

JOSÉ ELIERSON BARROS COSTA

**EFEITO ANTINEOPLÁSICO DO COMPOSTO
4,2',3',4'-TETRAMETOXI CHALCONA EM
LINHAGEM DE NEUROBLASTOMA B103 DE
RATO**

BELÉM-PA

2014

JOSÉ ELIERSON BARROS COSTA

**EFEITO ANTINEOPLÁSICO DO COMPOSTO
4,2',3',4'-TETRAMETOXI CHALCONA EM LINHAGEM
DE NEUROBLASTOMA B103 DE RATO**

Trabalho de defesa apresentado ao Programa de Pós-Graduação em Neurociências e Biologia Celular, Instituto de Ciências Biológicas, Universidade Federal do Pará, como requisito parcial para obtenção do grau de Mestre em Biologia Celular.

Orientador: Prof. Anderson Manoel Herculano Oliveira da Silva.

BELÉM-PA

2014

Dados Internacionais de Catalogação-na-Publicação (CIP)

Costa, José Elierson Barros, 1985-
Efeito antineoplásico do composto
4,2',3',4'-tetrametoxi chalcona em linhagem de
neuroblastoma B103 de rato / José Elierson
Barros Costa. - 2014.

Orientador: Anderson Manoel Herculano da
Silva.

Dissertação (Mestrado) - Universidade Federal
do Pará, Instituto de Ciências Biológicas,
Programa de Pós-Graduação em Neurociências e
Biologia Celular, Belém, 2014.

1. Neuroblastoma. 2. Tumores em crianças. 3.
Câncer Tratamento. I. Título.

CDD 22. ed. 618.929948

JOSÉ ELIERSON BARROS COSTA

**EFEITO ANTINEOPLÁSICO DO COMPOSTO
4,2',3',4'-TETRAMETOXI CHALCONA EM
LINHAGEM DE NEUROBLASTOMA B103 DE
RATO**

BANCA EXAMINADORA:

1. Prof. Dr. Evander de Jesus Oliveira Batista
Núcleo de Medicina Tropical - UFPA
2. Prof. Dr. Fernando Allan Farias Rocha
Universidade Federal do Pará- UFPA

BELÉM – PA

2014

DEDICATÓRIA

A Deus, por ter me dado forças para terminar este trabalho, ser minha fonte de vida e fé.

Aos meus amados pais, Eli de Paulo Costa e Maria Jose Barros Costa, por tudo que já fizeram por mim. Pelo apoio e o carinho incondicional, sem o qual não chegaria aqui.

A minha esposa Suzanne Roberta Costa, pelo apoio e incentivo em todos os momentos deste trabalho.

AGRADECIMENTOS

Ao meu orientador Dr. Anderson Manoel Herculano Oliveira da Silva, pela realização e conclusão deste trabalho no Laboratório de Neuroendocrinologia.

À UFPA por me conceder o privilégio de adquirir o título de mestre em Neurociências e Biologia Celular.

À CAPES pelo incentivo financeiro.

Aos meus amigos do Laboratório de Neuroendocrinologia.

EPÍGRAFE

“Aprendi o silêncio com os faladores, a tolerância com os intolerantes, a bondade com os maldosos; e, por mais estranho que pareça, sou grato a esses professores.”

Khalil Gibran

RESUMO

Neuroblastoma é a neoplasia mais frequentemente diagnosticada na infância. O termo é comumente usado para se referir a uma ampla variedade de tumores neuroblásticos, incluindo os neuroblastomas, ganglioneuroblastomas e ganglioneuromas. Estimativas mostram que 8 milhões de crianças até 15 anos de idade por ano são atingidas por esta neoplasia, onde 80% dos casos são acometidos em até 4 anos de idade, o tumor é derivado de células malignas embrionárias advindas de células neuronais primordiais, desde gânglios simpáticos até medula adrenal e outros pontos. Neste estudo, foi avaliado o potencial citotóxico do composto 4,2',3',4' tetrametoxi chalcona em modelo *in vitro* de neuroblastoma B103 de rato. Foram preparadas soluções estoques da droga a 50mM em dimetilsulfóxido (DMSO) e armazenadas a -20°C para o preparo de novas concentrações (150µM, 100 µM, 75 µM e 50 µM). A viabilidade celular foi testada a partir de cultura de células da glia do córtex de rato e de neuroblastoma b103. Ensaio de migração celular e formação de colônias também foram realizados. Para a análise estatística foi realizado a análise de variância um critério (ANOVA) seguido pelo teste de Tukey, utilizando-se o programa BioEstat 5.0. Na avaliação do efeito citotóxico das chalconas, foi observado que o tratamento com o composto 4,2`3`4'-tetrametoxi chalcona não demonstrou nenhum efeito citotóxico contra células normais do córtex de rato para as concentrações testadas, enquanto que em culturas de células de neuroblastoma B103 foi demonstrado que esta droga promove a morte celular de forma significativa.

Palavras chaves: Câncer, Neuroblastoma, Chalconas, Antineoplásico e apoptose.

ABSTRACT

Neuroblastoma is the most frequently diagnosed malignancy in childhood. The term is commonly used to refer to a wide variety of neuroblastic tumors, including neuroblastomas, ganglioneuromas and ganglioneuroblastomas. Estimates show that 8 million children under 15 years of age per year are affected by this cancer, where 80% of cases are affected in up to 4 years of age, the tumor is malignant cells derived from embryonic arising from primary neuronal cells, since nodes adrenal medulla and sympathetic to other points. In this study, we assessed the cytotoxic potential of the compound 4,2',3',4'-tetrametoxchalcone in vitro model B103 rat neuroblastoma. Drug stock solutions were prepared at 50mM in dimethylsulphoxide (DMSO) and stored at -20 ° C for the preparation of new concentrations (150µM, 100 mM, 75 mM and 50 mM). Cell viability was assayed from culture of glial cells from rat cortex. Cell migration assays and colony formation were also conducted. For statistical analysis, analysis of variance criterion (ANOVA) followed by Tukey test using the BioEstat 5.0 program was conducted. In the evaluation of cytotoxic effect of chalcones, it was observed that treatment with the compound 4,2',3',4'-tetrametoxchalcone showed no cytotoxic effect against normal cells of rat cortex for the concentrations tested, whereas in cell cultures neuroblastoma B103 was shown that the drug promotes cell death significantly.

Keywords: Cancer, Neuroblastoma, Chalcones, Antineoplastic and apoptosis

LISTA DE FIGURA

Figura 1: Distribuição proporcional dos dez tipos de câncer mais incidentes estimados para 2014 por sexo, exceto pele não melanoma. (Fonte: INCA, 2014)

Figura 2: Ciclo Celular: Divisão de uma célula eucarionte hipotética com dois cromossomos. Dando origem a duas células-filhas geneticamente idênticas que darão início a um novo ciclo celular. Fonte: ALBERTS, 2004.

Figura 3: As fases do ciclo celular. As células crescem continuamente na interfase, a qual esta dividida em três fases: A fase S de replicação do DNA; G_1 é o intervalo entre a fase M e a fase S; A G_2 é o intervalo entre a fase S e a fase M; A fase M é representada pela divisão do núcleo e depois do citoplasma. Fonte: ALBERTS, 2004.

Figura 4: Foto mostrando cultura de células de neuroblastoma B103. (Fonte: YANAGIDA, *et al.*; 2009).

Figura 5: Estrutura geral da chalconas.

Figura 6: Estrutura das 3',4',5'- trimetoxi chalconas (R=substituinte).

Figura 7: Estrutura plana da 2'-hidroxichalcona.

Figura 8: Estrutura plana da dibenzalacetona.

Figura 9: Estrutura plana da 4,2',3',4'- tetrametoxi chalcona

Figura 10: Viabilidade celular de cultura de astrócitos tratados por 24h com o composto 2'-hidroxichalcona nas concentrações de 100 e 150 μ M. Grupo controle (DMEM), veículo (0,3% DMSO). n=6 e $*p < 0,01$ (ANOVA, seguido do teste de Tukey).

Figura 11: Viabilidade celular de cultura de astrócitos tratados por 24h com o composto dibenzalacetona nas concentrações de 100 e 150 μ M. Grupo controle (DMEM), veículo (0,3% DMSO). n=6 e $*p < 0,01$ (ANOVA, seguido do teste de Tukey).

Figura 12: Viabilidade celular de cultura de astrócitos tratados por 24h com o composto 4,2',3',4'- tetrametox chalcona nas concentrações de 100 e 150 μ M. Grupo controle (DMEM), veículo (0,3% DMSO). n=6 e $*p < 0,01$ (ANOVA, seguido do teste de Tukey).

Figura 13: Viabilidade celular de neuroblastoma B103 tratado por 24h com o composto 4,2',3',4'-tetrametox chalcona nas concentrações de 50, 75, 100 e 150 μ M. Grupo controle (DMEM), veículo (0,3% DMSO). n=6 e $*p < 0,01$ (ANOVA, seguido do teste de Tukey).

Figura 14: Migração celular em cultura de neuroblastoma B103 observada nos tempos 0 e 24h para o controle e veículo (DMSO 0,3%).

Figura 15: Migração celular em cultura observada nos tempos 0 e 24h de tratamento com o composto 4,2`3`4'-tetrametoxichalcona nas concentrações de 50, 75, 100 e 150 μm .

Figura 16: Capacidade de formação de colônia de células da linhagem de neuroblastoma B103 após o tratamento prévio por 24h com o composto 4,2`3`4'- tetrametoxi chalcona a 100 e 150 μm . Análise realizada após 14 dias de cultivo.

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	1
1.1. CÂNCER E SUA FORMAÇÃO	1
1.1.1. Ciclo Celular	6
1.1.2. Apoptose e Necrose	9
1.2. NEUROBLASTOMA	14
1.3. CHALCONAS	20
1.4. OBJETIVO	24
1.4.1. Objetivo Geral	24
1.4.2. Objetivos Específicos	24
2. MATERIAL E MÉTODOS	25
2.1. CULTURA CELULAR DE LINHAGEM NEOPLÁSICA	25
2.2. COMPOSTOS	25
2.3. CULTURA PRIMÁRIA DE ASTRÓCITOS DE RATO	27
2.4. VIABILIDADE CELULAR	27
2.5. ENSAIO DE MIGRAÇÃO CELULAR	28
2.6. ENSAIO DE FORMAÇÃO DE COLÔNIA	28
2.7. ANÁLISE ESTATÍSTICA	29
3. RESULTADOS	30
3.1. A VALIAÇÃO DO EFEITO CITOTÓXICO DAS CHALCONAS 2'- HIDROXICHALCONA, DIBENZALACETONA E 4,2',3',4'- TETRAMETOXICHALCONA SOBRE CÉLULAS NORMAIS DO CÓRTEX DE RATO	30

3.2. AVALIAÇÃO DO EFEITO CITOTÓXICO DO COMPOSTO 4,2',3,4'- TETRAMETOXICALCONA SOBRE A LINHAGEM DE NEUROBLASTOMA DE RATO B103	31
3.3. AVALIAÇÃO DO EFEITO DO COMPOSTO 4,2',3',4' - TETRAMETOXICALCONA SOBRE A MIGRAÇÃO CELULAR DA LINHAGEM DE NEUROBLASTOMA B103 DE RATOS	31
3.4. AVALIAÇÃO DO EFEITO DO COMPOSTO 4,2',3,4' - TETRAMETOXICALCONA SOBRE A FORMAÇÃO DE COLÔNIA EM LINHAGEM DE NEUROBLASTOMA B103	31
4. DISCUSSÃO	39
5. CONCLUSÃO	45

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. INTRODUÇÃO

1.1. O CÂNCER E SUA FORMAÇÃO

A denominação comum de câncer abrange mais de 100 tipos diferentes de doenças, já que cada tecido do organismo humano pode desenvolver uma ou mais doenças malignas. O que todas essas doenças têm em comum é, principalmente, a proliferação desordenada das células e a capacidade que algumas têm de invadir o tecido ao seu redor. Sua origem se dá por condições multifatoriais, e esses fatores causais podem agir em conjunto ou em sequência para iniciar ou promover o câncer (RICH & EYLER, 2008; INCA, 2012).

