



UNIVERSIDADE FEDERAL DO DELTA DO PARNAÍBA
BACHARELADO EM BIOMEDICINA

BENEDITO DOS SANTOS ALVES

**CHALCONA DO TIPO TERPENÓIDE INIBE ETAPAS-CHAVE DA
PROGRESSÃO METASTÁTICA *IN VITRO* EM CÉLULAS DE
ADENOCARCINOMA COLORRETAL**

PARNAÍBA - PI

2025

BENEDITO DOS SANTOS ALVES

**CHALCONA DO TIPO TERPENÓIDE INIBE ETAPAS-CHAVE DA
PROGRESSÃO METASTÁTICA *IN VITRO* EM CÉLULAS DE
ADENOCARCINOMA COLORRETAL**

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 Bacharel em Biomedicina.

Orientadora: Prof.^a Dr.^a Ana Jérsia Araújo.

Parnaíba - PI

2025

FICHA CATALOGRÁFICA
Universidade Federal do Delta do Parnaíba

A474c Alves, Benedito dos Santos

Chalcona do tipo terpenóide inibe etapas-chave da progressão metastática *in vitro* em células de adenocarcinoma colorretal [recurso eletrônico] / Benedito dos santos Alves. – 2025.

62 p.

TCC (Bacharelado em Ciências Biomedicina) – Universidade Federal do Delta do Parnaíba, 2025.

Orientação: Prof^a. Dr^a. Ana Jérsia Araújo.

1. Câncer colorretal. 2. Chalcona tipo terpenóide. 3. Viabilidade celular. 4. Metástase. I. Araújo, Ana Jérsia. II. Título.

CDD: 616.994

BENEDITO DOS SANTOS ALVES

**CHALCONA DO TIPO TERPENÓIDE INIBE ETAPAS-CHAVE DA
PROGRESSÃO METASTÁTICA *IN VITRO* EM CÉLULAS DE
ADENOCARCINOMA COLORRETAL**

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 Bacharel em Biomedicina.

Aprovado em 02 de julho de 2025.

BANCA EXAMINADORA

Prof.^a Dr.^a Ana Jérsia Araújo (Orientadora)

Universidade Federal do Delta do Parnaíba

Prof.^a Dr.^a France Keiko Nascimento Yoshioka

Universidade Federal do Delta do Parnaíba

Dr.^a Jessica Maria Teles Souza

Universidade Federal do Delta do Parnaíba

Aos meus pais, que, com muito empenho e amor, deram a mim todas as oportunidades que lhes foram negadas pela vida.

AGRADECIMENTOS

Agradeço à minha família pelo amor, compreensão e apoio incondicional. À minha mãe, **Maria do Livramento**, por ser um exemplo de força, profissionalismo, dedicação, cuidado e carinho. A meu pai, **Ronaldo Alves**, por me mostrar que inteligência, humildade e responsabilidade andam juntas. Gostaria de agradecer a ambos por sempre terem acreditado em mim e por me ensinarem que o conhecimento pode mudar vidas. Agradeço também à **Melissa** e ao **Frederico**, por serem, mesmo à distância, minha dose diária de serotonina. Como dizem os poetas, vocês fazem parte da minha alma. Sou grato por cada gesto de apoio, por entenderem minha ausência e por permanecerem ao meu lado, mesmo quando a distância se fez presente. A vocês, minha eterna gratidão.

À minha orientadora, **Prof.^a Dr.^a Ana Jérsia**, por acreditar em meu potencial, me orientar no mundo da pesquisa e por sempre ser tão paciente, mesmo nos puxões de orelha. Obrigado pelos conhecimentos compartilhados, pelas críticas, sugestões e conselhos que levarei para vida. Gostaria de agradecer também ao **Prof. Dr. José Delano**, coordenador do grupo de pesquisa, por todas as dicas, hipóteses e conhecimentos transmitidos.

À toda equipe do Laboratório de Cultura de Células do Delta, por terem sido a melhor equipe que eu poderia escolher. Agradeço a **Rodrigo Elísio**, por ser um pesquisador incomparável, digno de toda admiração. Obrigado pelas sugestões, ponderações e ideias no desenvolvimento deste estudo. À **Jéssica Teles, Fabrício Machado, Gisele Araújo, Fernanda Iris, Matheus Pedrosa, Rafaela Ribeiro, Rebeca Barbosa, Dakson Douglas e Stéphanie Matos** por toda paciência e conhecimentos compartilhados. Aos meus colegas de iniciação científica, que se tornaram amigos queridos, em especial **Naiane Penha**, por compartilhar comigo, desde o início, as dores e os sabores da carreira científica. A todos que compõem o LCC Delta, pelos bons momentos, pelas risadas e pelas conversas profundas. O cotidiano fica menos cansativo quando se tem pessoas como vocês por perto.

Àquelas que, junto a mim, compõem um quarteto poderoso, **Bianca Dourado, Lara Emily e Karoliny Chaves**, por estarem ao meu lado em todos os momentos da graduação. Tenho vocês como inspiração profissional, pois sei que todas serão biomédicas excepcionais. Só tenho a agradecer por todas as risadas, surtos e conselhos. Você們 estão marcadas em minha memória para sempre.

Aos amigos que fizeram parte dessa trajetória, de forma direta ou indireta, por me lembrarem que também sou humano. Meus mais sinceros agradecimentos à **Marina Véras, Gabriela Marta, Jessiane Cruz, Shayanne Rodrigues, Jayane Sousa, Yale Guimarães**,

Benjamin Oliveira, Ismael Eurico, Manuele Lima e Vitória Maria. Obrigado pela parceria, pelas risadas e por acreditarem em meu potencial mais do que eu poderia sonhar. Vocês são pessoas incríveis e guardarei todas as nossas lembranças com muito carinho, as que construímos e as que ainda iremos construir.

Aos professores que contribuíram para minha formação ao longo desses anos de graduação, por todos os conhecimentos, ensinamentos, palavras de apoio e incentivo. Vocês foram essenciais nessa caminhada.

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

Agradeço à **Universidade Federal do Delta do Parnaíba**, bem como às agências de fomento, **CAPES** e **CNPq**, pelo apoio ao desenvolvimento da pesquisa, em especial ao apoio financeiro.

Em toda essa jornada, conheci seres humanos incríveis que influenciaram a pessoa e o profissional que sou hoje. Gostaria de expressar meus mais sinceros agradecimentos àqueles que não foram citados aqui, mas que contribuíram de forma significativa para o sucesso dessa caminhada. Concordo com Carla Madeira: Há certo milagre nos encontros. Por isso, sou extremamente grato pelos encontros que o destino me concedeu até aqui, bem como pelos encontros que ainda estão por vir.

RESUMO

O câncer colorretal (CCR) está entre os tipos de neoplasias mais incidentes em todo o mundo, apresentando prognóstico desfavorável, sobretudo devido à elevada taxa de metástases, principal causa de morbidade e mortalidade entre os pacientes. Diante disso, cresce o interesse na busca por novas moléculas com potencial para interferir na disseminação das células tumorais. Neste contexto, a síntese de compostos baseada em produtos naturais surge como uma abordagem estratégica, permitindo a modificação racional de estruturas bioativas para potencializar seus efeitos terapêuticos e ampliar sua aplicabilidade farmacológica. Chalconas e ionona têm se destacado por apresentarem diversas propriedades biológicas, incluindo atividade anticâncer. Com base nessa perspectiva, o presente trabalho teve como objetivo investigar o efeito citotóxico, antimigratório e antiadesivo de uma chalcona do tipo terpenóide (BR4Cl), resultante da combinação estrutural de chalcona e ionona, em células de adenocarcinoma colorretal humano (SW-480). Inicialmente, a atividade citotóxica de BR4Cl foi avaliada pelo ensaio de MTT, revelando valores de IC_{50} de 12,44 μ M, 4,62 μ M e 3,64 μ M, após 24, 48 e 72 horas de tratamento, respectivamente. A partir da curva de crescimento celular de 24 horas, foram estabelecidas as concentrações subcitotóxicas de 0,05 μ M e 0,10 μ M para os ensaios de adesão e migração celular. A viabilidade celular frente a essas concentrações foi confirmada pelos ensaios de exclusão com azul de Tripan e análise morfológica por panótico rápido, não sendo observadas alterações significativas após 24 horas de exposição. No ensaio clonogênico, BR4Cl não reduziu significativamente o número ou área das colônias formadas. Por outro lado, o ensaio de migração celular demonstrou que BR4Cl, nas concentrações testadas, inibiu de maneira significativa a migração das células SW-480 após 24 e 48 horas de tratamento. Adicionalmente, o ensaio de adesão celular indicou que BR4Cl promoveu uma redução significativa na adesão das células à fibronectina, com inibições de 32,68% e 44,16% para 0,05 μ M e 0,10 μ M, respectivamente, após pré-tratamento de 24 horas. Dessa forma, os dados obtidos indicam que BR4Cl apresenta potencial citotóxico frente ao CCR e é capaz de interferir em etapas cruciais da progressão metastática, como migração e adesão celular, em testes *in vitro*. No entanto, estudos adicionais são necessários para elucidar os mecanismos moleculares subjacentes a esses efeitos e avançar na avaliação do seu potencial terapêutico.

Palavras-chave: Câncer colorretal; Chalcona tipo terpenóide; Viabilidade celular; Metástase.

ABSTRACT

Colorectal cancer (CRC) is among the most prevalent types of neoplasms worldwide and presents an unfavorable prognosis, mainly due to its high rate of metastasis, the leading cause of morbidity and mortality among patients. In this context, there is increasing interest in identifying new molecules capable of interfering with tumor cell dissemination. Within this framework, the synthesis of compounds based on natural products has become a strategic approach, allowing for the rational modification of bioactive structures to enhance their therapeutic effects and expand their pharmacological applicability. Chalcones and ionones have been highlighted for presenting several biological properties, including anticancer activity. Based on this perspective, the present study aimed to investigate the cytotoxic, antimigratory, and anti-adhesive effects of a terpenoid-like chalcone (BR4Cl), resulting from the structural combination of chalcone and ionone, in human colorectal adenocarcinoma cells (SW-480). Initially, the cytotoxic activity of BR4Cl was evaluated using the MTT assay, revealing IC_{50} values of 12.44 μ M, 4.62 μ M, and 3.64 μ M after 24, 48, and 72 hours of treatment, respectively. Based on the 24-hour cell viability curve, subcytotoxic concentrations of 0.05 μ M and 0.10 μ M were established for cell adhesion and migration assays. Cell viability at these concentrations was confirmed by Trypan blue exclusion and morphological analysis using fast panoptic staining, with no significant alterations observed after 24 hours of exposure. In the clonogenic assay, BR4Cl did not significantly reduce the number or area of the colonies formed. On the other hand, the cell migration assay demonstrated that BR4Cl, at the tested concentrations, significantly inhibited the migration of SW-480 cells after 24 and 48 hours of treatment. Additionally, the cell adhesion assay indicated that BR4Cl significantly reduced cell adhesion to fibronectin, with inhibitions of 32.68% and 44.16% for 0.05 μ M and 0.10 μ M, respectively, after 24 hours of pretreatment. Taken together, these findings indicate that BR4Cl exhibits cytotoxic potential against CRC and is capable of interfering with critical steps in metastatic progression, such as cell migration and adhesion, *in vitro*. However, further studies are needed to elucidate the molecular mechanisms underlying these effects and to advance the evaluation of its therapeutic potential.

Keywords: Colorectal cancer; Terpenoid-like chalcone; Cell viability; Metastasis.

LISTA DE SÍMBOLOS E ABREVIATURAS

5-FU	5-Fluorouracil
BMP	<i>Bone Morphogenetic Protein</i> (Proteína Morfogenética Óssea)
CCR	Câncer Colorretal
CFA	<i>Colony Formation Assay</i> (Ensaio de formação de colônias)
CI₅₀	Concentração Inibitória Média
DMEM	<i>Dulbecco's Modified Eagle Medium</i>
DMSO	Dimetilsulfóxido
DOX	Doxorrubicina
EMT	<i>Epithelial-Mesenchymal Transition</i> (Transição Epitelial Mesenquimal)
FAK	<i>Focal Adhesion Kinase</i> (Cinase de adesão focal)
IC	Intervalo de Confiança
MEC	Matriz Extracelular
mTOR	<i>Mammalian Target of Rapamycin</i> (Alvo da Rapamicina em Mamíferos)
MTT	<i>3-(4,5-dimetil-2-tiazol)-2,5-difenil-brometo de tetrazolium</i>
NF-κB	<i>Nuclear Factor-κB</i> (Fator Nuclear-κB)
PBS	<i>Phosphate Buffer Solution</i> (Tampão Fosfato)
RTK	<i>Receptor Tyrosine Kinase</i> (Receptor de Tirosina Quinase)
SFB	Soro Fetal Bovino
TGF-β	<i>Transforming Growth Factor Beta</i> (Fator de Crescimento Transformador Beta)

LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Perfil citotóxico de BR4Cl em comparação à doxorrubicina frente à linhagem celular de câncer colorretal SW-480 pelo ensaio do MTT após 24, 48 e 72 h de incubação.....	38
---	----

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Características do câncer - representação atual.....	14
Figura 2. Representação esquemática da cascata metastática.....	16
Figura 3. Representação da ativação do Programa de Transição Epitelial-Mesenquimal (EMT).....	17
Figura 4. Representação da migração celular por lamelipódios e filopódios.....	22
Figura 5. Representação estrutural dos isômeros de chalconas.....	23
Figura 6. Delineamento experimental do estudo.....	29
Figura 7. Estrutura química da chalcona do tipo terpenoide (BR4Cl) utilizada no estudo.....	30
Figura 8. Curva de viabilidade celular de células SW-480 determinado pelo ensaio do MTT após 24 horas de incubação com BR4Cl.....	39
Figura 9. Efeito de BR4Cl na viabilidade de SW-480 determinado pelo ensaio por exclusão de azul de Tripan após 24 horas de tratamento.....	40
Figura 10. Avaliação morfológica de células SW-480 após 24 horas de tratamento com BR4Cl, realizada com a coloração panótico rápido.....	41
Figura 11. Efeito de BR4Cl sobre a formação de colônias em células tumorais SW-480 após 24 horas de tratamento.....	42
Figura 12. Efeito de BR4Cl sobre o potencial migratório de células SW-480.....	43
Figura 13. Efeito de BR4Cl sobre a adesão de células SW-480 à fibronectina	44

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	12
2 REFERENCIAL TEÓRICO	14
2.1 Aspectos gerais do câncer colorretal e metástase	14
2.2 Mecanismos de migração e adesão celular	19
2.3 Chalconas	23
2.4 Chalconas tipo terpenoide.....	25
3 OBJETIVOS	28
3.1 Objetivo geral.....	28
3.2 Objetivos específicos.....	28
4 METODOLOGIA.....	29
4.1 Delineamento experimental	29
4.2 Obtenção da amostra.....	29
4.3 Ensaio de redução do MTT.....	30
4.4 Ensaio de exclusão do azul de Tripán.....	31
4.5 Análise morfológica por coloração com panótico rápido.....	32
4.6 Ensaio clonogênico.....	33
4.7 Ensaio de migração celular – <i>Scratch assay</i>	34
4.8 Ensaio de adesão em fibronectina	36
5 RESULTADOS	38
5.1 Ensaio de redução do MTT	38
5.2 Ensaio de exclusão do azul de Tripán.....	39
5.3 Análise morfológica por coloração com panótico rápido.....	40
5.4 Ensaio clonogênico.....	41
5.5 Ensaio de migração celular – <i>Scratch assay</i>	42
5.6 Ensaio de adesão em fibronectina	44
6 DISCUSSÃO	45
7 CONCLUSÃO.....	51
REFERÊNCIAS.....	52

1 INTRODUÇÃO

O câncer é uma doença multifatorial caracterizada pelo crescimento celular desordenado e por gênese e progressão complexas, afetando milhões de pessoas em todo o mundo (Ouyang *et al.*, 2021). No Brasil, o Instituto Nacional do Câncer (INCA) estima aproximadamente 704 mil novos casos da doença entre os anos de 2023 e 2025 (INCA, 2022). O desenvolvimento do câncer ocorre por meio de múltiplas etapas que resultam em alterações na arquitetura tecidual, sendo essas mudanças decorrentes de modificações genéticas induzidas por fatores como envelhecimento, exposição a agentes químicos mutagênicos e radiação ionizante (Feitelson *et al.*, 2015; Takeshima; Ushijima, 2019).

O câncer colorretal é o terceiro tipo de câncer mais frequente no mundo, com aproximadamente 1,8 milhões de novos casos e mais de 860 mil mortes registradas anualmente, configurando-se como um sério problema de saúde pública (INCA, 2022; Dosunmu; Shergill, 2024). Essa neoplasia tem origem no acúmulo de mutações genéticas nas células do intestino grosso, promovendo a transição de lesões benignas para malignas ao longo do tempo (Li *et al.*, 2024). Embora intervenções terapêuticas como cirurgia e quimioterapia estejam disponíveis, um número expressivo de pacientes evolui para quadros metastáticos, o que compromete o prognóstico e frequentemente leva ao óbito (Ahmad *et al.*, 2021).

A metástase consiste na disseminação de células cancerosas do tumor primário para órgãos ou tecidos distantes, por meio da corrente sanguínea ou linfática (Keum; Giovannucci, 2019). Esse processo representa a principal causa de mortalidade entre pacientes com câncer, superando os óbitos decorrentes do tumor primário (Gerstberger; Jiang; Ganesh, 2023). Durante a cascata metastática, as células tumorais invadem o parênquima tecidual adjacente, penetram nos vasos sanguíneos ou linfáticos e, assim, adquirem a capacidade de migrar para locais distantes. Posteriormente, essas células extravasam da vasculatura e colonizam tecidos secundários, originando micrometástases que, com o tempo, evoluem para metástases clinicamente detectáveis (Zeeshan; Mutahir, 2017; Lambert; Pattabiraman; Weinberg, 2017; Li *et al.*, 2024).

