



UNIVERSIDADE FEDERAL DO DELTA DO PARNAÍBA
BACHARELADO EM BIOMEDICINA

NAIANE DOS SANTOS DA PENHA

**CHALCONA HIDROXILADA INIBE A MIGRAÇÃO E A ADESÃO CELULAR EM
MODELO *IN VITRO* DE CARCINOMA ESPINOCELULAR ORAL**

PARNAÍBA-PI

2025

NAIANE DOS SANTOS DA PENHA

**CHALCONA HIDROXILADA INIBE A MIGRAÇÃO E A ADESÃO CELULAR EM
MODELO *IN VITRO* DE CARCINOMA ESPINOCELULAR ORAL**

Trabalho de conclusão de curso apresentado à
Coordenação do Curso de Bacharelado em
Biomedicina, da Universidade Federal do Delta do
Parnaíba, como requisito obrigatório para obtenção
do título de Bacharela em Biomedicina.

Orientadora: Profa. Dra. Ana Jérsia Araújo

PARNAÍBA-PI

2025

FICHA CATALOGRÁFICA
Universidade Federal do Delta do Parnaíba

P399c Penha, Naiane dos Santos da
 Chalcona hidroxilada inibe a migração e a adesão celular em modelo
 in vitro de carcinoma espinocelular oral [recurso eletrônico] / Naiane dos
 Santos da Penha. – 2025.
 56 p.

 TCC (Bacharelado em Biomedicina) – Universidade Federal do Delta
 do Parnaíba, 2025.
 Orientação: Prof^ª. Dr^ª. Ana Jérsia Araújo

 1. Anticâncer. 2. Chalcona. 3. Química medicinal. 4. Motilidade
 celular. 5. Adesão celular. I. Araújo, Ana Jérsia. II. Título.

CDD: 612

NAIANE DOS SANTOS DA PENHA

**CHALCONA HIDROXILADA INIBE A MIGRAÇÃO E A ADESÃO CELULAR EM
MODELO *IN VITRO* DE CARCINOMA ESPINOCELULAR ORAL**

Trabalho de conclusão de curso apresentado à Coordenação do Curso de Bacharelado
em Biomedicina, da Universidade Federal do Delta do Parnaíba, como requisito
obrigatório para obtenção do título de Bacharela em Biomedicina.

Aprovado em 01 de julho de 2025.

BANCA EXAMINADORA

Profa. Dra. Ana Jérsia Araújo (Orientadora)
Universidade Federal do Delta do Parnaíba

Prof. Dr. Giovanni Rebouças Pinto
Universidade Federal do Delta do Parnaíba

Me. Dakson Douglas Araújo
Universidade Federal do Delta do Parnaíba

À minha mãe (*in memoriam*), cuja força transcende a partida e se faz presente em todos aqueles que a amam.

AGRADECIMENTOS

Agradeço, sobretudo, a **Deus**, que, com seu imenso amor, não me desamparou em momento algum. Chegar até aqui representa não apenas o encerramento de mais um ciclo, mas a superação de uma trajetória marcada por renúncias e perdas irreparáveis. Apesar dos desafios, que muitas vezes pareciam intransponíveis, essa jornada também foi composta por pequenas vitórias diárias e grandes pessoas que me motivaram a continuar.

Agradeço, especialmente, aos meus pais, que foram meu suporte em todos os momentos, dos mais leves aos mais difíceis. À minha mãe, **Raimunda Conceição**, por sempre acreditar na minha capacidade e nunca medir esforços para que eu pudesse alcançar meus objetivos. Mesmo ausente fisicamente, sua coragem e persistência continuam vivas em mim, e sua memória é, para sempre, minha fonte de força e inspiração. Ao meu pai, **José Nóbrega**, cuja firmeza e sabedoria moldam minha existência, obrigada por ser o abrigo para onde sei que sempre posso retornar.

Aos meus irmãos, parte essencial de quem sou e com quem tenho a felicidade de compartilhar a vida: à **Viviane**, por enxergar força quando tudo em mim era cansaço; à **Niviane**, por ser calmaria nos meus momentos de turbulência; à **Liliane**, pela motivação e cuidado; aos queridos **Caitano** e **Renato**, por todo o suporte e confiança.

Agradeço também às minhas amigas e irmãs de vida, **Bruna Severo** e **Erilane Melo**, com quem pude dividir alegrias, medos, conquistas e frustrações. Obrigada por cada conversa ao fim do dia e por cada riso compartilhado.

À minha orientadora, **Profª. Drª. Ana Jérsia Araújo**, minha gratidão pelo acolhimento e confiança desde o início. Agradeço sua orientação firme, as contribuições valiosas e todo o conhecimento compartilhado ao longo desta trajetória. Sua dedicação à ciência e ao desenvolvimento dos seus alunos foi essencial para a realização deste trabalho.

A todos que compõem o LCCDelta, parte essencial da minha formação, meu muito obrigada. Em especial, ao **Prof. Dr. José Delano**, agradeço profundamente pela orientação, acolhimento e por me incentivar mesmo nos momentos mais difíceis. Levarei comigo seus ensinamentos com muito respeito e admiração. Ao querido **Rodrigo Elísio**, sou grata pelo apoio constante, desde o primeiro projeto até a fase final deste trabalho. À **Gisele Araújo**, **Fabício Machado**, **Jéssica Teles**, **Stéphanie Matos**, **Fernanda Iris**, **Matheus Pedrosa** e **Rafaela Ribeiro**, agradeço por compartilharem seus conhecimentos, pela paciência em cada explicação

e pela disposição em ajudar sempre que necessário. Aos meus companheiros de Iniciação Científica, em especial a **Benedito Alves**, cuja parceria desde o início foi fundamental para enfrentar os desafios e celebrar as conquistas da imersão no universo da ciência.

Aos amigos que o tempo me presenteou e cuja presença tornou a caminhada mais leve, expresso minha sincera gratidão. A **Wendson Machado**, que dividiu comigo não só os desafios da graduação, mas também as angústias e os medos que tantas vezes pareciam grandes demais para suportar sozinha. Sua escuta atenta e suas palavras reconfortantes me ensinaram que tudo bem não ser forte o tempo todo, e que cada novo dia traz consigo a chance de recomeçar. A **Victor Augusto**, por ser o abraço cálido e cheio de afeto; à **Isabele Alves**, abrigo entre lágrimas silenciosas; à **Kaline Araújo**, equilíbrio sensato e a voz serena da razão; e a **Kaique Aguiar**, que, como um dia ensolarado à beira-mar, renova as forças e devolve o riso.

Estendo meus agradecimentos aos amigos que, de forma direta ou indireta, contribuíram ao longo desta trajetória. À **Shayanne Rodrigues**, **Ivã Magalhães** e **Jayane Sousa**, agradeço por cada gesto de apoio, palavra de incentivo e presença acolhedora nos momentos de desânimo.

Aos professores que, ao longo da minha graduação, prestaram suporte fundamental para meu desenvolvimento acadêmico, pessoal e profissional, manifesto meu profundo reconhecimento e agradecimento.

A quem segurou minha mão no momento mais difícil da minha vida, minha sincera gratidão. Obrigada por me impulsionar a seguir em frente quando a exaustão e a incerteza ameaçavam me consumir.

À **Prof.^a Dr.^a Caridad Noda Pérez** (UFG), pela gentil concessão e pela síntese da amostra utilizada neste estudo.

Aos membros da banca examinadora, **Prof. Dr. Giovanny** e **Me. Dakson Douglas**, por aceitarem participar deste momento tão significativo da minha trajetória acadêmica. Expresso minha admiração e respeito por esses profissionais que tive o privilégio de conhecer ao longo da graduação e que, de diferentes formas, contribuíram para minha formação.

A todos que continuam ao meu lado (firmes, companheiros de estrada e de vida), vocês são o alicerce sobre o qual construí uma linda parte da minha história. Nada teria sido possível sem vocês.

RESUMO

O carcinoma espinocelular oral (OSCC) é o tipo mais prevalente de câncer de cabeça e pescoço, caracterizando-se por um comportamento altamente invasivo e frequentemente associado ao desenvolvimento de metástases, principal causa de mortalidade entre os pacientes. A quimioterapia convencional, amplamente utilizada no tratamento dessa neoplasia, enfrenta importantes limitações, devido aos efeitos adversos intensos e à baixa seletividade para células tumorais. Esses fatores comprometem a qualidade de vida dos pacientes e reduzem a eficácia terapêutica. Nesse cenário, a química medicinal surge como uma abordagem promissora na busca por novas moléculas capazes de conter a progressão tumoral. Dentre os compostos investigados, as chalconas se destacam pelo amplo potencial biológico, especialmente por suas atividades antiproliferativa e antimetastática. Diante disso, este trabalho teve como objetivo avaliar os efeitos de uma chalcona hidroxilada sintética, contendo cloro como substituinte na posição *para* do anel B, denominada como HC-A3, sobre etapas do processo metastático do carcinoma espinocelular oral, utilizando um modelo *in vitro*. Inicialmente, a molécula HC-A3 foi testada frente à linhagem HSC-3 para a determinação do perfil citotóxico. Por meio do ensaio de MTT, após 24, 48 e 72 horas de tratamento, observou-se que a amostra apresentou um perfil de ação tempo-dependente, com valores de CI_{50} variando entre 45,4 e 8,3 μM . Para os experimentos subsequentes, foram definidas as concentrações subcitotóxicas de 0,25, 0,5 e 1,0 μM , com base nos valores de CI_{50} após 72 horas de tratamento e confirmadas por meio do ensaio de exclusão com azul de Tripán e por análises morfológicas. No ensaio clonogênico, verificou-se que a chalcona HC-A3 não interferiu na capacidade proliferativa das células, uma vez que não inibiu a formação de colônias. Entretanto, nas concentrações testadas, a HC-A3 foi capaz de inibir significativamente a migração celular após 24 e 48 horas de exposição, quando comparada ao controle negativo. Além disso, foi demonstrado que a molécula reduziu de forma expressiva a adesão celular à fibronectina. Com base nesses resultados, foi possível demonstrar o potencial citotóxico da HC-A3, bem como sua capacidade de inibir etapas essenciais do processo metastático. No entanto, estudos adicionais ainda são necessários para elucidar os mecanismos moleculares envolvidos na sua ação sobre os eventos migratórios e adesivos associados à metástase.

Palavras-chave: Anticâncer; Chalcona; Química medicinal; Motilidade celular; Adesão celular.

ABSTRACT

Oral squamous cell carcinoma (OSCC) is the most prevalent type of head and neck cancer, characterized by highly invasive behavior and frequently associated with the development of metastases, the main cause of mortality among patients. Conventional chemotherapy, widely employed in the treatment of this neoplasm, faces significant limitations due to its severe adverse effects and low selectivity for tumor cells. These factors compromise patients' quality of life and reduce therapeutic efficacy. In this context, medicinal chemistry has emerged as a promising approach in the search for new molecules capable of halting tumor progression. Among the compounds investigated, chalcones have attracted attention due to their broad biological potential, particularly their antiproliferative and antimetastatic activities. Accordingly, the present study aimed to evaluate the effects of a synthetic hydroxylated chalcone containing a chlorine substituent at the para-position of the B-ring, referred to as HC-A3, on key steps of the metastatic process in oral squamous cell carcinoma, using an in vitro model. Initially, the cytotoxic profile of HC-A3 was assessed against the HSC-3 cell line. Using the MTT assay after 24, 48, and 72 hours of treatment, HC-A3 demonstrated a time-dependent cytotoxic effect, with IC_{50} values ranging from 45.4 to 8.3 μ M. Based on the IC_{50} values obtained after 72 hours of treatment, sub-cytotoxic concentrations of 0.25, 0.5, and 1.0 μ M were selected for subsequent experiments and confirmed through trypan blue exclusion assay and morphological analysis. In the clonogenic assay, HC-A3 did not impair the proliferative capacity of the cells, as it did not inhibit colony formation. However, at the tested concentrations, HC-A3 significantly inhibited cell migration after 24 and 48 hours of exposure compared to the negative control. Furthermore, the compound markedly reduced cell adhesion to fibronectin. Based on these findings, HC-A3 demonstrated both cytotoxic potential and the ability to inhibit critical steps of the metastatic process. Nevertheless, further studies are required to elucidate the molecular mechanisms underlying their effects on migration and adhesion events associated with metastasis.

Keywords: Anticancer; Chalcone; Medicinal chemistry; Cell motility; Cell adhesion.

LISTA DE SÍMBOLOS E ABREVIATURAS

ANOVA	<i>Analysis of variance</i> (Análise de variância)
BSA	<i>Bovine Serum Albumin</i> (Albumina sérica bovina)
CI₅₀	Concentração inibitória média
DMEM	<i>Dulbecco's Modified Eagle Medium</i>
DMSO	Dimetilsulfóxido
DOX	Doxorrubicina
EMT	<i>Epithelial-Mesenchymal Transition</i> (Transição Epitélio Mesenquimal)
E.P.M.	Erro Padrão da Média
FAK	Cinase de Adesão Focal
IC	Intervalos de Confiança
MEC	Matriz Extracelular
MET	<i>Mesenchymal Epithelial Transition</i> (Transição Mesenquimal Epitelial)
MICs	<i>Metastasis-Initiating Cells</i> (Células Iniciadoras de Metástases)
MTT	<i>3-(4,5-dimetil-2-tiazol) -2,5-difenil-brometo de tetrazolium</i>
OSCC	<i>Oral squamous cell carcinoma</i> (Carcinoma Espinocelular Oral)
PBS	<i>Phosphate Buffer Solution</i> (Tampão Fosfato)
SFB	Soro Fetal Bovino

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Características do câncer.....	15
Figura 2. Representação esquemática do processo metastático.	17
Figura 3. Fases da migração celular.	19
Figura 4. Representação estrutural e numérica das chalconas.	22
Figura 5. Estrutura química da Chalcona hidroxilada (HC-A3).....	28
Figura 6. Curva do percentual de crescimento celular de células HSC-3 determinado pelo ensaio do MTT após 72 horas de incubação	36
Figura 7. Efeito de HC-A3 na viabilidade de células HSC-3 determinado pelo ensaio de exclusão do azul de Tripan após 24 horas de tratamento.	37
Figura 8. Análise morfológica das células HSC-3 após 24 horas de tratamento com HC-A3 , com coloração por panótico rápido.	38
Figura 9. Efeito de HC-A3 sobre a formação de colônias em células tumorais HSC-3 após 24 horas de tratamento.....	39
Figura 10. Efeito de HC-A3 sobre o potencial migratório de células HSC-3.	41
Figura 11. Efeito de HC-A3 sobre a adesão de células HSC-3 à fibronectina.....	42

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	12
2 REFERENCIAL TEÓRICO	14
2.1 Aspectos gerais do câncer e carcinoma escamocelular oral	14
2.2 Processo metastático	16
2.3 Mecanismos de migração e adesão celular	19
2.4 Chalconas	22
2.5 Chalconas hidroxiladas	24
3 OBJETIVOS	27
3.1 Objetivo geral	27
3.2 Objetivos específicos	27
4 METODOLOGIA	28
4.1 Obtenção da amostra	28
4.2 Cultura celular	28
4.3 Avaliação citotóxica <i>in vitro</i> pelo teste do MTT	29
4.4 Ensaio de exclusão por azul de Tripan	29
4.5 Avaliação da morfologia celular por coloração com panótico rápido	30
4.6 Ensaio clonogênico	31
4.7 Ensaio de migração celular - <i>Wound healing assay</i>	32
4.8 Ensaio de adesão celular em fibronectina	32
4.9 Análise estatística	33
5 RESULTADOS	35
5.1 Avaliação citotóxica <i>in vitro</i> pelo ensaio do MTT	35
5.2 Ensaio de exclusão por azul de Tripan	36
5.3 Avaliação da morfologia celular por coloração com panótico rápido	37
5.4 Ensaio clonogênico	39
5.5 Ensaio de migração celular - <i>Wound healing assay</i>	40
5.6 Ensaio de adesão celular em fibronectina	41
6 DISCUSSÃO	43
7 CONCLUSÃO	49
8 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	50

1 INTRODUÇÃO

O câncer é um conjunto de doenças complexas, caracterizadas pela proliferação intensa e desordenada de células anormais, capazes de invadir tecidos adjacentes e se disseminar para outros órgãos (Anand *et al.*, 2022). Essa condição representa um grave problema de saúde pública, em virtude das elevadas taxas de incidência, prevalência e mortalidade. Segundo a Agência Internacional para a Pesquisa sobre o Câncer (IARC), a incidência global da doença deverá ultrapassar 35 milhões de casos até 2050. Esse cenário é alarmante, sobretudo considerando que entre 30% e 50% dos casos poderiam ser evitados com medidas eficazes de prevenção, e que o diagnóstico precoce tem o potencial de reduzir significativamente os índices de mortalidade (OMS, 2022).