O processo de formação do câncer é chamado de carcinogênese e, em geral, acontece de forma lenta, podendo levar vários anos para que uma célula cancerosa origine um tumor detectável. Esse processo é composto por três estágios: estágio de iniciação, no qual os genes sofrem ação dos agentes cancerígenos; estágio de promoção, no qual os agentes oncopromotores atuam na célula já alterada; e o estágio de progressão, caracterizado pela multiplicação descontrolada e irreversível da célula (INCA, 2012).

A doença é classificada de acordo com o tipo de célula normal que a originou, e não de acordo com os tecidos para os quais se espalhou. Sendo assim, os carcinomas são os tipos mais comuns de câncer, originando-se de células que revestem o corpo, incluindo a pele e uma série de revestimentos internos, como os da boca, garganta, brônquios, esôfago, estômago, intestino, bexiga, útero e ovários, e os revestimentos dos dutos mamários, próstata e pâncreas. Há também os carcinosarcomas, tumores geralmente de alta malignidade, derivados de dois tipos de tecidos embrionários e os teratomas, derivados de três tipos de tecidos embrionários. Os sarcomas originam-se de tecidos de suporte em vez dos de revestimento, tais como ossos, tecido gorduroso, músculo e tecido fibroso, encontrados na maior parte do corpo. Os linfomas originam-se de linfócitos, e podem ser divididos em linfomas de Hodgkin e não-Hodgkin, de acordo com o tipo de célula afetada. A leucemia é um câncer que se origina de células da medula óssea. Os melanomas originam-se das células da pele que produzem pigmento, os melanócitos. Os

gliomas originam-se a partir de células do tecido cerebral ou da medula espinhal. Os neuroblastomas são tumores geralmente pediátricos derivados de células malignas embrionárias advindas de células neuronais primordiais (HUNT *et al.*; 2011; NCI, 2014).

Em termos de comportamento, uma vez que as células cancerosas não têm a capacidade de invadir o tecido adjacente, o tumor é considerado benigno, com possibilidade de completa remoção. Os tumores benignos são geralmente de crescimento lento, formados por massas expansivas que comprimem ao invés de invadir o tecido circundante. Como tal, eles geralmente representam pouca ameaça, a não ser quando crescem em um espaço confinado, como o crânio, por exemplo. No entanto, muitos chamados de tumores benignos tem potencial maligno, nomeadamente aquelas que ocorrem no intestino grosso, e estes devem ser removido antes que a malignidade se desenvolva. Contudo, quando as células tumorais apresentam a capacidade de se espalhar para outros tecidos, invadindo o tecido circundante e, mais significativamente, colonizando órgãos distantes, este tumor se torna maligno e passa a ser chamado de câncer propriamente dito. Os tumores malignos em geral apresentam crescimento rápido, além disso, podem apresentar resistência ao tratamento e levar à morte do paciente (ALISSON, 2001; HUNT *et al.*; 2011).

A formação das neoplasias se dá pelo desequilíbrio entre a proliferação celular e a apoptose (morte celular programada) (ALMEIDA *et al.*; 2005). Estes eventos são controlados por uma grande quantidade de genes, que, ao sofrerem mutações, podem ter seus produtos expressos de maneira alterada, iniciando a formação do tumor. As células neoplásicas podem se espalhar por todo o corpo, através da circulação sanguínea ou do sistema linfático, num processo conhecido como metástase (ALISON, 2001).

Assim, o câncer é resultado de uma série de acontecimentos moleculares que, fundamentalmente, alteram as propriedades de células normais. Resultam de disfunções genéticas, mutações em células somáticas que podem ser ativadas ou exacerbadas por fatores ambientais. Essas mutações podem causar um mau funcionamento de processos bioquímicos e

resultar em uma proliferação desregulada de células (LARANJEIRO *et al.*; 2013).

O desenvolvimento do câncer pode envolver dezenas, até centenas, de genes, por meio de mutações gênicas, quebras e perdas cromossômicas, ampliações gênicas, instabilidade genômica e mecanismos epigenéticos, sendo os principais grupos de genes envolvidos nesse processo: proto-oncogenes e genes supressores de tumor (DANTAS *et al.*; 2009). Estes são denominados genes críticos do câncer. Os proto-oncogenes, entre outros, estão relacionados com o controle das atividades normais da célula, e ao sofrerem mutação resulta em aumento de função e seu mutante, as suas formas hiperativas, são denominados de oncogênes. Esses genes são responsáveis por aumentar a proliferação celular, ao mesmo tempo em que inibem a apoptose. Os genes supressores de tumor são genes que expressam produtos que regulam negativamente o ciclo celular. Quando mutados deixam de exercer seus papéis através de processos específicos para cada gene. Apesar do meio mais comum de perda de função desses genes se darem através de mutação na estrutura do DNA, em alguns casos, pode ocorrer silenciamento do gene por um processo epigenético (não altera a estrutura do DNA), como a hipermetilação do DNA, que é transmitida de maneira estável por mitose (ROBERT, 2010).

Muitos dos genes críticos do câncer regulam o ciclo celular visto que seus produtos são componentes das vias de sinalização que controlam o comportamento da célula com a sua vizinhança, principalmente os sinais da vizinhança celular que leva à divisão celular, à diferenciação e apoptose. Muitas mutações levam ao aumento da síntese de componentes que estimulam a proliferação, ativando vias de crescimento, síntese de DNA e a divisão celular.

Células cancerosas precisam bloquear as vias que regulam a apoptose para inibirem a morte celular. Muitas mutações relacionadas com a inibição da apoptose já foram encontradas, por exemplo, a do gene *Bcl-2* que produz uma proteína com o mesmo nome que bloqueia a apoptose em cânceres humanos.

Outro gene muito importante para o desenvolvimento do câncer é o *p53*, um gene supressor de tumor que está envolvido em diversas funções da divisão celular. Este gene apresenta mutação em mais de 50% dos casos de câncer. A disfunção desse gene faz com que o ciclo celular prossiga mesmo que haja uma mutação no DNA, permitindo sua transmissão às células descendentes e iniciando um processo neoplásico (OZAKI & NAKAGAWARA, 2010).

Outras vias de sinalização levam à inibição do ciclo celular como a família das proteínas TGF β que possuem o efeito anticrescimento. A perda dessa inibição do crescimento mediada por TGF β , está presente em um grande número de cânceres humanos (RAVITS, 1997).

Muito se sabe acerca da origem do câncer. Todavia, ainda se fazem necessários estudos mais aprofundados sobre o assunto. Hoje sabe-se que a base da doença é genética e que a chance de desenvolvê-la aumenta ao herdar mutações ou ao se expor a diversos fatores de risco, como agentes químicos, físicos e virais, que podem provocar mutações e alterações no material genético.

De acordo com estimativas mundiais do projeto Globocan 2012, da International Agency for Research on Cancer (IARC), da Organização Mundial da Saúde (OMS), houve 14,1 milhões de casos novos de câncer e um total de 8,2 milhões de mortes por câncer, em todo o mundo, em 2012. O número de casos de câncer continuará aumentando nos países em desenvolvimento e crescerá ainda mais em países desenvolvidos se medidas preventivas não forem amplamente aplicadas. Nesses, os tipos de câncer mais frequentes na população masculina foram próstata, pulmão e cólon e reto; e mama, cólon e reto e pulmão entre as mulheres. Nos países em desenvolvimento, os três cânceres mais frequentes em homens foram pulmão, estômago e fígado; e mama, colo do útero e pulmão nas mulheres (INCA, 2014).

O número anual de casos de câncer no mundo deverá aumentar 50% nas duas próximas décadas, segundo a IARC e a OMS. O índice de mortes pela doença também deverá crescer de forma preocupante no período. Um relatório publicado recentemente mostra que os países da África, da Ásia e

das Américas do Sul e Central concentram 60% dos casos mundiais de câncer e 70% das mortes pela doença. Estima-se que em 2030, a carga global será de 21,4 milhões de casos novos de câncer e 13,2 milhões de mortes por câncer, em consequência do crescimento e do envelhecimento da população, bem como da redução na mortalidade infantil e nas mortes por doenças infecciosas em países em desenvolvimento (INCA, 2014).

De acordo com os dados do INSTITUTO NACIONAL DE CÂNCER, para os anos de 2012 e 2013, a estimativa foi de 518.510 casos novos de câncer no Brasil. Já as estimativas para o ano de 2014, que será válida também para o ano de 2015, apontam para a ocorrência de aproximadamente 576 mil casos novos de câncer, incluindo os casos de pele não melanoma, reforçando a magnitude do problema do câncer no país (INCA, 2012;2014).

O câncer de pele do tipo não melanoma (182 mil casos novos) será o mais incidente na população brasileira, seguido pelos tumores de próstata (69 mil), mama feminina (57 mil), cólon e reto (33 mil), pulmão (27 mil), estômago (20 mil) e colo do útero (15 mil). Sem considerar os casos de câncer de pele não melanoma, estimam-se 395 mil casos novos de câncer, 204 mil para o sexo masculino e 190 mil para sexo feminino. Em homens, os tipos mais incidentes serão os cânceres de próstata, pulmão, cólon e reto, estômago e cavidade oral; e, nas mulheres, os de mama, cólon e reto, colo do útero, pulmão e glândula tireóide (Figura 1) (INCA,2014).

Localização primária	casos	%			Localização primária	casos	%
Próstata	68.800	22,8%	Homens		Mama Feminina	57.120	20,8%
Traqueia, Brônquio e Pulmão	16.400	5,4%			Cólon e Reto	17.530	6,4%
Cólon e Reto	15.070	5,0%			Colo do Útero	15.590	5,7%
Estômago	12.870	4,3%			Traqueia, Brônquio e Pulmão	10.930	4,0%
Cavidade Oral	11.280	3,7%			Glândula Tireoide	8.050	2,9%
Esôfago	8.010	2,6%			Estômago	7.520	2,7%
Laringe	6.870	2,3%			Corpo do Útero	5.900	2,2%
Bexiga	6.750	2,2%			Ovário	5.680	2,1%
Leucemias	5.050	1,7%			Linfoma não Hodgkin	4.850	1,8%
Sistema Nervoso Central	4.960	1,6%			Leucemias	4.320	1,6%
			Mulheres				

*Números arredondados para 10 ou múltiplos de 10.

Figura 1. Distribuição proporcional dos dez tipos de câncer mais incidentes estimados para 2014 por sexo, exceto pele não melanoma. (Fonte: INCA, 2014)

1.1.1. Ciclo Celular

A função básica do ciclo celular (Figura 2) é duplicar todo o material genético de forma exata, e garantir a correta segregação dos cromossomos para as células-filha geneticamente idênticas. As células eucarióticas possuem um sistema complexo de proteínas regulatórias, conhecidas como sistema de controle do ciclo celular, que coordena todo o avanço do ciclo celular. O cerni do sistema é um conjunto de mudanças bioquímicas coordenadas que controlam os principais eventos do ciclo celular, desde o início da replicação do DNA até a segregação dos cromossomos replicados (DRINKS, 1997).