A busca por novas moléculas capazes de inibir a progressão tumoral continua sendo um dos principais desafios no combate ao câncer. Nesse contexto, os produtos naturais, especialmente as chalconas, têm se destacado como fontes promissoras de compostos bioativos,

em razão de sua estrutura química versátil (Dias *et al.*, 2013). As chalconas, amplamente encontradas em produtos naturais, apresentam diversas atividades biológicas, incluindo propriedades anti-inflamatórias, antioxidantes, antimicrobianas e anticâncer (Lai *et al.*, 2023; Ouyang *et al.*, 2021). No entanto, seu amplo espectro de ação pode levar a interações irreversíveis com macromoléculas biológicas, potencialmente resultando em efeitos adversos. Nesse sentido, a modificação química da estrutura básica dessas chalconas tem se mostrado uma estratégia promissora para reduzir sua reatividade, contribuindo para o desenvolvimento de derivados com melhor perfil farmacológico e potencial aplicação clínica (Gomes *et al.*, 2017; Zhou; Xing, 2015; Amslinger *et al.*, 2013).

As chalconas terpenoides, ou chalconas semelhantes a terpenoides, são compostos híbridos formados pela combinação dos esqueletos de chalconas e ionona (Lima *et al.*, 2019). A β -ionona, por sua vez, é um composto terpenoide cílico presente na estrutura de moléculas biologicamente relevantes, como o ácido retinoico, β -caroteno e vitamina A (Custodio *et al.*, 2021). Enquanto os terpenos são hidrocarbonetos simples, os terpenoides correspondem a formas modificadas desses compostos, caracterizadas pela presença de diferentes grupos funcionais e grupos metil oxidados. Tais modificações estruturais conferem aos terpenoides uma variedade de propriedades biológicas, incluindo atividade anticâncer (Manoel *et al.*, 2022). Nesse contexto, estudos têm demonstrado que chalconas associadas a estruturas de iononas podem apresentar diversas atividades biológicas, como efeitos antiandrogênicos, antimicrobianos e antiproliferativos (Silva *et al.*, 2021).

À luz do exposto, o presente estudo tem como objetivo avaliar, *in vitro*, o efeito de um derivado de chalcona tipo terpenoide (BR4Cl), o qual apresenta um átomo de cloro como substituinte halogênico na posição *para* em sua estrutura química, sobre os processos envolvidos na metástase, utilizando a linhagem celular de adenocarcinoma colorretal SW-480.

2 REFERENCIAL TEÓRICO

2.1 Aspectos gerais do câncer colorretal e metástase

O câncer é uma doença complexa, considerada uma das principais causas de morte em todo o mundo, em que grupos celulares crescem de forma anormal e desordenada (WalyEldeen *et al.*, 2023). Nos tecidos normais, têm-se o controle da produção e da liberação de sinais de crescimento, que orientam a progressão do ciclo celular e a divisão das células, assegurando a homeostase do número de células e a manutenção fisiológica dos tecidos (Hanahan; Weinberg, 2011). Em tecidos cancerosos, com a aquisição de características malignas, as células passam a apresentar um conjunto de capacidades funcionais, que as adaptam para o surgimento do tumor maligno (Hanahan, 2022).

Essas capacidades funcionais surgem de mudanças dinâmicas no genoma celular, que incitam a transformação progressiva de células normais para células malignas. As alterações genéticas podem ocorrer de modo a produzirem oncogenes com ganho dominante de função e genes supressores de tumor com perda recessiva de função, ambos levando ao fenótipo canceroso (Hanahan; Weinberg, 2000). Assim, por meio dessas mutações, as células cancerosas são capazes de sustentar a sinalização para proliferação, evitar supressores de crescimento, escapar da morte celular, adquirir imortalidade replicativa, reprogramar seu metabolismo e iniciar o processo de invasão e metástase (Hanahan, 2022) (Figura 1).

Figura 1. Características do câncer - representação atual.



Fonte: Adaptado de Hanahan (2022).

O câncer colorretal é a quarta causa principal de morte por câncer no mundo, correspondendo a cerca de 9,2% das mortes por câncer em todo globo (Li *et al.*, 2021). Comparado aos demais tipos de câncer, é considerado o segundo câncer mais comum na população feminina e o terceiro mais comum na população masculina, com maior incidência nesta última população (Dekker *et al.*, 2019). A maioria dos casos de câncer colorretal trata-se de adenocarcinomas, os quais originam-se a partir de células epiteliais glandulares do intestino grosso (Ahmad *et al.*, 2021). Outros tipos de câncer colorretal menos frequentes incluem o carcinoma de células escamosas, carcinoma adenoescamoso e o carcinoma de células fusiformes (Keum; Giovannucci, 2019).

Aproximadamente 35% a 40% dos casos de câncer colorretal (CCR) são classificados como hereditários. Todavia, a maioria dos casos de CCR surge de forma esporádica (60 - 65%), por meio de mutações somáticas e alterações epigenéticas adquiridas por exposição a fatores de risco ambientais (Jasperson *et al.*, 2010; Ahmad *et al.*, 2021). Dentre os vários fatores ambientais relacionados ao estilo de vida que aumentam o risco de desenvolvimento desse tipo de câncer, destaca-se o tabagismo, o consumo excessivo de álcool e a obesidade. Em associação a esses fatores, o envelhecimento populacional também contribui para o aumento da incidência do CCR (Dekker *et al.*, 2019).

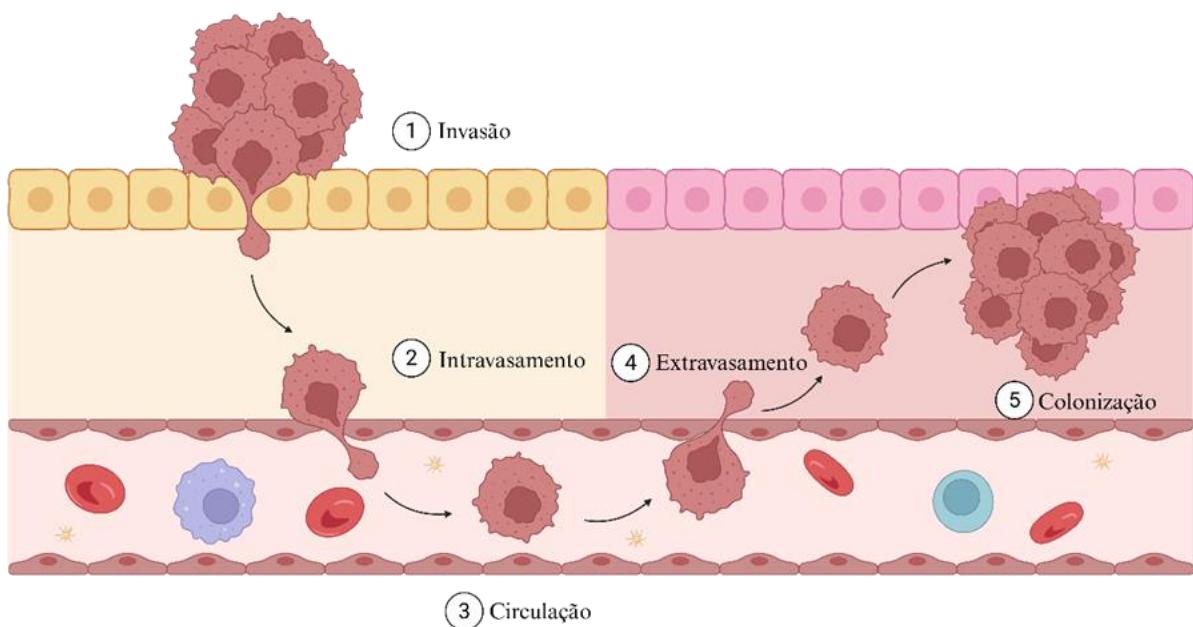
O câncer colorretal se origina por meio do acúmulo de danos genéticos irreversíveis em células estaminais ou células semelhantes a células estaminais, localizadas na base das criptas colônicas. Essas alterações genéticas e epigenéticas predispõem as células afetadas a iniciarem e manterem o crescimento do tumor pela inativação de genes supressores de tumor e a ativação de oncogenes. Com o crescimento celular descontrolado, tem-se o surgimento de uma lesão neoplásica precursora, um pólipos, que pode progredir para doença maligna ao longo de 10 a 15 anos. Assim, durante esse período, as células sofrem alterações genéticas adicionais, conferindo-lhes vantagens de crescimento seletivo, características agressivas e potencial metastático (Dekker *et al.*, 2019; Keum; Giovannucci, 2019).

O prognóstico do CCR, em geral, é considerado ruim devido à alta taxa de metástases e recorrência após intervenção (Chen *et al.*, 2023; Pita-Fernández *et al.*, 2015). A cirurgia é a primeira abordagem terapêutica contra o CCR, em especial para pacientes em estágio inicial da doença, podendo ser utilizada em associação à quimioterapia e radioterapia, nos casos avançados e com ocorrência de metástases (Abedizadeh *et al.*, 2024; Tang *et al.*, 2023). Quanto

ao tratamento quimioterápico, o 5-fluorouracil (5-FU) é o tratamento padrão para os casos de câncer colorretal metastático, sendo usualmente combinado com outros medicamentos nos regimes quimioterápicos multidrogas, como leucovorina, oxaliplatina e irinotecano, visando o aumento da sobrevida do paciente (Al Bitar *et al.*, 2023).

Embora tenha-se melhorado o diagnóstico precoce e as formas de tratamento nos últimos anos, uma quantidade significativa de pacientes com CCR inicial ainda apresenta a tendência de desenvolver metástases e, consequentemente, a render-se a essa condição patológica (Ahmad *et al.*, 2021). A metástase é a causa principal de letalidade do câncer e diz respeito ao processo no qual se tem a disseminação de células cancerosas a partir de um tumor primário para órgãos distantes (Suhail *et al.*, 2019). Para que a metástase ocorra, é necessário que as células tumorais invadam o tecido local circundante, penetrem na corrente sanguínea, resistam à pressão dos vasos sanguíneos, escapem do sistema imune, extravasem pelas paredes vasculares para o parênquima dos tecidos, se adaptem e formem colônias no novo tecido (Fares *et al.*, 2020; Lambert; Pattabiraman; Weinberg, 2017) (Figura 2).

Figura 2. Representação esquemática da cascata metastática.

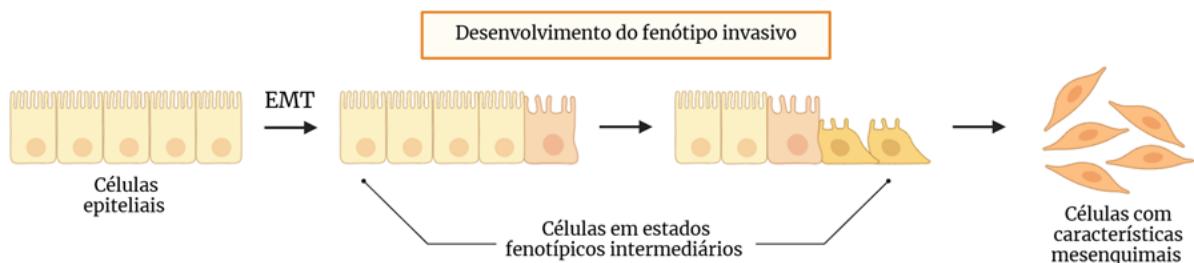


Fonte: Criado com Biorender. Autoria própria, 2025.

A ativação do processo metastático decorre da atuação de estressores microambientais, como pressões mecânicas da matriz extracelular (MEC), sinais adesivos de componentes da matriz, interações célula-célula, sinais solúveis, como fatores de crescimento e citocinas, e influências da microbiota intratumoral, os quais são capazes de induzir eventos de reprogramação celular que possibilitam a invasão e migração das células em busca de ambientes favoráveis à sua sobrevivência (Fares *et al.*, 2020; Suhail *et al.*, 2019). Desse modo, em associação à reprogramação metabólica, os estressores microambientais podem possibilitar a ocorrência de mudanças fenotípicas nas células cancerosas, causando-lhes a adoção de estados que se assemelham aos estados mesenquimais, de forma plástica, com dinamicidade no decorrer do processo de metástase (Suhail *et al.*, 2019).

Nesse contexto, um processo essencial que possibilita as etapas da cascata metastática é o programa de Transição Epitelial Mesenquimal (EMT - do inglês *Epithelial-Mesenchymal Transition*), que, fisiologicamente, é utilizado durante o período embrionário, em especial no processo de gastrulação, e, em indivíduos adultos, possui atuação na cicatrização de tecidos epiteliais (Lambert; Pattabiraman; Weinberg, 2017; Mittal, 2018; Lamouille; Xu; Deryck, 2014). O EMT atua na conversão de células epiteliais em células que possuem a capacidade de entrar em estados fenotípicos com características mesenquimais. Com a ativação do programa EMT, as células podem passar por diferentes estados fenotípicos intermediários entre os estados epitelial e mesenquimal (Zhang; Weinberg, 2018) (Figura 3).

Figura 3. Representação da ativação do Programa de Transição Epitelial-Mesenquimal (EMT).



Fonte: Criado com Biorender. Autoria própria, 2025.

Dessa forma, sob a ação do programa EMT, as células perdem suas características de células epiteliais, como as junções celulares e a polaridade apical-basal, sofrem reorganização

do citoesqueleto, mudanças nos programas de sinalização e reprogramação de sua expressão gênica, o que resulta no aumento da motilidade celular e possibilita o desenvolvimento do fenótipo invasivo (Lamouille; Xu; Deryck, 2014). Nesse sentido, as células cancerosas sob influência do EMT apresentam alterações morfológicas e moleculares, como a aquisição de uma morfologia fusiforme, a diminuição da expressão de marcadores epiteliais, cita-se E-caderina, Zônula de Oclusão-1 e Ocludina, e o aumento de marcadores mesenquimais, como N-caderina, Vimentina, Proteína Específica de Fibroblastos 1 e Fibronectina (Mittal, 2018; Zhang; Weinberg, 2018). Ademais, as células também adquirem resistência à apoptose e aumentam sua capacidade de secretar enzimas degradativas, cuja atuação resulta na digestão da matriz extracelular (Banyard; Bielenberg, 2015).

O programa EMT pode sofrer influências de uma série de vias de sinalização diferentes, incluindo a via de sinalização do fator de crescimento transformador beta (TGF- β), via de sinalização da proteína morfogenética óssea (BMP), via de sinalização do receptor de tirosina quinase (RTK), via de sinalização Wnt/ β -catenina e via de sinalização de hipóxia (Babaei; Aziz; Jaghi, 2021). Essas vias atuam induzindo fatores de transcrição, abrangendo as famílias Snail, Twist e Zeb, que auxiliam um conjunto de reguladores epigenéticos a incitar programas transpcionais que interferem nos efeitos biológicos da EMT (Lu; Kang, 2019). Desse modo, tais vias ampliam a expressão de marcadores mesenquimais e reduzem a expressão de marcadores epiteliais, alterando o fenótipo celular (Babaei; Aziz; Jaghi, 2021).

Em carcinomas, as alterações causadas pelo EMT capacitam as células cancerosas, possibilitando que muitas das etapas da cascata de invasão-metástase sejam concluídas, incluindo a invasão local, saída para os tecidos distantes e formação de depósitos micrometastáticos (Zhang; Weinberg, 2018). Todavia, o EMT não possui influência somente sobre a transformação de tumores iniciais em malignidades invasivas, sua ativação pode, ainda, possuir impacto na geração de células cancerosas semelhantes a células tronco, possibilitando o aumento da autorrenovação, da capacidade de iniciar tumores e de resistir à quimioterapia e apoptose (Mittal, 2018). Assim, comprehende-se a ativação do EMT como um evento crítico para o aumento da invasividade, disseminação e resistência das células tumorais (Lambert; Pattabiraman; Weinberg, 2017).

2.2 Mecanismos de migração e adesão celular

A migração celular é uma habilidade fundamental em uma série de processos fisiológicos, tanto de desenvolvimento corporal quanto relacionado a patologias, atuando no reparo de danos, na resposta imune, reconstrução vascular, invasão tumoral e metástase (SenGupta; Parent; Bear, 2021; Ma *et al.*, 2023). Nos tecidos, as células possuem a capacidade de perceber uma variedade de sinais ambientais e de responder a esses estímulos, migrando para próximo ou para longe desses sinais, de modo a executar programas morfogenéticos durante o desenvolvimento embrionário, preparar uma resposta imune ou reparar tecidos lesados (SenGupta; Parent; Bear, 2021).

As células podem espalhar-se por meio de dois modos, como células individuais, por intermédio da migração de células únicas mesenquimais ou ameboïdes, ou pela migração coletiva, em que a adesão e cooperação entre as células continuam íntegras (Te Boekhorst; Friedl, 2016). Para migração individual mesenquimal, as células adquirem uma morfologia de caráter fusiforme, que se assemelha à morfologia de fibroblastos. Essa morfologia alongada é resultado da adesão mediada por integrinas e das altas forças de tração nos polos celulares. Ademais, as células mesenquimais também recrutam proteases, as quais atuam digerindo e remodelando a matriz extracelular, possibilitando seu movimento migratório (Friedl, 2004).

Por outro lado, as células que migram na forma ameboïde adquirem formas redondas ou irregulares e passam por ciclos de expansão e contração, que levam à passagem da célula pelas lacunas da MEC (Liu *et al.*, 2015). Esse tipo de migração é geralmente realizado por células-tronco hematopoéticas, leucócitos e células tumorais (Friedl, 2004). O fenótipo ameboïde caracteriza-se pela locomoção rápida, que pode ser explicada pela forte polarização celular, que permite às células a projeção eficiente de pseudópodes e bolhas (Bear; Haugh, 2014). Na migração ameboïde, as células ligam-se ao substrato por interações curtas e relativamente fracas, o que possibilita o movimento rápido de rastejo (Friedl, 2004). Ademais, esse modo de migração independe da degradação proteolítica ou da abertura de junções celulares, uma vez que as células em migração ameboïde se movem em ambientes porosos, não necessitando de tais processos para sua movimentação (Lämmermann; Sixt, 2009).