O carcinoma espinocelular oral (OSCC) é a neoplasia maligna mais comum da cavidade oral, apresentando elevadas taxas de morbimortalidade devido ao seu comportamento agressivo, que compromete tecidos fundamentais para funções como a alimentação e a fala (Bugshan; Farooq, 2020; McCord *et al.*, 2021). Essa neoplasia é caracterizada pela proliferação descontrolada de células epiteliais escamosas, comumente localizadas na língua e no assoalho bucal, sendo frequentemente associada a fatores de risco como o tabagismo, o etilismo e a infecção pelo papilomavírus humano (HPV) (Rizg *et al.*, 2022). Apesar dos avanços no diagnóstico e nas abordagens terapêuticas, o prognóstico ainda é reservado, principalmente em razão da alta incidência de metástases em linfonodos cervicais (Juurikka *et al.*, 2021).

A disseminação metastática compromete a eficácia de terapias locais, como a ressecção cirúrgica, exigindo o uso de abordagens sistêmicas, como a quimioterapia. No entanto, os quimioterápicos disponíveis frequentemente apresentam limitações, relacionadas à alta toxicidade e ao desenvolvimento de quimiorresistência por parte das células do OSCC (Gou, Zheng; Huang, 2022). A formação de metástases envolve processos biológicos complexos, entre os quais se destacam a adesão e a migração celular. Embora esses eventos sejam essenciais para a organização fisiológica dos tecidos, sofrem alterações no contexto tumoral, favorecendo a invasão e a disseminação das células cancerosas. Assim, terapias que visam interromper as interações moleculares e as vias de sinalização associadas à metástase tumoral mostram-se promissoras para conter a progressão da doença (Yayan *et al.*, 2024).

Esse cenário ressalta a necessidade de estratégias terapêuticas inovadoras e direcionadas, preferencialmente derivadas de fontes menos tóxicas (Loa; Chow; Zhang, 2009). Sob essa perspectiva, a química medicinal desempenha um papel importante ao reunir conhecimentos de biologia molecular, química orgânica e farmacologia para projetar e otimizar moléculas bioativas (Verli; Barreiro, 2005; Guido; Andricopulo; Oliva, 2010). Estratégias como a modelagem molecular baseada em alvos e estudos de relação estrutura-atividade possibilitam o desenvolvimento de novos compostos capazes de regular ou modular funções-alvo específicas intrinsecamente relacionadas a doenças como o câncer. Além disso, a otimização estrutural é crucial para maximizar a potência, seletividade e afinidade pelos alvos de interesse, bem como para melhorar características físico-químicas e farmacocinéticas (Andricopulo *et al.*, 2009).

Desse modo, as chalconas têm sido amplamente exploradas e destacam-se por sua estrutura química privilegiada (Zhuang *et al.*, 2017). A heterogeneidade e a flexibilidade estrutural desses compostos conferem-lhes uma ampla gama de atividades biológicas, incluindo propriedades anticâncer, além de possibilitar sua interação com diversos alvos terapêuticos (Constantinescu; Lungu, 2021; Ouyang *et al.*, 2021). Ademais, o desenvolvimento de protocolos sintéticos, aliado a modificações em sua estrutura central ou à introdução de cadeias laterais, permite a rápida expansão quantitativa dos derivados de chalcona (Zhuang *et al.*, 2017). Alterações estruturais estratégicas, tais como a adição de halogênios, hidroxilas, carboxilas ou outros grupos funcionais, podem modular suas propriedades biológicas e favorecer sua ligação a alvos moleculares específicos (Jandial *et al.*, 2014).

Diante disso, este estudo teve como objetivo avaliar a atividade anticâncer de uma chalcona hidroxilada sintética (HC-A3), com ênfase em seus efeitos sobre a adesão e migração de células do carcinoma de células escamosas oral. Para isso, foram utilizados modelos experimentais que permitiram analisar a resposta das células cancerosas à exposição ao composto, contribuindo para o esclarecimento de seu mecanismo de ação e para o desenvolvimento de novas estratégias terapêuticas contra essa neoplasia.

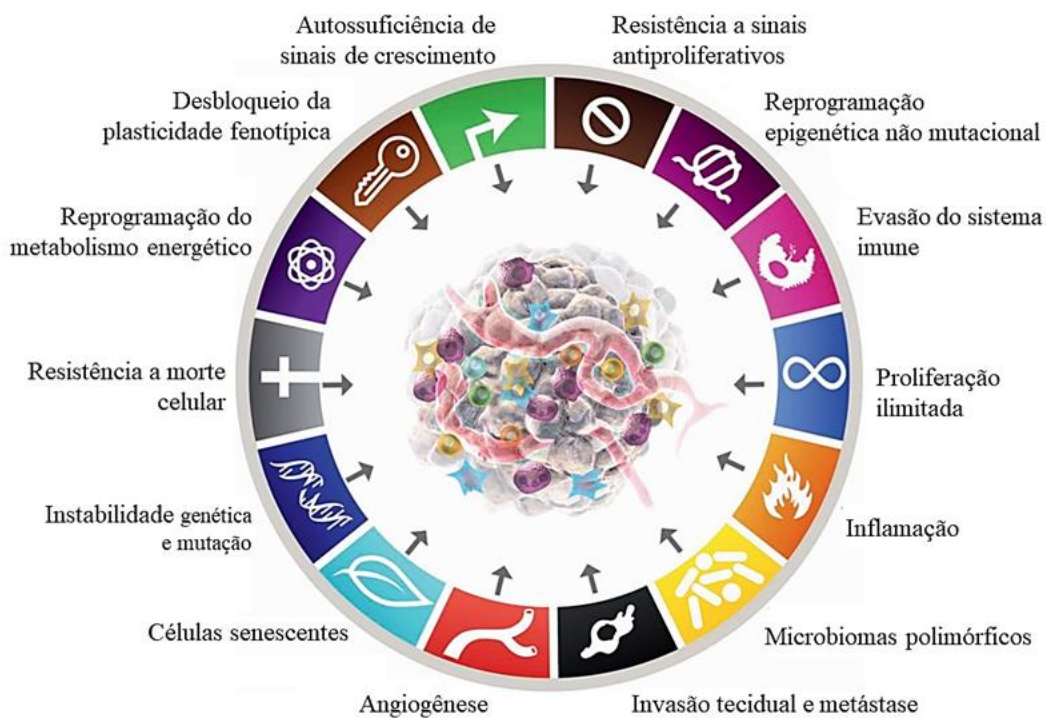
2 REFERENCIAL TEÓRICO

2.1 Aspectos gerais do câncer e carcinoma escamocelular oral

O câncer é um grupo de doenças complexas e heterogêneas, caracterizadas pela proliferação descontrolada de células anormais, capazes de invadir tecidos adjacentes e se disseminar para órgãos distantes. Essa condição decorre do acúmulo progressivo de mutações genéticas e/ou alterações epigenéticas, que afetam a expressão de genes essenciais à regulação do ciclo celular (Anand *et al.*, 2022; WalyEldeen *et al.*, 2023). Em condições fisiológicas normais, a proliferação celular é rigidamente controlada por sinais que regulam a divisão, diferenciação e morte das células, por meio de uma interação coordenada entre oncogenes e genes supressores de tumor (WalyEldeen *et al.*, 2023). No entanto, durante a carcinogênese, as mutações induzem um ganho de função dominante em oncogenes, enquanto os genes supressores de tumor sofrem perda de função recessiva, resultando em um estímulo contínuo à proliferação celular (Baylin; Jones, 2016; Hanahan, 2022).

Em geral, o desenvolvimento do câncer consiste em uma sequência multietápica, na qual as células cancerosas, à medida que progridem para o estado neoplásico, adquirem sucessivamente características que lhes conferem vantagens seletivas de crescimento (Figura 1). Nesse contexto, as células tumorais tornam-se capazes de sustentar sinais proliferativos, evadir mecanismos supressores do crescimento e resistir à morte celular programada, culminando no descontrole da proliferação celular. O câncer também é marcado pela capacidade de replicação ilimitada, indução da angiogênese e pela habilidade de invadir tecidos e metastatizar para sítios distantes. Além disso, diversos outros fatores contribuem para a progressão tumoral, como a instabilidade genômica, a reprogramação do metabolismo energético e a manipulação ativa do microambiente tumoral (Hanahan, 2022).

Figura 1. Características do câncer



Fonte: Adaptado de Hanahan, 2022.

A aquisição e manutenção dessas características dependem não apenas das células cancerosas, mas também das contribuições de diversos tipos celulares que compõem o microambiente tumoral (TME), promovendo interações heterotípicas complexas (Xiao; Yu, 2021; Hanahan; Weinberg, 2011). Nesse contexto, o TME inclui uma ampla variedade de células não tumorais, como células imunes infiltradas, fibroblastos, linfócitos, células inflamatórias, além de componentes acelulares, como a matriz extracelular (MEC) e elementos moleculares, incluindo quimiocinas, citocinas, fatores de crescimento e vesículas extracelulares (Xiao; Yu, 2020). Essa heterogeneidade intratumoral é fundamental para a progressão do câncer, uma vez que os elementos não malignos do TME exercem uma função protumorigênica, conferindo à massa tumoral diversas habilidades que favorecem a sobrevivência celular, evasão da resposta imune e resistência terapêutica (Arneth, 2019; Laplagne *et al.*, 2019).

Dentre os diversos tipos de câncer, o carcinoma espinocelular oral (OSCC) ocupa posição de destaque, configurando-se como a neoplasia maligna mais prevalente da cavidade oral, responsável por mais de 90% dos casos que acometem essa região (Hovav; Wilensky, 2024). O OSCC origina-se do acúmulo sequencial de mutações nos queratinócitos, os quais passam a apresentar vantagens proliferativas em relação às células normais adjacentes, afetando

predominantemente a língua e o assoalho bucal (Feller *et al.*, 2023). Fatores comportamentais também desempenham papéis relevantes na gênese desse tipo tumoral. Nesse contexto, o uso crônico de tabaco e álcool constitui os principais fatores de risco, e, quando associados, podem aumentar em até 35 vezes a probabilidade de desenvolvimento do câncer na cavidade oral (Chamoli *et al.*, 2021).

O OSCC caracteriza-se por seu comportamento biologicamente agressivo, devido à elevada capacidade de invasão local, formação de metástases à distância e comprometimento das funções do trato aerodigestivo superior (Gou; Zheng; Huang, 2022). A ocorrência de metástases regionais, principalmente em linfonodos cervicais, representa um fator prognóstico desfavorável, associado à redução da taxa de sobrevivência em aproximadamente 50%. Em estágios mais avançados, o OSCC frequentemente apresenta disseminação metastática para os pulmões, podendo também afetar outros órgãos, como o fígado e os ossos. Nesse contexto, a presença de metástases configura-se como um marco clínico crítico, associado à piora do prognóstico e à redução das chances de sucesso terapêutico (Bugshan; Farooq, 2020).

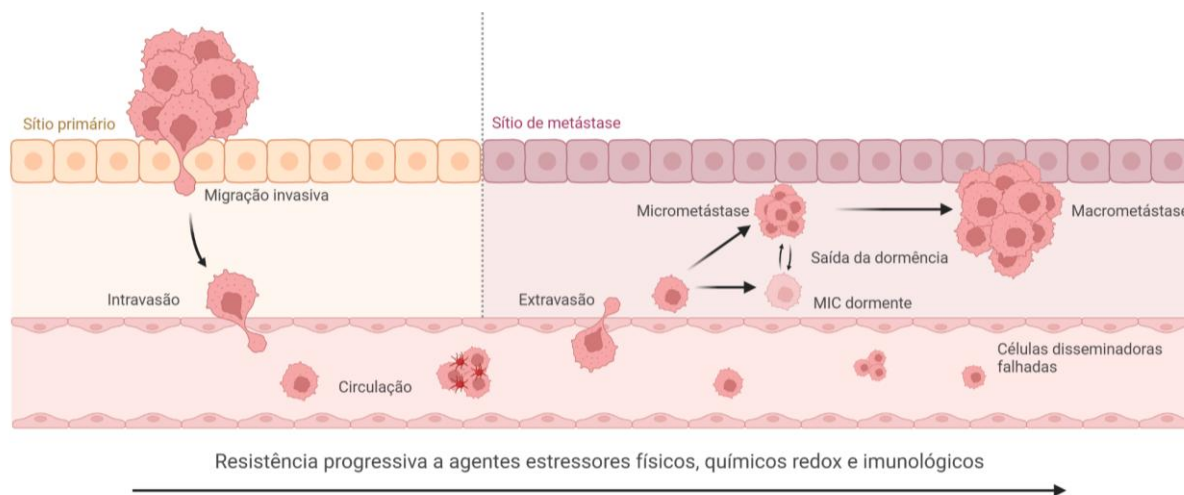
2.2 Processo metastático

A metástase é o processo pelo qual as células cancerosas de um tumor primário disseminam-se para órgãos distantes e consiste na manifestação mais letal do câncer (Suhail *et al.*, 2019). Diferente dos tumores primários, que podem ser tratados com terapias locais, o câncer metastático é uma doença sistêmica que afeta múltiplos órgãos, seja pela invasão direta ou por alteração do seu metabolismo. Nesse sentido, a metástase clinicamente aparente estabelece um desafio à remissão completa do câncer, em razão da resistência às terapias atuais (Gerstberger; Jiang; Ganesh, 2023).

A metástase abrange uma série de eventos biológicos complexos e bem definidos (Figura 2), que compreendem a invasão, intravasão, transporte pela circulação, extravasão e colonização (Zeeshan, Mutahir, 2017). Inicialmente, as células de um tumor primário ultrapassam os limites da membrana basal e invadem tecidos adjacentes, sendo capazes de sobreviver na ausência de fatores de crescimento específicos (Gerstberger; Jiang; Ganesh, 2023). Posteriormente, as células tumorais adentram os vasos da via sanguínea ou linfática, são transportadas pela circulação e atingem órgãos distantes, onde finalmente extravasam para colonizá-los (Steeg, 2016). Ao longo dessa cascata, diversos mecanismos são acionados, como

a interação com o estroma, evasão ao sistema imune, modulação do microambiente tecidual e promoção de resistência terapêutica (Suhail *et al.*, 2019).

Figura 2. Representação esquemática do processo metastático.



Fonte: Adaptado de Gerstberger; Jiang; Ganesh, 2023.

Um dos processos essenciais que facilitam a promoção de metástases no câncer é a transição epitélio-mesenquimal (EMT), uma mudança fenotípica reversível no qual as células tumorais adquirem capacidades invasivas e móveis (Massagué; Obenauf, 2016). De maneira fisiológica, a EMT desempenha funções essenciais no desenvolvimento embrionário, na formação de diferentes tipos celulares e cicatrização tecidual. Entretanto, durante a progressão tumoral, pode ocorrer a reativação deste programa, no qual a perda dos traços epiteliais de adesão intercelular e polarização apical-basal permite que as células cancerosas se desprendam do tumor primário e se disseminem para tecidos mais distantes (Banyard, Bielenberg, 2015; Pascussi *et al*, 2016).

O processo de EMT pode ser mediado por diversos fatores transcricionais, como Snail, Slug, Twist, Zeb1 e Zeb2, os quais favorecem a transição para o fenótipo mesenquimal. Esses fatores de transcrição regulam negativamente a expressão de E-caderina e aumentam a expressão de marcadores mesenquimais, como a vimentina (Hanahan; Weinberg, 2011; Banyard, Bielenberg, 2015). Por consequência, a alteração da expressão de E-caderina leva a uma perturbação nos mecanismos de aderência célula-célula e célula-MEC, como junções estreitas, junções comunicantes, junções aderentes, desmossomos e hemidesmossomos (Pascussi *et al*, 2016). Essa perturbação também leva a perda da polaridade apical-basal, remodelação do citoesqueleto e conversão da morfologia poligonal para uma morfologia

fibroblástica, o que favorece a transposição da barreira endotelial, migração e intravasão (Kraljevic Pavelic, 2011; Hanahan e Weinberg, 2011; Pascussi *et al.*, 2016).