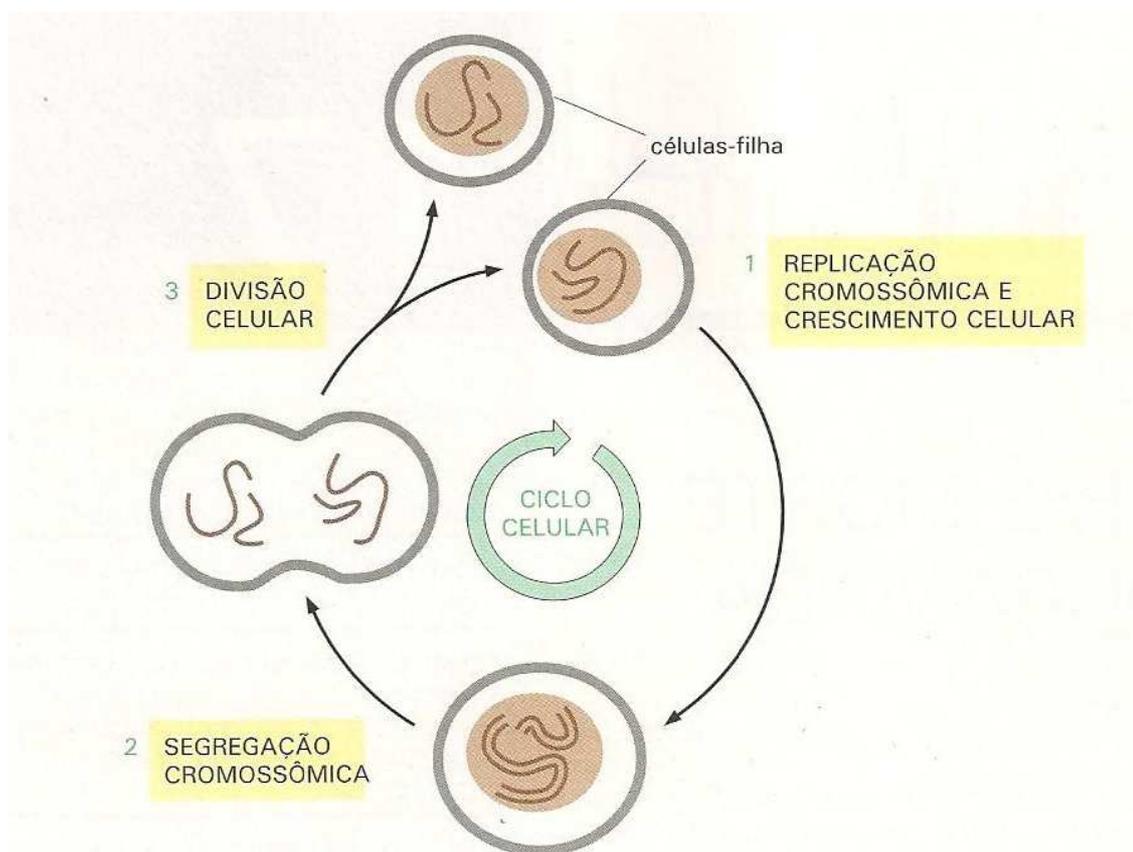


Figura 2: Ciclo Celular: Divisão de uma célula eucarionte hipotética com dois cromossomos. Dando origem a duas células-filhas geneticamente idênticas que darão início a um novo ciclo celular. Fonte: ALBERTS, 2004.

O sistema de controle do ciclo celular realiza um papel central na regulação do número de células que compõe os tecidos do corpo. Alterações relacionadas ao mau funcionamento deste sistema podem levar ao desenvolvimento de doenças como o câncer devido às divisões celulares excessivas (LARANJEIRO *et al.*; 2013).

O ciclo celular eucariótico é comumente dividido em quatro fases: G_1 , S, G_2 e M (Figura 3), sendo que as principais são a interfase (G_1 , S, G_2), que compreende a duplicação do material celular incluindo o material genético e a mitose (fase M), onde ocorre a divisão celular propriamente dita conhecida por citocinese (VIALLARD, 2001).

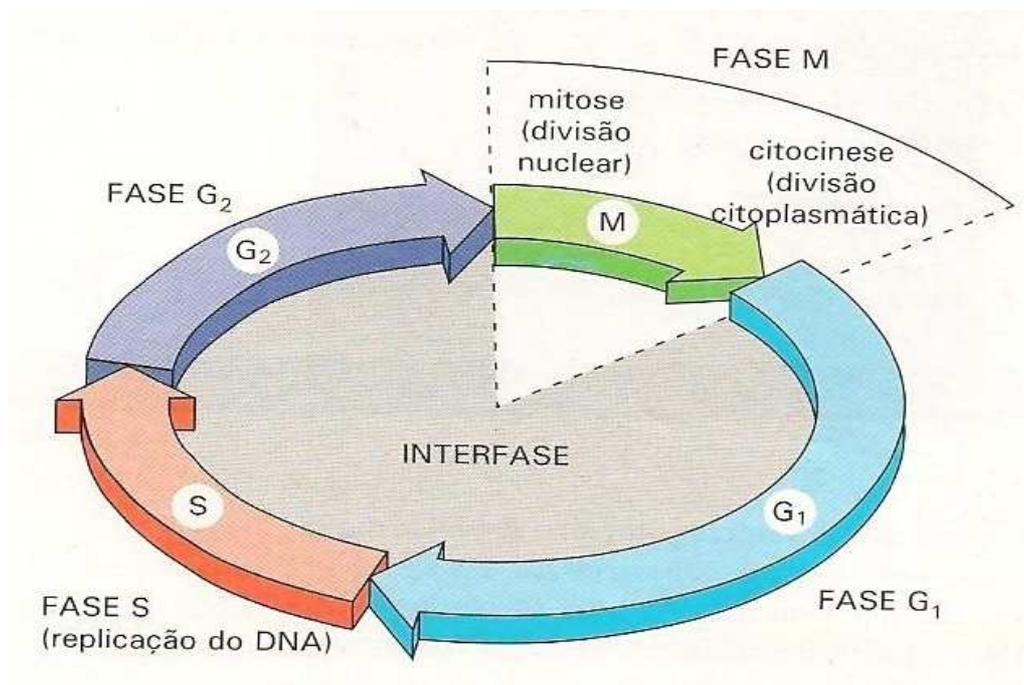


Figura 3: As fases do ciclo celular. As células crescem continuamente na interfase, a qual esta dividida em três fases: A fase S de replicação do DNA; G_1 é o intervalo entre a fase M e a fase S; A G_2 é o intervalo entre a fase S e a fase M; A fase M é representada pela divisão do núcleo e depois do citoplasma. Fonte: ALBERTS, 2004.

Com a duplicação do genoma as células também têm que duplicar suas organelas e macromoléculas, para evitar reduzirem de tamanho a cada divisão. Para isso as células devem organizar seu crescimento, aumentando a

massa celular na divisão. Para isto, três intervalos distintos ocorrem durante a interfase: o primeiro, denominado de fase G₁, ocorre entre a mitose e o período de duplicação do DNA. O segundo intervalo é a fase de síntese de DNA (fase S) e por fim, ocorre o período compreendido entre as fases S e M denominado de fase G₂. A fase G₁ inicia-se com o aumento de síntese de proteínas e RNAs depois da mitose, além de dar tempo para células monitorarem o ambiente se é favorável ou não a duplicação. Na fase S, a célula está comprometida com a duplicação do DNA e na fase G₂ a célula se prepara para a mitose sintetizando os componentes que terão papel nesta fase (LARANJEIRO *et al.*; 2013; HUNT *et al.*; 2011).

Terminada a interfase, inicia-se a fase M que inclui a divisão nuclear (mitose) e a divisão citoplasmática (citocinese). A mitose começa com a montagem do fuso mitótico e a condensação dos cromossomos. Em seguida, o envelope nuclear é desfeito e os cromossomos condensados são pareados como cromátides irmãs tornam-se presos aos microtúbulos do fuso mitótico. Continuando a mitose a célula para brevemente em um estado chamado de metáfase, onde os cromossomos são alinhados no plano equatorial formando o fuso mitótico. O início da anáfase é marcado pela separação das cromátides irmãs, onde os cromossomos migram para os pólos opostos da célula e formam novos núcleos. A célula divide-se em duas na citocinese, o que completa a mitose (HUNT *et al.*; 2011).

O sistema de controle do ciclo celular possui pontos de checagem específicos que podem interromper o ciclo caso ocorra o mau funcionamento dos processos anteriores, dando tempo para que a maquinaria da célula repare o erro, evitando a catástrofe se esse erro fosse repassado a diante. Existem três pontos principais de checagem: na fase G₁, na fase G₂ e na fase M na checagem da metáfase. O atraso nas fases G₁ e G₂ servem para dar tempo para que nestes pontos de checagem de danos no DNA corrijam os erros caso ocorram. Esses pontos servem ainda para regular o sistema de controle por sinais extracelulares de outras células. Tais sinais podem promover ou inibir a proliferação celular regulando os processos na fase G₁ (HUNT *et al.*; 2011).

O sistema de controle do ciclo celular funciona utilizando cinases dependentes de ciclinas (Cdks) da família de potéino-quinase que é ativado de forma cíclica e que catalisam a fosforilação de proteínas que participam do ciclo. A seqüência dos eventos do ciclo celular ocorre pelo acoplamento das Cdks as proteínas conhecidas como ciclinas que regulam as atividades de fosfolilação das Cdks, que por sua vez, dá seqüência nos eventos do ciclo celular (VIALLARD, 2001).

1.1.2. Apoptose e Necrose

Vários sinais modulam a proliferação celular, a sobrevivência e a morte celular e essa ação coordenada leva a célula normal ao crescimento e a divisão até a sua senescência (FOSTER, 2008; MESTER & REDEUILH, 2008). No entanto, as células tumorais perdem a capacidade de regular esses sinais, resultando num descontrole da proliferação e escape da morte celular, contribuindo para o desenvolvimento dos tumores. Os estímulos tóxicos ou deletérios podem desencadear a morte celular por necrose ou apoptose, as quais são diferenciadas pela morfologia e vias bioquímicas celulares (BAYLY *et al.*; 1997; COTRAN, *et al.*; 2000; FOSTER, 2008; KUWANA & NEWMeyer; 2003).

A necrose é definida como uma forma de morte celular iniciada por estímulos ambientais que resultam num rompimento abrupto da membrana e exposição do conteúdo intracelular (BRAS *et al.*; 2005). Durante a necrose, ocorre condensação da cromatina e a célula aumenta de volume, ocorre um inchaço das mitocôndrias, juntamente com o retículo endoplasmático, e ocorre a desorganização dos ribossomos (UCHIYAMA, 1995). Há aumento da permeabilidade da membrana, por diminuição nos níveis de ATP, que tem como consequência comprometimento da bomba de Na^+/K^+ e de outros fenômenos que são ATP-dependentes (TRUMP *et al.*; 1997). Levando ao rompimento de organelas e da membrana plasmática e liberação de componentes intracelulares, promovendo uma reação inflamatória local (BOUJRAD *et al.*; 2007, KERR *et al.*; 1995). Ainda que o material necrótico seja removido por fagócitos, a inflamação causa danos locais significativos (KERR *et al.*; 1995).

Não há evidência de remodelamento de cromatina durante a necrose, e a célula entra em citólise imediata, com perda da integridade da membrana plasmática. A citólise é o estágio final da decadência celular evidente no processo de necrose (HAIL *et al.*; 2006).