Na migração coletiva, as junções célula-célula são mantidas e as células movem-se como fios ou cordas multicelulares em associação para o interior dos tecidos (Friedl, 2004). Nesse tipo de migração, as células líderes, localizadas na porção anterior do grupo, são

responsáveis por detectar o microambiente e definir a direção e a velocidade de migração para todo o conjunto de células. Em oposição, as células seguidoras apresentam fortes interações celulares para que o grupo celular seja polarizado, uma vez que as células seguidoras não possuem a borda de ataque devido ao contato célula-célula. Assim, as células seguem conectadas em uma mesma direção, de modo a responderem os estímulos ambientais de forma coordenada (Mayor; Etienne-Manneville, 2016).

Em geral, fibroblastos, células-tronco e algumas células tumorais usufruem do modo de migração mesenquimal (SenGupta; Parent; Bear, 2021). As células que passam pela migração mesenquimal efetuam tração no substrato por meio de adesões focais ligadas à protusões de actina, como lamelipódios ou filopódios (Liu *et al.*, 2015). Os lamelipódios são estruturas que apresentam uma rede de filamentos de actina curtos e ramificados, os quais são responsáveis pela produção da força física necessária para protrusão da borda celular. Todavia, os filopódios são estruturas finas, compostas por filamentos de actina paralelos organizados em feixes, que possuem como uma de suas funções a sondagem do microambiente circundante. Em geral, os filopódios podem ser encontrados originando-se da rede de actina limelipodial (Hotulainen; Lappalainen, 2006; Mattila; Lappalainen, 2008).

Adicionalmente, as adesões focais são estruturas essenciais no processo migratório. São complexos de proteínas que sustentam a ligação do citoesqueleto de actina aos receptores de integrina transmembrana e à matriz extracelular (Chapnick; Jacobsen; Liu, 2013). As integrinas são receptores heterodiméricos, compostos por subunidades α e β , que possibilitam o reconhecimento de proteínas constituintes da MEC, como fibronectina e colágeno. Após as integrinas se conectarem com proteínas da MEC, outras proteínas com funções estruturais e de sinalização são recrutadas para os locais de adesão. Assim, o recrutamento de moléculas adaptadoras, como talina, pode ocorrer após a ligação das integrinas à MEC. A talina, em acréscimo, apresenta sítio de ligação para outra molécula, a vinculina, que, por sua vez, se liga ao citoesqueleto de actina. Desse modo, a matriz extracelular pode ser fisicamente ligada ao citoesqueleto da célula, possibilitando a fixação deste ao meio externo (Seong; Wang; Wang, 2013).

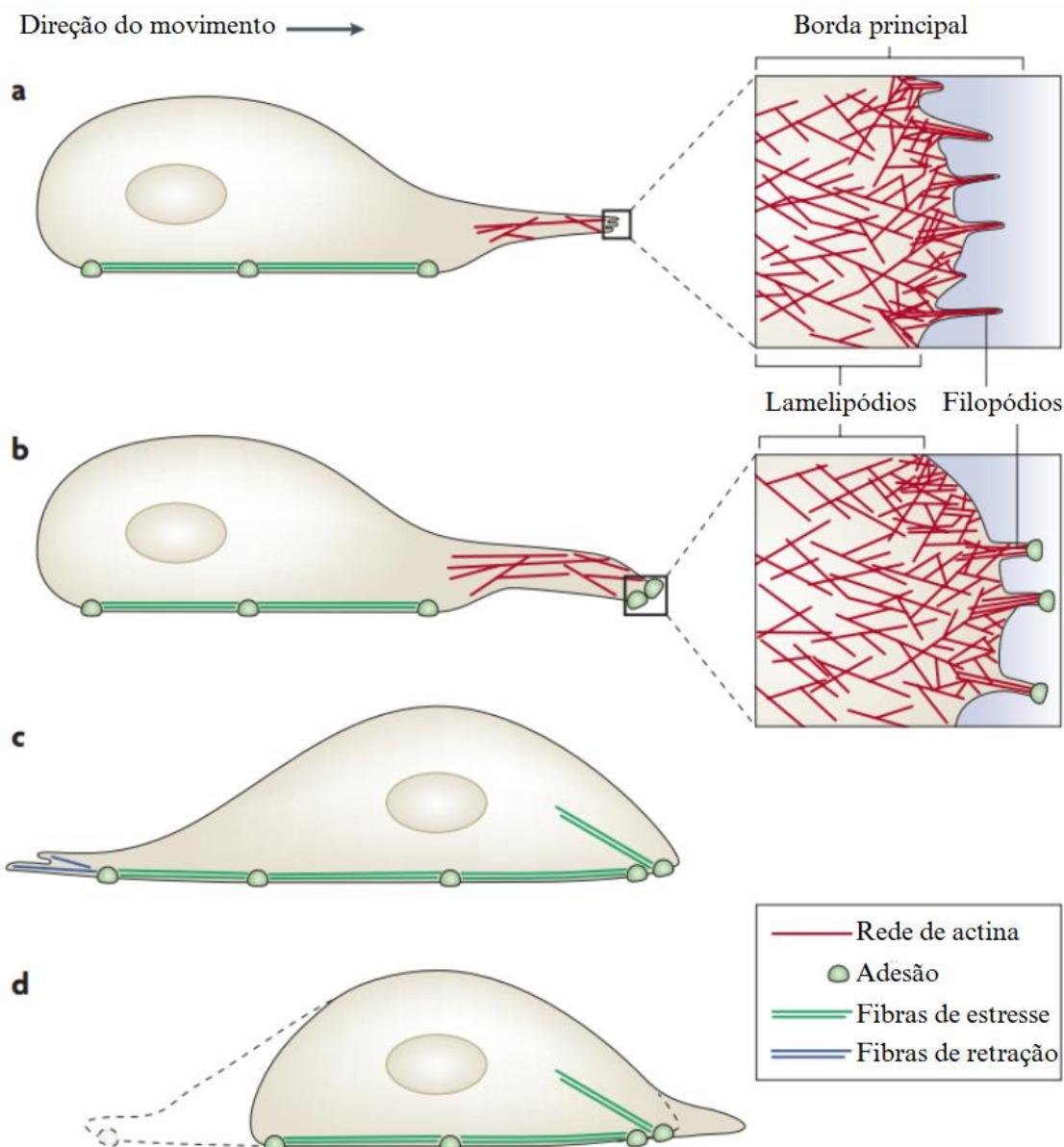
Enquanto o contato das células com a matriz extracelular é mediado principalmente por integrinas, a adesão célula-célula ocorre por intermédio de caderinas (Sousa; Pereira; Paredes, 2019). As caderinas são proteínas transmembranas que necessitam de cálcio para sua atuação e

que possibilitam a coesão intracelular tecidual, de modo a formar estruturas juncionais densamente compactadas entre as células, preservando a arquitetura do tecido (Janiszewska; Primi; Izard, 2020). As caderinas estão envolvidas na migração celular, em especial, na migração coletiva, de modo a contribuir para a coordenação das células, influenciando a direcionalidade e a velocidade migratória celular (Peglion; Llense; Etienne-Manneville, 2014). Fisiologicamente, as interações adesivas possuem a capacidade de modular o fenótipo celular, uma vez que existe uma conexão entre os receptores de adesão celular e as vias de transdução de sinal (Läubli; Borsig, 2019). No câncer, ao longo da cascata metastática, ocorrem alterações na adesão célula-célula e célula-matriz, o que possibilita interferências nos processos de proliferação, sobrevivência e migração das células, impulsionando a progressão do câncer (Sousa; Pereira; Paredes, 2019; Läubli; Borsig, 2019).

O processo de migração celular pode ser dividido em etapas, as quais incluem: o estabelecimento da polaridade celular no eixo frontal-traseiro, extensão da borda de ataque da migração celular, ocorrência de adesão entre a célula e a matriz extracelular e contração da porção celular traseira (Ma *et al.*, 2023). Durante a migração, a borda de ataque passa a apresentar protrusões de membrana formadas pela polimerização de actina, estabelecendo pontos de contato com a matriz. Por outro lado, na borda celular traseira, as adesões celulares são desfeitas, possibilitando a retração do movimento da célula (Le Dévédec *et al.*, 2010).

Essas alterações citoesqueléticas ocorrem devido às cascadas de sinalização que envolvem proteínas GTPase da família RHO. Na borda de ataque, a exemplo, RAC e CDC42 atuam induzindo rearranjos citoesqueléticos, possibilitando a formação de protusões de membrana, e, de forma simultânea, promovem a conexão de integrinas com a MEC. Em contrapartida, na porção celular posterior, uma outra via de sinalização com participação de proteínas da família RHO leva à retração da célula (Mayor; Etienne-Manneville, 2016).

Figura 4. Representação da migração celular por lamelipódios e filopódios.



Fonte: Adaptado de Mattila; Lappalainen, 2008.

Ademais, as células tumorais podem adaptar-se e alterar seu mecanismo de migração, a depender dos gatilhos ambientais, de modo a apresentar plasticidade nos modos de migração, transitando entre os mecanismos migratórios. Dessa forma, essas células podem passar de células de migração coletiva para células únicas ou de células mesenquimais para ameboides (Te Boekhorst; Friedl, 2016). Essa plasticidade do modo de migração é um fator importante para o sucesso da metástase do câncer, haja vista que as células em metástase devem possuir a

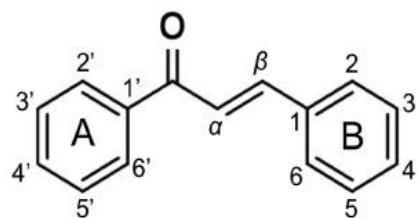
capacidade de navegar por diferentes matrizes extracelulares para escapar do tumor primário e alcançar locais distantes (Liu *et al.*, 2015).

2.3 Chalconas

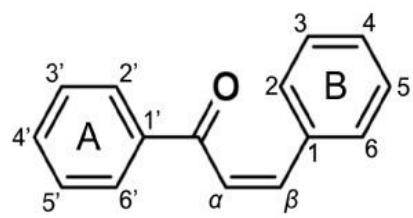
Os flavonoides são compostos polifenólicos que representam um conjunto de metabólitos secundários com atividade biológica em organismos vegetais e que apresentam baixo peso molecular com estrutura básica de difenilpropano (C6-C3-C6) (Constantinescu; Lungu, 2021). Os flavonoides podem ser divididos em nove classes, as quais incluem flavonóis, flavonas, flavanonas, flavan-3-óis, antocianidinas, isoflavonas, proantocianidinas, auronas e chalconas (Mahapatra; Bharti; Asati, 2015). As chalconas são compostos que apresentam distribuição ampla em frutas, vegetais e chás (Sahu *et al.*, 2012). Desse modo, trata-se de compostos prevalentes em plantas utilizadas tradicionalmente com finalidade medicinal ou dietética (Villa; Heckman; Bandyopadhyay, 2024).

As chalconas possuem 1,3-diaril-2-propen-1-ona como arcabouço químico, apresentando dois anéis aromáticos unidos por um sistema carbonil α , β -insaturado de três carbonos (Ouyang *et al.*, 2021; Gomes *et al.*, 2017). Esses compostos podem ser encontrados na natureza em duas configurações estruturais, como isômero trans (*E*) ou como isômero cis (*Z*). O isômero *E* é a configuração mais comum entre as chalconas, dado sua maior estabilidade termodinâmica. Por outro lado, o isômero *Z* apresenta instabilidade em decorrência de fortes efeitos estéricos entre o anel A e o grupo carbonil (Gomes *et al.*, 2017).

Figura 5. Representação estrutural dos isômeros de chalconas.



(1) Trans (E)



(2) Cis (Z)

Fonte: Gomes *et al.*, 2017.

A literatura científica aponta o amplo espectro de atividades biológicas apresentadas pelas chalconas e seus derivados, incluindo atividades anti-inflamatórias (Lin *et al.*, 2019), antimicrobianas (Okolo *et al.*, 2021), antidiabéticas (Welday Kahssay; Hailu; Taye Desta, 2021) e anticâncer (Guan *et al.*, 2021; Michalkova *et al.*, 2023). A respeito da atividade anticâncer, as chalconas possuem a capacidade de interferir em estágios variados de desenvolvimento dos tumores por meio da regulação do ciclo celular, proliferação celular, angiogênese e apoptose (Chen *et al.*, 2023). Em geral, as chalconas podem interagir com uma variedade de alvos moleculares como 5a-redutase, aromatase, proteassoma, via de sinalização JAK/STAT, tubulina, catepsina-K, topoisomerase-II, NF-kB e mTOR, promovendo sua ação anticâncer (Mahapatra; Bharti; Asati, 2015). Essa variedade de alvos moleculares, bem como as muitas aplicações medicinais desses compostos, pode ser explicada por sua estrutura flexível, a qual possibilita ligações efetivas a diferentes enzimas e receptores celulares (Constantinescu; Lungu, 2021).

As chalconas, naturais e sintéticas, apresentam efeitos citotóxicos em uma gama de linhagens celulares tumorais humanas, em especial, as moléculas sintéticas, as quais apresentam ação anticâncer mais evidente em comparação às chalconas naturais (Yang *et al.*, 2022). De modo geral, as chalconas são sintetizadas pela condensação de Claisen-Schmidt de um aldeído com cetona pela catalização de base ou catalização de ácido por posterior desidratação (Sahu *et al.*, 2012). Apesar de a condensação de Claisen-Schmidt ser o método mais comum, outras reações utilizadas para produção da estrutura química padrão das chalconas (1,3-difenil-2-propen-1-ona) são a reação de carbonilação de acoplamento de Heck, reação de acoplamento de isomerização de Sonogashira, reação de deuteração de fluxo contínuo, reação de acoplamento de Suzuki-Miyaura e reação mediada por catalizador ácido sólido (Ouyang *et al.*, 2021; Zhuang *et al.*, 2017).

Ademais, derivados de chalconas podem ser produzidos em laboratório por meio da alteração química da estrutura básica de chalconas originais com variadas substituições estruturais (Rudrapal *et al.*, 2021). Assim, com a adição de grupos funcionais diversos, como carboxilas e halogênios, é possível a ampliação da interação dessas moléculas com diferentes alvos moleculares e, como consequência, do espectro de atividades biológicas desses compostos (Ouyang *et al.*, 2021). A produção desses derivados se torna possível graças à química simples das chalconas, sua síntese facilitada e sua capacidade de substituição de numerosos átomos de hidrogênio (Constantinescu; Lungu, 2021). Desse modo, devido a essas

características, as chalconas e seus derivados têm se estabelecido como compostos de interesse na pesquisa científica para o desenvolvimento de novos fármacos com ação anticâncer.

2.4 Chalconas tipo terpenoide

As chalconas do tipo terpenoide são moléculas híbridas, que apresentam estrutura composta pela combinação das estruturas de chalcona e ionona (Manoel *et al.*, 2022). A ionona é uma substância cetônica constituída por 13 carbonos e que possui arcabouço terpenoide monocíclico (Aloum *et al.*, 2020). Os compostos terpenoides são hidrocarbonetos compostos por unidades de isopreno ($\text{CH}_2 = \text{C}(\text{CH}_3) - \text{CH} = \text{CH}_2$), que podem ser encontrados em plantas, fungos e animais, apresentando diferentes grupos funcionais e grupos metil oxidados (Manoel *et al.*, 2022). Na natureza, existem diversas formas isoméricas de ionona, como α -ionona e β -ionona, as quais são utilizadas principalmente como ingredientes aromatizantes na indústria de cosméticos e de produtos de limpeza (Aloum *et al.*, 2020).

Nesse contexto, registros na literatura revelam que β -ionona e seus compostos derivados são capazes de exibir atividades farmacológicas consideráveis, incluindo atividade anti-inflamatória, antifúngica, antibacteriana, antiproliferativa e antimetastáticas (Ansari; Emami, 2016). A β -ionona (4-[2,6,6-trimetil-1-ciclohexen-1-il]-3-buten-2-ona) compreende um composto terpenoide cíclico precursor dos carotenoides, considerado o arcabouço básico do núcleo do ácido retinóico, retinol, β -caroteno e vitamina A, que, de modo semelhante às chalconas, pode ser encontrada em frutas e vegetais (Silva *et al.*, 2021; Custodio *et al.*, 2021; Ansari; Emami, 2016). Apesar de ser encontrada na natureza, β -ionona pode ser produzida em laboratório. O método mais comum para síntese de β -ionona é a ciclização de pseudoionona em meio solvante inerte, associado à presença de ácidos fortes (Ansari; Emami, 2016).

Ademais, β -ionona tem destacado-se no cenário científico em consequência de sua capacidade de induzir a apoptose *in vitro* e *in vivo*, bem como por eliminar de modo seletivo células tumorais (Custodio *et al.*, 2021). A literatura demonstra que β -ionona exerce ação antitumoral em diversos tipos de câncer, compreendendo melanoma, próstata, mama e câncer de cólon (Zhou; Geng; Wu, 2010). A exemplo, cita-se o estudo de Janakiram e colaboradores (2008), no qual β -ionona foi capaz de reduzir a proliferação celular e induzir a apoptose de forma dependente da dose na linhagem de câncer colorretal humano HCT-116. Entretanto,

ainda que β -ionona tenha sua atuação investigada contra diferentes linhagens cancerosas, a atuação anticâncer de chalconas do tipo terpenoide e seus mecanismos de ação permanecem obscuros (Custodio *et al.*, 2021).