Após a intravasão, as células tumorais são transportadas através dos vasos sanguíneos ou linfáticos. Durante esse percurso, as células tumorais circulantes (CTCs) são intensamente expostas ao atrito devido a força de cisalhamento, estresse oxidativo e atuação da imunidade inata (Gerstberger; Jiang; Ganesh; 2023; Massagué J, Obenauf, 2016). Devido a isso, muitas CTCs se agrupam com plaquetas, neutrófilos e células estromais, formando microclusters que fornecem proteção, conferindo-lhes maior potencial metastático em comparação às células individuais (Zeeshan; Mutahir, 2017; Gerstberger; Jiang; Ganesh; 2023). Nesse sentido, o processo metastático é extremamente ineficiente, pois a capacidade de metastatização das CTCs é significativamente influenciada pelos eventos da microcirculação (Varotsos Vrynas *et al.*, 2021). Apenas cerca de 0,2% das células que emergem do tumor primário são capazes de formar metástases em órgãos-alvo (Zeeshan; Mutahir; 2017).

Ao atingir os capilares de um órgão distante, as CTCs remanescentes se aderem ao endotélio vascular e promovem a ruptura dos vasos. Paralelamente, ocorre a extravasão das células tumorais em direção ao parênquima dos novos tecidos (Zeeshan; Mutahir, 2017). Ao passo que se estabelecem em um novo sítio, as células que foram submetidas a EMT podem passar pelo processo inverso, denominado transição mesenquimal-epitelial (MET), retomando seu fenótipo não invasivo. Isso ocorre devido à ausência de exposição contínua aos sinais indutores de invasão (Hanahan, Weinberg; 2022). Entretanto, a disseminação física destas células nem sempre resulta na colonização do novo sítio, uma vez que as micrometástase podem permanecer em um estado dormente mesmo após sua disseminação exitosa (Hanahan; Weinberg, 2011).

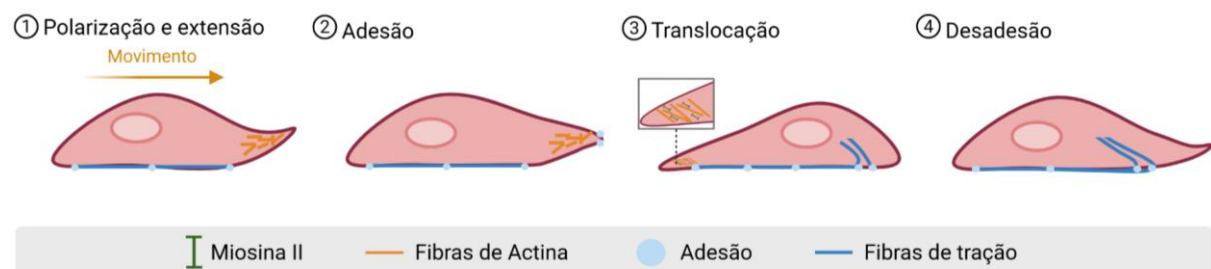
Durante o período de dormência, as células tumorais saem do ciclo celular ou entram em um equilíbrio dinâmico entre proliferação e eliminação imunológica (Majidpoor; Mortezaee, 2021). Essa latência pode resultar de diversos fatores, como a liberação de supressores sistêmicos pelo próprio tumor primário, incapacidade de ativação da angiogênese, ausência de nutrientes para o tumor e atuação do sistema imune do indivíduo (Demicheli *et al.*, 2008, Folkman, 2002). No entanto, esse estado de dormência celular é reversível, o que justifica a possibilidade do crescimento metastático macroscópico mesmo após a ressecção cirúrgica do tumor primário ou após sua destruição quimioterápica (Hanahan; Weinberg, 2011).

Nesse contexto, o processo metastático compreende duas fases: a disseminação física das células cancerosas para tecidos distantes e a adaptação a microambiente de tecidos estranhos, que leva à formação de micrometástases (Hanahan; Weinberg, 2011). Devido às células tumorais disseminadas serem clinicamente indetectáveis, as etapas de disseminação e dormência são consideradas doenças micrometastáticas. Em contrapartida, as células iniciadoras de metástases (MICs) bem-sucedidas originam as macrometástases em razão da capacidade de adaptação ao novo microambiente tecidual, o que permite seu crescimento e a colonização de órgãos distantes do sítio primário (Gerstberger; Jiang; Ganesh; 2023).

2.3 Mecanismos de migração e adesão celular

A migração celular é um processo complexo e coordenado, que além de ser essencial para fenômenos fisiológicos, como desenvolvimento, homeostase e resposta a lesões, também é crucial para o sucesso da metástase tumoral (Hammad; Machaca, 2021). De modo geral, a migração é mediada por sinais bioquímicos e interações entre as células e o ambiente extracelular, que influenciam as vias de mecanosinalização, a mecânica celular e a arquitetura do citoesqueleto (Zanotelli; Zhang; Reinhart-King, 2022). Dessa forma, para possibilitar o movimento celular direcional, primeiramente a célula se polariza, com extensão dos lamelipódios na parte frontal e, em seguida, essas extensões são estabilizadas por aderências focais iniciais e impulsionadas pela polimerização da actina. Finalmente, na extremidade traseira, as aderências focais maduras se desmontam, permitindo o avanço do corpo celular (Figura 3) (Hammad; Machaca, 2021; SenGupta; Pai; Bear, 2021).

Figura 3. Fases da migração celular.



Fonte: Adaptado de Chi *et al.*, 2014.

Com base no tipo celular e no microambiente, a migração pode ocorrer em célula única ou de forma coletiva, sendo este último o modo predominante de invasão em células tumorais.

No processo migratório individual, as células podem utilizar dois modos principais de migração, o mesenquimal e o ameboide (Ma *et al.*, 2023; Pearson, 2019). A forma mesenquimal geralmente apresenta uma menor velocidade migratória e caracteriza-se por uma dependência de interações específicas com a MEC, uma morfologia alongada com protrusões na extremidade frontal e a capacidade de gerar forte tração no substrato através de redes de actina contráteis (Pearson, 2019; SenGupta; Pai; Bear, 2021).

Em contraste, no movimento ameboide, as células apresentam uma morfologia arredondada, com mudanças constantes de forma em razão da rápida extensão e retração de pseudópodes, que interagem com o substrato por meio de adesões fracas e transitórias, resultando em uma maior velocidade de migração. Nesse sentido, a migração ameboide caracteriza-se por um rastejamento da célula, promovida pela polarização do citoesqueleto de actina, que promove o enrijecimento e contração do córtex celular sem a necessidade de adesões focais maduras, resultando em uma locomoção sem degradação da matriz extracelular (SenGupta; Pai; Bear, 2021; Delgado; Lennon-Duménil, 2022).

Na migração coletiva, as células mantêm suas junções aderentes intercelulares enquanto invadem os tecidos circundantes, podendo migrar em aglomerados compactos, filamentos lineares estreitos ou em lâminas largas. As células em coletividade migratória podem subdividir-se em duas populações: células líderes, presente na frente invasiva, e células seguidoras (Saxena; Jolly; Balamurugan, 2020). As células líderes apresentam maior custo metabólico em razão da necessidade de remodelação da MEC, que exige alta contratilidade celular. Assim, as células da frente invasiva tornam-se semelhantes às células migratórias individuais, uma vez que são responsáveis por limpar o caminho, interagir e responder às diferentes variações de densidade da matriz. Devido ao alto consumo energético, quando uma célula líder se esgota, outra célula assume sua função, mantendo a dinâmica da migração (Zanotelli; Zhang; Reinhart-King, 2022).

Durante o processo migratório, a adesão celular, que é mediada pela composição, porosidade e propriedades mecânicas da MEC, desempenha um importante papel na definição do modo de locomoção adotado pelas células (Lintz; Muñoz; Reinhart-King, 2017). Nesse sentido, a principal diferença entre a migração pela via ameboide e pela via mesenquimal reside na forma em que as células interagem com a matriz. A migração ameboide caracteriza-se por adesões fracas e transientes, enquanto a migração mesenquimal é altamente dependente de

adesões estáveis. Nesta perspectiva, a migração celular não deve ser vista como um mecanismo isolado, mas sim como um processo contínuo e equilibrado entre adesão, contratilidade e as propriedades mecânicas da matriz (Chi *et al.*, 2014).

A ação da actomiosina, por exemplo, gera sinais mecânicos importantes da MEC e força contrátil no citoesqueleto, que é transmitida aos complexos de adesão que conectam a célula ao seu entorno e facilitam sua locomoção (Lintz; Muñoz; Reinhart-King, 2017). Durante a migração, as células formam protrusões na borda anterior (lamelipódios e filopódios), onde adesões nascentes, mediadas por integrinas, são estabelecidas para permitir a tração (Chi *et al.*, 2014). Após a adesão inicial, proteínas como talina e vinculina são recrutadas para formar adesões focais maduras, que permite o fortalecimento da ligação com o citoesqueleto de actina. Na parte posterior da célula, o desmonte das adesões focais é essencial para a translocação do corpo celular, um processo altamente regulado pela atividade contrátil da actomiosina, promovendo a migração polarização e direcionada (Liu *et al.*, 2015; Chi *et al.*, 2014).

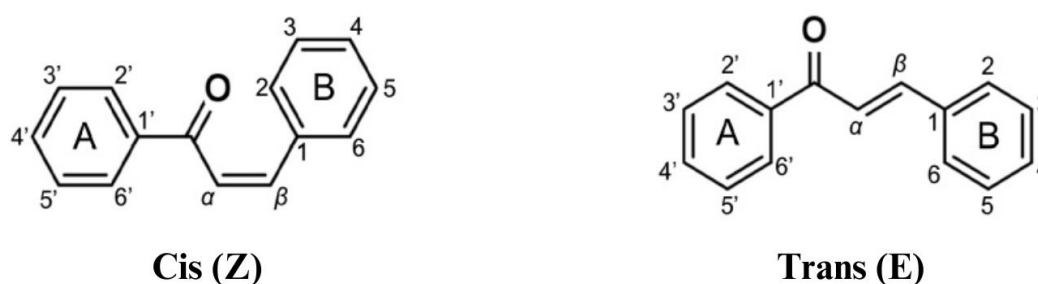
Além das integrinas, a vimentina também se conecta as adesões focais via filamina A, que é uma proteína-esqueleto que estabiliza as estruturas tridimensionais da teia de actina. A vimentina contribui para a construção da arquitetura do citoesqueleto celular, gerando força mecânica ao interagir com microfilamentos e microtúbulos (Liu *et al.*, 2015). Além disso, a vimentina também induz alterações na forma, motilidade e adesão celular durante a EMT. O achatamento celular resultante desse processo pode contribuir para a resistência celular a uma variedade de forças mecânicas externas, representando um fator crucial para a sobrevivência de células metastáticas, que enfrentam estresses físicos anormais durante o processo migratório (Mendez; Kojima, Goldman, 2010).

Em resumo, a migração e adesão celular são fenômenos complexos e altamente regulados, que depende de múltiplos fatores, incluindo a ativação de vias de sinalização intracelular, a interação com proteínas da matriz extracelular, a dinâmica do citoesqueleto e a comunicação com outras células (Zanotelli; Zhang; Reinhart-King, 2022). No contexto do câncer, a desregulação desses processos facilita a invasão e a metástase tumoral. Logo, compreender os mecanismos subjacentes à adesão e migração celular não apenas amplia o entendimento dos diversos processos biológicos essenciais, mas também fornece novas possibilidades para o desenvolvimento de alternativas terapêuticas, visando atenuar ou inibir a progressão tumoral.

2.4 Chalconas

As chalconas (1,3-difenil-2-propen-1-ona) são compostos naturais precursores da biossíntese dos flavonoides e amplamente encontradas em especiarias, frutas, chás e vegetais (Ouyang *et al.*, 2021). Esses fitocompostos consistem em moléculas pequenas, não quirais, altamente lipofílicas e que apresentam baixo peso molecular (Rudrapal *et al.*, 2021). Estruturalmente, as chalconas apresentam um esqueleto químico simples, constituídas por dois anéis aromáticos unidos através de três carbonos em um sistema de cetona α,β -insaturado, podendo encontrar-se nas formas isômeras *cis* ou *trans* (Figura 4), sendo esta última termodinamicamente mais estável (Zhuang *et al.*, 2017).

Figura 4. Representação estrutural e numérica das chalconas.



Fonte: Adaptado de Gomes *et al.*, 2017.

Nas chalconas, sugere-se que a ligação dupla conjugada ao grupo carbonila seja a principal responsável pela diversidade abrangente de atividades biológicas. Desse modo, as modificações estruturais são frequentemente realizadas nas regiões que compreendem os dois anéis aromáticos, pois a alteração na porção farmacofórica pode levar a inatividade da molécula (Burmaoglu *et al.*, 2021). No cenário da modificação estrutural, além de sua química simples, outro fator que confere notoriedade a este composto é a grande quantidade de hidrogênios substituíveis, que possibilita a síntese de muitos derivados de chalcona com diferentes grupos funcionais, os quais podem conferir melhoria no perfil biológico e nas propriedades físico-químicas (Constantinescu; Lungu, 2021; Ouyang *et al.*, 2021; WalyEldeen *et al.*, 2023).

Esses compostos têm despertado considerável interesse em razão do amplo espectro de bioatividades justificado pela sua versatilidade estrutural, que permite a ligação eficaz a diversas enzimas e receptores (Constantinescu; Lungu, 2021). Dentre os efeitos farmacológicos já descritos incluem-se as propriedades antibacteriana (Vásquez-Martínez *et al.*, 2019; Satokata

et al., 2022), antioxidante (Sökmen *et al.*, 2016), antileishmania (de Mello *et al.*, 2014), anticâncer (Bułakowska *et al.*, 2023; El-Atawy *et al.*, 2014), citotóxica (Amin *et al.*, 2023), anti-inflamatória (Yadav *et al.*, 2011; Ur Rashid *et al.*, 2019), antimetastática (Sun *et al.*, 2021) e antiangiogênica (Mirossay, Varinská, Mojžiš, 2017; Wang *et al.*, 2019). No entanto, essa diversidade de atividades biológicas pode indicar um entrave à aplicabilidade clínica das chalconas, em virtude de seu perfil de interação com múltiplos alvos moleculares, o que leva a interferência no tratamento direcionado (Ouyang *et al.*, 2021).

Quanto à atividade anticâncer, diversos estudos *in vitro* e *in vivo* têm demonstrado que a aplicação das chalconas e seus derivados pode atenuar a progressão tumoral, atuando por meio de um conjunto diversificado de mecanismos celulares e moleculares (El-Atawy *et al.*, 2014; Moreira *et al.*, 2021). Dentre os principais mecanismos, destacam-se a interferência na via p53 e a inibição de alvos como glicoproteína P, histona desacetilases (HDAC), Sirtuína 1, proteassoma, VEGF, tubulina, fosfatase CDC25B, topoisomerase, NF-κB, mTOR, BRAF e Wnt/β-catenina (Chen *et al.*, 2020; Kumar *et al.*, 2021). Essa atuação multialvo permite a atuação das chalconas na indução de apoptose, inibição da formação de novos vasos sanguíneos, bloqueio da polimerização de microtúbulos e interferência em processos inflamatórios e de resistência a múltiplos fármacos (Ouyang *et al.*, 2021).

A compreensão dos possíveis mecanismos de ação e dos alvos específicos pode auxiliar no desenvolvimento de novos medicamentos anticâncer com maior eficácia. Sob esse viés, a química medicinal tem demonstrado esforços intensos para viabilizar o design e a síntese de novas chalconas clinicamente aplicáveis, baseando-se na modificação convencional da estrutura, a fim de potencializar suas atividades farmacológicas e eliminar propriedades indesejada (Gomes *et al.*, 2017; Burmaoglu *et al.*, 2021). Nesse sentido, a adição de diferentes grupos funcionais pode permitir a interação direcionada a alvos moleculares distintos, dependendo da posição, número e grupo dos substituintes, o que pode estar associada a melhora da seletividade (Jandial *et al.*, 2014).

Em consonância com essas observações, diversos compostos baseados em chalconas têm sido desenvolvidos e examinados quanto a sua eficácia no combate ao câncer e aos efeitos sobre os processos metastáticos. Neste cenário, a síntese de derivados de chalcona tem ganhado notoriedade, em virtude de sua capacidade de adaptação estrutural, o que possibilita a ampliação

de suas ações farmacológicas, tornando-os opções viáveis na busca por terapias inovadoras e mais eficazes para o tratamento do câncer (Dhaliwal *et al.*, 2022; Chen *et al.*, 2023).