Todavia, a apoptose é um processo fisiológico muito bem regulado de morte celular programada e desempenha um papel relevante na homeostase de diferentes tecidos em resposta a numerosos estímulos. Esse processo é caracterizado por diversas alterações morfológicas e bioquímicas das células e é de crucial importância para o desenvolvimento embrionário, maturação do sistema imune, defesa contra infecções virais e eliminação de tumores (BERGANTINI *et al.*; 2005; BRAS *et al.*; 2005). É caracterizada por alterações no citoesqueleto que induzem contração celular, fragmentação do DNA, condensação da cromatina levando a aparência de núcleos picnóticos, formação de vesículas sem perda de integridade da membrana e sem resposta inflamatória (LAVIN, 1993; LIAO *et al.*; 2005; YASUHARA *et al.*; 2003).

A apoptose pode ser dividida em três fases: de iniciação, efetora e de degradação. A fase de iniciação é altamente dependente do tipo de estímulo apoptótico recebido pela célula por via endógena ou por receptores de superfície com domínios de morte (estresse oxidativo, erros no DNA e presença de citocinas). A maneira como se inicia essa primeira fase pode influenciar as características e a eficácia das fases seguintes (efetora e de degradação). A fase efetora há ativação da cascata de caspases, constituída da ativação de proteases, nucleases, e de outros intermediários que participam dessa fase. Na fase de degradação, a célula adquire as características bioquímicas e morfológicas características desse processo (GREEN & KROEMER, 1998).

As características estruturas típicas da apoptose são resultantes dos eventos ocorridos nas fases efetora e de degradação: diminuição do volume celular, condensação da cromatina, cariorex, e eventuais brotamentos nas membranas, formando corpos apoptóticos (KROEMER *et al.*; 2007; HAIL *et al.*; 2006).

Há duas vias principais de regulação da apoptose: 1) Apoptose mediada por receptores de morte (TNF, TNFR1, TRAMP, TRAIL e de Fas) presentes na membrana plasmática, denominada via extrínseca e 2) Apoptose mediada pela mitocôndria, denominada via intrínseca (HAJRA & LIU, 2004; HAIL *et al.*; 2006). Tanto a via extrínseca quanto a intrínseca possuem um grupo independente de caspases iniciadoras que convergem sinais para o mesmo grupo de caspases efetoras, com finalidade de executar os eventos intracelulares de morte celular programada (HAJRA & LIU, 2004; ZHANG *et al.*; 2004).

A via extrínseca é iniciada por associação de diferentes receptores de morte na membrana plasmática e, ao se agruparem, promovem o recrutamento de proteínas adaptadoras (COHEN, 1997; HAIL *et al.*; 2006). Dentre os receptores na membrana plasmática, o receptor fas/CD95 recruta procaspase 8 e/ou procaspase 10, e a elevação nos níveis de procaspases próxima a membrana garantem interação dessas caspases inativas com proteínas adaptadoras associadas a fas/CD95. A ligação desse complexo protéico promove a autocatálise das procaspases que se tornam nesse momento em caspases iniciadoras ativadas. A ativação proteolítica sequencial de outras caspases culmina na ativação de caspases efetoras 3, 6 e 7 que estão no citoplasma (HAJRA & LIU, 2004). Ainda, a ativação de outros receptores de morte na membrana plasmática, especialmente do receptor de estresse celular, junto a ação das caspases iniciadoras 8 e 10, integram os sinais de apoptose de via extrínseca aqueles de via intrínseca (HAJRA & LIU, 2004; HAIL *et al.*; 2006). Assim, é preciso avaliar sinais na membrana plasmática capazes de agir sinergicamente com sinais mitocondriais, na indução de apoptose.

Na via intrínseca, diversos sinais atuam modulando a permeabilização da membrana mitocondrial externa. O caminho mitocondrial pode ser ativado por vários estímulos incluindo hipóxia, espécies reativas de oxigênio, irradiação ultravioleta ou gama, a falta de fatores de crescimento e vários compostos citotóxicos, resultando na ativação de proteínas pro-apoptóticas. Estas proteínas alteram a permeabilidade da membrana externa mitocondrial através da formação de canais que causam a liberação e redistribuição de

pequenos íons, solutos, metabólitos, citocromo *c* e de proteínas carreadoras de elétrons da cadeia respiratória para o citosol. (BELIZÁRIO *et al.*; 2007; ANTONSSON *et al.*; 2004). O citocromo *c* liberado no citosol é necessário como co-fator e rapidamente se associa com a região C-terminal a uma proteína adaptadora (Apaf-1), esta interação facilita a ligação a procaspase 9 formando um complexo chamado de apoptossomo, e através da clivagem proteolítica a caspase 9 se torna ativa e subsequentemente ativando outras caspases (GREEN & KROMER, 1998; THORBERRY & LAZEBNIK, 1998). O complexo catalítico gerado pelos sinais mitocondriais e a ação das caspases ativadas de via extrínica são sinais convergentes responsáveis pela ativação das caspases efetoras 3 e 7. (HAIL *et al.*; 2006).

Até o momento, já foram caracterizadas mais de doze isoformas de caspases e aproximadamente dois terços destas enzimas apresentam função no processo de apoptose. Dois tipos de caspases atuam nas vias de sinalização para apoptose e são denominadas de iniciadoras (caspases 8 - 9 e 10) e efetoras ou executoras (caspases 3, 6 e 7) (THORBERRY & LAZEBNIK, 1998).

As caspases clivam seus alvos nos resíduos de ácido aspártico. Como mecanismo de proteção contra ativação inadvertida, essas enzimas são sintetizadas na forma de precursores inativos (zimogênios), necessitando de clivagem para iniciar sua ativação (HENGARTNER 2000). As pró-enzimas contêm 3 domínios: um domínio aminoterminal, uma subunidade menor de 10 kDa (cadeia β interna) e uma subunidade maior, com 20kDa (cadeia α externa). A forma ativa da enzima possui duas subunidades maiores e duas menores é um tetrâmero $\alpha_1\beta_1\beta_2\alpha_2$, entre as quais forma dois sítios ativos da enzima (EARNSHAW *et al.*; 1999). A ativação envolve processo proteolítico, com formação de heterodímeros entre as subunidades menor e maior (THORBERRY & LAZEBNIK, 1998).

As caspases clivam proteínas envolvidas na regulação do citoesqueleto, incluindo gelsolina, fodrina, Gas-2, proteína quinase de adesão focal (FAK), proteína quinase p21, isoformas da proteína quinase C e Mekk-1. A destruição da rede de microtúbulos provoca o arredondamento e

deslocamento da célula do tecido. Várias alterações do núcleo apoptótico são dependentes da ação da caspase-6, caspases que degradam as lamínas A, e C do envólucro nuclear. O rompimento dessas estruturas parece facilitar o acesso e degradação das fitas de DNA na região internucleossomal pela nuclease CAD (Dnase Ativada por Caspase). Em células não apoptóticas, CAD está presente como um complexo inativo com ICAD (inibidor de Dnase Ativada por Caspase). Após a indução da apoptose, ICAD é inativada pelas caspases 3 e 7, deixando CAD livre para funcionar como uma nuclease (ENARI *et al.*; 1998).

Outro fator mitocondrial pró-apoptótico é o Smac/DIABLO que atua inibindo as IAPs (inibidores de apoptose) de bloquear a atividade das caspases. As IAPs pertencem a uma família de proteínas com atividade anti-apoptótica que atuam como inibidores endógenos de caspases. Após dano mitocondrial, a Smac/DIABLO é liberada do espaço intermembrana para o citoplasma, juntamente com o citocromo c. Enquanto o citocromo c liga-se à APAF-1 e ativa diretamente a caspase-9, Smac/DIABLO remove as IAP de sua ligação inibitória com as caspases (GRIVICICH, 2007). A permeabilização de membrana mitocondrial e liberação de citocromo c são fundamentais para os sinais de via intrínseca, as quais dependem da modulação de proteínas anti e pró-apoptóticas da família Bcl-2 (TJALMA *et al.*; 1998).

A família Bcl-2 possui cerca de vinte proteínas já identificadas, cada uma delas com duas ou mais isoformas. Dentre essas proteínas, bax, bak, bcl-Xs, bok, bad, bid exercem função pró-apoptóticas enquanto as proteínas bcl-2, bcl-XL, bl-w, mcl-1 têm função anti-apoptótica. Na mitocôndria, durante a apoptose, algumas modificações dessas proteínas podem ocorrer (ZHANG *et al.*; 2004). É conhecido que, durante a apoptose, membros da família Bcl-2 podem ser fosforilados (bcl-2 e bad), clivados (bid) e podem ter mudanças de conformação e oligomerização (bax e bak). Os sinais mitocondriais anti ou pró-apoptóticos estão em equilíbrio e a predominância de um desses sinais, conduz, respectivamente, a sobrevivência ou morte celular programada (CHAN & YU, 2004). A interação de proteínas anti e pró-apoptóticas ocorre por domínio hidrofóbicos gerados por membros da família Bcl-2 que interage com proteínas pró-apoptóticas (BRAS *et al.*; 2005). Proteínas BH3 (Bid e Bim),

interagem com proteínas pró-apoptóticas da família Bcl-2, como bak e bax e essa interação induz a ativação/oligomerização (KUTUK & BASAGA, 2006). Assim, no equilíbrio anti e pro-apoptótico são modulados por vias que se complementam, nas quais ocorre a associação das proteínas bcl-2/bax e bcl-xL/bak. Se o estímulo for anti-apoptótico, a ligação de bcl-2/bax e bcl-xL/bak é mantida, impedindo a formação do poro na membrana mitocondrial e liberação de citocromo-c e das IAPs. Entretanto, por estímulo pró-apoptótico, a ativação de bax e bak ocorre pela forma clivada de bid (tbid), seguida da oligomerização bax e bak na membrana mitocondrial, com subsequente liberação das proteínas apoptogênicas (citocromo c) e consequente indução de morte celular (PETROS *et al.*; 2004; BRAS *et al.*; 2005; KUTUK & BASAGA, 2006).

1.2. NEUROBLASTOMA

O neuroblastoma (Figura 4) é um tumor embrionário do sistema nervoso simpático, que se desenvolve durante o crescimento fetal ou nos primeiros anos de vida a partir de células simpáticas derivadas da crista neural. É uma neoplasia maligna, responsável por 97% de todos os tumores neuroblásticos (DAVIDOFF, 2013). Os tumores neuroblásticos são historicamente classificados em neuroblastomas (comportamento maligno), ganglioneuroblastomas (comportamento intermédio) e ganglioneuromas (comportamento benigno) (JENNIGS *et al.*; 1993; MAHONEY *et al.*; 2006).

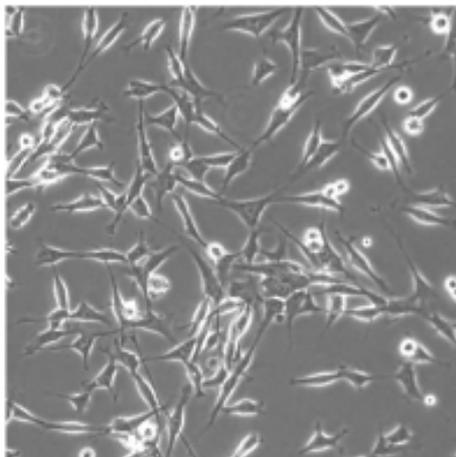


Figura 4: Foto mostrando cultura de células de neuroblastoma B103. Microscopia aumento 100x (Fonte: YANAGIDA, *et al.*; 2009).

Clinicamente é classificado em cinco estágios diferentes, de acordo com o Sistema Internacional de Estadiamento de Neuroblastoma (INSS). Os tumores em fase inicial (estágios 1 e 2) não sofrem metástase para o osso ou medula óssea e são tratáveis com medicamentos quimioterápicos e irradiação. Os tumores em estágio avançado (estágios 3 e 4) são altamente metastáticos e geralmente respondem positivamente ao tratamento inicial. No entanto, eles muitas vezes se tornam resistentes à quimioterapia e irradiação. O quinto estágio dos tumores neuroblásticos (estágio 4S) sofre regressão espontânea com tratamento mínimo ou mesmo sem intervenção médica (JIANG *et al.*; 2011). A Tabela 1 descreve mais detalhes acerca do estadiamento do neuroblastoma, de acordo com o INSS (DAVIDOFF, 2013).