A β -ionona apresenta um anel ciclohexil, o qual pode passar por modificações, possibilitando a síntese de diferentes derivados com possíveis propriedades anticâncer. Ao ser submetida à condensação de Claisen-Schmidt, a β -ionona pode originar chalconas do tipo terpenoide em consequência de seus diversos grupos metil (Custodio *et al.*, 2021). Diferentes atividades biológicas podem ser encontradas descritas na literatura a respeito das chalconas do tipo terpenoide, incluindo propriedades antimicrobianas, antileishmania (Tiwari *et al.*, 2013) antiandrogênicas (Zhou; Geng; Wu, 2010) e antiproliferativas (Silva *et al.*, 2021; Zhou; Geng; Wu, 2010). Nesse sentido, destaca-se o estudo de Zhou e colaboradores (2009) no qual chalconas baseadas em ionona apresentaram potencial antiproliferativo *in vitro* contra células de câncer de próstata, bem como atividades antiandrogênicas.

As chalconas podem ser modificadas quimicamente, de modo a apresentarem bioatividades diferentes a depender da posição, número e natureza dos substituintes incluídos em sua estrutura básica (Constantinescu; Lungu, 2021). Em um trabalho de Dias e colaboradores (2013), um conjunto de derivados de chalconas e flavonol foram sintetizados e avaliados quanto a sua atividade anticâncer. Os autores observaram que compostos halogenados apresentavam potencial anticâncer superior em comparação a análogos portadores de grupos metoxil/metil, de modo a inibirem o crescimento celular à medida que os substituintes alternavam de flúor (F) para cloro (Cl) e bromo (Br) nas posições *meta* ou *para* no anel fenil.

Ademais, a literatura demonstra que compostos que possuem grupos de retirada de elétrons apresentam maior atividade inibitória do que compostos que portam grupos doadores de elétrons (Sharma *et al.*, 2013). Nesse sentido, em um trabalho desenvolvido por Lima e colaboradores (2019), um conjunto de chalconas tipo terpenoide foi avaliado quanto a sua atuação em células cancerosas. Os autores revelaram que a atividade citotóxica dos compostos estudados era reduzida conforme grupos fracos de retirada de elétrons eram adicionados ao anel fenil. Desse modo, a inserção de Br ou Cl, os quais são pouco extratores de elétrons em comparação ao grupo nitro utilizado nos demais compostos do estudo, diminui a atividade citotóxica das demais chalconas terpenoides sintetizadas. Entretanto, os autores concluíram que, apesar da ocorrência da redução da atividade citotóxica causada pela presença desses

grupos, a associação de β -ionona e um conjunto adicional de carbonos α , β -insaturados à estrutura era capaz de aumentar a atividade anticâncer de chalconas que apresentam Br e Cl como substituintes em sua estrutura.

Por conseguinte, baseando-se nas atividades biológicas descritas dos compostos com esqueleto de chalcona e de ionona, abrangendo a atividade anticâncer, o presente estudo possui a finalidade de avaliar o efeito inibitório de etapas-chave do processo metastático *in vitro* de uma chalcona sintética do tipo terpenoide, buscando verificar seu potencial anticâncer contra células de adenocarcinoma colorretal da linhagem SW-480.

3 OBJETIVOS

3.1 Objetivo geral

Avaliar o potencial de um derivado de chalcona tipo terpenóide (BR4Cl) sobre os eventos adesivos e migratórios relacionados à metástase, utilizando metodologias *in vitro*, frente à linhagem de câncer colorretal humano SW-480.

3.2 Objetivos específicos

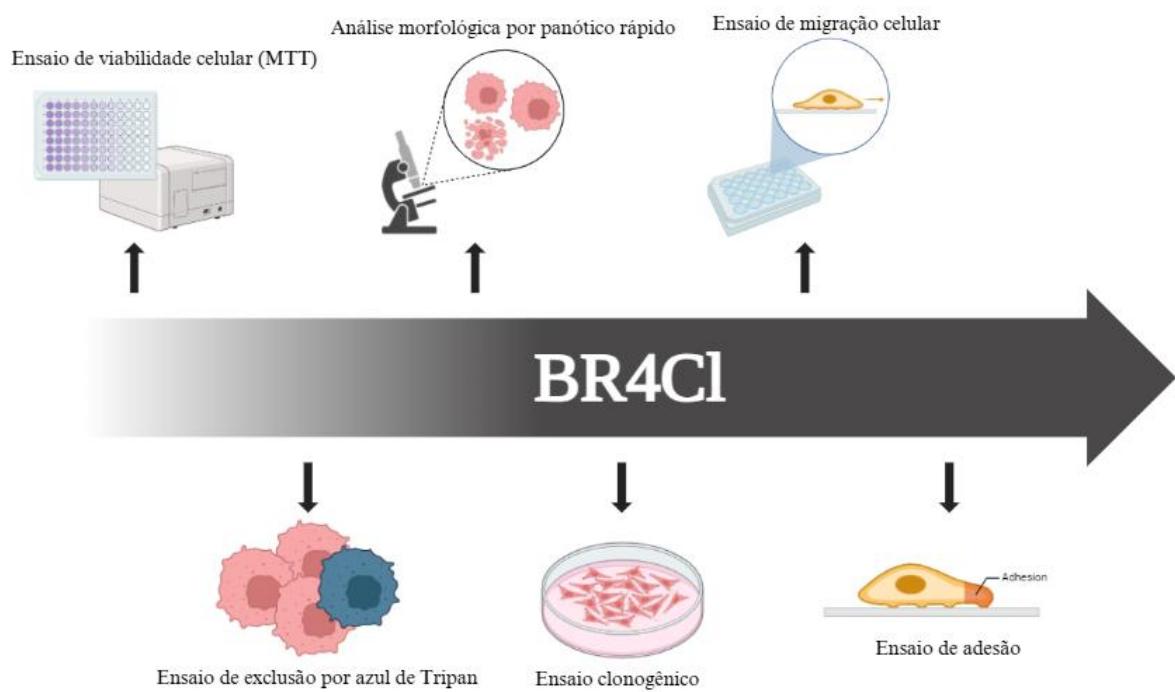
- Avaliar o perfil citotóxico do composto BR4Cl em células da linhagem SW-480;
- Determinar as concentrações não citotóxicas de BR4Cl em células SW-480;
- Investigar as alterações morfológicas induzidas por concentrações subcitotóxicas de BR4Cl na linhagem SW-480;
 - Avaliar o impacto de BR4Cl no processo de formação de colônias da linhagem SW-480;
 - Analisar a influência de BR4Cl sobre o processo migratório das células da linhagem SW-480;
 - Examinar o potencial inibitório de BR4Cl no processo de adesão celular da linhagem SW-480.

4 METODOLOGIA

4.1 Delineamento experimental

A Figura 6 ilustra o delineamento experimental, apresentando de maneira esquemática as principais etapas do desenvolvimento da pesquisa, bem como as técnicas empregadas.

Figura 6. Delineamento experimental do estudo.



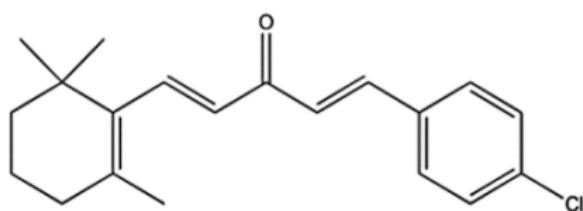
Fonte: Criado com Biorender. Autoria própria, 2025.

4.2 Obtenção da amostra

O derivado de chalcona do tipo terpenoide (BR4Cl) utilizado neste estudo foi sintetizado por meio da reação de Claisen-Schmidt entre α - e β -ionona com benzaldeídos substituídos dissolvidos em metanol, sendo gentilmente cedido pela equipe coordenada pela Professora Dr.^a Caridad Noda Pérez, do Instituto de Química da Universidade Federal de Goiás (UFG). O composto apresenta fórmula molecular $C_{20}H_{23}OCl$, peso molecular de 314,6 g/mol e dispõe do cloro como substituinte halogênico. A amostra foi cedida na forma de substância pura, solubilizada em dimetilsulfóxido (DMSO) e armazenada a -20°C até sua utilização nos ensaios

in vitro. A estrutura química do composto objeto de estudo está representada a seguir (Figura 7). Até o presente momento, os dados na literatura a respeito desta molécula permanecem escassos.

Figura 7. Estrutura química da chalcona do tipo terpenoide (BR4Cl) utilizada no estudo.



Fonte: Lima *et al.*, 2019.

4.3 Ensaio de redução do MTT

Princípio do método

O ensaio de redução do MTT baseia-se na conversão do brometo de 3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difeniltetrazólio (MTT), um corante amarelo solúvel em água, em formazan, um composto roxo e insolúvel (Mosmann, 1983). O MTT é capaz de atravessar a membrana celular e ser reduzido por enzimas mitocondriais ou citoplasmáticas, como as oxidoredutases, presentes em células viáveis. Os cristais de formazan formados podem ser posteriormente solubilizados, permitindo a quantificação da viabilidade celular por espectrofotometria (Kumar; Nagarajan; Uchil, 2018; Präbst, 2017). Esse método foi empregado para investigar o perfil citotóxico do composto BR4Cl frente à linhagem tumoral SW-480 e para determinar concentrações não citotóxicas, visando o prosseguimento dos experimentos subsequentes.

Procedimento experimental

As células foram cultivadas em frascos de cultura contendo meio DMEM suplementado com 10% de soro fetal bovino (SFB) e 1% de antibiótico (penicilina e estreptomicina). Quando atingiram confluência superior a 70%, foram semeadas em placas de 96 poços na concentração de 5×10^4 células/ mL e mantidas a 37 °C, em atmosfera umidificada com 5% de CO₂, por 24 horas. Após esse período de incubação, realizou-se o tratamento com o controle negativo (meio DMEM completo), utilizado como referência de crescimento celular basal, e com diferentes

concentrações do composto BR4Cl, variando de 79,5 a 1,23 μ M. A doxorrubicina foi utilizada como controle positivo com concentrações variando de 9,2 a 0,14 μ M. As células foram, então, incubadas novamente sob as mesmas condições descritas anteriormente.

O ensaio de MTT foi realizado em triplicata, com leitura das placas após 24, 48 e 72 horas de incubação. Três horas antes do término de cada período, o meio de cultura de cada poço foi cuidadosamente removido, e 150 μ L de uma solução de MTT (0,5 mg/mL) diluída em meio DMEM não completo foram adicionados aos poços. Em seguida, as placas foram incubadas por mais 3 horas, permitindo que o MTT fosse internalizado pelas células metabolicamente ativas e convertido em cristais de formazan.

Após o período de incubação com a solução de MTT, esta foi removida de cada poço, e 150 μ L de dimetilsulfóxido (DMSO) foram adicionados para promover a solubilização dos cristais de formazan. A placa foi então submetida à agitação por aproximadamente 10 minutos. Em seguida, realizou-se a leitura da absorbância em leitor de ELISA SPECTRAMAX 190, utilizando comprimento de onda de 595 nm, para quantificação do formazan formado.

Os dados obtidos foram analisados utilizando o software GraphPad Prism, versão 8.0.1. As leituras de absorbâncias foram convertidas em porcentagem de inibição com base na média de absorbância do controle negativo. A concentração inibitória média, definida como a concentração capaz de promover 50% de inibição do efeito máximo, foi determinada por análise de regressão não linear, juntamente com seus respectivos intervalos de confiança a 95% (IC 95%).

4.4 Ensaio de exclusão do azul de Tripan

Princípio do método

O azul de Tripan é um corante vital utilizado para diferenciar células viáveis de não viáveis. As células não viáveis absorvem o corante, tornando-se azuis, enquanto as viáveis permanecem incolores ao microscópio. Isso ocorre porque as células viáveis possuem membrana celular íntegra, que impede a entrada do corante presente no meio circundante. Por outro lado, as células inviáveis apresentam membranas celulares danificadas, incapazes de controlar a passagem de macromoléculas, permitindo a absorção do corante (Louis; Siegel, 2011; Stoddart, 2011). O ensaio foi realizado utilizando concentrações não citotóxicas durante

um período de 24 horas, com o objetivo de confirmar que as concentrações selecionadas não interferem na viabilidade celular.

Procedimento experimental

As células da linhagem SW-480 foram semeadas em placas de 24 poços a uma concentração de 1×10^5 células/poço e mantidas a 37 °C em atmosfera de 5% de CO₂ por 24 horas. Após esse período, as células foram tratadas com concentrações de 0,05 µM e 0,10 µM, determinadas a partir dos resultados obtidos pelo teste do MTT, e incubadas por mais 24 horas. A doxorrubicina foi utilizada como controle positivo na concentração de 0,10 µM. Após a incubação, o meio de cultura foi removido dos poços e armazenado em microtubos tipo Eppendorfs. Em seguida, os poços foram lavados duas vezes com 100 µL de PBS e as células foram tripsinizadas com 200 µL de tripsina 1x, promovendo a perda da adesão entre as células e o fundo da placa. A ação da tripsina foi interrompida com 500 µL de meio de cultura e os poços foram limpos novamente para assegurar que nada permanecesse em seu interior. Todo o conteúdo foi então coletado nos microtubos contendo o meio previamente removido.

As amostras foram centrifugadas a 1500 rpm por 5 minutos. Em seguida, o sobrenadante foi descartado, e o pellet celular foi ressuspensionado em 1 mL de PBS. Por fim, uma alíquota de 90 µL foi retirada de cada amostra e misturada a 10 µL de azul de tripan a 0,4 %, procedendo-se à contagem de células viáveis e inviáveis em câmara de Neubauer.

Os dados foram analisados com base na média ± erro padrão da média, obtida a partir da triplicata de pelo menos dois experimentos independentes. A análise estatística foi realizada por meio de análise de variância (ANOVA), seguida por Pós-Teste de Tukey para comparação com o controle negativo, com nível de significância de 5% ($p<0,05$).

4.5 Análise morfológica por coloração com panótico rápido

Princípio do método

O método de coloração por panótico rápido baseia-se no princípio de Romanowsky, no qual a mistura de corantes, como eosina e azul de metileno, é utilizada na coloração de estruturas celulares. Dependendo das características dessas estruturas, elas apresentam padrões específicos ao microscópio. Estruturas básicas são coradas em tons vermelhos (acidófilas), enquanto estruturas ácidas assumem tons de azul (basófilas). Por outro lado, estruturas com pH

neutro exibem coloração intermediária, variando entre azul e vermelho. A coloração por panótico rápido é amplamente utilizada devido à sua rapidez em comparação com outros métodos de coloração (Schützler, 2022). No presente estudo, essa técnica foi empregada para avaliar as alterações morfológicas causadas pela exposição das células SW-480 à BR4Cl.

Procedimento experimental

As células SW-480 foram semeadas na concentração de 1×10^5 em placas de 24 poços e incubadas em estufa a 37 °C e 5 % de CO₂. Após 24 horas de incubação as células foram expostas a BR4Cl nas concentrações de 0,05 µM e 0,10 µM, sendo incubadas novamente por mais 24 horas. Após o período de incubação, as células foram tripsinizadas, para que perdessem a aderência com o assoalho da placa e pudessem ser dispostas em microtubos Eppendorfs, os quais foram centrifugados a 1500 rpm por 5 minutos. O sobrenadante foi descartado e o pellet de células foi ressuspandido em 1 ml de PBS. Uma alíquota de 100 µL foi retirada das amostras e centrifugada a 1500 rpm por 5 minutos em centrífuga de lâminas, para que as células aderissem às lâminas. Posteriormente, as lâminas foram coradas com o kit panótico rápido (Laborclin®), permanecendo cerca de 10 segundos em cada uma das substâncias. A doxorrubicina (0,10 µM) foi utilizada como controle positivo.

As lâminas coradas foram observadas em microscópio óptico para avaliação das características morfológicas das células tratadas em comparação com as células não tratadas (controle). O registro das análises foi realizado por fotografia em microscopia óptica com aumento de 200 vezes.

4.6 Ensaio clonogênico

Princípio do método

O ensaio clonogênico ou ensaio de formação de colônias (CFA) é um ensaio de sobrevivência celular *in vitro*, baseado na capacidade de células individuais originarem colônias. Essa técnica é amplamente utilizada para investigar a sensibilidade das células à radioterapia, quimioterapia ou terapias moleculares direcionadas *in vitro* (Braselmann *et al.*, 2015; Brix *et al.*, 2020). Neste estudo, o ensaio clonogênico foi utilizado com o objetivo de avaliar a capacidade de BR4Cl inibir a formação de colônias ou reduzir o tamanho das colônias de células SW-480.

Procedimento experimental

Para realização do teste, as células SW-480 foram semeadas em placas de 24 poços na concentração de 1×10^5 células/poço e incubadas por 24 horas em estufa com 37°C e 5% de CO₂. Após esse período de incubação, as células foram tratadas com 0,05 µM e 0,10 µM de BR4Cl e incubadas novamente por um período de 24 horas. Decorrido esse tempo, as células foram replaqueadas em placas de 12 poços a uma concentração de 0,03 x 10⁴ e mantidas nas mesmas condições descritas anteriormente por um período de sete dias. Após a incubação, o sobrenadante foi descartado e os poços lavados com PBS. Em seguida, 400 µL de cada um dos corantes do kit panótico rápido (Laborclin®) foram adicionados a cada um dos poços, permanecendo cerca de 30 segundos em contato com as células. A doxorrubicina (0,10 µM) 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.

A área e o número das colônias foram medidos com auxílio do software ImageJ e a análise dos dados foi realizada com base na média ± erro padrão da média de pelo menos dois experimentos independentes realizados em triplicata para verificação da ocorrência de diferença estatística entre os diferentes grupos. Os dados foram comparados por análise de variância (ANOVA) seguida por Pós-Teste de Tukey, com nível de significância de 5% ($p<0,05$), utilizando o programa GraphPadPrism versão 8.0.1.