2.5 Chalconas hidroxiladas

A modificação estrutural das chalconas a partir da substituição de hidrogênio por diferentes grupos funcionais, como hidroxilas, arilos e halogênios apresenta influência direta sobre as propriedades físico-químicas e biológicas (Ouyang *et al.*, 2021; WalyEldeen *et al.*, 2023). A presença de grupo hidroxila é comum em diversos medicamentos e desempenham funções importantes nas propriedades farmacodinâmicas e farmacocinéticas, auxiliando na formação de ligações de hidrogênio, o que pode potencializar o metabolismo de compostos bioativos (Huo *et al.*, 2024). Nesse cenário, as chalconas hidroxiladas são compostos orgânicos caracterizados pela presença de um ou mais grupos hidroxila em sua estrutura. Essa hidroxilação pode ocorrer em várias posições dos A e/ou B, o que resulta em uma diversidade de derivados de chalcona, os quais podem apresentar interações com alvos biológicos distintos (Lee *et al.*, 2016).

No que diz respeito à atividade biológica, as chalconas hidroxiladas têm demonstrado eficácia em diversos ensaios. Sugere-se que os efeitos anticâncer das chalcona estejam associados a presença de grupos de hidroxilas em sua estrutura e, por consequência, os derivados hidroxilados apresentem efeitos mais potentes (Alshangiti *et al.*, 2019). Logo, a posição e a quantidade de hidroxilas no anel fenil é essencial para a regulação dessa atividade biológica, tanto em compostos de ocorrência natural, quanto nos compostos sintéticos (Navarini *et al.*, 2009; Alshangiti *et al.*, 2019; Ouyang *et al.*, 2021). Diversos estudos têm relatado que a presença de grupos hidroxila pode elevar a capacidade de interação desses compostos com enzimas específicas, as quais estão envolvidas na interferência na proliferação celular, manejo do ciclo, indução de morte por apoptose e inibição da formação de metástases (Loa; Chow; Zhang, 2009; Navarini *et al.*, 2009; Ma *et al.*, 2020).

Estudos realizados por Loa e colaboradores (2008), avaliaram o efeito antiproliferativo e a relação estrutura-atividade de 68 polifenóis (chalconas, flavanonas, flavonas e isoflavonas) com diferentes grupos substituintes em diversas posições dos anéis A e B, frente a células de câncer de fígado humano. Os resultados demonstraram que, dentre os grupos, as chalconas hidroxiladas demonstraram efeito mais potente na supressão das células cancerosas, com maior destaque aos compostos com adição de hidroxila na posição 2' carbono no Anel B. Navarini e

colaboradores (2009) avaliaram a atividade citotóxica de uma série de hidroxichalconas sintéticas contra células de melanoma B16-F10. Neste estudo, três compostos foram capazes de reduzir significativamente a viabilidade celular, com dois deles induzindo a morte por apoptose. O composto 1 foi o mais ativo, com valor de CI_{50} de 12 μM . Essa maior atividade parece associar-se à presença de um grupo hidroxila livre no anel A. Esses resultados destacam o impacto da hidroxilação na otimização das propriedades de chalconas.

Ademais, as capacidades bioativas das chalconas estão associadas às diferentes propriedades eletrônicas de átomos ou grupamentos ligados aos anéis A e B, que podem atuar como doadores ou aceptores de elétrons. Nesse sentido, a adição de halogênios em uma molécula pode resultar em alterações distintas nas suas propriedades. A inclusão de cloro no anel fenil pode conduzir a um ligeiro aumento na lipofilicidade molecular e na permeabilidade da membrana, melhorando a absorção e distribuição pelo organismo. Além disso, o cloro também pode resultar na polarização da estrutura da molécula, promovendo um aumento na capacidade de interação com receptores, melhora na ligação e potencialmente na ação do fármaco (Mphahlele *et al.*, 2024; Huo *et al.*, 2024).

Estudos relataram que hidroxichalconas com substituintes eletronegativos no anel B apresentaram citotoxicidade mais elevada em diversas linhagens tumorais, quando comparadas às moléculas com substituintes eletrodoadores (Nam *et al.*, 2003). Saito e colaboradores (2018) demonstraram que as propriedades de halogênios influenciaram a atividade da hidroxila, evidenciando que as hidroxichalconas contendo cloro apresentaram maior potência citotóxica em comparação a compostos com outros substituintes ou sem substituição.

A chalcona hidroxilada investigada no presente estudo corresponde a um composto halogenado inédito, caracterizado pela presença de um átomo de cloro como substituinte na posição *para* do anel B. Investigações preliminares conduzidas por nosso grupo de pesquisa demonstraram que a molécula identificada como HC-A3 exerceu atividade citotóxica significativa frente a diversas linhagens de células tumorais, apresentando valores de CI_{50} variando entre 3,9 μM em linhagem SCC-4 (OSCC) e 14,8 μM em linhagem HL-60 (leucemia promielocítica aguda), após 72 horas de tratamento (dados não publicados).

Considerando a relevância farmacológica das chalconas e seu potencial como agentes antineoplásicos, o presente estudo justifica-se pela busca por novas moléculas com capacidade de interferir tanto na proliferação quanto nos mecanismos associados à metástase tumoral.

Nesse contexto, propõe-se que as chalconas hidroxiladas possam representar uma alternativa promissora no desenvolvimento de fármacos inovadores voltados à prevenção da progressão e disseminação de neoplasias malignas.

3 OBJETIVOS

3.1 Objetivo geral

Avaliar o potencial de uma chalcona hidroxilada (HC-A3) sobre diferentes etapas do processo metastático, por meio de ensaios *in vitro*, utilizando a linhagem de carcinoma espinocelular oral HSC-3.

3.2 Objetivos específicos

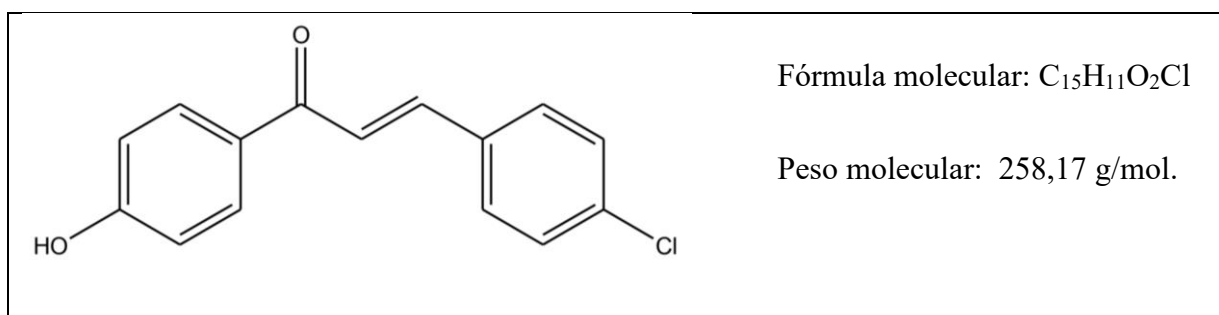
- Avaliar a atividade citotóxica do composto HC-A3 frente à linhagem HSC-3, por meio do ensaio de viabilidade celular com MTT;
- Determinar as concentrações subcitotóxicas do composto HC-A3, utilizando o ensaio de exclusão com Azul de Tripan;
- Identificar alterações morfológicas induzidas pelo composto HC-A3 nas células HSC-3, por meio da coloração com Panótico Rápido;
- Investigar o efeito do composto HC-A3 sobre a capacidade proliferativa de longo prazo da linhagem HSC-3, utilizando o ensaio clonogênico;
- Verificar a influência do composto HC-A3 na migração celular da linhagem HSC-3, por meio do ensaio de cicatrização (*wound healing assay*);
- Analisar o impacto do composto HC-A3 sobre a adesão celular da linhagem HSC-3, por meio de ensaio de adesão *in vitro*.

4 METODOLOGIA

4.1 Obtenção da amostra

A molécula HC-A3 (Figura 5) foi sintetizada e caracterizada pela equipe coordenada pela Prof.^a Dra. Caridad Noda Pérez, do Instituto de Química da Universidade Federal de Goiás (UFG). A substância, gentilmente cedida em sua forma pura, foi solubilizada em dimetilsulfóxido (DMSO) e armazenada a -20 °C até sua utilização nos ensaios *in vitro*.

Figura 5. Estrutura química da Chalcona hidroxilada HC-A3.



Fonte: Elaborado pelo autor, 2025.

4.2 Cultura celular

As células de carcinoma de células escamosas de língua HSC-3 foram cultivadas em meio de Eagle modificado por Dulbecco (DMEM), suplementado com 10% de soro fetal bovino (SFB) e 1% de antibiótico (penicilina/estreptomicina), sendo incubadas a 37 °C em atmosfera umidificada com 5% de CO₂. Para a manutenção das culturas, o meio foi removido e o frasco lavado duas vezes com solução tampão salina de fosfato (PBS) estéril. Em seguida, foi adicionada solução de tripsina diluída em PBS para promover o desprendimento celular. Após a dissociação, a ação da tripsina foi inibida pela adição de meio completo contendo SFB. Uma alíquota da suspensão celular foi transferida para um novo frasco, e o volume original foi completado com meio fresco.

4.3 Avaliação citotóxica *in vitro* pelo teste do MTT

Princípio do método

O MTT, brometo de 3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difenil tetrazólio, é um sal amarelo hidrossolúvel e capaz de atravessar a membrana plasmática. O ensaio de redução do MTT consiste em uma técnica colorimétrica que avalia, de forma indireta, a viabilidade, proliferação ou citotoxicidade celular. Em células metabolicamente ativas, enzimas do tipo oxidoredutase mitocondrial reduzem o MTT a cristais insolúveis de formazan, de coloração púrpura, os quais podem ser quantificados por espectrofotometria. A intensidade da cor formada é diretamente proporcional ao número de células viáveis (Mosmann, 1983; Gonçalves; Sobral, 2020).

Procedimento experimental

Para a realização do ensaio, células da linhagem HSC-3 foram semeadas em placas de 96 poços, na concentração de 7×10^4 células/poço, e incubadas por 24 horas. Decorrido esse período, as células foram tratadas com concentrações seriadas do composto HC-A3 (1,56 a 100 μ M) e da doxorrubicina (0,14 a 9,2 μ M), preparadas em triplicata, e incubadas por 24, 48 e 72 horas. Três horas antes do término de cada período de incubação, o meio de cultura foi descartado e adicionados 150 μ L da solução de MTT (0,5 mg/mL), preparada em meio DMEM, a cada poço. Em seguida, a placa foi reincubada por mais 3 horas para permitir a redução do MTT a cristais de formazan. Posteriormente, o sobrenadante foi removido e os cristais de formazan foram dissolvidos com 150 μ L de dimetilsulfóxido (DMSO) por poço. A leitura das absorbâncias foi realizada em espectrofotômetro (SpectraMax® 190, Molecular Devices), utilizando o comprimento de onda de 595 nm.

Os dados foram analisados no software GraphPad Prism, versão 8.0, e os valores de absorbância foram convertidos em porcentagem de inibição celular, com base na média da absorbância do controle negativo. A concentração inibitória média necessária para reduzir em 50% a viabilidade celular (CI₅₀), juntamente com os respectivos intervalos de confiança de 95% (IC 95%), foi determinada por regressão não linear.

4.4 Ensaio de exclusão por azul de Tripan

Princípio do método

O azul de Tripán é um corante diazoderivado da toluidina, solúvel em água, amplamente utilizado na avaliação da viabilidade celular por ser um método simples, rápido e de baixo custo. O ensaio baseia-se na análise da integridade da membrana plasmática, servindo como um método indireto para estimar a viabilidade celular. Isso é possível devido à capacidade do corante de penetrar células mortas ou em processo de morte, que apresentam comprometimento da membrana, permitindo sua absorção e conferindo-lhes uma coloração azul. Dessa forma, é possível distingui-las das células viáveis, que permanecem incolores (Gonçalves; Sobral, 2020).

Procedimento experimental

Para a realização do teste, células da linhagem HSC-3 foram semeadas em placas de 24 poços, na densidade de 1×10^5 células/poço, e mantidas a 37 °C em atmosfera umidificada com 5% de CO₂ por 24 horas. Posteriormente, as células foram tratadas com o composto HC-A3 nas concentrações de 0,25, 0,5 e 1,0 µM, definidas com base nos resultados do ensaio de MTT de 72 horas, correspondendo a 1/32, 1/16 e 1/8 da CI₅₀, respectivamente. A doxorubicina (DOX) foi utilizada como controle positivo, na concentração de 0,1 µM.

Após 24 horas de incubação, o meio de cultura foi removido de cada poço e armazenado em microtubos. Em seguida, os poços foram lavados com PBS estéril e submetidos à tripsinização para promover o desprendimento celular. A ação da tripsina foi inibida com a adição de meio completo (DMEM + SFB). As amostras foram então centrifugadas a 1500 rpm por 5 minutos, o sobrenadante descartado e o pellet celular ressuspensionado em PBS. Por fim, foi retirada uma alíquota de 90 µL da suspensão celular, à qual foram adicionados 10 µL de azul de Tripán, realizando-se a contagem celular em câmara de Neubauer.

4.5 Avaliação da morfologia celular por coloração com panótico rápido

Princípio do método

Para a análise morfológica, utilizou-se a coloração por panótico rápido, que se baseia na diferenciação das estruturas celulares com base em suas propriedades ácido-base. O corante básico liga-se aos grupamentos ácidos das moléculas celulares, corando-os de azul. Em contraste, o corante ácido combina-se com as estruturas celulares básicas, conferindo-lhe uma tonalidade rosa (Junqueira; Carneiro, 2012). A coloração foi realizada objetivando demonstrar que as concentrações definidas abaixo da CI₅₀ não afetaram a viabilidade celular.

Procedimento experimental

As células foram semeadas em placas de 24 poços e tratadas com três diferentes concentrações de chalcona HC-A3, as quais foram determinadas a partir dos valores de CI_{50} obtidos no teste de MTT, e mantidas na incubadora por 24 horas. Após o tempo de incubação, realizou-se a etapa de manutenção da placa para posterior formação e ressuspensão do pellet celular. Da suspensão, 100 μ L foram adicionados à citocentrífuga (1500 rpm por 5 minutos) para a adesão das células às lâminas. Posteriormente, foram fixadas com solução de triarilmetano a 0,1% e coradas com solução de xantenos a 0,1% e tiazinas a 0,1% (Laborclin®). As lâminas com células coradas foram analisadas no microscópio óptico e as alterações morfológicas foram registradas.

4.6 Ensaio clonogênico

Princípio do método

O ensaio clonogênico é um ensaio que se baseia na capacidade de células individuais se proliferarem e formar colônias *in vitro*. Essa técnica é amplamente utilizada para analisar a sobrevivência e capacidade de clonagem celular após tratamento com radiação ionizante ou quimioterápicos (Puc; Marcus; Cieciura, 1956).

Procedimento Experimental

As células foram semeadas a uma densidade de 1×10^5 células/poço em placas de 24 poços estéreis e incubadas a 37°C com 5% de CO_2 por 24 horas. Para o tratamento, foram adicionadas as concentrações de 0,25 μ M, 0,5 μ M e 1,0 μ M de HC-A3 nos poços correspondentes, com uma incubação adicional de 24 horas. Após o tempo de incubação, as células foram replaqueadas em placas de 12 poços a uma concentração de $0,03 \times 10^4$ células/poço, mantendo-se as mesmas condições de incubação por um período de sete dias.

Ao final desse período, o sobrenadante foi descartado e os poços lavados com PBS. Em seguida, as células foram fixadas com solução de triarilmetano a 0,1% e coradas com solução de xantenos a 0,1% e tiazinas a 0,1% (Laborclin®). A doxorrubicina (0,10 μ M) foi utilizada como controle positivo. Por fim, as colônias foram fotografadas para análise, solubilizadas com uma solução de metanol e ácido acético (3:1) e a absorbância foi quantificada em 600 nm em leitor de placas. O número de colônias foi quantificado com auxílio do software ImageJ.

4.7 Ensaio de migração celular - *Wound healing assay*

Princípio do método

O ensaio de cicatrização de feridas (*wound healing assay*) é uma técnica simples, barata e altamente reprodutível para estudar a migração celular *in vitro*. Esse método baseia-se na criação de uma ferida em uma monocamada celular, seguida pela captura de imagens nos tempos inicial e final. A comparação da área da ferida durante esse intervalo de tempo permite avaliar a migração celular, sendo útil, particularmente, para o estudo da migração em células cancerosas (Freitas; Jozic; Bedogni, 2021).