Tabela 1. Sistema Internacional de Estadiamento de Neuroblastoma (INSS).

Estágio 1	Tumor localizado, confinado à área de origem, do qual é possível efetuar excisão completa; com ou sem doença residual; nódulos linfáticos ipsilaterais histologicamente negativos.
Estágio 2A	Tumor localizado, do qual não é possível efetuar excisão completa; nódulos linfáticos ipsilaterais e colaterais histologicamente negativos.
Estágio 2B	Tumor localizado, do qual é possível efetuar excisão completa ou incompleta; nodulos linfáticos ipsilaterais histologicamente positivos e nódulos linfáticos colaterais histologicamente negativos.
Estágio 3	Tumor irressecável unilateral com infiltração na linha média, com ou sem nódulos linfáticos envolvidos ou tumor localizado unilateral com nódulos linfáticos colaterais envolvidos ou ainda tumor irressecável da linha média com infiltração bilateral ou envolvimento dos nódulos linfáticos.
Estágio 4	Tumor primário com metástases em nódulos linfáticos distantes, osso, medula óssea, fígado, pele e/ou outros órgãos.
Estágio 4S	Tumor primário, como definido nos estágios 1, 2A e 2B, com metástases restrita à pele, fígado e/ou medula óssea (crianças com <1 ano – Lactentes).

Além da classificação em estágios da doença, os neuroblastomas também são classificados de acordo com as variáveis de prognóstico em três grupos de risco: baixo, médio e alto risco. A probabilidade de sobrevivência em cada grupo é de 95% a 100%, 85% e 90%, e inferior a 30%, respectivamente (JIANG *et al.*; 2011; DAVIDOFF, 2012).

O prognóstico pode variar de acordo com os fatores de risco clínicos e biológicos como idade, estadiamento, histologia e a presença do gene *N-myc*, sendo este último extremamente importante na determinação acurada dos grupos de alto risco e na previsão de resposta do paciente (GEORGE *et al.*; 2005).

O neuroblastoma é o tumor sólido extracraniano mais comum na infância, sendo responsável por cerca de 7 a 10% das neoplasias pediátricas e 15% de todas as mortes por câncer em pacientes pediátricos com menos de 15 anos de idade (MARIS *et al.*; 2007; COLON & CHUNG, 2011). Trata-se de uma doença extremamente heterogênea, os tumores podem regredir espontaneamente, mesmo sem terapia, ou exibir um fenótipo extremamente agressivo, pouco sensível às atuais terapias antineoplásicas. Alguns dos fatores responsáveis por esta heterogeneidade foram identificados e crescentes evidências indicam que as características biológicas e moleculares do neuroblastoma são altamente preditivas quanto ao seu comportamento clínico (DAVIDOFF, 2012). O tumor pode surgir em qualquer lugar ao longo do sistema nervoso simpático, porém é mais frequente na medula adrenal (BRODEUR, 2003; MARIS *et al.*; 2007).

Noventa por cento das crianças com neuroblastoma são diagnosticadas antes dos 5 anos de idade. Enquanto crianças que apresentam estágios inferiores da doença (fase 1, 2 e 4s) tendem a ter um melhor prognóstico, mais de 75% dos pacientes com idade superior a um ano apresentam a doença em fases avançadas (estágios 3 e 4), caracterizadas por metástase (BRODEUR, 2003; JIANG *et al.*; 2011).

O quadro clínico dos neuroblastomas é extremamente variado, dependendo das características do tumor primário, de sua integridade, do comprometimento de estruturas vizinhas e da presença de metástases, pois

uma vez que são tumores que crescem a partir das células ganglionares primitivas do sistema nervoso simpático, eles podem ser encontrados ao longo de todo sistema nervoso simpático (MAHONEY *et al.*; 2006).

O neuroblastoma manifesta-se frequentemente em fases avançadas, surgindo sintomatologia apenas quando o tumor se torna volumoso ou quando se desenvolvem metástases. O tumor se dissemina através das vias linfática e hematogênica para a medula óssea, osso, fígado, pele e raramente pulmão e cérebro. A maioria dos tumores primários (65%) ocorre dentro do abdome, com pelo menos metade desses surgindo na medula adrenal. Outros sítios comuns da doença incluem a garganta, tórax e pelve (SCHWAB *et al.*; 1993, SCHWAB *et al.*; 2000).

Os tumores podem acometer raramente o sistema nervoso central, e em cerca de 1% dos casos o tumor primário não pode ser identificado. A localização preferencial do tumor primário varia de acordo com a idade do paciente, sendo que as crianças com menos de 1 ano de idade têm maior incidência de tumores torácicos, quando comparadas às crianças maiores. Os sinais e sintomas variam de acordo com o território acometido (SCHWAB *et al.*; 1993, 2000).

O aumento de volume abdominal devido ao crescimento do tumor é um dos principais sintomas, com massas irregulares e dolorosas (GOLDEN & FEUSNER, 2002). O tumor pode ser detectado acidentalmente, durante consultas por outros motivos, exames radiológicos, ou mesmo antes do nascimento, numa ecografia de rotina. As crianças podem queixar-se de desconforto abdominal. Se a massa for volumosa poderá provocar sintomas compressivos como retenção urinária, constipação ou oclusão intestinal, edema escrotal e dos membros inferiores ou hipertensão vascular. Tumores volumosos podem sangrar, provocando distensão abdominal, que também pode estar associada ao envolvimento hepático secundário (KEDAR, 1981). Na região torácica, os tumores apresentam-se muitas vezes como uma massa, podendo permanecer assintomáticos por longo tempo, causando distúrbios respiratórios, por compressão das vias aéreas (KAPLAN *et al.*; 1980; PARISI *et al.* 1993).

O neuroblastoma cervical surge comumente sob a forma de uma massa. A metastização ganglionar cervical pode confundir-se inicialmente com uma linfadenopatia inflamatória. A síndrome de Horner por compromisso da inervação simpática superior também é característica. A sintomatologia relacionada com a presença de metástases é muito rica, frequentemente as crianças apresentam um aspecto visivelmente doente, com sintomas constitucionais que incluem má evolução ponderal, febre ou irritabilidade. As metástases da medula óssea podem originar um quadro semelhante a uma leucemia. As metástases ósseas podem provocar redução da atividade, claudicação e a criança poderá queixar-se de dor óssea ou articular, muitas vezes confundida com artrite. Um achado muito característico do neuroblastoma é o desenvolvimento de equimose peripalpebral (KAPLAN *et al.*; 1980).

A ocorrência do neuroblastoma na idade adulta é excepcional, sendo a incidência de 0,2 casos por milhão de pessoas por ano, o que torna esse tipo de tumor extremamente raro nesta fase da vida. Os locais mais comuns de ocorrência desta neoplasia em adultos, considerando alguns casos relatados, são regiões como retroperitônio (30%), seguido de supra-renal, pélvis e mediastino, além de outros locais mais raros, como cabeça e pescoço, mesentério e coluna torácica. A idade média de ocorrência em adultos compreende a faixa etária de 38 a 49 anos, com igual incidência em ambos os sexos masculino e feminino (FRANKS *et al.*; 1997; HASEGAWA *et al.*; 2001; MCLEAN *et al.*; 2004; SINGH *et al.*; 2010).

Vários fatores de risco para o desenvolvimento do neuroblastoma foram propostos e são objetos de estudos devido ao início precoce da doença. Diversos estudos têm investigado fatores pré-natais, de gestação e concepção. Estes fatores têm incluído a ocupação dos pais, o tabagismo, o consumo de álcool, o uso de medicamentos durante a gravidez, exposição à infecção nos primeiros anos de vida, o uso de pesticidas, entre outros (MICHALEK *et al.*; 1996; OLSHAN *et al.*; 1999; DE ROOS *et al.*; 2001; DANIELS *et al.*; 2001; MENEGAUX *et al.*; 2004). Contudo, nenhum desses estudos apresentou resultado definitivo. Assim, nenhuma exposição pré ou

pós-natal à drogas, produtos químicos ou radiação pode ser considerada como sendo responsável pelo desenvolvimento desta neoplasia.

Alguns pacientes com neuroblastoma demonstram uma predisposição para desenvolver a doença, e isto segue um padrão hereditário autossômico dominante. Estes apresentam características distintivas: surgimento mais precoce, múltiplos tumores primários e bom prognóstico (TONINI *et al.*; 2003).

Mesmo considerando-se a predisposição genética para desenvolver a doença, deve ficar claro que a maioria dos neuroblastomas ocorrem espontaneamente. Mutações somáticas como ganha ou perda de alelos, ativação oncogênica ou alterações no índice de DNA das células tumorais têm sido considerados fatores importantes no desenvolvimento de neuroblastoma esporádico (BRODEUR, 2003).

Há um discreto predomínio da ocorrência de neuroblastoma em crianças do sexo masculino sobre o feminino (DAVIS, 1987), além de acometer mais crianças de cor branca, que são diagnosticados antes dos 15 anos de idade (GOODMAN *et al.*; 1991; GURNEY *et al.*; 1996).

A incidência de neuroblastoma por ano é de 10,5% por milhão de crianças e corresponde a mais de 7% das neoplasias malignas em doentes com menos de 15 anos e cerca de 15% dos óbitos pediátricos. O pico de incidência é com a idade de 0 a 4 anos, com uma idade média de 23 meses. Quarenta por cento dos pacientes que apresentam sintomas clínicos no diagnóstico são menores de 1 ano de idade e menos de 5% com os sintomas clínicos são de idade superior a 10 anos (PARK *et al.*; 2008; BENEDETTI & CIMINI, 2010).

Nos últimos anos têm-se evidenciado muitos esforços no desenvolvimento de drogas extremamente eficazes para o tratamento de neoplasias (DEVITA & CHU, 2008). Na atualidade, o tratamento do câncer compreende cada vez mais a quimioterapia combinada e, às vezes, em associação com outras formas de tratamento. Tais drogas farmacológicas são empregadas para promover a morte das células doentes sem causar danos ao tecido normal.

No momento em que uma quantidade de células susceptíveis é exposta a um agente antineoplásico apropriado, estas geralmente morrem seguindo uma cinética de primeira ordem, isto é, uma porcentagem constante de células é morta. Por isso, a chance máxima de cura existe quanto menor for o número de células tumorais presentes. O tratamento quimioterápico antineoplásico tem como objetivo impedir que as células cancerosas se multipliquem e invada estruturas adjacentes, evitando o processo de metástase e, em última instância a morte do paciente.

O primeiro quimioterápico antineoplásico foi desenvolvido a partir do gás mostarda, usado nas duas grandes Guerras Mundiais como arma química. Após a exposição de soldados a este agente, verificou-se que eles desenvolveram hipoplasia medular e linfóide, o que levou ao seu uso no tratamento dos linfomas malignos. Com sua publicação, em 1946, dos estudos clínicos feitos com o gás mostarda e das observações sobre os efeitos do ácido fólico em crianças com leucemias, verificou-se um crescente avanço da quimioterapia antineoplásica (SCOTT, 1970; GHANEI & HARANDI, 2007). Desde então, quimioterápicos mais ativos e menos tóxicos encontram-se disponíveis para uso na prática clínica. Os avanços verificados nas últimas décadas, na área da quimioterapia antineoplásica, têm levado a aplicação de outros tipos de tratamentos de câncer e permitindo maior número de curas (SCOTT, 1970; DEVITA & CHU, 2008).