4.7 Ensaio de migração celular – *Scratch assay*

Princípio do método

O ensaio do arranhão foi um dos primeiros métodos desenvolvidos para o estudo da migração celular *in vitro*. Trata-se de uma metodologia simples e de baixo custo, baseada na observação da migração celular em direção ao fechamento de um arranhão produzido em uma monocamada celular, até que os contatos célula-célula sejam restabelecidos. As etapas fundamentais deste ensaio envolvem a criação de um arranhão na monocamada, a captura de imagens no tempo inicial e em intervalos de tempo regulares durante o processo migratório, e a posterior comparação dessas imagens para determinar a taxa de migração celular (Rodriguez; Wu; Guan, 2004; Liang; Park; Guan, 2007). No presente estudo, esse teste foi utilizado com o

objetivo de avaliar a atividade do composto BR4Cl sobre o processo de migração das células SW-480.

Procedimento experimental

As células SW-480 foram semeadas em placas de 24 poços a uma concentração de $2,5 \times 10^4$ células/poço com 1 ml de meio DMEM contendo soro fetal bovino (SFB). Quando as células atingiram confluência de aproximadamente 90%, receberam um pré-tratamento com 8 $\mu\text{g}/\text{ml}$ de mitomicina, como inibidor da proliferação, adicionado 2 horas antes do arranhão para apoiar exclusivamente a migração celular. Em seguida, foi realizada uma lesão na monocamada celular com o uso de uma ponteira (P200) pressionada contra o assoalho do poço de cultura, originando uma ferida na camada de células. Os poços foram lavados duas vezes com PBS para retirada completa dos detritos celulares da fenda formada.

Posteriormente, foi adicionado 1 ml de meio suplementado com apenas 0,25% de SFB com o objetivo de induzir a privação de nutrientes e dificultar a proliferação celular. Os poços foram fotografados (aumento de 50x) com auxílio de um microscópio óptico invertido (ZEISS, modelo Axiovert 40C) visando a captura de imagens correspondentes ao tempo zero (T_0) de cada poço. As células foram tratadas com concentrações não citotóxicas de BR4Cl (0,05 μM e 0,10 μM). A migração celular foi monitorada após 24 e 48 horas de incubação. Os poços foram fotografados novamente no aumento de 50x para comparação.

O percentual de migração celular foi quantificado com base na área do corte no tempo zero e após 24 ou 48 horas de incubação, utilizando o programa ImageJ. A migração das células para a área de corte foi expressa como percentual de migração celular por meio da equação a seguir:

$$\% \text{ migração celular} = [(AT_0 - AT_{24\text{h} \text{ ou } 48\text{h}}) / AT_0] \times 100\%,$$

onde, AT_0 corresponde à área do corte mensurada imediatamente após a realização do corte, $AT_{24\text{h}}$ e $AT_{48\text{h}}$ corresponde à área do corte 24 e 48 horas após sua realização, respectivamente (YUE *et al.*, 2010).

A análise dos dados foi realizada baseando-se na média \pm erro padrão da média de pelo menos dois experimentos independentes realizados em triplicata. Para a verificação da ocorrência de diferença estatisticamente significativa entre os diferentes grupos, os dados foram

comparados por análise de variância (ANOVA) seguida por Pós-Teste de Tukey, com nível de significância de 5% ($p<0,05$), utilizando o programa GraphPad Prism versão 8.0.1.

4.8 Ensaio de adesão em fibronectina

Princípio do método

A capacidade das células de se aderirem a proteínas da matriz extracelular ou a outras células é uma das propriedades mais importantes das células derivadas de organismos multicelulares, uma vez que essa capacidade se relaciona ao desenvolvimento embrionário e ao surgimento de doenças (Kucik; Wu, 2004). A adesão celular é um processo complexo que envolve múltiplas interações moleculares, mudanças em vias de sinalização intracelular e modulação da montagem do citoesqueleto. Os ensaios de adesão visam avaliar a capacidade de uma célula ou linhagem celular específica de se aderir a um substrato adesivo e testar a sensibilidade da interação célula-substrato a inibidores (Humphries, 2009). Neste estudo, esse ensaio foi utilizado para investigar as interações entre as células SW-480 e avaliar sua capacidade de adesão a componentes da matriz extracelular após tratamento com BR4Cl.

Procedimento experimental

As células SW-480 foram semeadas em placas de cultura celular na concentração de 1×10^5 células/mL e mantidas a 37°C e 5% CO₂ por 24 horas em estufa de cultura de células. Após isso receberam um tratamento durante 24 horas com BR4Cl nas concentrações de 0,05 µM e 0,10 µM. Em seguida, em uma placa de 24 poços foi adicionado 300 µL de fibronectina em cada poço (10 µg/mL), a qual foi deixada em temperatura ambiente por 1 hora. Após esse período, a solução de revestimento de cada poço foi removida e 300 µL/poço de BSA a 1% (p/v) foram adicionados e deixados em temperatura ambiente por mais 1 hora. Posteriormente, a solução de bloqueio restante de cada poço foi removida e os poços foram lavados com 300 µL de PBS.

Em seguida, as células foram removidas da placa contendo o tratamento com BR4Cl, centrifugadas e o pellet ressuspenso em meio sem soro. Após isso, as células foram contadas e replaqueadas em uma densidade de 2×10^5 em placa contendo fibronectina. A placa foi submetida à incubação por 60 minutos em incubadora com 5% de CO₂ e 37 °C. Ao final desse período de tempo, os poços foram lavados duas vezes com 200 µL de PBS para remoção das

células não aderentes. No final do experimento, as células foram coradas com o kit panótico rápido (Laborclin®), sendo adicionado cerca de 300 µL de cada um dos três corantes em cada poço, permanecendo em contato com as células por cerca de 30 segundos. Posteriormente, as células aderentes foram fotografadas em microscópio invertido com aumento de 200x. As imagens obtidas foram analisadas utilizando o programa ImageJ. Os dados foram comparados por análise de variância (ANOVA) seguida por Pós-Teste de Tukey, com nível de significância de 5% ($p<0,05$), utilizando o programa GraphPad Prism versão 8.0.1.

5 RESULTADOS

5.1 Ensaio de redução do MTT

Com base na análise realizada por meio do ensaio de MTT, foram determinados os valores da concentração inibitória média (CI_{50}), conforme apresentados na Tabela 1. A amostra avaliada demonstrou efeito citotóxico, com valores de CI_{50} que variaram de 12,44 μM , 4,62 μM e 3,64 μM após 24, 48 e 72 horas de exposição, respectivamente. A doxorrubicina foi utilizada como controle positivo. No entanto, não foi possível determinar a CI_{50} da doxorrubicina no intervalo de 24 horas, possivelmente devido à utilização de concentrações inferiores àquelas necessárias para reduzir a viabilidade celular em 50% nesse período.

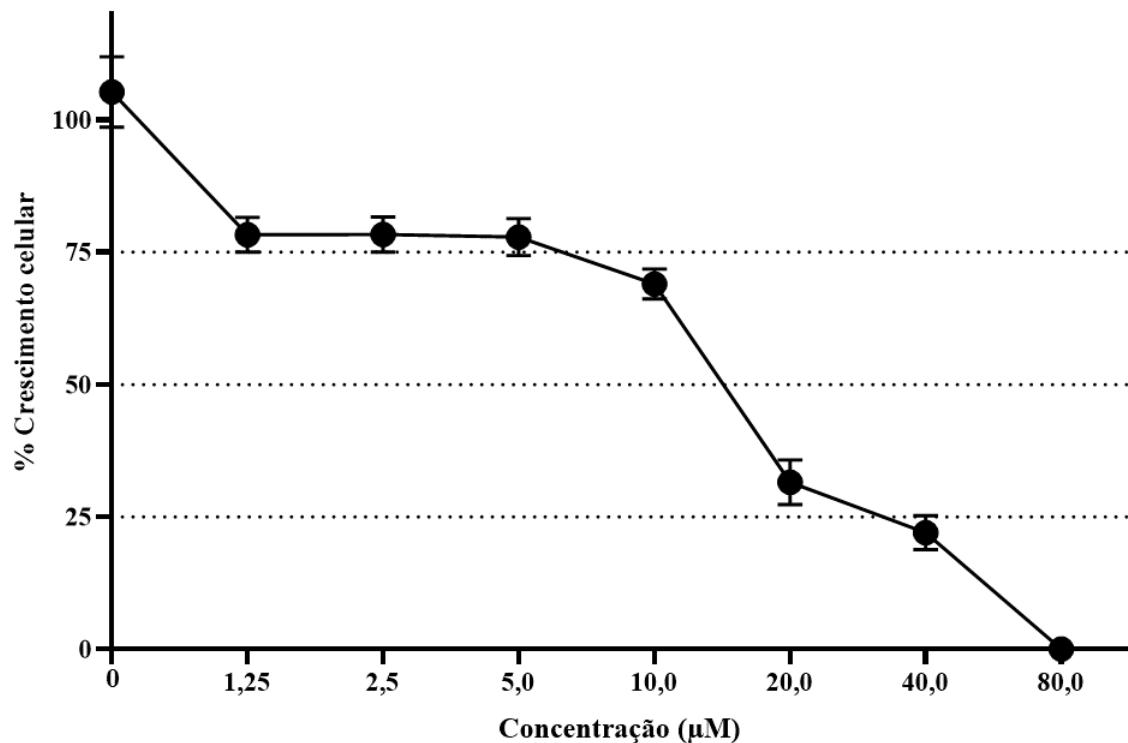
Tabela 1. Perfil citotóxico de BR4Cl em comparação à doxorrubicina frente à linhagem celular de câncer colorretal SW-480 pelo ensaio do MTT após 24, 48 e 72h de incubação.

Amostras	CI ₅₀ (μM)		
	Intervalo de confiança (95%)		
	24 horas	48 horas	72 horas
BR4Cl	12,44 (10,12 - 15,00)	4,62 (3,89 – 5,47)	3,64 (2,97 – 4,46)
Doxorrubicina	> 9,2 (0,23 – 0,42)	0,31 (0,08 – 0,12)	0,10

Os valores de CI_{50} estão apresentados em μM e foram calculados a partir de regressão não linear utilizando o programa GraphPad Prism Software versão 8.0.1. Os intervalos de confiança (IC 95%) foram obtidos por meio de pelo menos três experimentos independentes realizados em triplicata, sendo mostrados entre parênteses. Doxorrubicina foi utilizada como controle positivo. Fonte: Acervo do autor, 2025.

Com base nos dados obtidos para o composto BR4Cl no ensaio de redução do MTT após 24 horas de exposição, foi possível a elaboração da curva de viabilidade celular. A partir dessa curva, foram definidas as concentrações não citotóxicas de 0,05 μM e 0,10 μM , que foram selecionadas para os ensaios subsequentes com 24 horas de exposição em células SW-480 (Figura 8). A doxorrubicina (Dox) foi utilizada como controle positivo na concentração subcitotóxica de 0,10 μM .

Figura 8. Curva de viabilidade celular de células SW-480 determinado pelo ensaio do MTT após 24 horas de incubação com BR4Cl.

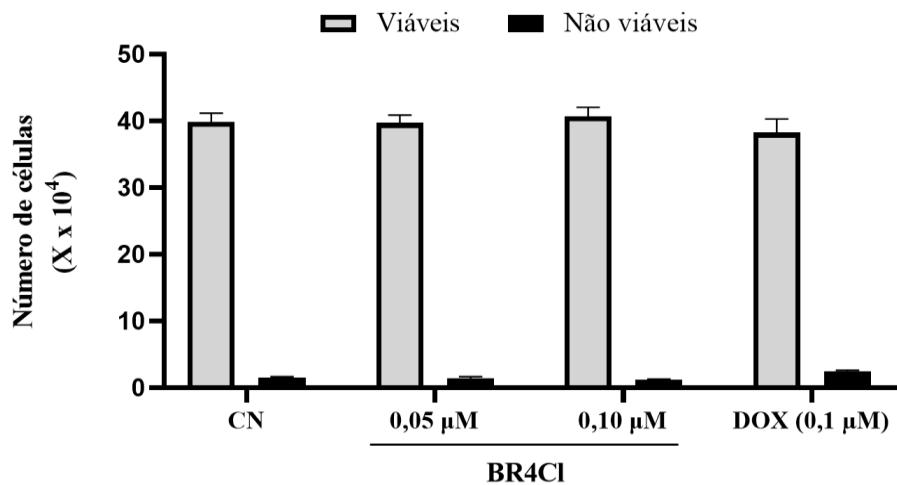


Fonte: Elaborado pelo autor, 2025.

5.2 Ensaio de exclusão do azul de Tripan

O ensaio de viabilidade celular por exclusão do azul de Tripan foi realizado visando quantificar individualmente células viáveis e não viáveis, após 24 horas de incubação com o composto BR4Cl. Como observado na Figura 9, nesse intervalo de tempo, as concentrações selecionadas não interferiram na viabilidade das células SW-480 quando comparadas ao controle negativo. Esse resultado era esperado, visto que as concentrações utilizadas são subcitotóxicas, não devendo, portanto, induzir morte celular significativa.

Figura 9. Efeito de BR4Cl na viabilidade de SW-480 determinado pelo ensaio de exclusão do azul de Tripan após 24 horas de tratamento.

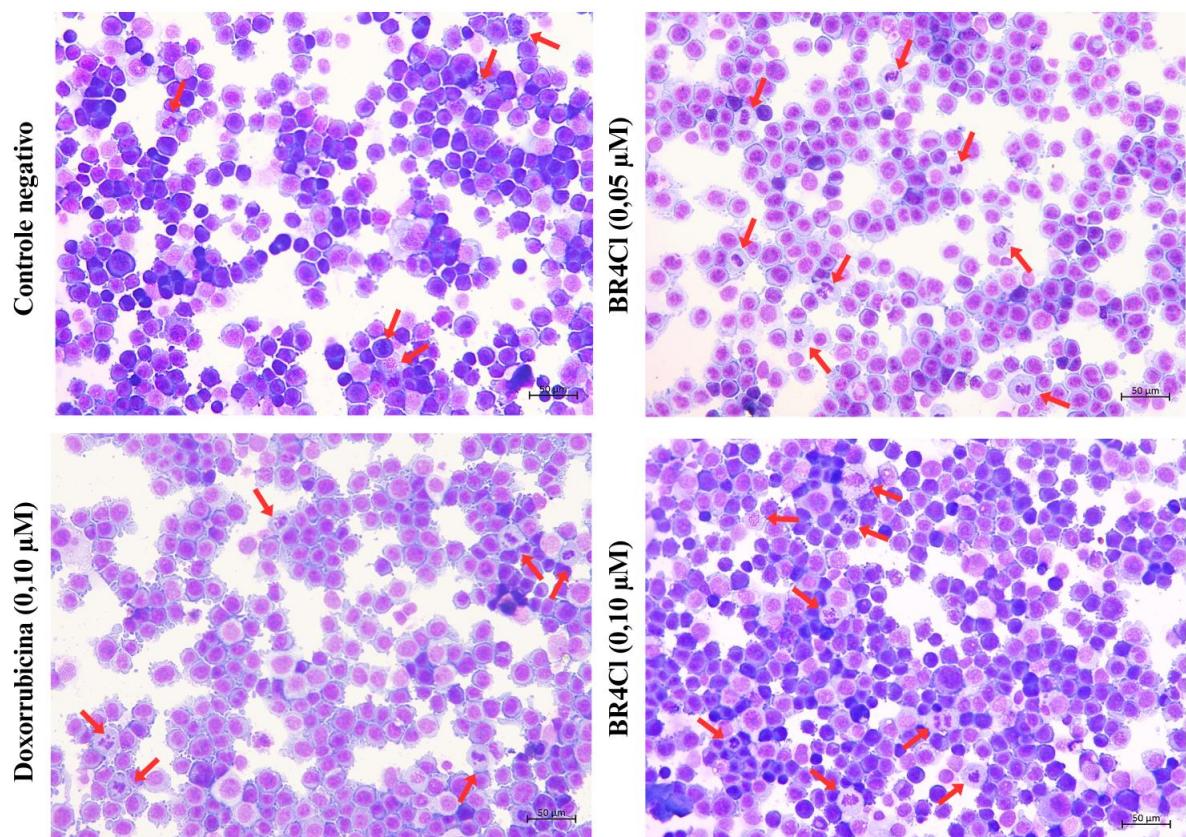


Os dados correspondem à média \pm E.P.M. de no mínimo dois experimentos independentes. (*p<0,05) comparado ao controle negativo por ANOVA, seguido de pós teste de Tukey. Fonte: Elaborado pelo autor, 2025.

5.3 Análise morfológica por coloração com panótico rápido

Com o objetivo de confirmar se as concentrações de 0,05 μ M e 0,10 μ M de BR4Cl não induziram morte celular na linhagem SW-480 após 24 horas de exposição, a análise morfológica foi realizada utilizando a coloração com panótico rápido. Neste ensaio, o controle negativo apresentou-se com a morfologia típica dessa linhagem celular, com a presença de figuras mitóticas (setas vermelhas), as quais podem ser indicativas de atividade proliferativa. As células tratadas com BR4Cl (0,05 e 0,10 μ M), assim como aquelas expostas à doxorrubicia (0,10 μ M), não apresentaram alterações morfológicas compatíveis com morte celular, mantendo também a presença de figuras mitóticas.

Figura 10. Avaliação morfológica de células SW-480 após 24 horas de tratamento com BR4Cl, realizada com a coloração panótico rápido.



A avaliação morfológica revelou a presença de figuras mitóticas (setas vermelhas) após tratamento com as concentrações subcitotóxicas de BR4Cl. Fonte: Elaborado pelo autor, 2025.