Procedimento experimental

As células HSC-3 foram semeadas em placas de 24 poços em meio DMEM sem SFB. Após atingirem a confluência de aproximadamente 90%, as células receberam um pré-tratamento com 8 µg/mL de mitomicina, como inibidor da proliferação, 2 horas antes do arranhão. Posteriormente, foi realizada uma lesão na monocamada celular utilizando uma ponteira (p200) pressionada contra o assoalho do poço, originando uma fenda. Os poços foram lavados duas vezes com PBS para remoção de resíduos celulares. Em seguida, foi adicionado meio DMEM com 0,25% de SFB, a fim de promover a privação de nutrientes e inibir a proliferação celular. As imagens dos poços foram capturadas no tempo zero (T_0) com o auxílio do microscópio óptico invertido (ZEISS, modelo Axiovert 40C).

As células foram submetidas ao tratamento com concentrações não citotóxicas de HC-A3 (0,25 µM; 0,5 µM e 1,0 µM). A migração celular foi avaliada após 24 e 48 horas de incubação, e os poços foram fotografados novamente para comparação. O percentual de migração celular foi determinado com base na variação da área da lesão entre o tempo zero e os períodos de 24 e 48 horas de incubação, utilizando o software ImageJ. A migração foi expressa em percentual, conforme a fórmula: $\% \text{ migração celular} = [(AT_0 - AT_t) / AT_0] \times 100$, em que AT_0 representa a área inicial do corte, medida imediatamente após sua realização, e AT_t corresponde à área remanescente após 24 e 48 horas.

4.8 Ensaio de adesão celular em fibronectina

Princípio do método

A adesão celular é um processo complexo que envolve múltiplas interações moleculares diferentes. O ensaio de adesão consiste em avaliar a capacidade de uma linhagem celular de se aderir a uma superfície ou matriz extracelular. Para isso, o ensaio consiste no cultivo das células em uma placa revestida com um substrato específico, para monitoramento da adesão (Humphries, 2009).

Procedimento Experimental

As células HSC-3 foram semeadas em meio privado de soro em placas de 24 poços a uma concentração de 1×10^5 células/mL e mantidas a 37°C e 5% CO₂ por 24 horas. Após o período de incubação, as células receberam um pré-tratamento com 0,25 µM, 0,5 µM e 1,0 µM de HC-A3 por 24 horas. Posteriormente, o meio foi removido e os poços foram lavados com PBS. As células foram centrifugadas por 5 minutos a 1500 rpm e o pellet foi ressuspensão em meio DMEM sem soro.

Para o preparo do substrato, na placa de 24 poços foram adicionados 300 µL/poço de fibronectina (10 µg/mL) diluída em PBS, e incubada por 1 hora à temperatura ambiente. Posteriormente, a solução de revestimento de cada poço foi removida e adicionados 300 µL/poço de BSA a 1%, o qual permaneceu em temperatura ambiente por 1 hora. Decorrido esse tempo, a solução de bloqueio foi removida e os poços foram lavados com 300 µL de PBS.

Após a ressuspensão do pellet, as células foram semeadas na placa revestida com fibronectina em uma densidade de 2×10^5 células/mL em meio DMEM sem soro, seguido por 1 hora de incubação a 37 °C. Após a incubação, o sobrenadante foi cuidadosamente removido e os poços foram lavados duas vezes com 200 µL de PBS. As células foram fixadas com solução de triarilmetano a 0,1% e coradas com solução de xantenos a 0,1% e tiazinas a 0,1% (Laborclin®). Os poços foram analisados em um microscópio óptico invertido para capturar imagens. As imagens foram avaliadas utilizando o programa ImageJ.

4.9 Análise estatística

Os dados obtidos nos experimentos foram expressos como média \pm erro padrão da média (EPM) de, no mínimo, três experimentos independentes realizados em duplicata ou triplicata. As análises estatísticas foram realizadas utilizando o software GraphPad Prism versão

8.0. Os dados foram comparados pela análise de variância (ANOVA), seguida do Pós-Teste de Tukey. Considera-se um nível de significância de 5% ($p < 0,05$).

5 RESULTADOS

5.1 Avaliação citotóxica *in vitro* pelo ensaio do MTT

O efeito citotóxico do composto frente à linhagem de carcinoma de células escamosas orais, HSC-3, foi analisado por meio do ensaio do MTT após 24, 48 e 72 horas de tratamento. A doxorubicina foi utilizada como controle positivo no estudo. Os dados dispostos na tabela 1 apresenta os valores de concentração inibitória média (CI₅₀) obtidos no ensaio. A chalcona hidroxilada HC-A3 demonstrou efeito citotóxico em todos os tempos testados, com redução gradual da CI₅₀ decorrente do aumento do tempo de exposição, revelando que a molécula apresenta um perfil de tempo-dependência. Os valores de CI₅₀ variaram entre 45,4 e 8,3 µM, após 24 e 72 horas de tratamento, respectivamente.

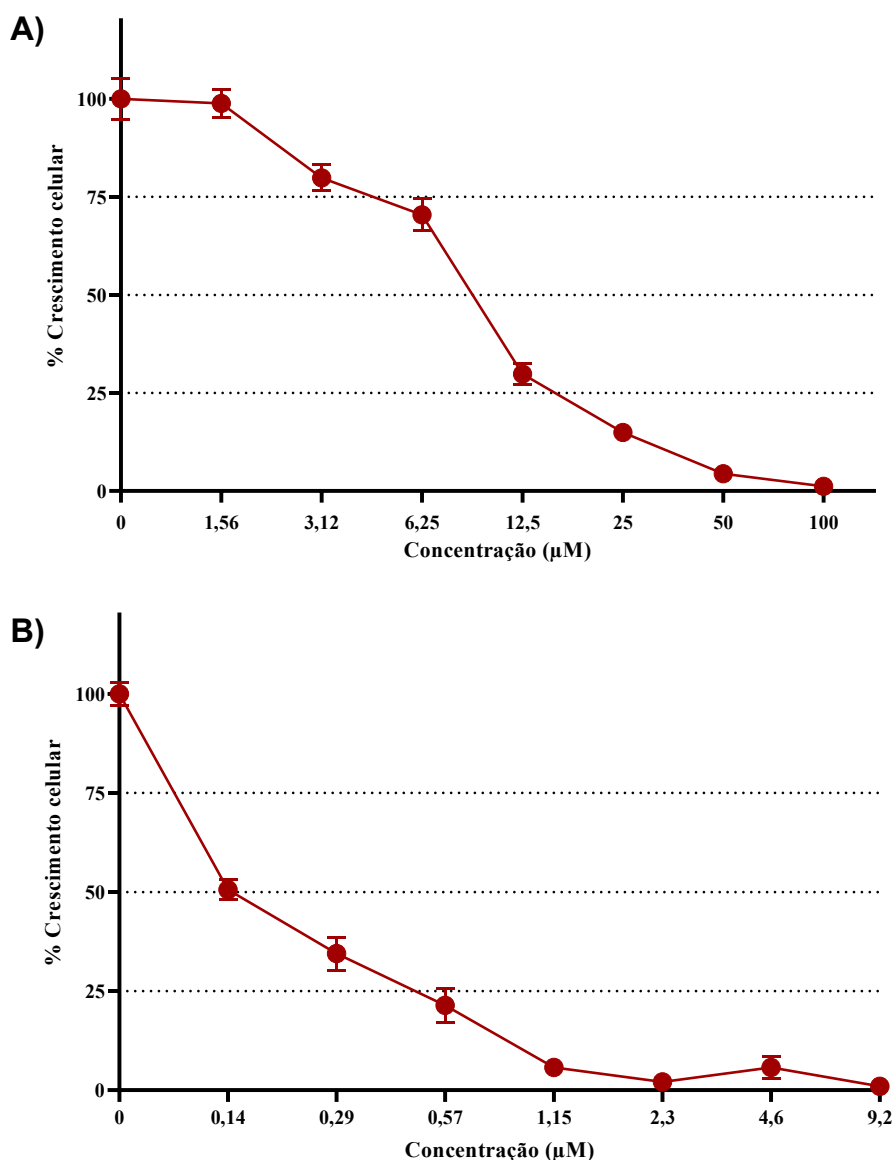
Tabela 1. Perfil citotóxico de HC-A3 em comparação à doxorubicina frente à linhagem celular HSC-3 pelo ensaio do MTT após 24, 48 e 72h de incubação.

HSC-3	CI ₅₀ (µM)		
	Intervalo de confiança de 95%		
	24 h	48 h	72 h
HC-A3	45,4 (34,5 - 62,4)	30,6 (25,3 - 37,1)	8,3 (7,4 - 9,2)
DOX	0,27 (0,23 - 0,31)	0,23 (0,20 - 0,28)	0,17 (0,12 - 0,22)

Os valores de CI₅₀ foram calculados a partir de regressão não linear utilizando o programa GraphPad Prism Software versão 8.0.1. Fonte: Elaborado pelo autor, 2025.

Por meio dos valores de CI₅₀ e da curva de crescimento celular em 72 horas (Figura 6), foram definidas as concentrações não citotóxicas de 0,25 µM; 0,5 µM e 1,0 µM para utilização nos ensaios subsequentes na mesma linhagem celular. A doxorubicina (DOX) foi utilizada na concentração de 0,1 µM (concentração subcitotóxica) como controle positivo dos demais ensaios.

Figura 6. Curva do percentual de crescimento celular de células HSC-3 determinado pelo ensaio do MTT após 72 horas de incubação.



Resposta celular ao tratamento com HC-A3 (A). Resposta celular ao tratamento com Dox (B). Fonte: Elaborado pelo autor, 2025.

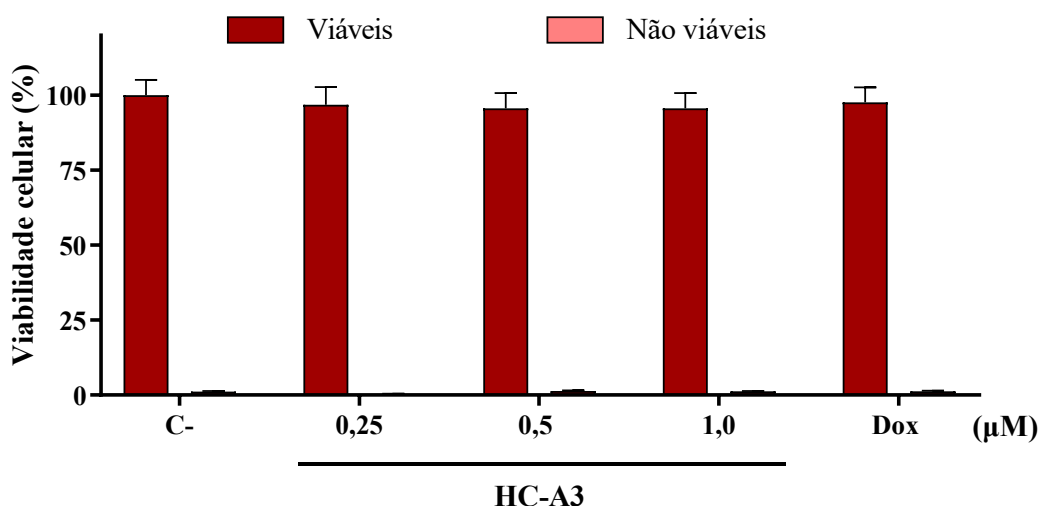
5.2 Ensaio de exclusão por azul de Tripan

Para confirmar a viabilidade celular nas concentrações não citotóxicas previamente determinadas pelo ensaio de MTT, foi realizado o ensaio de exclusão por azul de Tripan na linhagem HSC-3 após 24 horas de exposição ao composto. Conforme ilustrado na Figura 7, não foram observadas alterações significativas na viabilidade celular nas concentrações escolhidas, indicando que a maioria das células permaneceu viável, com baixa porcentagem de células não viáveis quando comparadas ao controle negativo. Esses resultados validam o uso dessas

concentrações como não citotóxicas para os ensaios subsequentes, como análise morfológica, migração e adesão.

Como controle positivo, a doxorrubicina (0,1 μM) também não apresentou redução significativa da viabilidade celular ($p < 0,05$), confirmando a sensibilidade do ensaio. Os dados reforçam que a HC-A3, nas concentrações testadas, não compromete significativamente a integridade celular em 24 horas, sendo adequada para avaliação de outros efeitos biológicos não relacionados à citotoxicidade direta.

Figura 7. Efeito de HC-A3 na viabilidade de células HSC-3 determinado pelo ensaio de exclusão do azul de Tripán após 24 horas de tratamento.

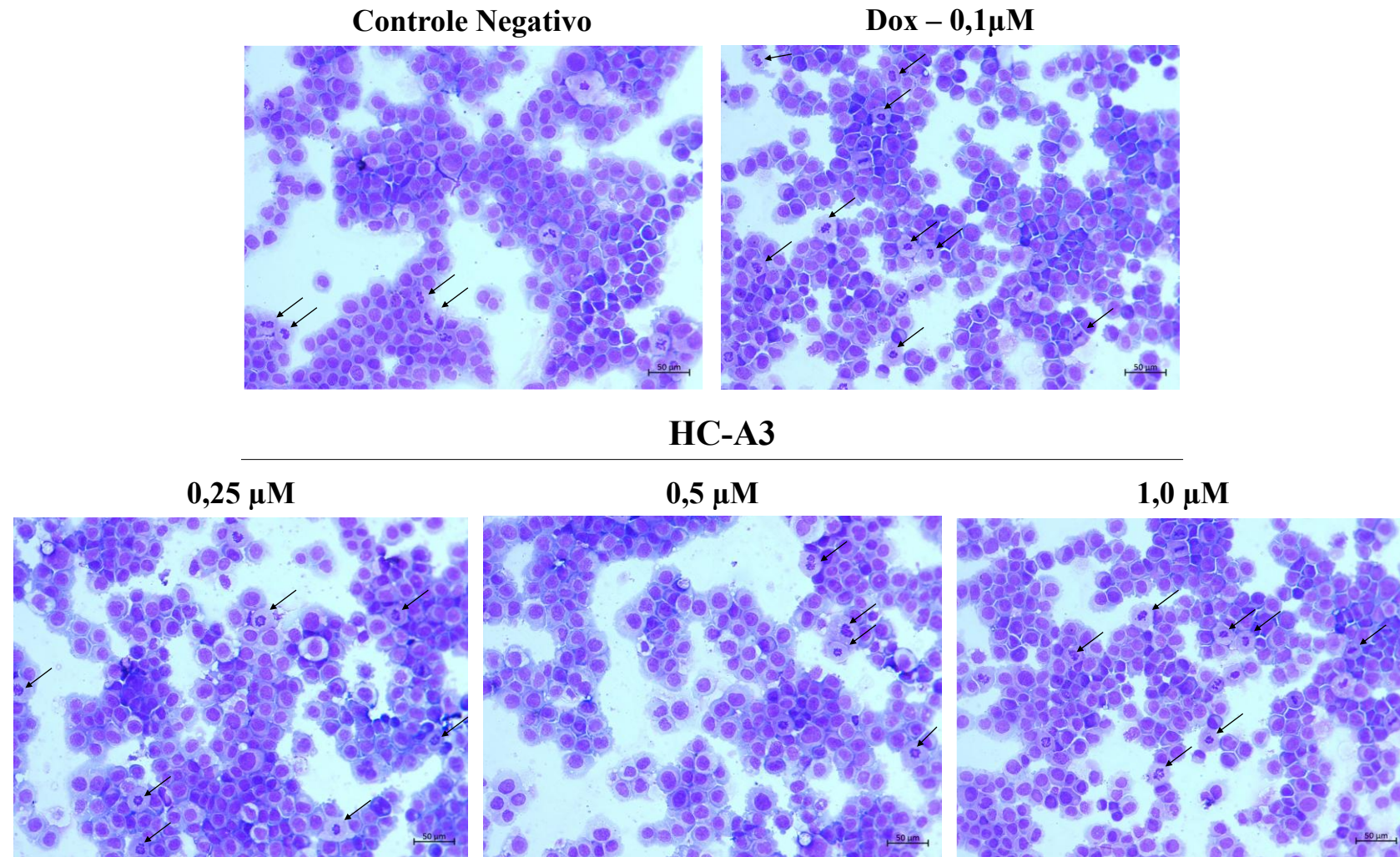


Os dados correspondem à média \pm erro padrão da média (EPM) de no mínimo dois experimentos independentes. (* $p < 0,05$) comparado ao controle negativo por ANOVA, seguido de pós teste de Tukey. A Doxorrubicina (DOX) foi utilizada como controle positivo. Fonte Elaborado pelo autor, 2025.