1.3. CHALCONAS

Os produtos naturais têm sido utilizados como compostos promissores para o tratamento de muitas doenças, incluindo o câncer, devido à sua capacidade para inibir o crescimento de células anormais e induzir a apoptose (JOHNSEN, 2007). Entre os compostos que têm sido descobertos e que apresentam atividades antiproliferativa e com bom potencial terapêutico, estão os flavonóides, os quais são sintetizado a partir de chalconas em plantas.

Chalconas (1,3-difenil-2-propen-1-onas) compreendem uma classe de compostos orgânicos naturais presentes em uma variedade de espécies de

plantas. São comumente conhecidos como pigmentos amarelos encontrados em diferentes órgãos vegetais, sobretudo nas flores, tendo fundamental papel no processo de polinização das plantas em função da pigmentação produzida, o que atrai pássaros e insetos (ZUANAZZI, 2001; ZHANG *ET AL.*; 2013).

Quimicamente as chalconas consistem em uma cadeia aberta no qual os dois anéis aromáticos são unidos por um sistema ceto- α,β -insaturado, sendo 1,3-difenil-2-propen-1-ona a estrutura básica, conforme a Figura 5 (ECHEVERRIA *ET AL.*; 2009; ÁVILA, 2008; CHIARADIA, 2008).

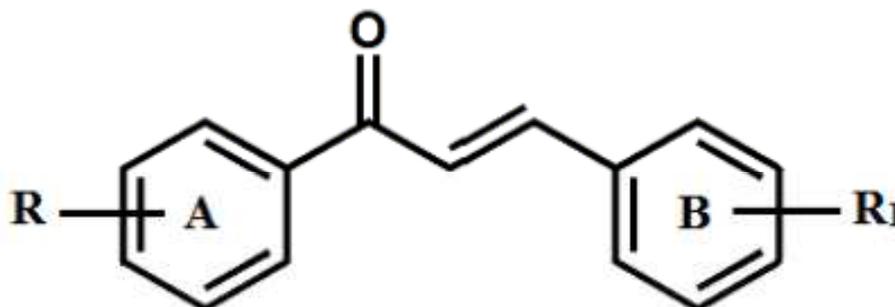


Figura 5. Estrutura geral da chalconas.

São compostos precursores da via de biossíntese dos flavonóides, que possuem diversas propriedades biológicas, incluindo antitumoral, antimutagênicas, anti-inflamatória, antioxidante, antifúngicas, antibacterianas, antiprotozoárias, analgésica, entre outras (DUCKI, 2007; KONTOGIORGIS, 2008; BANDGAR, 2010; ZHANG *et al.*; 2013).

Essa vasta gama de atividades é em grande parte atribuída às inúmeras possibilidades de substituições nos anéis aromáticos das chalconas, possibilitando a obtenção de uma grande quantidade de compostos, uma vez que existem inúmeros benzaldeídos e acetofenonas comerciais que podem ser combinados, fornecendo a variedade estrutural pretendida (DUCKI, 1998).

As chalconas podem ser obtidas sinteticamente através de vários métodos, onde a reação de condensação aldólica entre aldeídos e acetofenonas é a forma mais simples e geral para obter estes compostos (VOGEL, 1989; YADAV *et al.*; 2011).

Chalconas sintéticas apresentaram uma potente capacidade na regulação da biossíntese de GSH, baixas concentrações, não tóxicas, demonstraram inibir a síntese do óxido nítrico sintase (NOS) do tipo induzível, induz a expressão HO⁻ e a síntese de Glutathiona (GSH). Sua toxicidade tem sido associada com a produção de espécies reativa de oxigênio (ROS) e disfunção mitocondrial (KACHADOURIAN, 2006, 2011, 2012; BAN, 2004).

As chalconas com substituição de três hidrogênios por metoxilas em um dos anéis aromáticos são descritas na literatura como potenciais agentes antitumorais (SRINIVASAN, 2009; BHAT, 2005).

Bhat *et al.* (2005) destacaram que a presença do padrão de substituição 3',4',5'-trimetoxifenil é essencial para a atividade citotóxica observada para as chalconas testadas frente a 12 linhagens celulares de câncer humano.

Em outro estudo Quintin *et al.* (2009) observaram que a presença de metoxilas como substituintes dos hidrogênios do anel A das chalconas aumenta a citotoxicidade, definindo que as 3',4',5'-trimetoxichalconas (Figura 6) são as que demonstram maior potencial citotóxico. Estudos recentes de Boumendjel *et al* (2008) mostraram que a dimetoxilação ou trimetoxilação em carbonos das posições 2',4',6' foram altamente benéficos para a parada do ciclo celular em G2/M, enquanto que a hidroxilação na posição 2' foi prejudicial. Esta última observação foi contrária aos resultados de Rao *et al* (2004), que demonstraram alta citotoxicidade da 2'-hidroxi chalcona, contra células de câncer U937.

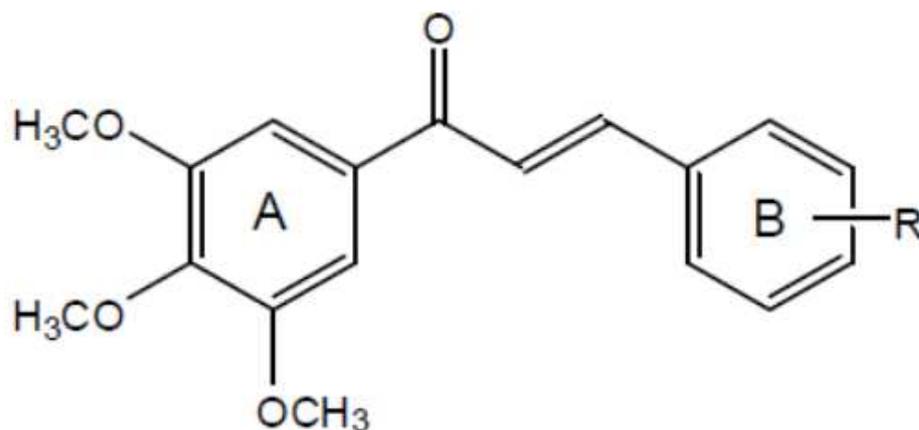


Figura 6. Estrutura das 3',4',5'-trimetoxichalconas (R=substituinte).

Dados da literatura sugerem que a atividade anti-câncer de algumas chalconas é resultado de sua ligação à tubulina, impedindo a polimerização dos microtúbulos (LAWRENCE, 2005). A avaliação da atividade antimitótica de trimetoxichalconas descreve uma chalcona comparável, e em alguns casos melhor, que a da combrestatina-A4 (PETTIT, 1989). Essa comparação pode ser feita, uma vez que o padrão de substituição do anel A nesses compostos é o mesmo (3,4,5-trimetoxifenil), os quais se ligam ao sítio de ligação da colchicina na tubulina (LAWRENCE, 2005). As estruturas da Combrestatina inibem a polimerização da tubulina, causando um dano ao sistema de microtúbulos do tumor e inibindo o processo de mitose celular (GO, 2002; LAWRENCE, 2005).

1.4. OBJETIVOS

1.4.1. Objetivo Geral

Avaliar o potencial efeito antineoplásico de diferentes chalconas (2'-Hidroxicalcona, Dibenzalacetona e 4,2'3'4' tetrametoxalcona) em modelo *in vitro* de neuroblastoma B103 de rato.

1.4.2. Objetivos Específicos

- Avaliar o efeito citotóxico das chalconas 2'-Hidroxicalcona, Dibenzalacetona e 4,2'3'4'-tetrametoxalcona em astrócitos do córtex de rato.
- Avaliar o efeito do tratamento da droga 4,2'3'4' tetrametoxalcona sobre a linhagem de neuroblastoma B103 de rato.
- Avaliar o efeito da droga 4,2'3'4' tetrametoxalcona sobre a capacidade de migração de células de neuroblastoma B103 de rato.
- Avaliar o efeito da droga 4,2'3'4' tetrametoxalcona sobre a capacidade de formação de colônia de células de neuroblastoma B103 de rato.
- Avaliar o efeito do tratamento com a droga 4,2'3'4' tetrametoxalcona sobre o padrão de morte apoptótico ou necrótico de células da linhagem de neuroblastoma B103 de rato por marcação com DAPI (4',6-diamidino-2-fenilindole).

2. MATERIAL E MÉTODOS

2.1. CULTURA CELULAR DE LINHAGEM NEOPLÁSICA

A linhagem neoplásica utilizada neste trabalho foi a de neuroblastoma de rato B103 as quais foram mantidas em crioproteção em nitrogênio líquido. Após o descongelamento, as células foram cultivadas em garrafas para cultura de células de 25 cm² de área com 5 ml meio nutriente DEMEM suplementado com 10% de soro fetal bovino (FBS), 10U/ml penicilina e 10µg de streptomina e mantidas em estufa de CO₂ a 37 °C, efetuando-se a troca do meio a cada dois dias.

2.2. COMPOSTOS

Os compostos 2'-hidroxichalcona PM=224u, dibenzalacetona PM= 234u e 4,2',3',4'- tetrametoxi chalcona PM= 328u foram sintetizadas no Laboratório de Química de Produtos Naturais da Universidade Federal do Pará e cedidas pelo professor doutor Heriberto Rodrigues Bitencourt.