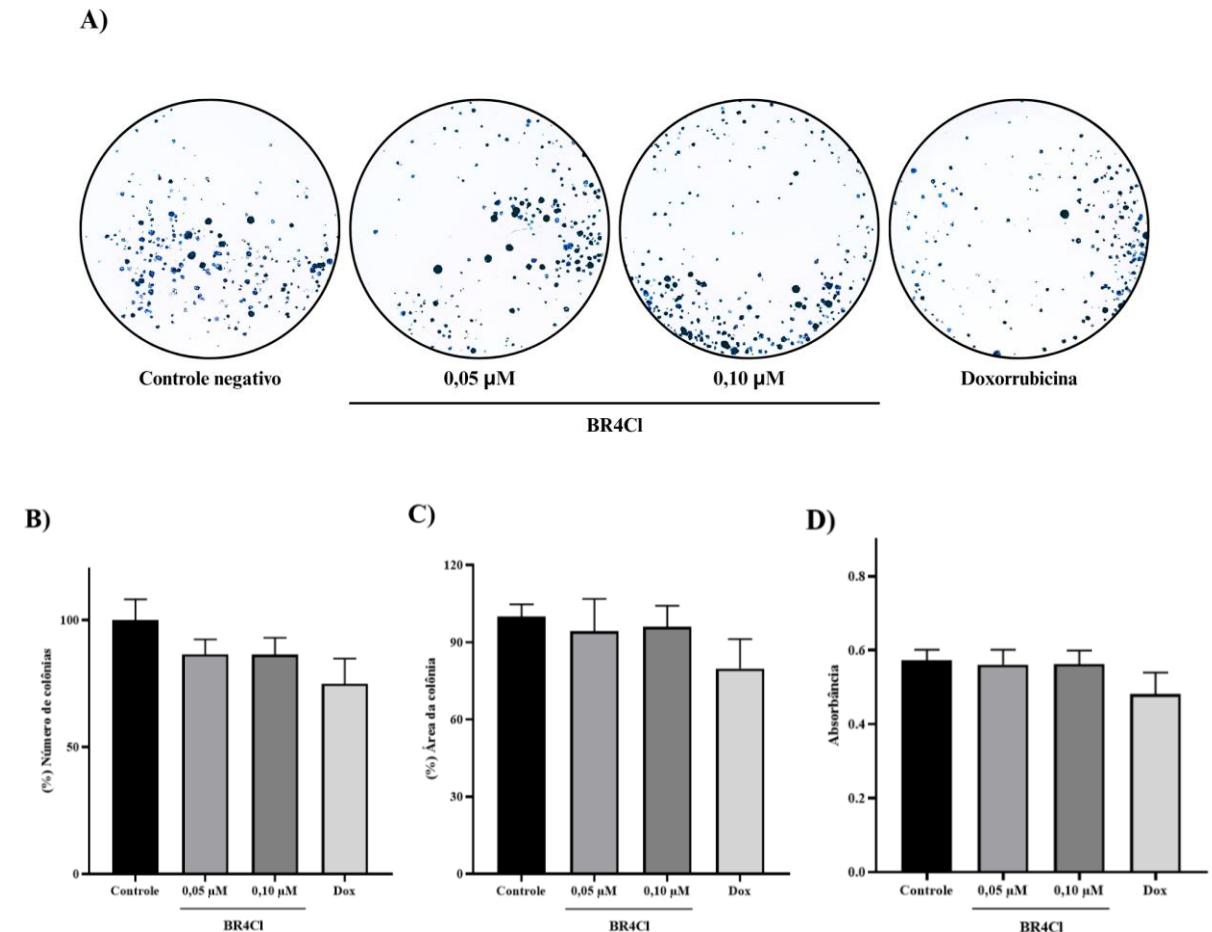
5.4 Ensaio clonogênico

Os resultados evidenciaram que as concentrações de 0,05 μ M e 0,10 μ M de BR4Cl, após 24 horas de tratamento, não reduziram significativamente o número de colônias formadas pelas células SW-480 em comparação ao controle sem tratamento (Figura 11). O percentual de colônias formadas após exposição a BR4Cl foi de 86,46% na concentração de 0,05 μ M e 86,41% na concentração de 0,10 μ M, em relação ao controle negativo. A doxorrubicina (0,10 μ M), utilizada como controle positivo, apresentou um percentual de 74,88% (Figura 11B).

O tratamento com BR4Cl também não interferiu significativamente a área da colônia de células SW-480 quando comparado ao controle negativo (Figura 11C). A análise espectrofotométrica realizada após a solubilização do corante utilizado para visualização das colônias corroborou os dados obtidos nas demais análises (Figura 11D). Esses achados indicam

que BR4Cl, nas concentrações testadas, não afetou significativamente a capacidade proliferativa das células da linhagem SW-480.

Figura 11. Efeito de BR4Cl sobre a formação de colônias em células tumorais SW-480 após 24 horas de tratamento.



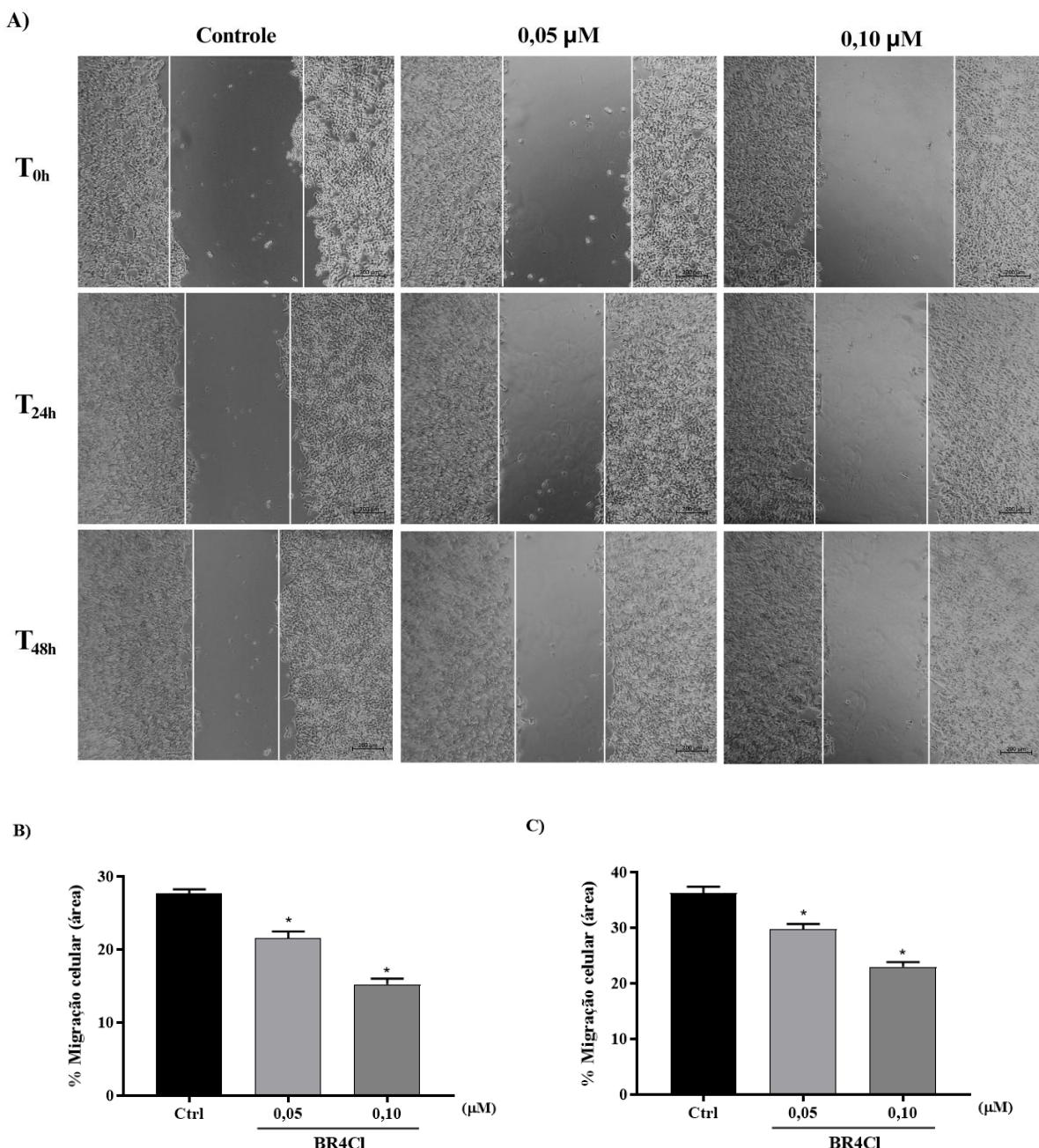
O experimento foi realizado em triplicata. A imagem corresponde a uma das triplicatas representativa (A). Gráfico de porcentagem do número de colônia (B). Gráfico da área da colônia (C). Gráfico da absorbância após descoloração (D). Os resultados foram expressos como média \pm erro padrão da média (EPM)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

5.5 Ensaio de migração celular – *Scratch assay*

A taxa de fechamento da área do arranhão, realizado sobre a monocamada celular, foi calculada com base na comparação entre a área inicial do risco (tempo zero) e após o tempo de 24 ou 48 horas de exposição. O composto BR4Cl, nas concentrações 0,05 µM e 0,10 µM, reduziu significativamente ($p<0,05$) o percentual de migração em comparação ao controle negativo na linhagem SW-480 (Figura 12). Após o tempo de incubação contínua de 24 horas,

o percentual de migração foi de 77,75% na concentração de 0,05 μM e de 55,05% na concentração de 0,10 μM , em comparação ao controle negativo (Figura 12B). No período de 48 horas, o percentual de migração foi de 82,14% na concentração de 0,05 μM e 63,23% na concentração de 0,10 μM , em comparação ao controle negativo (Figura 12C).

Figura 12. Efeito de BR4Cl sobre o potencial migratório de células SW-480.

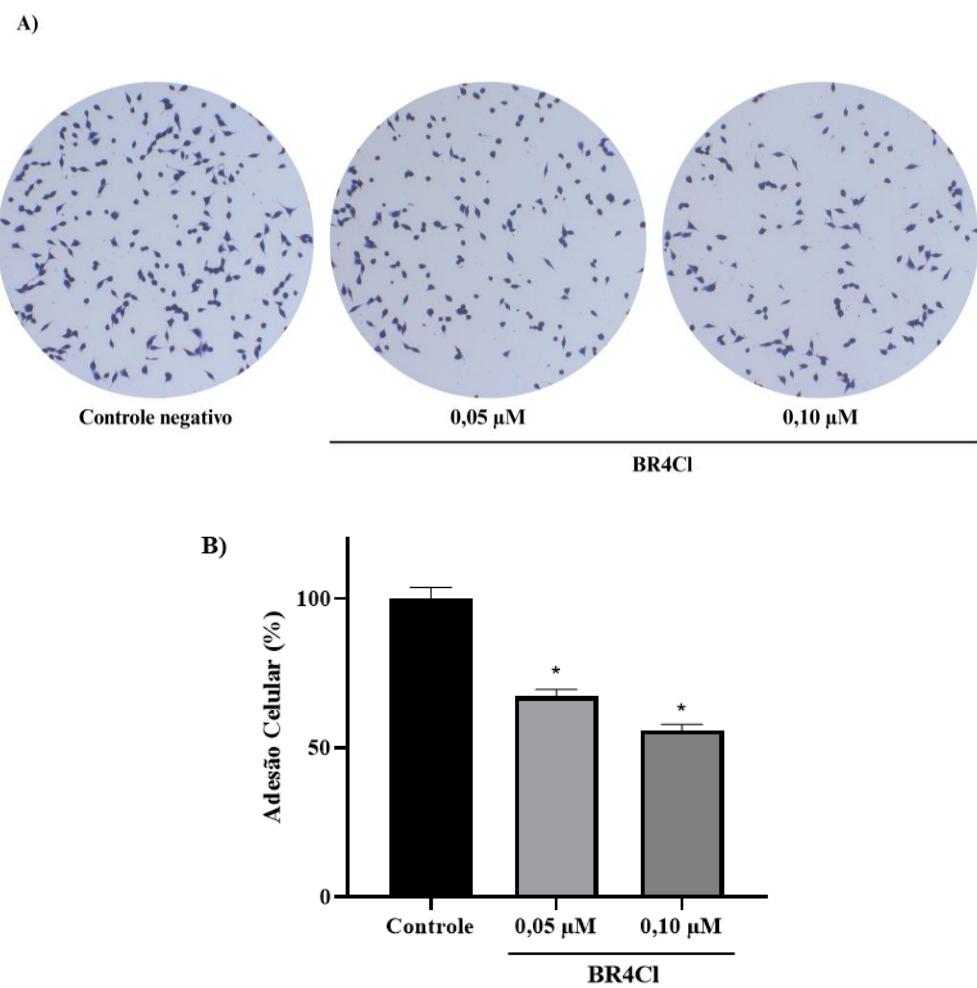


Fotos representativas da porcentagem de fechamento do risco por microscopia óptica com objetiva de 5x nos tempos 0; 24 e 48 h (A). Gráfico gerado por meio da área de cada risco dado em porcentagem após 24 horas (B) e 48 horas de migração (C). Os resultados foram expressos como média \pm erro padrão da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

5.6 Ensaio de adesão em fibronectina

De acordo com os resultados, ambas as concentrações testadas inibiram significativamente a adesão das células SW-480 à fibronectina, tanto em comparação ao controle não tratado, quanto entre si (Figura 13A). As concentrações de 0,05 μ M e 0,10 μ M reduziram a adesão celular em 32,68% e 44,16%, respectivamente, após 24 horas de tratamento (Figura 13B). Esses achados sugerem que o composto interfere nas interações célula-matriz extracelular, um processo fundamental para a adesão, migração e potencial metastático de células tumorais, reforçando seu potencial como agente antimetastático.

Figura 13. Efeito de BR4Cl sobre a adesão de células SW-480 à fibronectina.



Imagens representativas do ensaio de adesão, utilizando as concentrações de 0,05 μ M e 0,10 μ M de BR4Cl (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 \pm erro padrão da média (EPM) e um valor de $p < 0,05$ foi considerado estatisticamente significativo. Fonte: elaborado pelo autor, 2025.

6 DISCUSSÃO

A metástase representa a principal causa de morbidade e mortalidade em pacientes com câncer, sendo responsável por grande parte dos casos de falência terapêutica (Stoletov; Beatty; Lewis, 2020). Apesar disso, muitos esforços na pesquisa oncológica ainda estão concentrados no desenvolvimento de agentes antiproliferativos, enquanto o combate à capacidade metastática das células tumorais permanece subexplorado (Solomon *et al.*, 2021). Essa lacuna evidencia a necessidade urgente de novos compostos capazes de interferir nos processos que sustentam a disseminação tumoral.

Ao longo da história, produtos de origem natural desempenharam um papel central no tratamento de diversas doenças humanas (Atanasov *et al.*, 2021). Atualmente, esses compostos têm despertado grande interesse na química medicinal, sendo amplamente utilizados como ferramentas farmacêuticas. Suas atividades biológicas inspiram o desenho e a síntese de novos medicamentos, especialmente no contexto do câncer (Muhammad *et al.*, 2022; Ribaudo, 2022). A produção de moléculas híbridas também surge como uma estratégia promissora no desenvolvimento de fármacos anticâncer, favorecendo propriedades como maior atividade e especificidade (Gao; Huang; Xiao, 2020).

Nesse contexto, estudos têm destacado as atividades biológicas de chalconas e seus derivados, em especial sua ação anticâncer (Constantinescu; Lungu, 2021). De forma semelhante, a β -ionona e seus derivados demonstram atividades farmacológicas relevantes, incluindo efeitos antiproliferativos e antimetastáticos (Ansari; Emami, 2016). Com base nessas evidências, híbridos contendo estruturas de chalcona e β -ionona têm sido sintetizados e avaliados quanto ao seu potencial contra células tumorais.

A linhagem SW-480, derivada do tumor primário de um paciente com câncer colorretal metastático (Ahmed *et al.*, 2013), apresentam alterações na expressão de vimentina, E-caderina e β -catenina. Tais marcadores estão associados ao fenótipo mesenquimal, sendo amplamente empregadas como modelo experimental para estudos de metástase (Brabletz *et al.*, 2001; Liu *et al.*, 2023; Li *et al.*, 2023; Chen *et al.*, 2020).

Nossos dados demonstraram que BR4Cl inibiu significativamente o crescimento das células SW-480, apresentando valores de IC_{50} de 12,44 μ M, 4,62 μ M e 3,64 μ M, após 24, 48 e

72 horas de tratamento, respectivamente. A redução progressiva desses valores sugere um efeito citotóxico dependente do tempo, especialmente nas primeiras 48 horas. Um efeito análogo é observado em alguns medicamentos já utilizados na terapêutica oncológica, como a carboplatina e a doxifluridina, que apresentam ação inicial rápida contra as células cancerosas (Hazekawa *et al.*, 2019).

Adicionalmente, estudos anteriores corroboram esses achados. Custódio *et al.* (2021) relataram ação citotóxica de uma chalcona terpenóide frente a diferentes linhagens tumorais, incluindo HL-60, HCT-116, PC-3 e SNB-19. Do mesmo modo, Lima *et al.* (2019) também relataram a citotoxicidade de BR4Cl contra SF-295, OVCAR-8 e HCT-116, com destaque para a maior sensibilidade desta última. Em comparação, nossos resultados sugerem que a linhagem SW-480 é ainda mais sensível à BR4Cl, possivelmente devido a características específicas do seu perfil molecular.

Considerando que medicamentos com potencial antimetastático não precisam, necessariamente, reduzir o volume tumoral por indução de morte celular, mas sim impedir a disseminação das células tumorais (Solomon *et al.*, 2021), tornou-se essencial a determinação das concentrações não citotóxicas de BR4Cl. Essa etapa foi fundamental para evitar interferências nos ensaios subsequentes, garantindo que eventuais reduções em eventos metastáticos fossem atribuídas à interferência funcional do composto e não a efeitos citotóxicos indiretos.