5.3 Avaliação da morfologia celular por coloração com panótico rápido

Para reafirmar que as concentrações de 0,25 μM , 0,5 μM e 1,0 μM não provocam morte celular na linhagem celular HSC-3 no período de 24 horas, foi realizada a análise morfológica utilizando a coloração por Panótico Rápido. A Figura 8 apresenta imagens representativas obtidas por microscopia óptica. No controle negativo, as células apresentam morfologia preservada, com membranas bem definidas e citoplasma uniforme. Observou-se também a presença de figuras mitóticas (setas pretas), indicativas da manutenção da atividade proliferativa. Nos grupos tratados com a HC-A3, bem como no grupo de células expostas à doxorrubicina, não foram observadas características sugestivas de morte celular, apresentando também a presença de figuras mitóticas.

Figura 8. Análise morfológica das células HSC-3 após 24 horas de tratamento com HC-A3, com coloração por panótico rápido.



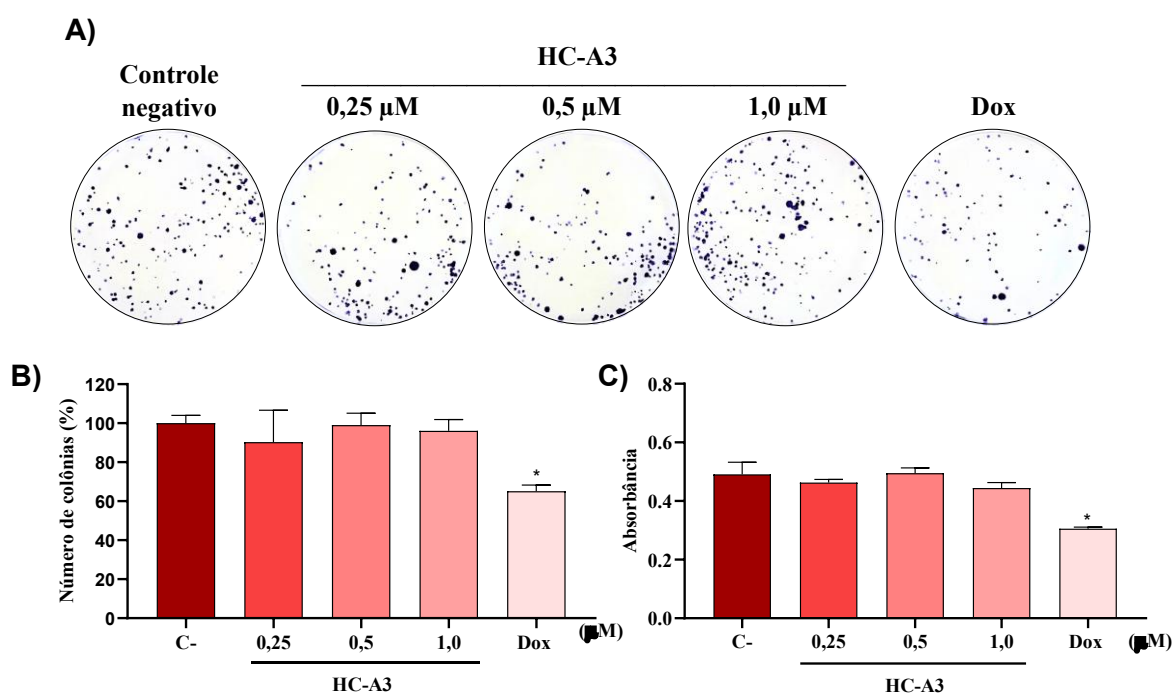
As células foram analisadas por microscopia óptica (400x). Escala de 50 μ m. Setas pretas: figuras mitóticas. Fonte: Elaborado pelo autor, 2025.

5.4 Ensaio clonogênico

O efeito do composto HC-A3 na formação de colônias celulares foi avaliado por meio do ensaio de clonogenicidade, após pré-tratamento com diferentes concentrações (0,25; 0,5 e 1,0 μM) por 24 horas. A Figura 9A apresenta uma das triplicatas representativas, demonstrando visualmente a preservação da densidade e do tamanho das colônias.

O gráfico 9B exibe a quantificação do número de colônias formadas, expressa em porcentagem em relação ao controle negativo, enquanto o gráfico 9C representa a média das absorvâncias obtidas após coloração das colônias, como forma indireta de estimar a biomassa celular. Não foram observadas diferenças estatisticamente significativas ($p > 0,05$) para nenhuma das concentrações testadas de HC-A3, tanto no número de colônias quanto na absorvância. Esses resultados indicam que, nas condições experimentais avaliadas, o composto HC-A3 não exerceu efeito significativo sobre a capacidade proliferativa e clonogênica das células HSC-3.

Figura 9. Efeito de HC-A3 sobre a formação de colônias em células tumorais HSC-3 após 24 horas de tratamento.



O experimento foi realizado em triplicata. A imagem corresponde a uma das triplicatas representativa (A). Gráfico de porcentagem do número de colônia (B). Gráfico da absorvância das colônias (C). Os resultados foram expressos como média \pm EPM e um valor de $p < 0,05$ foi considerado estatisticamente significativo. Fonte: Elaborado pelo autor, 2025.

Acreditamos que a doxorubicina exerceu um efeito citostático em curto prazo, o que explica a manutenção da viabilidade celular no ensaio de exclusão com azul de tripan. No entanto, os danos ao DNA causados pelo fármaco, incluindo inibição da topoisomerase II e estresse oxidativo, comprometem a capacidade de replicação celular, o que se refletiu na inibição significativa da formação de colônias no ensaio clonogênico. Isso demonstra que a célula pode permanecer viável por um período, mas perde sua capacidade proliferativa a longo prazo.

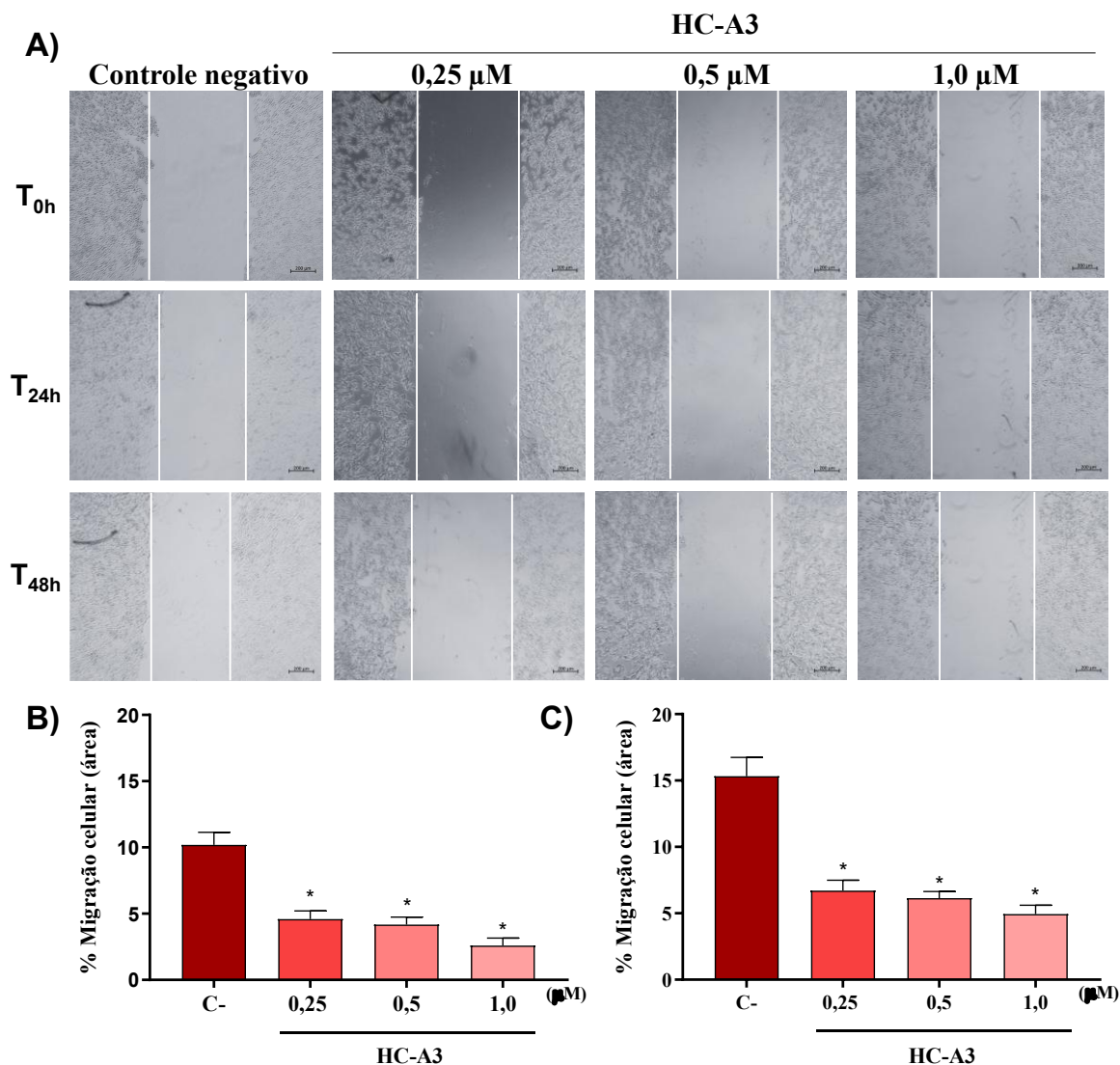
5.5 Ensaio de migração celular - *Wound healing assay*

O ensaio de migração (*wound healing assay*) foi realizado para investigar o efeito da chalcona hidroxilada HC-A3 sobre a capacidade migratória das células HSC-3. A Figura 10A mostra imagens representativas das “feridas” celulares obtidas imediatamente após o risco (T_{0h}) e após 24 e 48 horas de tratamento (T_{24h} e T_{48h}), nas diferentes concentrações testadas (0,25; 0,5 e 1,0 μ M). No grupo controle negativo (C-), observou-se um fechamento significativo da área da ferida ao longo do período de incubação, indicando elevada atividade migratória das células. Por outro lado, os grupos tratados com a chalcona HC-A3 demonstraram redução na capacidade de migração celular, evidenciada pela maior persistência do espaço entre as bordas da ferida após o período de incubação.

A análise quantitativa (Figuras 10B e 10C) confirmou esses achados, demonstrando redução estatisticamente significativa ($p < 0,05$) na porcentagem de migração celular em todos os grupos tratados, em comparação ao controle. Após 24 horas de exposição, a migração celular foi de 4,5%, 4,1% e 2,5% nas concentrações de 0,25, 0,5 e 1,0 μ M, respectivamente, enquanto o grupo controle apresentou 10,1%. Resultados semelhantes foram observados após 48 horas de tratamento, com percentuais de 6,7%, 6,1% e 4,9% para as mesmas concentrações, comparados a 15,3% no controle.

Esses dados sugerem que o composto HC-A3 exerce atividade antimigratória nas células HSC-3, o que pode representar um potencial mecanismo antimetastático, considerando que a migração celular é um processo-chave na progressão tumoral e metástase.

Figura 10. Efeito de HC-A3 sobre o potencial migratório de células HSC-3.

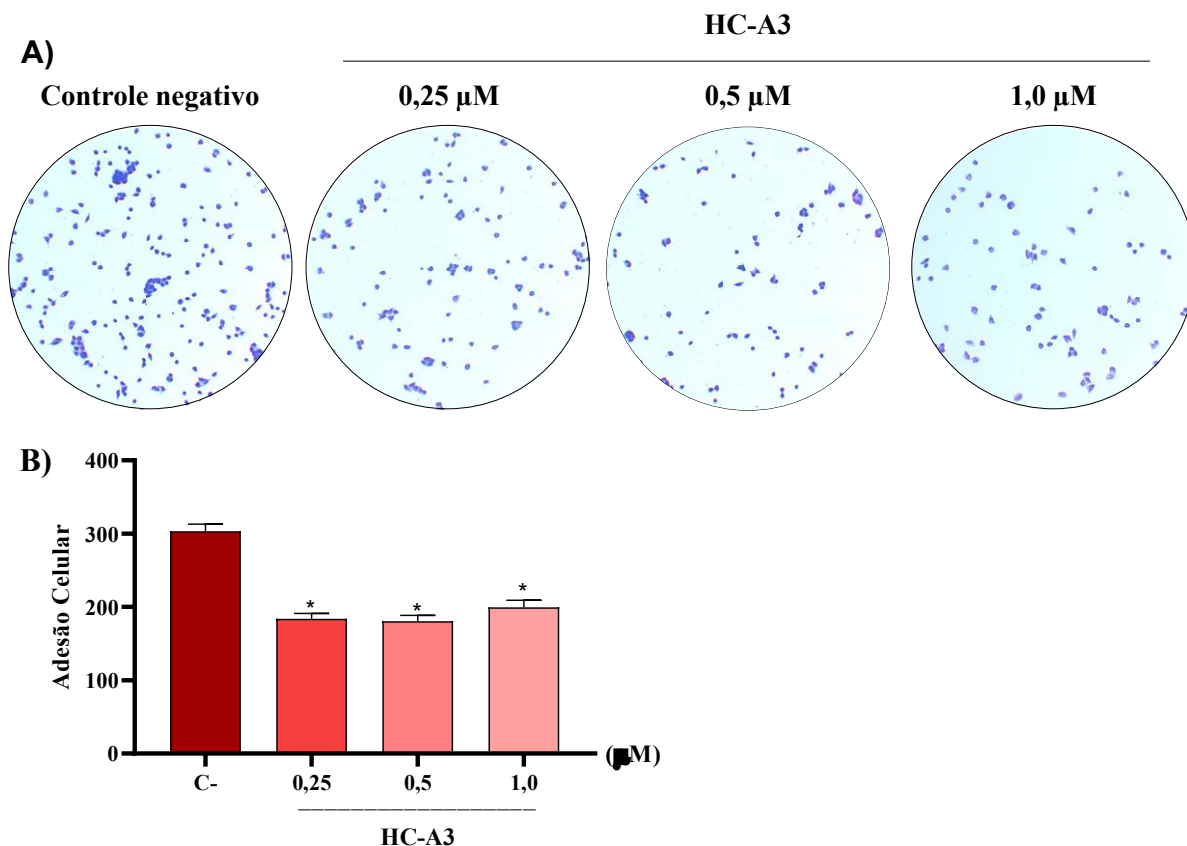


Fotos representativas da porcentagem do fechamento do risco por microscopia óptica com objetiva de 5x nos tempos 0; 24 e 48 h (A). Gráfico gerado através da área de cada risco dado em porcentagem após 24 horas (B) e 48 horas de migração (C). Os resultados foram expressos como média \pm EPM e um valor de $p < 0,05$ foi considerado estatisticamente significativo. Fonte: Elaborado pelo autor, 2025.

5.6 Ensaio de adesão celular em fibronectina

A capacidade de adesão celular à matriz extracelular foi avaliada por meio do ensaio de adesão em placas recobertas com fibronectina, após o pré-tratamento das células com o composto HC-A3 nas concentrações de 0,25, 0,5 e 1,0 μM , durante 24 horas. A Figura 11A apresenta a densidade de células aderidas nas diferentes condições experimentais, evidenciando visualmente uma redução da adesão celular nos grupos tratados, em comparação ao controle negativo.

Figura 11. Efeito de HC-A3 sobre a adesão de células HSC-3 à fibronectina.



Imagens representativas do ensaio de adesão, utilizando as concentrações de 0,25 μM, 0,5 μM e 1,0 μM de HC-A3 (A). Gráfico da porcentagem de adesão à fibronectina gerado a partir das imagens tiradas de quatro campos representativos de cada replicata (B). Os resultados foram expressos como média ± EPM e um valor de $p < 0,05$ foi considerado estatisticamente significativo. Fonte: Elaborado pelo autor, 2025.

A quantificação da adesão celular (Figura 11B) revelou uma redução estatisticamente significativa ($p < 0,05$) em todas as concentrações testadas do composto HC-A3. Esses resultados indicam que o HC-A3 compromete significativamente a capacidade das células HSC-3 de aderirem à fibronectina, sugerindo uma possível interferência nas interações célula-matriz extracelular.