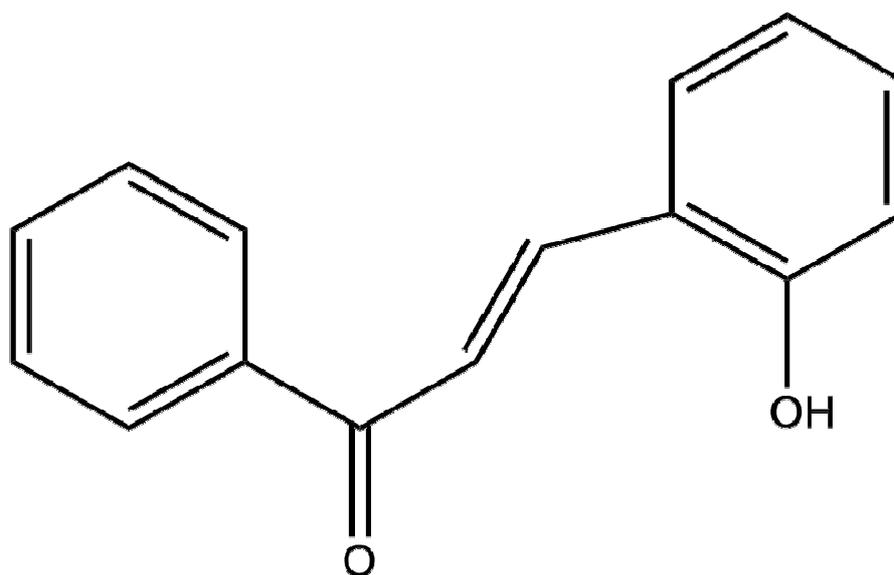


Figura 7: Estrutura plana da 2'-hidroxi chalcona

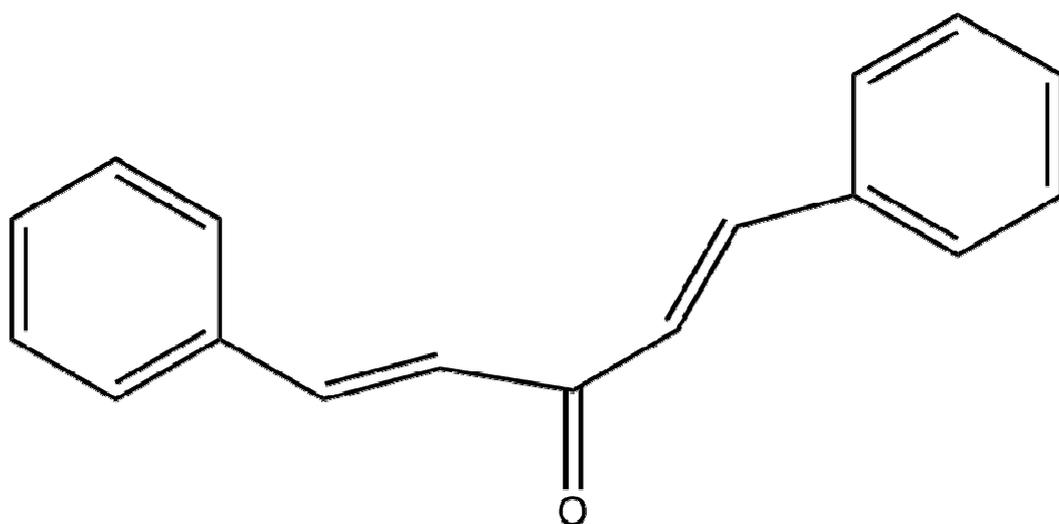


Figura 8: Estrutura plana da dibenzalacetona

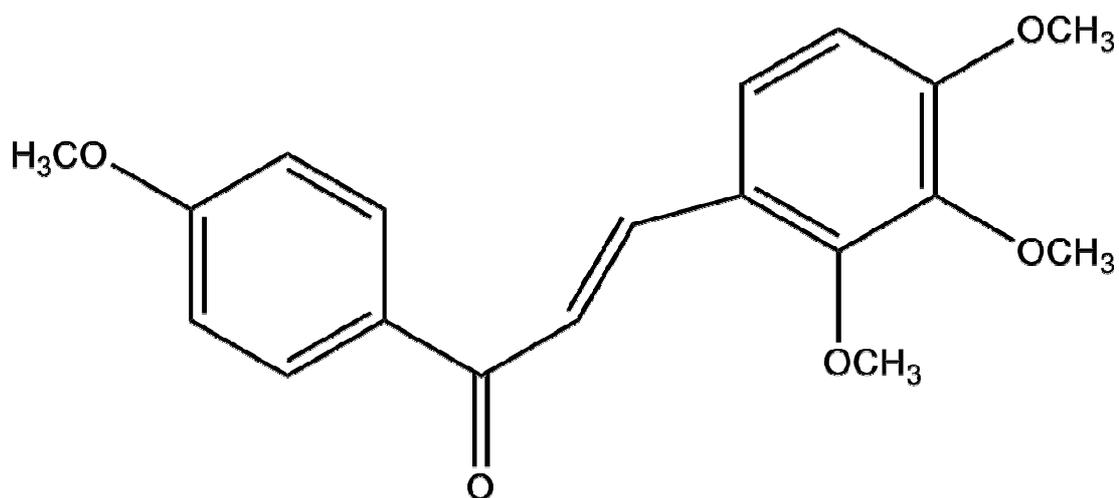


Figura 9: Estrutura plana da 4,2',3',4'- tetrametoxi chalcona

Foram preparadas soluções estoques dos compostos a 50mM em dimetilsulfóxido (DMSO) e armazenadas a -20°C para o preparo de novas concentrações (150µM, 100 µM, 75 µM e 50 µM) usadas nos experimentos.

2.3. CULTURA PRIMÁRIA DE ASTRÓCITOS DE RATO

As culturas foram feitas utilizando-se ratos com um dia pós-nascimento. Os animais foram anestesiados, sendo este processo seguido por craniotomia e dissecação do córtex cerebral. Fatias de tecido cerebral foram submetidos à dissociação química com tripsina 1% por 10 minutos com posterior dissociação mecânica. As células foram plaqueadas em meio DEMEM com 10% de soro bovino fetal em uma confluência de 5×10^6 / placa e mantidas em estufa de CO₂ durante 14 dias para se ter total confluência e realização dos experimentos de citotoxicidade das drogas testadas em células normais do córtex de rato em diferentes concentrações.

2.4. VIABILIDADE CELULAR

Utilizando o método proposto por Mosmann (1983) a viabilidade celular foi avaliada baseando-se na conversão do cromógeno solúvel, brometo de 3-[4,5-dimetil-triazol-2-il]-2,5-difeniltetrazólio (MTT), pela ação das desidrogenases presentes em células viáveis, em formazan pouco solúvel, o qual forma cristais na cor violeta no interior das células que pode ser solubilizado e lido em espectrofotômetro com comprimento de onda igual a $\lambda = 570$ nm.

No ensaio de citotoxicidade, culturas de células da glia do córtex de rato feitas em placas de 24 poços, foram expostas as drogas 2`-Hidroxi chalcona, Dibenzalacetona e 4,2`,3`,4`-tetrametoxi chalcona em diferentes concentrações (150µM e 100µM), para determinar a droga com melhor efeito.

Para o ensaio de concentração, após 24 h de cultivo na placa de 24 poços, as células foram tratadas com diferentes concentrações da chalcona

4,2',3',4'-tetrametoxi chalcona (150 μ M, 100 μ M, 75 μ M e 50 μ M). No controle, utilizamos apenas DMEM e no grupo veículo 0,3% de dimetilsulfóxido (DMSO) em meio DMEM, n=4 para todos os grupos.

2.5. ENSAIO DE MIGRAÇÃO CELULAR

Após 24h de cultivo em placa de 24 poços, foi realizada uma lesão transversal na área central da superfície de cultivo, com a utilização de uma ponteira de 10 μ l. A cultura foi lavada com PBS e os grupos foram: controle (apenas DMEM); veículo (0,3% de DMSO em DMEM) e os tratados com a droga A4 nas concentrações de 150, 100, 75, 50 μ M.

A migração celular para a área lesionada foi acompanhada por captura de imagens usando câmera digital acoplada ao microscópio invertido com contraste de fase com objetiva 40X, nos tempos zero, 24h e 48h após o tratamento.

2.6. ENSAIO DE FORMAÇÃO DE COLÔNIA

As células foram plaqueadas em garrafas de culturas numa densidade de 4x10⁵ células, e após 24h de cultivo foram tratadas com a chalcona 4,2',3',4'-tetrametoxi chalcona nas concentrações de 150, 100, 75 e 50 μ M, além do controle (DMEM) e do veículo (0,3% de DMSO).

Após 24h de tratamento as células foram lavadas 2x com PBS e dissociadas quimicamente com tripsina por 5 minutos, seguido de inativação com DMEM e centrifugação (3000 rpm/3 min). O conteúdo celular foi ressuspensão em 1ml de meio de cultivo e efetuado a contagem de células utilizando a câmara de Neubauer e o corante azul trypan 0,4%.

Uma densidade de 400 células viáveis de cada tratamento foram semeadas em novas placas de cultura e cultivadas por 14 dias, realizando-se a troca de meio a cada 3 dias. Ao final deste período as culturas foram lavadas com PBS e coradas com cristal violeta 0,25% / etanol 50% por 30

minutos, em seguida lavadas 2x com PBS e realizado a captura de imagem com câmera digital para avaliar a capacidade de formação de colônia.

2.7. ANÁLISE ESTATÍSTICA

Para a análise estatística foi realizado a análise de variância um critério (ANOVA) seguido pelo teste de Tukey. Todos os testes foram realizados no programa através do programa BioEstat 5.0 (Ayres *et al.*; 2008).

3. RESULTADOS

3.1. A VALIAÇÃO DO EFEITO CITOTÓXICO DAS CHALCONAS 2'-HIDROXICHALCONA, DIBENZALACETONA E 4,2',3',4'-TETRAMETOXICHALCONA SOBRE CÉLULAS NORMAIS DO CÓRTEX DE RATO.

Ensaios de viabilidade celular foram realizados para avaliar o efeito citotóxico dos compostos testados.

O tratamento com as chalconas em cultura de células de córtex de rato, mostrou que o composto 2'-hidroxi chalcona nas concentrações de 100 μ M (45,98 \pm 2,28) e 150 μ M (6,87 \pm 1,14) promoveu morte celular de maneira significativa em relação a porcentagem do controle, foi realizado a análise de variância um critério (ANOVA) seguido pelo teste de Tukey. * p <0,01 (Figura 10).

O tratamento com o composto dibenzalacetona demonstrou diferença estatisticamente significativa do efeito citotóxico em ambas as concentrações experimentais 100 μ M (24,52 \pm 10,67) e 150 μ M (16,98 \pm 1,43), foi realizado a análise de variância um critério (ANOVA) seguido pelo teste de Tukey. * p <0,01 (Figura 11).

Já o tratamento com o composto 4,2',3',4'- tetrametoxi chalcona não demonstrou nenhuma diferença estatisticamente significativa em relação ao efeito citotóxico contra células normais do córtex de rato para as duas concentrações testadas 100 μ M (111,61 \pm 11,54) e 150 μ M (121,86 \pm 12,36), foi realizado a análise de variância um critério (ANOVA) seguido pelo teste de Tukey. (Figura 12).

3.2. AVALIAÇÃO DO EFEITO CITOTÓXICO DO COMPOSTO 4,2',3',4'-TETRAMETOXICHALCONA SOBRE A LINHAGEM DE NEUROBLASTOMA B103 DE RATOS.

O tratamento com o composto 4,2',3',4'- tetrametoxi chalcona em culturas de células de Neuroblastoma B103 demonstrou que este composto promove a morte celular de forma estatisticamente significativa em todas as concentrações testadas 50 μ M (47,02 \pm 3,13), 75 μ M (44,38 \pm 1,64), 100 μ M (37,37 \pm 2,84) e 150 μ M (37,38 \pm 3,97) (Figura 13).

3.3. AVALIAÇÃO DO EFEITO DO COMPOSTO 4,2',3',4'- TETRAMETOXI CHALCONA SOBRE A MIGRAÇÃO CELULAR DA LINHAGEM DE NEUROBLASTOMA B103 DE RATOS

A capacidade migratória das células de neuroblastoma B103 perante o tratamento com o composto 4,2',3',4'-tetrametoxi chalcona foi avaliado pelo ensaio de migração celular (Figura 14 e 15). De acordo com as imagens, podemos observar que tanto no controle (DMEM) quanto no veículo (DMSO 0,3%), após 24 horas houve migração de células com o fechamento completo da área de lesão. Contudo o tratamento com o composto 4,2',3',4'-tetrametoxichalcona nas concentrações de 50, 75, 100 e 150 μ M promove alteração na capacidade de migração e invasão das células após 24h de tratamento .

3.4. AVALIAÇÃO DO EFEITO DO COMPOSTO 4,2',3',4'-TETRAMETOXI CHALCONA SOBRE A FORMAÇÃO DE COLÔNIA EM LINHAGEM DE NEUROBLASTOMA B103.

No ensaio de capacidade de formação de colônia (Figura 16) podemos observar que o tratamento com o veículo (DMSO 0,3%) não apresentou diferença em relação ao controle. No tratamento com a droga 4,2',3',4'-tetrametoxi chalcona observamos que na concentração de 100 μ M houve

redução do número de colônias formadas. Já na concentração de 150 μ M a reduziu a capacidade de formação de colônia de forma significativa. Além disso, o diâmetro destas colônias mostrou-se relativamente menor do que as do controle e veículo (dados não mostrados).