Com o objetivo de confirmar os dados obtidos na curva de viabilidade celular, foi realizado o ensaio de exclusão por azul de Tripan, que permite diferenciar células viáveis e não viáveis com base na integridade da membrana plasmática (Avelar-Freitas, 2014). Os resultados confirmaram que as concentrações de 0,05 μ M e 0,10 μ M de BR4Cl não afetaram a viabilidade das células SW-480 após 24 horas de tratamento. Esses achados corroboram a literatura, que recomenda o uso de concentrações subcitotóxicas em ensaios de migração e adesão celular (Rossette *et al.*, 2017; De Sá *et al.*, 2024).

Como abordagem complementar, foi utilizada a coloração por panótico rápido para avaliar a morfologia e integridade celular. Não foi observada presença significativa de morte celular nos grupos tratados, reforçando os dados de viabilidade. Além disso, a presença de figuras mitóticas tanto nos grupos controle quanto tratados indica que a atividade proliferativa celular foi preservada (Jahanifar *et al.*, 2024).

Apesar desses resultados indicarem ausência de toxicidade nas concentrações utilizadas, é relevante destacar que compostos estruturalmente semelhantes, como chalconas e β -ionona, são descritos na literatura por induzir parada mitótica em diferentes modelos celulares (Zhu *et al.*, 2010; Jones *et al.*, 2013; Dong *et al.*, 2013; Du *et al.*, 2019; Saito *et al.*, 2021; Gao *et al.*, 2021; Moura *et al.*, 2022). Assim, embora não tenha sido observada interferência no ciclo celular nas condições testadas, não se pode descartar a possibilidade de que o BR4Cl exerça efeitos semelhantes em concentrações mais elevadas ou em tempos de exposição prolongados.

Dando continuidade aos experimentos, foi realizado o ensaio clonogênico com o objetivo de avaliar o impacto de concentrações subcitotóxicas de BR4Cl na capacidade de formação de colônias pelas células SW-480. Após 24 horas de pré-tratamento, não foram observadas diferenças significativas entre os grupos tratados e o controle negativo, sugerindo que, nas condições testadas, BR4Cl não compromete a proliferação celular a longo prazo.

A formação de colônias está diretamente relacionada à sobrevivência e ao potencial tumorigênico de células metastáticas (De Sá *et al.*, 2024). Frequentemente, esse ensaio é conduzido com concentrações próximas à CI_{50} , o que pode limitar a interpretação dos resultados, uma vez que a morte celular inviabiliza a formação de colônias (Lu *et al.*, 2020; Jin *et al.*, 2022; Chittasupho *et al.*, 2024; Wu *et al.*, 2025). Neste estudo, a ausência de efeito no ensaio clonogênico pode ser atribuída ao uso intencional de concentrações subcitotóxicas, previamente validadas pelos ensaios de viabilidade e morfologia celular.

No entanto, é relevante considerar que alguns compostos podem afetar a sobrevivência reprodutiva das células tumorais mesmo em concentrações não citotóxicas. Estudos anteriores demonstraram que certos agentes, como os avaliados por Araújo *et al.* (2024) e De Sá *et al.* (2024), foram capazes de inibir a formação de colônias sem provocar morte celular. Isso pode ocorrer devido à interferência em processos essenciais como progressão do ciclo celular, reparo de danos ao DNA, sinalização mitogênica ou indução de senescência celular (Cairns; Harris; Mak, 2011). Nesses casos, as células permanecem viáveis, mas perdem a capacidade de se dividir e originar novas colônias. Embora esse não tenha sido o caso com BR4Cl nas concentrações avaliadas, este resultado reforça que tais concentrações não interferem na viabilidade das células, haja vista a não ocorrência de efeitos citotóxicos e citostáticos.

O prognóstico do câncer colorretal (CCR) está intimamente associado à ocorrência de metástases durante sua progressão. A taxa global de sobrevida em cinco anos para pacientes

com CCR é de aproximadamente 64%. No entanto, esse número cai drasticamente para menos de 15% em casos de CCR metastático, refletindo a elevada agressividade dessa condição (Cañellas-Socias; Sancho; Batlle, 2024). Diante desse cenário, torna-se essencial a investigação de moléculas capazes de modular vias biológicas envolvidas na progressão e disseminação tumoral.

Entre os eventos fundamentais para a metástase estão a migração e a adesão celular, que permitem o desprendimento das células tumorais do sítio primário, sua movimentação pelo microambiente tumoral e eventual colonização de tecidos distantes (Kawauchi, 2012). No presente estudo, avaliou-se o efeito da chalcona BR4Cl sobre a motilidade de células SW-480 por meio do ensaio de migração celular *in vitro*. Os resultados indicam que BR4Cl, nas concentrações de 0,05 μ M e 0,10 μ M, reduziu significativamente a migração celular após 24 e 48 horas de tratamento. Achados semelhantes foram relatados por Predes *et al.* (2019), que demonstraram a inibição da migração de células SW-480 pela lonchocarpina, uma chalcona natural. De modo análogo, Fang *et al.* (2022) observaram que a β -ionona retardou de forma significativa a migração de células de câncer de próstata após 24 horas de exposição.

A adesão celular à matriz extracelular (MEC) é outro evento essencial no processo metastático, permitindo que as células tumorais se ancorem e interajam com o microambiente tecidual (Kawauchi, 2012; Lin; Shih, 2014). As integrinas desempenham papel central nesse processo, promovendo o reconhecimento e a ligação a componentes da MEC como colágeno, laminina, vitronectina e fibronectina, além de modularem a resposta celular a estímulos ambientais (Nikit *et al.*, 2015; Hamidi; Ivaska, 2018). Com base nisso, foi realizado um ensaio de adesão celular para avaliar o impacto da BR4Cl na adesão de células SW-480 à fibronectina.

Os resultados demonstraram uma redução estatisticamente significativa na adesão das células pré-tratadas com BR4Cl por 24 horas, com o efeito mais pronunciado observado na concentração de 0,10 μ M. Esse achado é consistente com o trabalho de Lin e Shih (2014), que relataram inibição dose-dependente da adesão célula-matriz em células de adenocarcinoma gástrico tratadas com chalcona. De forma complementar, Huang *et al.* (2012) também demonstraram que a β -ionona foi capaz de inibir a adesão de células de hepatocarcinoma humano à matriz extracelular.

A literatura demonstra que chalconas, β -ionona e seus derivados são capazes de interferir significativamente nos processos de adesão e migração celular em diferentes tipos de

câncer, por meio da modulação de componentes e vias de sinalização envolvidos na progressão tumoral. Xiao *et al.* (2023), por exemplo, relataram que um derivado de chalcona foi capaz de inibir a migração e adesão de células de câncer de próstata resistentes à castração por meio da interação com a cinase de adesão focal (FAK), uma proteína-chave na transdução de sinais relacionados à proliferação, adesão e motilidade celular.

De forma semelhante, Huang *et al.* (2012) demonstraram que a β -ionona inibiu a migração, adesão e invasão de células de hepatocarcinoma pela supressão da atividade de metaloproteinases e da via de sinalização FAK, a qual participa do rearranjo do citoesqueleto celular, promovendo a dinâmica adesiva e migratória. A FAK, por sua vez, é uma proteína fosforilada dependente de integrinas, comumente associada à migração e invasão de células tumorais, incluindo aquelas do câncer colorretal (Jeong, 2018).

Além disso, Predes *et al.* (2019) relataram a inibição da migração de células de câncer colorretal, incluindo a linhagem SW-480, após o tratamento com lonchocarpina, uma chalcona natural que atua como modulador negativo da via Wnt/ β -catenina. Esta via está diretamente relacionada à regulação de proteínas de membrana envolvidas nos processos de adesão e migração celular. De maneira análoga, Fang *et al.* (2022) mostraram que a β -ionona também promoveu a degradação da β -catenina e a inibição da Transição Epitelial-Mesenquimal (EMT), reduzindo a migração e invasividade de células de câncer de próstata. Esse efeito foi acompanhado pela diminuição da expressão de marcadores mesenquimais, como N-caderina e vimentina.

No contexto do câncer colorretal, a ativação aberrante da via Wnt/ β -catenina está associada à indução da EMT, promovendo a repressão de marcadores epiteliais e a ativação de fatores de transcrição que favorecem o fenótipo migratório e invasivo (Sun *et al.*, 2024). A EMT, portanto, é um processo crítico na metástase, conferindo às células tumorais maior plasticidade e capacidade de disseminação (Heerboth *et al.*, 2015).

Importante destacar que chalconas também podem interferir na EMT por vias alternativas à Wnt/ β -catenina. Chen *et al.* (2019) demonstraram que um composto com estrutura de chalcona supriu a EMT em células de câncer de ovário, mesmo em concentrações não citotóxicas, por meio da regulação negativa de fatores de transcrição relacionados à EMT e modulação de marcadores epiteliais e mesenquimais. Da mesma forma, Lu, Zheng e Fan (2022) mostraram que a cardamonina, uma chalcona natural, inibiu a EMT em células de câncer

colorretal, promovendo o aumento da expressão de E-caderina e a redução de N-caderina, resultando em menor capacidade migratória e invasiva.

Considerando que a molécula BR4Cl apresenta estruturas químicas que remetem tanto à chalcona quanto à ionona, é plausível sugerir que seu efeito sobre a adesão e migração de células SW-480 decorra da interferência em vias semelhantes às discutidas anteriormente. No entanto, estudos adicionais são necessários para elucidar os mecanismos moleculares específicos pelos quais BR4Cl interfere nos eventos celulares relacionados à metástase.

7 CONCLUSÃO

Neste estudo, o híbrido estrutural de chalcona e ionona, denominado BR4Cl, demonstrou significativa capacidade inibitória sobre etapas cruciais do processo metastático *in vitro*. Os resultados evidenciaram que BR4Cl reduziu de forma expressiva a migração das células SW-480 após 24 e 48 horas de exposição, além de comprometer a adesão celular à fibronectina, mesmo em concentrações não citotóxicas durante pré-tratamento de 24 horas. Esses achados indicam que BR4Cl atua como um promissor modulador de eventos-chave envolvidos na progressão metastática do câncer colorretal. Contudo, para validar seu potencial terapêutico, são necessários estudos adicionais que esclareçam os mecanismos moleculares específicos responsáveis por sua atividade, abrindo caminho para o desenvolvimento de estratégias inovadoras no combate ao câncer colorretal.

REFERÊNCIAS

- ABEDIZADEH, R. *et al.* Colorectal cancer: a comprehensive review of carcinogenesis, diagnosis, and novel strategies for classified treatments. **Cancer metastasis reviews**, v. 43, n. 2, p. 729–753, 2024.
- AHMAD, R. *et al.* Emerging trends in colorectal cancer: Dysregulated signaling pathways (Review). **International journal of molecular medicine**, v. 47, n. 3, 2021.
- AHMED, D. *et al.* Epigenetic and genetic features of 24 colon cancer cell lines. **Oncogenesis**, v. 2, n. 9, p. e71, 2013.
- AL BITAR, S. *et al.* Molecular mechanisms targeting drug-resistance and metastasis in colorectal cancer: Updates and beyond. **World journal of gastroenterology: WJG**, v. 29, n. 9, p. 1395–1426, 2023.
- ALOUM, L. *et al.* Ionone is more than a Violet's fragrance: A review. **Molecules (Basel, Switzerland)**, v. 25, n. 24, p. 5822, 2020.
- AMSLINGER, S. *et al.* Reactivity assessment of chalcones by a kinetic thiol assay. **Organic & biomolecular chemistry**, v. 11, n. 4, p. 549–554, 2013.
- ANSARI, M.; EMAMI, S. β -Ionone and its analogs as promising anticancer agents. **European journal of medicinal chemistry**, v. 123, p. 141–154, 2016.
- ARAÚJO, G. S. DE *et al.* Sulfonamide-chalcone hybrid compound suppresses cellular adhesion and migration: Experimental and computational insight. **Chemico-biological interactions**, v. 398, n. 111115, p. 111115, 2024.
- ATANASOV, A. G. *et al.* Natural products in drug discovery: advances and opportunities. **Nature reviews. Drug discovery**, v. 20, n. 3, p. 200–216, 2021.
- AVELAR-FREITAS, B. A. *et al.* Trypan blue exclusion assay by flow cytometry. **Brazilian Journal of Medical and Biological Research**, v. 47, n. 4, p. 307–315, 2014.
- BABAEI, G.; AZIZ, S. G.-G.; JAGHI, N. Z. Z. EMT, cancer stem cells and autophagy; The three main axes of metastasis. **Biomedecine & pharmacotherapie [Biomedicine & pharmacotherapy]**, v. 133, n. 110909, p. 110909, 2021.
- 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.
- BEAR, J. E.; HAUGH, J. M. Directed migration of mesenchymal cells: where signaling and the cytoskeleton meet. **Current opinion in cell biology**, v. 30, p. 74–82, 2014.
- BRABLETZ, T. *et al.* Variable beta-catenin expression in colorectal cancers indicates tumor progression driven by the tumor environment. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 98, n. 18, p. 10356–10361, 2001.

- BRASELMANN, H. *et al.* CFAssay: statistical analysis of the colony formation assay. **Radiation oncology (London, England)**, v. 10, n. 1, 2015.
- BRIX, N. *et al.* The clonogenic assay: robustness of plating efficiency-based analysis is strongly compromised by cellular cooperation. **Radiation oncology (London, England)**, v. 15, n. 1, 2020.
- CAIRNS, R. A.; HARRIS, I. S.; MAK, T. W. Regulation of cancer cell metabolism. **Nature reviews. Cancer**, v. 11, n. 2, p. 85–95, 2011.
- CAÑELLAS-SOCIAS, A.; SANCHO, E.; BATLLE, E. Mechanisms of metastatic colorectal cancer. **Nature reviews. Gastroenterology & hepatology**, v. 21, n. 9, p. 609–625, 2024.
- CHAPNICK, D. A.; JACOBSEN, J.; LIU, X. The development of a novel high throughput computational tool for studying individual and collective cellular migration. **PLoS one**, v. 8, n. 12, p. e82444, 2013.
- CHEN, C. *et al.* Isoliquiritigenin inhibits ovarian cancer metastasis by reversing epithelial-to-mesenchymal transition. **Molecules (Basel, Switzerland)**, v. 24, n. 20, p. 3725, 2019.
- CHEN, X. *et al.* Chalcone derivative CX258 suppresses colorectal cancer via inhibiting the TOP2A/Wnt/β-catenin signaling. **Cells (Basel, Switzerland)**, v. 12, n. 7, p. 1066, 2023.
- CHEN, X. *et al.* Ligustrazine inhibits the viability and motility of colon cancer cells. **Translational cancer research**, v. 9, n. 5, p. 3203–3213, 2020.
- CHITTASUPHO, C. *et al.* Clerodendrum chinense stem extract and nanoparticles: Effects on proliferation, colony formation, apoptosis induction, cell cycle arrest, and mitochondrial membrane potential in human breast adenocarcinoma breast cancer cells. **International journal of molecular sciences**, v. 25, n. 2, 2024.
- CONSTANTINESCU, T.; LUNGU, C. N. Anticancer activity of natural and synthetic chalcones. **International journal of molecular sciences**, v. 22, n. 21, p. 11306, 2021.
- CUSTODIO, J. M. F. *et al.* Alternative mechanisms of action for the apoptotic activity of terpenoid-like chalcone derivatives. **New journal of chemistry**, v. 45, n. 34, p. 15267–15279, 2021.
- DE SÁ, R. E. *et al.* Withaphysalin Derivatives from Iochroma arborescens Induce Antiproliferative and Antimigratory Activities in vitro. **Planta medica**, v. 90, n. 12, p. 938–948, 2024.
- DEKKER, E. *et al.* Colorectal cancer. **Lancet**, v. 394, n. 10207, p. 1467–1480, 2019.
- DIAS, T. A. *et al.* Superior anticancer activity of halogenated chalcones and flavonols over the natural flavonol quercetin. **European journal of medicinal chemistry**, v. 65, p. 500–510, 2013.
- DONG, H.-W. *et al.* β-Ionone arrests cell cycle of gastric carcinoma cancer cells by a MAPK pathway. **Archives of toxicology**, v. 87, n. 10, p. 1797–1808, 2013.

- DOSUNMU, G. T.; SHERGILL, A. Colorectal cancer: Genetic underpinning and molecular therapeutics for precision medicine. **Genes**, v. 15, n. 5, p. 538, 2024.
- DU, S. *et al.* 6-MOMIPP, a novel brain-penetrant anti-mitotic indolyl-chalcone, inhibits glioblastoma growth and viability. **Cancer chemotherapy and pharmacology**, v. 83, n. 2, p. 237–254, 2019.
- FANG, Q. *et al.* B-ionone inhibits epithelial-mesenchymal transition (EMT) in prostate cancer cells by negatively regulating the Wnt/β-catenin pathway. **Frontiers in bioscience (Landmark edition)**, v. 27, n. 12, p. 335, 2022.
- FARES, J. *et al.* Molecular principles of metastasis: a hallmark of cancer revisited. **Signal transduction and targeted therapy**, v. 5, n. 1, 2020.
- FEITELSON, M. A. *et al.* Sustained proliferation in cancer: Mechanisms and novel therapeutic targets. **Seminars in cancer biology**, v. 35, p. S25–S54, 2015.
- FRIEDL, P. Prespecification and plasticity: shifting mechanisms of cell migration. **Current opinion in cell biology**, v. 16, n. 1, p. 14–23, 2004.
- GAO, F.; HUANG, G.; XIAO, J. Chalcone hybrids as potential anticancer agents: Current development, mechanism of action, and structure-activity relationship. **Medicinal research reviews**, v. 40, n. 5, p. 2049–2084, 2020.
- GAO, X. *et al.* 4-hydroxyderricin promotes apoptosis and cell cycle arrest through regulating PI3K/AKT/mTOR pathway in hepatocellular cells. **Foods (Basel, Switzerland)**, v. 10, n. 9, p. 2036, 2021.
- GERSTBERGER, S.; JIANG, Q.; GANESH, K. Metastasis. **Cell**, v. 186, n. 8, p. 1564–1579, 2023.
- GOMES, M. *et al.* Chalcone derivatives: Promising starting points for drug design. **Molecules (Basel, Switzerland)**, v. 22, n. 8, p. 1210, 2017.
- GUAN, Y.-F. *et al.* Design, synthesis, and anticancer activity studies of novel quinoline-chalcone derivatives. **Molecules (Basel, Switzerland)**, v. 26, n. 16, p. 4899, 2021.
- HAMIDI, H.; IVASKA, J. Every step of the way: integrins in cancer progression and metastasis. **Nature reviews. Cancer**, v. 18, n. 9, p. 533–548, 2018.
- 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.
- HANAHAN, D.; WEINBERG, R. A. The hallmarks of cancer. **Cell**, v. 100, n. 1, p. 57–70, 2000.