Nas concentrações de 0,25, 0,5 e 1,0 μM, o número médio de células aderidas à fibronectina foi de $183,8 \pm 7,1$; $180,5 \pm 7,9$; e $199,4 \pm 9,5$, respectivamente, enquanto o grupo controle apresentou $303,1 \pm 9,8$ células aderidas. Esses dados representam uma redução aproximada de 40% na capacidade adesiva das células após o tratamento com o composto HC-A3.

6 DISCUSSÃO

A busca por novas estratégias terapêuticas contra o câncer tem se intensificado nas últimas décadas, resultando na introdução de cerca de 70 novos fármacos no arsenal oncológico (Brandão *et al.*, 2010). No entanto, os cânceres metastáticos continuam representando um dos maiores desafios clínicos, sendo responsáveis pela maioria das mortes relacionadas à doença. A metástase é um processo altamente dinâmico e assíncrono, que envolve múltiplas etapas, incluindo migração, invasão, adesão e colonização de tecidos distantes, frequentemente associado ao desenvolvimento de resistência terapêutica (Stoletov; Beatty; Lewis, 2020; Araújo *et al.*, 2024). Assim, compreender os mecanismos moleculares que regulam esses eventos é fundamental para a identificação de alvos críticos e o desenvolvimento de agentes terapêuticos mais eficazes (Klein, 2020).

A química medicinal exerce um papel fundamental no desenvolvimento de novos agentes terapêuticos, possibilitando uma constante evolução nesta área de pesquisa. Esses esforços contínuos se justificam pela necessidade de terapias mais eficazes e seletivas, bem como por novas estratégias que impeçam a progressão tumoral (Brandão *et al.*, 2010). Entre os diversos compostos estudados, a classe das chalconas tem se destacado devido à sua estrutura simples, versatilidade sintética e ampla gama de atividades biológicas, incluindo efeitos antiproliferativos e antimetastáticos (WalyEldeen *et al.*, 2023). Modificações estruturais obtidas pela introdução de diferentes substituintes, como no composto avaliado neste estudo, podem potencializar essas atividades ao influenciar propriedades físico-químicas importantes da molécula, tais como hidrofobicidade, densidade eletrônica e conformação estrutural (Mascarello, 2009).

Nesse sentido, a introdução de grupos hidroxila na estrutura das chalconas desempenha um papel importante em sua atividade quimioprotetora e anticâncer, sendo um fator determinante para o aumento de sua eficácia biológica (Birsá; Sarbu, 2023). Diversos estudos demonstram que a hidroxilação dos anéis A e/ou B contribui positivamente para as interações com alvos biológicos, aumentando a atividade citotóxica e antiproliferativa frente a células cancerosas (Lee *et al.*, 2016; Alshangiti *et al.*, 2019; Loa; Chow; Zhang, 2009). Sob essa perspectiva, os estudos conduzidos por Loa *et al.* (2009) mostraram que derivados hidroxilados de chalcona apresentaram maior eficácia na indução de parada do ciclo celular e apoptose, além de exibirem melhor desempenho na sensibilização de células tumorais a agentes terapêuticos.

Esses achados destacam a hidroxilação como uma modificação estrutural estratégica para potencializar os efeitos terapêuticos das chalconas.

Sabzevari e colaboradores (2004) destacaram a importância da presença do grupo hidroxila nos anéis A e/ou B das chalconas para sua atividade citotóxica, observando que um maior número de hidroxilas no anel A tende a reduzir o efeito citotóxico desses compostos. A chalcona hidroxilada HC-A3, avaliada no presente estudo, possui uma única hidroxila na posição para (4') do anel A, característica que pode estar relacionada à sua atividade citotóxica observada. Adicionalmente, essa atividade pode ser potencializada pela presença de um átomo de cloro na posição para (4'') do anel B, o que sugere uma contribuição sinérgica entre os grupos substituintes para o efeito biológico do composto.

Inicialmente, o perfil citotóxico do composto HC-A3 em células HSC-3 foi avaliado em diferentes tempos de tratamento por meio do ensaio de viabilidade celular utilizando o MTT. Os resultados revelaram uma redução progressiva nos valores de CI_{50} com o aumento do tempo de exposição, indicando uma atividade citotóxica dependente do tempo. Esse comportamento sugere que a exposição prolongada ao composto intensifica sua eficácia contra as células tumorais, possivelmente devido ao acúmulo intracelular da substância ou à ativação de vias de sinalização que desencadeiam processos de morte celular. Um perfil semelhante é observado em alguns quimioterápicos clinicamente utilizados, como o 5-FU e o docetaxel, que também apresentam redução nos valores de IC_{50} com o aumento do tempo de exposição em linhagens de células OSCC (Hazekawa et al., 2019).

Esses resultados são consistentes com os dados descritos por Hseu e colaboradores (2012), que observaram uma redução da viabilidade de células HSC-3 de maneira dependente do tempo e da concentração, após o tratamento com um derivado de chalcona por 24 e 48 horas. Esse perfil farmacológico é considerado vantajoso, pois sugere que os efeitos citotóxicos exercidos pelo composto podem ser mantidos mesmo em concentrações mais baixas quando administrado por períodos prolongados. Tal característica pode ser relevante em contextos terapêuticos, uma vez que a eficácia prolongada em doses reduzidas pode minimizar os efeitos adversos comumente associados a altas concentrações de agentes quimioterápicos.

Para avaliar os efeitos específicos da HC-A3 nas etapas da metástase do carcinoma espinocelular oral, foram determinadas concentrações não citotóxicas com base na curva de crescimento das células HSC-3 ao longo de 72 horas. Nesse contexto, os ensaios de exclusão

por azul de Tripán e a análise morfológica foram conduzidos como etapas preliminares essenciais, a fim de garantir que os efeitos observados nos experimentos subsequentes fossem atribuídos exclusivamente à modulação de processos metastáticos, e não à indução de morte celular causada pelo composto. Essa abordagem metodológica está em concordância com o estudo de Hseu *et al.* (2011) e Yu *et al.* (2020), que destacam a importância de distinguir entre efeitos citotóxicos diretos e a modulação específica de eventos envolvidos na metástase ao investigar a ação de compostos bioativos em células tumorais.

Os resultados do ensaio de exclusão por azul de Tripán revelaram que as concentrações de 0,25 μ M, 0,5 μ M e 1,0 μ M do composto HC-A3 não promoveram alterações significativas na viabilidade das células HSC-3 em comparação ao controle negativo. A análise morfológica por coloração panótica corroborou esses achados, demonstrando que as concentrações previamente definidas não induziram alterações morfológicas relevantes nas células. A preservação da integridade da membrana celular, evidenciada pela ausência de incorporação do corante vital, bem como a manutenção das características morfológicas típicas, incluindo a presença de figuras mitóticas, indicam que a atividade celular foi preservada (Movahhed *et al.*, 2023; Jahanifar *et al.*, 2024). Esses dados reforçam o caráter não citotóxico das concentrações selecionadas, validando sua aplicação nos ensaios subsequentes voltados à investigação de eventos metastáticos.

Além do ensaio de viabilidade celular com azul de Tripán, foi realizado o ensaio clonogênico para avaliar a capacidade das células HSC-3 em formar colônias, utilizando as mesmas concentrações previamente descritas. Esse potencial clonogênico reflete diretamente a habilidade das células cancerosas de proliferar, sobreviver, migrar e originar novas lesões, sendo um parâmetro essencial para a compreensão da progressão tumoral e da resposta a tratamentos antineoplásicos (Araújo *et al.*, 2024). Os dados obtidos após o pré-tratamento de 24 horas com HC-A3, em concentrações subcitotóxicas, demonstraram ausência de alterações significativas no número de colônias formadas em comparação ao controle negativo, indicando que, nessas condições, o composto não comprometeu a capacidade proliferativa das células nem a geração de progênie.

Em comparação com outros cânceres orais, o carcinoma de células escamosas de língua apresenta maior agressividade, proliferação acelerada e invasão mais acentuada. Devido ao suprimento sanguíneo abundante e à mobilidade da língua, essa malignidade tende a

metastatizar precocemente para os linfonodos cervicais (Shi *et al.*, 2017). A formação de metástases é um processo dinâmico que requer a saída das células cancerosas do tumor primário, sua sobrevivência na corrente sanguínea, adaptação a novos microambientes e evasão do sistema imunológico. Esse mecanismo, considerado uma das principais características do câncer, é responsável por mais de 90% das mortes relacionadas à doença. Portanto, compreender sua dinâmica é essencial para o desenvolvimento de terapias moleculares capazes de impedir ou reverter a progressão tumoral (Fares *et al.*, 2020; Bergers; Fendt, 2021).

Apesar da complexidade da metástase, a motilidade celular é uma característica comum a todas as suas fases, e a presença de mecanismos de migração está fortemente associada à progressão tumoral (Stoletov; Beatty; Lewis, 2020). No presente estudo, foi realizado um ensaio *in vitro* de migração celular com o objetivo de avaliar o efeito do composto HC-A3 sobre a motilidade das células cancerosas HSC-3. Os dados obtidos demonstraram que HC-A3, nas concentrações de 0,25 μ M, 0,5 μ M e 1,0 μ M, inibiu significativamente a migração celular em comparação ao controle negativo, após 24 e 48 horas de tratamento. De forma concordante, Seitz *et al.* (2021) demonstraram redução da atividade migratória em células de melanoma humano após o tratamento com concentrações subtóxicas de uma chalcona prenilada.

A adesão celular é uma etapa fundamental nos processos de migração e metástase, pois permite que as células tumorais interajam dinamicamente com a MEC para promover sua motilidade (Stoletov; Beatty; Lewis, 2020). A migração envolve ciclos coordenados de adesão e desadesão à MEC, cuja composição, organização e elasticidade influenciam diretamente a velocidade e a direção do movimento celular. Nesse contexto, a fibronectina destaca-se como um componente essencial, mediando interações com colágeno, lamininas e receptores de superfície celular, como as integrinas. Essas interações facilitam a adesão celular à MEC e, consequentemente, sua migração (Dzobo; Dandara, 2023).

Diante disso, foi realizado um ensaio de adesão celular para investigar o efeito do composto HC-A3 na adesão das células HSC-3 em um substrato de fibronectina. Os dados revelaram uma diferença estatisticamente significativa ($p < 0,05$) entre as células pré-tratadas por 24 horas e o controle negativo. Esses achados estão em consonância com os dados de Araújo *et al.* (2024), que investigaram o efeito antimetastático de um híbrido de chalcona sulfonamida em células metastáticas de melanoma B16-F10, constatando que a molécula interferiu em etapas primordiais da metástase, reduzindo a capacidade adesiva e migratória dessas células.

Corroborando os dados encontrados no presente estudo, a literatura descreve que derivados de chalcona podem interferir na progressão metastática de diversos tipos de câncer, sobretudo por meio da modulação de componentes moleculares e regulação de vias de sinalização associadas à motilidade e adesão celular. Chen *et al.* (2020), por exemplo, relataram que um derivado de chalcona reduziu a capacidade migratória de células de esôfago por meio do bloqueio da EMT, evidenciada pela regulação negativa de marcadores como N-caderina e Slug, além do aumento da expressão de E-caderina. De forma análoga, o estudo de Xu *et al.* (2015), evidenciou que o derivado sintético de chalcona L2H17 reduziu a migração e invasão de células de câncer de cólon, promovendo aumento da expressão de E-caderina.

Além disso, dados obtidos por Xiao *et al.* (2023), demonstraram que um derivado de chalcona foi capaz de inibir a adesão à matriz extracelular e a migração de células de câncer de próstata resistentes à castração por meio da inibição da expressão e fosforilação da cinase de adesão focal (FAK). A FAK é uma molécula reguladora central envolvida nos processos de transdução de sinal que controlam a proliferação e migração celular além de ser um componente essencial das adesões focais, estruturas importantes que conectam o citoesqueleto da célula à matriz extracelular (Kato *et al.*, 2019)

A ativação aberrante da via de sinalização WNT/ β -catenina é observada em diversos tipos de câncer e desempenha um papel fundamental nos processos de proliferação, diferenciação e metástase celular, sendo considerada a principal via envolvida no desenvolvimento do OSCC. Essa via é composta por ligantes, receptores e correceptores responsáveis pela transdução de sinais que desencadeiam uma variedade de respostas intracelulares, incluindo a regulação de proteínas de membrana relacionadas à adesão e migração celular (Zeng *et al.*, 2022). Nesse contexto, já existem relatos de que derivados de chalconas também podem interferir em eventos metastáticos por meio da modulação dessa via. Um exemplo é o estudo de Siqueira *et al.* (2021), que demonstrou que um derivado de chalcona foi capaz de reduzir a capacidade metastática de uma linhagem de carcinoma hepatocelular, promovendo a regulação positiva da proteína p53 e a inibição da via WNT/ β -catenina.

Com base nos resultados descritos, a chalcona hidroxilada HC-A3 mostra-se uma candidata promissora para novas terapias direcionadas à redução da metástase tumoral. É possível que seu efeito sobre a adesão e migração das células HSC-3 esteja relacionado à interferência em vias moleculares semelhantes às já relatadas na literatura. Contudo, estudos

adicionais são necessários para elucidar os mecanismos moleculares pelos quais o composto atua nos processos associados à metástase.

7 CONCLUSÃO

Este estudo revelou que a chalcona hidroxilada HC-A3 possui um promissor potencial antitumoral contra o carcinoma espinocelular oral. Além de reduzir a viabilidade celular de forma tempo-dependente, a HC-A3 se destacou por inibir processos críticos da metástase, como a migração e a adesão celular, mesmo em concentrações não citotóxicas. Esses resultados apontam a HC-A3 como uma candidata inovadora para terapias adjuvantes, oferecendo uma nova perspectiva no enfrentamento do câncer oral. Estudos futuros serão essenciais para aprofundar o entendimento de seus mecanismos de ação e validar sua eficácia em modelos pré-clínicos.

8 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ALSHANGITI, A. M. *et al.* 4-Hydroxychalcone induces cell death via oxidative stress in MYCN-amplified human neuroblastoma cells. **Oxidative Medicine and Cellular Longevity**, v. 2019, n. 1, p. 1670759, 2019.
- AMIN, M. M. *et al.* Design, synthesis, cytotoxic activities, and molecular docking of chalcone hybrids bearing 8-hydroxyquinoline moiety with dual tubulin/EGFR kinase inhibition. **Bioorganic Chemistry**, v. 134, p. 106444, 2023.
- ANAND, U. *et al.* Cancer chemotherapy and beyond: Current status, drug candidates, associated risks and progress in targeted therapeutics. **Genes & Diseases**, v. 10, n. 4, p. 1367-1401, 2022.
- 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.
- ARAÚJO, G. S. de *et al.* Sulfonamide-chalcone hybrid compound suppresses cellular adhesion and migration: Experimental and computational insight. **Chemico-Biological Interactions**, v. 398, p. 111115, 2024.
- BANYARD, J.; BIELENBERG, D. R. The role of EMT and MET in cancer dissemination. **Connective tissue research**, v. 56, n. 5, p. 403-413, 2015.
- BERGERS, G.; FENDT, S.-M. O metabolismo das células cancerígenas durante a metástase. **Nature Reviews Cancer** , v. 21, n. 3, p. 162-180, 2021.
- BIRSA, M. L.; SARBU, L. G. Hydroxy chalcones and analogs with chemopreventive properties. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 24, n. 13, p. 10667, 2023.
- BRANDÃO, H. N. *et al.* Chemistry and pharmacology of antineoplastic chemoterapeutical derivatives from plants. **Quimica Nova**, v. 33, p. 1359-1369, 2010.
- BUGSHAN, A.; FAROOQ, I. Oral squamous cell carcinoma: metastasis, potentially associated malignant disorders, etiology and recent advancements in diagnosis. **F1000Research**, v. 9, 2020.
- BURMAOGLU, S. *et al.* Design, synthesis and biological evaluation of novel bischalcone derivatives as potential anticancer agents. **Bioorganic Chemistry**, v. 111, p. 104882, 2021.
- BULAKOWSKA, A. *et al.* New Chalcone Derivatives Containing 2, 4-Dichlorobenzenesulfonamide Moiety with Anticancer and Antioxidant Properties. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 25, n. 1, p. 274, 2023.
- CHAMOLI, A. *et al.* Overview of oral cavity squamous cell carcinoma: Risk factors, mechanisms, and diagnostics. **Oral oncology**, v. 121, p. 105451, 2021.
- CHEN, J. *et al.* A chalcone inhibits the growth and metastasis of KYSE-4 esophageal cancer cells. **Journal of International Medical Research**, v. 48, n. 6, p. 0300060520928831, 2020.

