de células de câncer de mama MCF-7 através do aumento da expressão dos marcadores epiteliais zônula de oclusão-1 e E-caderina e da diminuição dos marcadores mesenquimais N-caderina e Vimentina, inibindo o processo EMT. Assim, supõe-se que A3 possa atuar interferindo no fenótipo EMT pela modulação desses marcadores epiteliais e mesenquimais.

5 CONCLUSÃO

Os resultados obtidos destacam a Chalcona A3 como uma molécula com potencial citotóxico e antimigratório que podem contribuir no contexto terapêutico contra carcinoma de células escamosas.

REFERÊNCIAS

- ADAN, A.; KIRAZ, Y.; BARAN, Y. Cell proliferation and cytotoxicity assays. **Current pharmaceutical biotechnology**, v. 17, n. 14, p. 1213-1221, 2016.
- ANDRICOPULO, A. D. et al. Structure-based drug design strategies in medicinal chemistry. **Curr. Top. Med. Chem.** v.9, n.9, p.771-90, 2009.
- ARIMOTO, S. et al. Lymphangiogenesis and lymph node metastasis in oral squamous cell carcinoma. **Anticancer research**, v. 38, n. 11, p. 6157–6162, 2018.
- CONSTANTINESCU, T.; LUNGU, C. N. Anticancer activity of natural and synthetic chalcones. **International journal of molecular sciences**, v. 22, n. 21, p. 11306, 2021.
- FELLER, G. et al. Tumour genetic heterogeneity in relation to oral squamous cell carcinoma and anti-cancer treatment. **International journal of environmental research and public health**, v. 20, n. 3, p. 2392, 2023.
- KIM, S. Y.; LEE, I.-S.; MOON, A. 2-Hydroxychalcone and xanthohumol inhibit invasion of triple negative breast cancer cells. **Chemico-biological interactions**, v. 203, n. 3, p. 565–572, 2013.
- LIANG, C.C.; PARK, A.Y.; GUAN, J.L. In vitro scratch assay: a convenient and Inexpensive method for analysis of cell migration in vitro. **Nat Protoc.**, v. 2, n. 2, p. 329-33, 2007.
- MOSMANN, Tim. Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: application to proliferation and cytotoxicity assays. **Journal of immunological methods**, v. 65, n. 1-2, p. 55-63, 1983.
- WALYELDEEN, A. A. et al. Chalcones: Promising therapeutic agents targeting key players and signaling pathways regulating the hallmarks of cancer. **Chemico-biological interactions**, v. 369, n. 110297, p. 110297, 2023.
- WANG, C. et al. Discovery of chalcone-modified estradiol analogs as antitumour agents that Inhibit tumour angiogenesis and epithelial to mesenchymal transition. **European journal of medicinal chemistry**, v. 176, p. 135–148, 2019.
- YU, T.-J. et al. Low concentration of withaferin a inhibits oxidative stress-mediated migration and invasion in oral cancer cells. **Biomolecules**, v. 10, n. 5, p. 777, 2020.
- ZHANG, Y. et al. A novel 3',5'-diprenylated chalcone induces concurrent apoptosis and GSDME-dependent pyroptosis through activating PKC δ /JNK signal in prostate cancer. **Aging**, v. 12, n. 10, p. 9103–9124, 2020.
- ZHANG, Y.; WEINBERG, R. A. Epithelial-to-mesenchymal transition in cancer: complexity and opportunities. **Frontiers of medicine**, v. 12, n. 4, p. 361–373, 2018.