- 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.
- HEERBOTH, S. *et al.* EMT and tumor metastasis. **Clinical and translational medicine**, v. 4, n. 1, p. 6, 2015.
- HOTULAINEN, P.; LAPPALAINEN, P. Stress fibers are generated by two distinct actin assembly mechanisms in motile cells. **The journal of cell biology**, v. 173, n. 3, p. 383–394, 2006.
- HUANG, C.-S. *et al.* The anti-metastatic efficacy of β -ionone and the possible mechanisms of action in human hepatocarcinoma SK-Hep-1 cells. **The British journal of nutrition**, v. 107, n. 5, p. 631–638, 2012.
- HUMPHRIES, M. J. Cell adhesion assays. **Methods in Molecular Biology**. Totowa, NJ: Humana Press, 2009.
- INSTITUTO NACIONAL DE CÂNCER (BRASIL). Estimativa 2023: incidência de câncer no Brasil /Instituto Nacional de Câncer. Rio de Janeiro: INCA, 2022.
- JAHANIFAR, M. *et al.* Mitosis detection, fast and slow: Robust and efficient detection of mitotic figures. **Medical image analysis**, v. 94, n. 103132, p. 103132, 2024.
- JANAKIRAM, N. B. *et al.* β -Ionone inhibits colonic aberrant crypt foci formation in rats, suppresses cell growth, and induces retinoid X receptor- α in human colon cancer cells. **Molecular cancer therapeutics**, v. 7, n. 1, p. 181–190, 2008.
- JANISZEWSKA, M.; PRIMI, M. C.; IZARD, T. Cell adhesion in cancer: Beyond the migration of single cells. **The journal of biological chemistry**, v. 295, n. 8, p. 2495–2505, 2020.
- JASPERSON, K. W. *et al.* Hereditary and familial colon cancer. **Gastroenterology**, v. 138, n. 6, p. 2044–2058, 2010.
- JEONG, K.-Y. Inhibiting focal adhesion kinase: A potential target for enhancing therapeutic efficacy in colorectal cancer therapy. **World journal of gastrointestinal oncology**, v. 10, n. 10, p. 290–292, 2018.
- JIN, X.-X. *et al.* A chalcone-syringaldehyde hybrid inhibits triple-negative breast cancer cell proliferation and migration by inhibiting CKAP2-mediated FAK and STAT3 phosphorylation. **Phytomedicine: international journal of phytotherapy and phytopharmacology**, v. 101, n. 154087, p. 154087, 2022.
- JONES, S. *et al.* B-ionone induces cell cycle arrest and apoptosis in human prostate tumor cells. **Nutrition and cancer**, v. 65, n. 4, p. 600–610, 2013.
- KAWAUCHI, T. Cell adhesion and its endocytic regulation in cell migration during neural development and cancer metastasis. **International journal of molecular sciences**, v. 13, n. 4, p. 4564–4590, 2012.

- KEUM, N.; GIOVANNUCCI, E. Global burden of colorectal cancer: emerging trends, risk factors and prevention strategies. **Nature reviews. Gastroenterology & hepatology**, v. 16, n. 12, p. 713–732, 2019.
- KUCIK, D. F.; WU, C. Cell-adhesion assays. **Cell Migration**. New Jersey: Humana Press, 2004.
- KUMAR, P.; NAGARAJAN, A.; UCHIL, P. D. Analysis of cell viability by the MTT assay. **Cold Spring Harbor protocols**, v. 2018, n. 6, 2018.
- LAI, W. *et al.* Design and synthesis of novel chalcone derivatives: Anti-breast cancer activity evaluation and docking study. **International journal of molecular sciences**, v. 24, n. 21, p. 15549, 2023.
- LAMBERT, A. W.; PATTABIRAMAN, D. R.; WEINBERG, R. A. Emerging biological principles of metastasis. **Cell**, v. 168, n. 4, p. 670–691, 2017.
- LÄMMERMANN, T.; SIXT, M. Mechanical modes of ‘amoeboid’ cell migration. **Current opinion in cell biology**, v. 21, n. 5, p. 636–644, 2009.
- LAMOUILLE, S.; XU, J.; DERYNCK, R. Molecular mechanisms of epithelial–mesenchymal transition. **Nature reviews. Molecular cell biology**, v. 15, n. 3, p. 178–196, 2014.
- LÄUBLI, H.; BORSIG, L. Altered cell adhesion and glycosylation promote cancer immune suppression and metastasis. **Frontiers in immunology**, v. 10, p. 2120, 2019.
- LE DÉVÉDEC, S. E. *et al.* Systems microscopy approaches to understand cancer cell migration and metastasis. **Cellular and molecular life sciences: CMLS**, v. 67, n. 19, p. 3219–3240, 2010.
- LI, J. *et al.* Genetic and biological hallmarks of colorectal cancer. **Genes & development**, v. 35, n. 11–12, p. 787–820, 2021.
- LI, Q. *et al.* Signaling pathways involved in colorectal cancer: pathogenesis and targeted therapy. **Signal transduction and targeted therapy**, v. 9, n. 1, 2024.
- LI, T. *et al.* Investigation of the effects of glabridin on the proliferation, apoptosis, and migration of the human colon cancer cell lines SW480 and SW620 and its mechanism based on reverse virtual screening and proteomics. **Oxidative medicine and cellular longevity**, v. 2023, p. 1117431, 2023.
- LIANG, C.-C.; PARK, A. Y.; GUAN, J.-L. In vitro scratch assay: a convenient and inexpensive method for analysis of cell migration in vitro. **Nature protocols**, v. 2, n. 2, p. 329–333, 2007.
- LIMA, R. S. *et al.* Structure and cytotoxic activity of terpenoid-like chalcones. **Arabian journal of chemistry**, v. 12, n. 8, p. 3890–3901, 2019.

LIN, S.-H.; SHIH, Y.-W. Antitumor effects of the flavone chalcone: inhibition of invasion and migration through the FAK/JNK signaling pathway in human gastric adenocarcinoma AGS cells. **Molecular and cellular biochemistry**, v. 391, n. 1–2, p. 47–58, 2014.

LIN, Y. *et al.* A novel chalcone derivative exerts anti-inflammatory and anti-oxidant effects after acute lung injury. **Aging**, v. 11, n. 18, p. 7805–7816, 2019.

LIU, Y. *et al.* Silencing MARCH2 inhibits the invasion, migration, and EMT transformation of human colorectal cancer SW480 cells. **Technology in cancer research & treatment**, v. 22, 2023.

LIU, Y.-J. *et al.* Confinement and low adhesion induce fast amoeboid migration of slow mesenchymal cells. **Cell**, v. 160, n. 4, p. 659–672, 2015.

LOUIS, K. S.; SIEGEL, A. C. Cell viability analysis using trypan blue: Manual and automated methods. **Methods in Molecular Biology**. Totowa, NJ: Humana Press, 2011.

LU, C.-F. *et al.* Synthesis and biological evaluation of amino chalcone derivatives as antiproliferative agents. **Molecules (Basel, Switzerland)**, v. 25, n. 23, p. 5530, 2020.

LU, T.; ZHENG, C.; FAN, Z. Cardamonin suppressed the migration, invasion, epithelial mesenchymal transition (EMT) and lung metastasis of colorectal cancer cells by down-regulating ADRB2 expression. **Pharmaceutical biology**, v. 60, n. 1, p. 1011–1021, 2022.

LU, W.; KANG, Y. Epithelial-mesenchymal plasticity in cancer progression and metastasis. **Developmental cell**, v. 49, n. 3, p. 361–374, 2019.

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

MAHAPATRA, D. K.; BHARTI, S. K.; ASATI, V. Anti-cancer chalcones: Structural and molecular target perspectives. **European journal of medicinal chemistry**, v. 98, p. 69–114, 2015.

MANOEL, D. S. *et al.* Second- and third-order nonlinear optical properties of mono-substituted terpenoid-like chalcones. **Journal of photochemistry and photobiology. A, Chemistry**, v. 429, n. 113898, p. 113898, 2022.

MATTILA, P. K.; LAPPALAINEN, P. Filopodia: molecular architecture and cellular functions. **Nature reviews. Molecular cell biology**, v. 9, n. 6, p. 446–454, 2008.

MAYOR, R.; ETIENNE-MANNEVILLE, S. The front and rear of collective cell migration. **Nature reviews. Molecular cell biology**, v. 17, n. 2, p. 97–109, 2016.

MICHALKOVA, R. *et al.* Chalcones and gastrointestinal cancers: Experimental evidence. **International journal of molecular sciences**, v. 24, n. 6, p. 5964, 2023.

MITTAL, V. Epithelial mesenchymal transition in tumor metastasis. **Annual review of pathology**, v. 13, n. 1, p. 395–412, 2018.

- 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.
- MOURA, A. F. *et al.* New synthetic sulfonamide chalcone induced cell cycle arrest and cell death in colorectal adenocarcinoma metastatic cells (SW-620). **Anti-cancer agents in medicinal chemistry**, v. 22, n. 12, p. 2340–2351, 2022.
- MUHAMMAD, N. *et al.* The role of natural products and their multitargeted approach to treat solid cancer. **Cells (Basel, Switzerland)**, v. 11, n. 14, p. 2209, 2022.
- NIIT, M. *et al.* Cell-cell and cell-matrix adhesion in survival and metastasis: Stat3 versus Akt. **Biomolecular concepts**, v. 6, n. 5–6, p. 383–399, 2015.
- OKOLO, E. N. *et al.* New chalcone derivatives as potential antimicrobial and antioxidant agent. **Scientific reports**, v. 11, n. 1, p. 21781, 2021.
- OUYANG, Y. *et al.* Chalcone derivatives: Role in anticancer therapy. **Biomolecules**, v. 11, n. 6, p. 894, 2021.
- PEGLION, F.; LLENSE, F.; ETIENNE-MANNEVILLE, S. Adherens junction treadmilling during collective migration. **Nature cell biology**, v. 16, n. 7, p. 639–651, 2014.
- PITA-FERNÁNDEZ, S. *et al.* Intensive follow-up strategies improve outcomes in nonmetastatic colorectal cancer patients after curative surgery: a systematic review and meta-analysis. **Annals of oncology**, v. 26, n. 4, p. 644–656, 2015.
- PRÄBST, K. *et al.* Basic Colorimetric Proliferation Assays: MTT, WST, and Resazurin. **Methods in Molecular Biology**. New York, NY: Springer New York, 2017.
- PREDES, D. *et al.* The chalcone lonchocarpin inhibits Wnt/β-catenin signaling and suppresses colorectal cancer proliferation. **Cancers**, v. 11, n. 12, p. 1968, 2019.
- RIBAUDO, G. Synthesis of flavonoids or other nature-inspired small molecules. **Molbank**, v. 2022, n. 1, p. M1313, 2022.
- RODRIGUEZ, L. G.; WU, X.; GUAN, J.-L. Wound-healing assay. **Cell Migration**. New Jersey: Humana Press, 2004.
- ROSSETTE, M. C. *et al.* The in vitro and in vivo antiangiogenic effects of flavokawain B. **Phytotherapy research: PTR**, v. 31, n. 10, p. 1607–1613, 2017.
- RUDRAPAL, M. *et al.* Chalcone scaffolds, bioprecursors of flavonoids: Chemistry, bioactivities, and pharmacokinetics. **Molecules (Basel, Switzerland)**, v. 26, n. 23, p. 7177, 2021.
- SAHU, N. K. *et al.* Exploring pharmacological significance of chalcone scaffold: a review. **Current medicinal chemistry**, v. 19, n. 2, p. 209–225, 2012.

- SAITO, Y. *et al.* Bicyclic chalcones as mitotic inhibitors for overcoming androgen receptor-independent and multidrug-resistant prostate cancer. **ACS omega**, v. 6, n. 7, p. 4842–4849, 2021.
- SCHÜTZLER, R. C. Estudo comparativo entre os métodos de coloração panótico rápido e giemsa dentro de uma rotina laboratorial. **Revista de Extensão e Iniciação Científica da Unisociesc**, v. 9, n.2, 2022.
- 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.
- SEONG, J.; WANG, N.; WANG, Y. Mechanotransduction at focal adhesions: from physiology to cancer development. **Journal of cellular and molecular medicine**, v. 17, n. 5, p. 597–604, 2013.
- SHARMA, V. *et al.* β -Ionone derived chalcones as potent antiproliferative agents. **European journal of medicinal chemistry**, v. 69, p. 310–315, 2013.
- SILVA, M. C. *et al.* Comparative conformational study of a new terpenoid-like chalcone. **Journal of molecular structure**, v. 1228, n. 129743, p. 129743, 2021.
- SOLOMON, J. *et al.* Are we ready for migrastatics? **Cells (Basel, Switzerland)**, v. 10, n. 8, p. 1845, 2021.
- SOUSA, B.; PEREIRA, J.; PAREDES, J. The crosstalk between cell adhesion and cancer metabolism. **International journal of molecular sciences**, v. 20, n. 8, p. 1933, 2019.
- STODDART, M. J. Cell viability assays: Introduction. **Methods in Molecular Biology**. Totowa, NJ: Humana Press, 2011.
- 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, L. *et al.* Wnt/ β -catenin signalling, epithelial-mesenchymal transition and crosslink signalling in colorectal cancer cells. **Biomedecine & pharmacotherapie [Biomedicine & pharmacotherapy]**, v. 175, n. 116685, p. 116685, 2024.
- TAKESHIMA, H.; USHIJIMA, T. Accumulation of genetic and epigenetic alterations in normal cells and cancer risk. **npj precision oncology**, v. 3, n. 1, 2019.
- TANG, Y.-L. *et al.* Resistance to targeted therapy in metastatic colorectal cancer: Current status and new developments. **World journal of gastroenterology: WJG**, v. 29, n. 6, p. 926–948, 2023.
- TE BOEKHORST, V.; FRIEDL, P. Plasticity of cancer cell invasion—mechanisms and implications for therapy. **Advances in Cancer Research**. Elsevier, 2016.

- TIWARI, A. *et al.* Chemotherapy of leishmaniasis part X: Synthesis and bioevaluation of novel terpenyl heterocycles. **Bioorganic & medicinal chemistry letters**, v. 23, n. 1, p. 248–251, 2013.
- VILLA, S. M.; HECKMAN, J.; BANDYOPADHYAY, D. Medicinally privileged natural chalcones: Abundance, mechanisms of action, and clinical trials. **International journal of molecular sciences**, v. 25, n. 17, p. 9623, 2024.
- WALYELDEEN, A. A. *et al.* Chalcones: Promising therapeutic agents targeting key players and signaling pathways regulating the hallmarks of cancer. **Chemico-biological interactions**, v. 369, n. 110297, p. 110297, 2023.
- WELDAY KAHSSAY, S.; HAILU, G. S.; TAYE DESTA, K. Design, synthesis, characterization and in vivo antidiabetic activity evaluation of some chalcone derivatives. **Drug design, development and therapy**, v. 15, p. 3119–3129, 2021.
- WU, T. *et al.* Tubeimoside-I, an inhibitor of HSPD1, enhances cytotoxicity of oxaliplatin by activating ER stress and MAPK signaling pathways in colorectal cancer. **Journal of ethnopharmacology**, v. 336, n. 118754, p. 118754, 2025.
- 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.
- YANG, Y. *et al.* A novel synthetic chalcone derivative, 2,4,6-trimethoxy-4'-nitrochalcone (Ch-19), exerted anti-tumor effects through stimulating ROS accumulation and inducing apoptosis in esophageal cancer cells. **Cell stress & chaperones**, v. 27, n. 6, p. 645–657, 2022.
- YUE, P. Y. K., *et al.* A simplified method for quantifying cell migration/wound healing in 96-well plates. **Journal of biomolecular screening**, v. 15, n. 4, p. 427–433, 2010.
- ZEESHAN, R.; MUTAHIR, Z. Cancer metastasis - tricks of the trade. **Udruzenje basicnih mediciniskih znanosti [Bosnian journal of basic medical sciences]**, 2017.
- ZHANG, Y.; WEINBERG, R. A. Epithelial-to-mesenchymal transition in cancer: complexity and opportunities. **Frontiers of medicine**, v. 12, n. 4, p. 361–373, 2018.
- ZHOU, B.; XING, C. Diverse molecular targets for chalcones with varied bioactivities. **Medicinal chemistry**, v. 5, n. 8, p. 388–404, 2015.
- ZHOU, J. *et al.* Syntheses and potential anti-prostate cancer activities of ionone-based chalcones. **Bioorganic & medicinal chemistry letters**, v. 19, n. 4, p. 1183–1186, 2009.
- ZHOU, J.; GENG, G.; WU, J. H. Synthesis and in vitro characterization of ionone-based chalcones as novel antiandrogens effective against multiple clinically relevant androgen receptor mutants. **Investigational new drugs**, v. 28, n. 3, p. 291–298, 2010.
- ZHU, J. *et al.* beta-Ionone-induced apoptosis in human osteosarcoma (U2os) cells occurs via a p53-dependent signaling pathway. **Molecular biology reports**, v. 37, n. 6, p. 2653–2663, 2010.

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