CHEN, X. *et al.* Chalcone Derivative CX258 Suppresses Colorectal Cancer via Inhibiting the TOP2A/Wnt/ β -Catenin Signaling. **Cells**, v. 12, n. 7, p. 1066, 2023.

CHI, Q. *et al.* Migração celular direcional induzida pela contratilidade da actomiosina traseira em matrizes tridimensionais: um mecanismo de acoplamento mecânico-químico. **Journal of The Royal Society Interface**, v. 11, n. 95, p. 20131072, 2014.

CONSTANTINESCU, T.; LUNGU, C. N. Anticancer activity of natural and synthetic chalcones. **International journal of molecular sciences**, v. 22, n. 21, p. 11306, 2021.

JANDIAL, D. D. *et al.* Molecular targeted approaches to cancer therapy and prevention using chalcones. **Current cancer drug targets**, v. 14, n. 2, p. 181-200, 2014.

DE MELLO, T. F. P. *et al.* Leishmanicidal activity of synthetic chalcones in *Leishmania (Viannia) braziliensis*. **Experimental Parasitology**, v. 136, p. 27-34, 2014.

DELGADO, M.-G.; LENNON-DUMÉNIL, A.-M. How cell migration helps immune sentinels. **Frontiers in Cell and Developmental Biology**, v. 10, p. 932472, 2022.

DEMICHELI, R. *et al.* The effects of surgery on tumor growth: a century of investigations. **Annals of oncology**, v. 19, n. 11, p. 1821-1828, 2008.

DHALIWAL, J. S. *et al.* Pharmacotherapeutics applications and chemistry of chalcone derivatives. **Molecules**, v. 27, n. 20, p. 7062, 2022.

DZOBO, K.; DANDARA, C. The extracellular matrix: its composition, function, remodeling, and role in tumorigenesis. **Biomimetics**, v. 8, n. 2, p. 146, 2023.

EL-ATAWY, M. A. *et al.* Synthesis, Characterization, Antioxidant, and Anticancer Activity against Colon Cancer Cells of Some Cinnamaldehyde-Based Chalcone Derivatives. **Biomolecules**, v. 14, n. 2, p. 216, 2024.

FARES, J. *et al.* Molecular principles of metastasis: a hallmark of cancer revisited. **Signal transduction and targeted therapy**, v. 5, n. 1, p. 28, 2020.

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.

FOLKMAN, J. Role of angiogenesis in tumor growth and metastasis. In: **Seminars in oncology**. WB Saunders, 2002. p. 15-18.

FREITAS, J. T.; JOZIC, I.; BEDOGNI, B. Wound healing assay for melanoma cell migration. **Melanoma: Methods and Protocols**, p. 65-71, 2021.

GERSTBERGER, S.; JIANG, Q.; GANESH, K. Metastasis. **Cell**, v. 186, n. 8, p. 1564-1579, 2023.

GOMES, M. N. *et al.* Chalcone derivatives: promising starting points for drug design. **Molecules**, v. 22, n. 8, p. 1210, 2017.

GONÇALVES, J. C. R.; SOBRAL, M. V. **Cultivo de células: da teoria à bancada**. João Pessoa: Editora UFPB, 2020.

GOU, Q.; ZHENG, L.-L.; HUANG, H. Unravelling the roles of Autophagy in OSCC: A renewed perspective from mechanisms to potential applications. **Frontiers in Pharmacology**, v. 13, p. 994643, 2022.

GUIDO, R. V. C.; ANDRICOPULO, A. D.; OLIVA, G. Planejamento de fármacos, biotecnologia e química medicinal: aplicações em doenças infecciosas. **Estudos avançados**, v. 24, p. 81-98, 2010.

HAMMAD, A. S.; MACHACA, K. Store operated calcium entry in cell migration and cancer metastasis. **Cells**, v. 10, n. 5, p. 1246, 2021.

HANAHAN, D. Hallmarks of cancer: new dimensions. **Cancer discovery**, v. 12, n. 1, p. 31-46, 2022.

HANAHAN, D.; WEINBERG, R. A. Hallmarks of cancer: the next generation. **cell**, v. 144, n. 5, p. 646-674, 2011.

HAZEKAWA, M. *et al.* Evaluation of IC50 levels immediately after treatment with anticancer reagents using a real-time cell monitoring device. **Experimental and therapeutic medicine**, v. 18, n. 4, p. 3197-3205, 2019.

HOVAV, A.-H.; WILENSKY, A. The role of the epithelial sentinels, Langerhans cells and $\gamma\delta$ T cells, in oral squamous cell carcinoma. **Periodontology 2000**, 2024.

HSEU, Y.-C. *et al.* Chalcone flavokawain B induces G2/M cell cycle arrest and apoptosis in human oral carcinoma HSC-3 cells via intracellular ROS generation and downregulation of the Akt/p38 MAPK signaling pathway. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 60, n. 9, p. 2385-2397, 2012.

HSEU, Y.-C. *et al.* Inhibitory effects of *Physalis angulata* on tumor metastasis and angiogenesis. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 135, n. 3, p. 762-771, 2011.

HUANG, S. *et al.* CHRDL1 inhibits OSCC metastasis via MAPK signaling-mediated inhibition of MED29. **Molecular Medicine**, v. 30, n. 1, p. 187, 2024.

HUMPHRIES, M. J. Cell adhesion assays. **Extracellular Matrix Protocols: Second Edition**, p. 203-210, 2009.

HUO, T. *et al.* Late-stage modification of bioactive compounds: Improving druggability through efficient molecular editing. **Acta Pharmaceutica Sinica B**, v. 14, n. 3, p. 1030-1076, 2024.

INTERNATIONAL AGENCY FOR RESEARCH ON CANCER - IARC. **Global cancer burden growing, amidst mounting need for services**. [S. l.], 2024. Disponível em: <https://www.paho.org/en/news/1-2-2024-global-cancer-burden-growing-amidst-mounting->

need-services. Acesso em: 2 dez. 2024.

JAHANIFAR, M. *et al.* Mitosis detection, fast and slow: robust and efficient detection of mitotic figures. **Medical Image Analysis**, v. 94, p. 103132, 2024.

JUNQUEIRA, L; CARNEIRO, J. *Biologia Celular e Molecular*. 9.ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2012.

KLEIN, C. A. Cancer progression and the invisible phase of metastatic colonization. **Nature Reviews Cancer**, v. 20, n. 11, p. 681-694, 2020.

KRALJEVIC PAVELIC, S. *et al.* Metastasis: new perspectives on an old problem. **Molecular cancer**, v. 10, p. 1-14, 2011.

KUMAR, V. *et al.* Recent advances in chalcone-based anticancer heterocycles: A structural and molecular target perspective. **Current Medicinal Chemistry**, v. 28, n. 33, p. 6805-6845, 2021.

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

LEITE, F. F. *et al.* Anticancer activity of chalcones and its derivatives: review and in silico studies. **Molecules**, v. 28, n. 10, p. 4009, 2023.

LINTZ, M.; MUÑOZ, A.; REINHART-KING, C. A. The mechanics of single cell and collective migration of tumor cells. **Journal of biomechanical engineering**, v. 139, n. 2, p. 021005, 2017.

LIU, C.-Y. *et al.* Vimentin contributes to epithelial-mesenchymal transition cancer cell mechanics by mediating cytoskeletal organization and focal adhesion maturation. **Oncotarget**, v. 6, n. 18, p. 15966, 2015.

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

MA, N. *et al.* Rac1: A regulator of cell migration and a potential target for cancer therapy. **Molecules**, v. 28, n. 7, p. 2976, 2023.

MA, Y. *et al.* Fli-1 activation through targeted promoter activity regulation using a novel 3', 5'-diprenylated chalcone inhibits growth and metastasis of prostate cancer cells. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 21, n. 6, p. 2216, 2020.

MAJIDPOOR, J.; MORTEZAEI, K. Steps in metastasis: an updated review. **Medical Oncology**, v. 38, n. 1, p. 3, 2021.

MASCARELLO, A. *et al.* Síntese e estudos da relação estrutura-atividade de chalconas biologicamente ativas em células de melanoma B16-F10 e na PtpA de *Mycobacterium tuberculosis*. 2009.

MASSAGUÉ, J.; OBENAU, A. C. Metastatic colonization by circulating tumour cells. **Nature**, v. 529, n. 7586, p. 298-306, 2016.

MCCORD, C. *et al.* Oral squamous cell carcinoma associated with precursor lesions. **Cancer Prevention Research**, v. 14, n. 9, p. 873-884, 2021.

MIROSSAY, L.; VARINSKÁ, L.; MOJŽIŠ, J. Antiangiogenic effect of flavonoids and chalcones: An update. **International journal of molecular sciences**, v. 19, n. 1, p. 27, 2017.

MOREIRA, J. *et al.* Chalcones as promising antitumor agents by targeting the p53 pathway: An overview and new insights in drug-likeness. **Molecules**, v. 26, n. 12, p. 3737, 2021.

MOSMANN, T. Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: application to proliferation and cytotoxicity assays. **Journal of immunological methods**, v. 65, n. 1-2, p. 55-63, 1983.

MOVAHHED, M. *et al.* Anti-metastatic effect of taraxasterol on prostate cancer cell lines. **Research in Pharmaceutical Sciences**, v. 18, n. 4, p. 439-448, 2023.

MPHAHLELE, M. J. *et al.* Design, synthesis and evaluation of the 2'-hydroxy-3'-iodo-5'-nitrochalcones for cytotoxicity (MCF-7 & A549) and potential to inhibit tyrosine kinase (VEGFR-2) activity. **Journal of Molecular Structure**, v. 1305, p. 137785, 2024.

NAM, N.-H. *et al.* Cytotoxic 2', 5'-dihydroxychalcones with unexpected antiangiogenic activity. **European journal of medicinal chemistry**, v. 38, n. 2, p. 179-187, 2003.

NAVARINI, A. L. F. *et al.* Hydroxychalcones induce apoptosis in B16-F10 melanoma cells via GSH and ATP depletion. **European journal of medicinal chemistry**, v. 44, n. 4, p. 1630-1637, 2009.

ORGANIZAÇÃO MUNDIAL DE SAÚDE. **Câncer**. [S. l.], 3 fev. 2022. Disponível em: <https://www.who.int/news-room/fact-sheets/detail/cancer>. Acesso em: 2 dez. 2024.

OUYANG, Y. *et al.* Chalcone derivatives: role in anticancer therapy. **Biomolecules**, v. 11, n. 6, p. 894, 2021.

PASCUSI, J.-M. *et al.* Bases fondamentales du processus métastatique. **Bulletin du Cancer**, v. 103, n. 6, p. S39-S47, 2016.

PEARSON, G. W. Control of invasion by epithelial-to-mesenchymal transition programs during metastasis. **Journal of clinical medicine**, v. 8, n. 5, p. 646, 2019.

PUCK, T. T.; MARCUS, P. I.; CIECIURA, S. J. Clonal growth of mammalian cells in vitro: growth characteristics of colonies from single HeLa cells with and without a "feeder" layer. **The Journal of experimental medicine**, v. 103, n. 2, p. 273-284, 1956.

- RUDRAPAL, M. *et al.* Chalcone scaffolds, bioprecursors of flavonoids: Chemistry, bioactivities, and pharmacokinetics. **Molecules**, v. 26, n. 23, p. 7177, 2021.
- SABZEVARI, O.; GALATI, G. *et al.* Molecular cytotoxic mechanisms of anticancer hydroxychalcones. *Chemico-Biological Interactions*, 148, 57-67, 2004.
- SAITO, Y. *et al.* 5'-Chloro-2, 2'-dihydroxychalcone and related flavanoids as treatments for prostate cancer. **European journal of medicinal chemistry**, v. 157, p. 1143-1152, 2018.
- SATOKATA, A. A. C. *et al.* Chalcones with potential antibacterial and antibiofilm activities against periodontopathogenic bacteria. **Anaerobe**, v. 76, p. 102588, 2022.
- SAXENA, K.; JOLLY, M. K.; BALAMURUGAN, K. Hypoxia, partial EMT and collective migration: Emerging culprits in metastasis. **Translational oncology**, v. 13, n. 11, p. 100845, 2020.
- SEITZ, T. *et al.* Xanthohumol, a prenylated chalcone derived from hops, inhibits growth and metastasis of melanoma cells. **Cancers**, v. 13, n. 3, p. 511, 2021.
- SENGUPTA, S.; PARENT, C. A.; BEAR, J. E. The principles of directed cell migration. **Nature Reviews Molecular Cell Biology**, v. 22, n. 8, p. 529-547, 2021.
- SHI, Y. *et al.* Isobavachalcone inhibits the proliferation and invasion of tongue squamous cell carcinoma cells. **Oncology letters**, v. 14, n. 3, p. 2852-2858, 2017.
- SÖKMEN, M.; AKRAM KHAN, M. The antioxidant activity of some curcuminoids and chalcones. **Inflammopharmacology**, v. 24, p. 81-86, 2016.
- STEEG, Patricia S. Targeting metastasis. **Nature reviews cancer**, v. 16, n. 4, p. 201-218, 2016.
- STEEG, P. S. Tumor metastasis: mechanistic insights and clinical challenges. **Nature medicine**, v. 12, n. 8, p. 895-904, 2006.
- STOLETOV, K.; BEATTY, P. H.; LEWIS, J. D. Novel therapeutic targets for cancer metastasis. **Expert review of anticancer therapy**, v. 20, n. 2, p. 97-109, 2020.
- SUHAIL, Y. *et al.* Systems biology of cancer metastasis. **Cell systems**, v. 9, n. 2, p. 109-127, 2019.
- SUN, M. *et al.* Angiogenesis, anti-tumor, and anti-metastatic activity of novel α -substituted hetero-aromatic chalcone hybrids as inhibitors of microtubule polymerization. **Frontiers in Chemistry**, v. 9, p. 766201, 2021.
- UR RASHID, H. *et al.* Promising anti-inflammatory effects of chalcones via inhibition of cyclooxygenase, prostaglandin E2, inducible NO synthase and nuclear factor kb activities. **Bioorganic Chemistry**, v. 87, p. 335-365, 2019.
- VAROTSOS VRYNAS, A. *et al.* Arresting metastasis within the microcirculation. **Clinical & Experimental Metastasis**, v. 38, n. 4, p. 337-342, 2021.

VÁSQUEZ-MARTÍNEZ, Y. A. *et al.* Antimicrobial, anti-inflammatory and antioxidant activities of polyoxygenated chalcones. **Journal of the Brazilian Chemical Society**, v. 30, n. 2, p. 286-304, 2019.

VERLI, H.; BARREIRO, E. J. Um paradigma da química medicinal: a flexibilidade dos ligantes e receptores. **Química nova**, v. 28, p. 95-102, 2005.

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, 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.

XIAO, H. *et al.* Chalcone Derivatives Suppress Proliferation and Migration of Castration-resistant Prostate Cancer Cells Through FAK-mediated DNA Damage. **Anticancer Research**, v. 43, n. 1, p. 389-403, 2023.

XU, S. *et al.* Chemopreventive effect of the chalcone derivative, L2H17, on the development of colon cancer. **Câncer BMC**, v. 15, p. 1-14, 2015.

YADAV, V. R. *et al.* The role of chalcones in suppression of NF- κ B-mediated inflammation and cancer. **International immunopharmacology**, v. 11, n. 3, p. 295-309, 2011.

YAYAN, J. *et al.* Adhesion, metastasis, and inhibition of cancer cells: a comprehensive review. **Molecular biology reports**, v. 51, n. 1, p. 165, 2024.

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.

ZANOTELLI, M. R.; ZHANG, J.; REINHART-KING, C. A. Mechanoresponsive metabolism in cancer cell migration and metastasis. **Cell metabolism**, v. 33, n. 7, p. 1307-1321, 2021.

ZEESHAN, R.; MUTAHIR, Z. Cancer metastasis-tricks of the trade. **Bosnian journal of basic medical sciences**, v. 17, n. 3, p. 172, 2017.

ZHUANG, C. *et al.* Chalcone: a privileged structure in medicinal chemistry. **Chemical reviews**, v. 117, n. 12, p. 7762-7810, 2017.