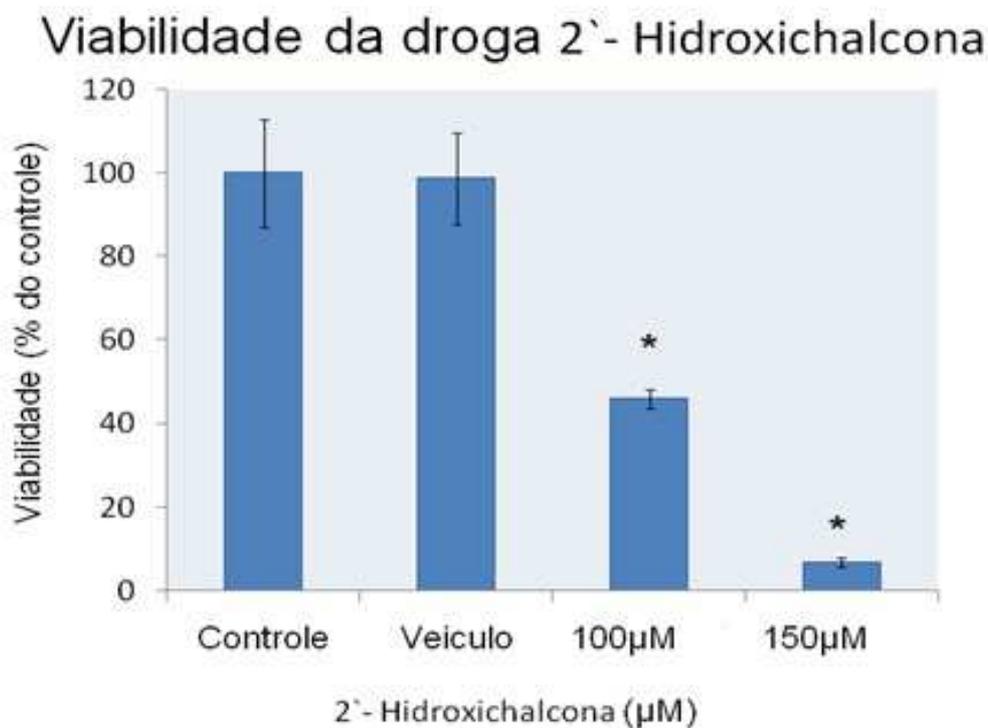


Figura 10: Viabilidade celular de cultura de astrócitos tratados por 24h com o composto 2'-hidroxi chalcona nas concentrações de 100 e 150 μ M. Grupo controle (DMEM), veículo (0,3% DMSO). n=6 e * p <0,01 (ANOVA, seguido do teste de Tukey).

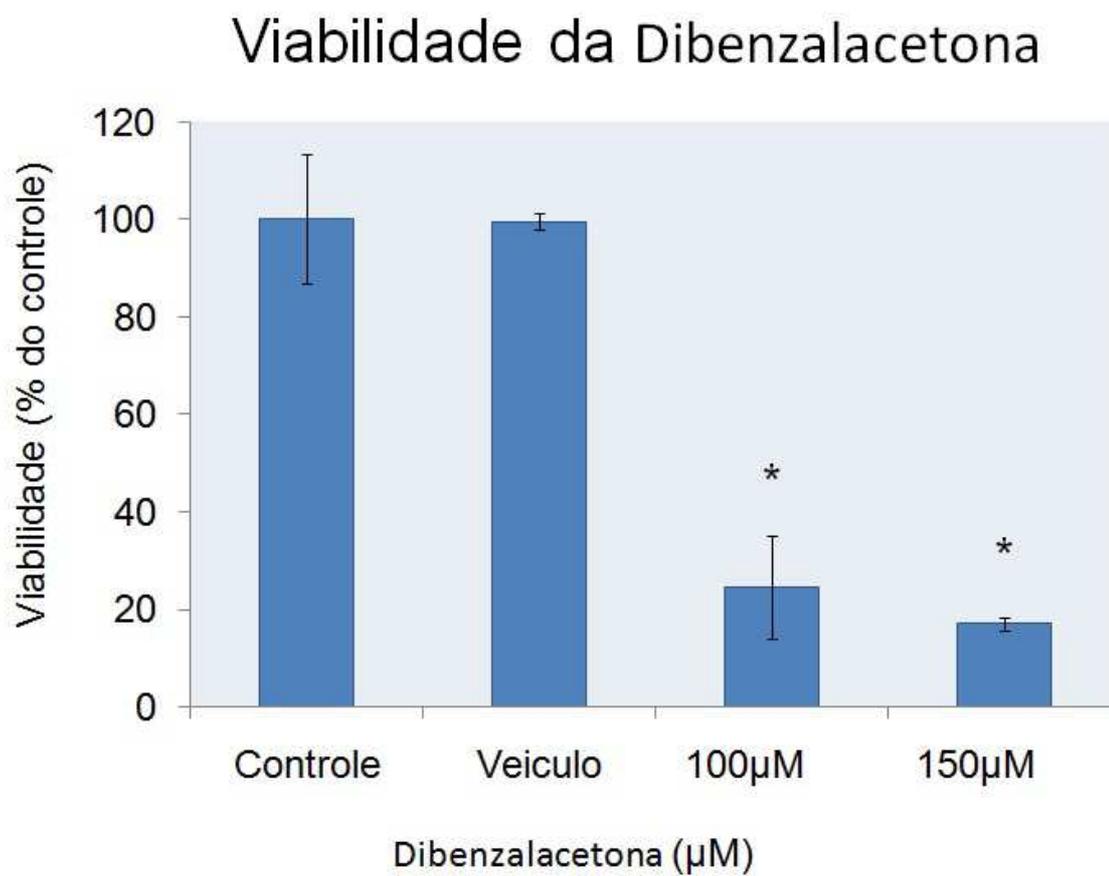


Figura 11: Viabilidade celular de cultura de astrócitos tratados por 24h com a composto dibenzalacetona nas concentrações de 100 e 150 µM. Grupo controle (DMEM), veículo (0,3% DMSO). n=6 e * $p < 0,01$ (ANOVA, seguido do teste de Tukey).

Viabilidade da 4,2`3`4'-tetrametox chalcona

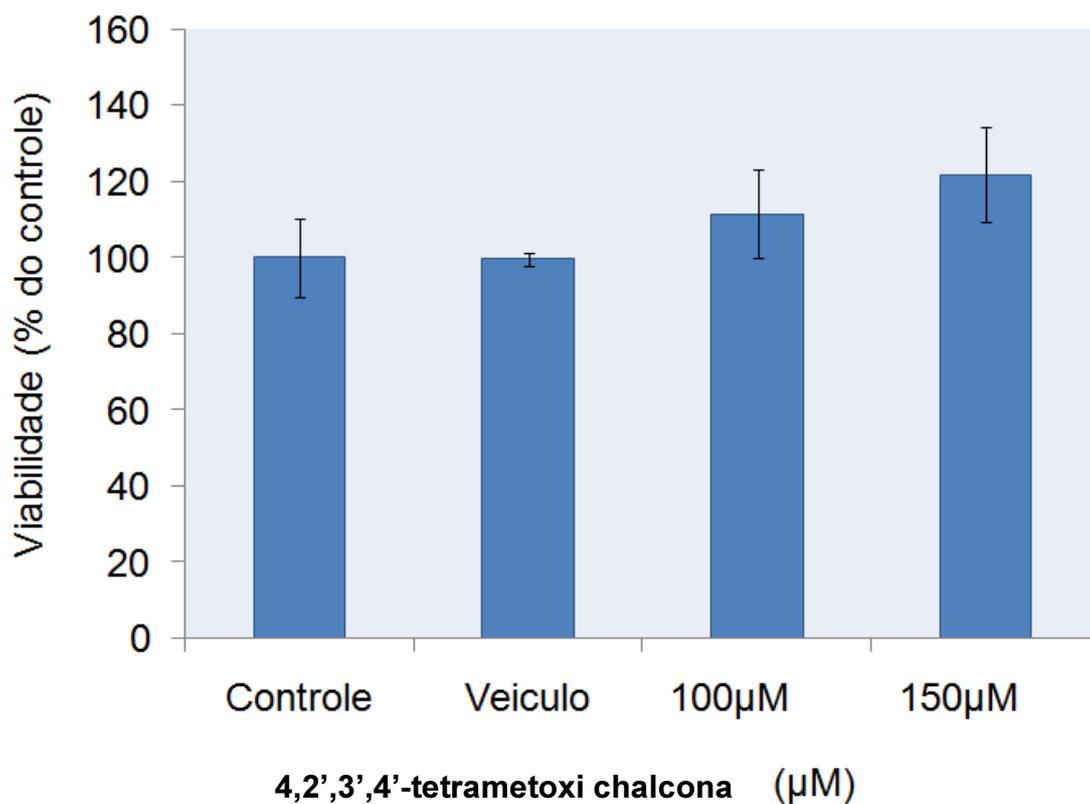


Figura 12: Viabilidade celular de cultura de astrócitos tratados por 24h com o composto 4,2',3',4'-tetrametoxi chalcona nas concentrações de 100 e 150 μM. Grupo controle (DMEM), veículo (0,3% DMSO). n=6 e * $p < 0,01$ (ANOVA, seguido do teste de

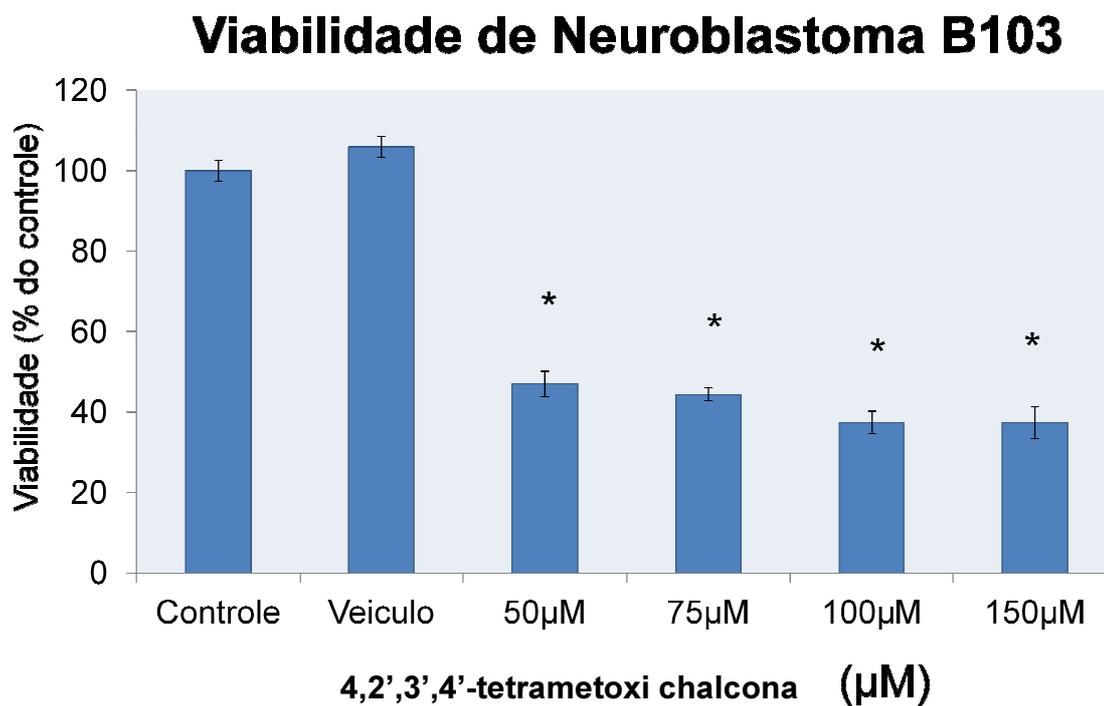


Figura 13: Viabilidade celular de neuroblastoma B103 tratado por 24h com a droga 4,2',3',4'-tetrametoxi chalcona nas concentrações de 50, 75, 100 e 150 µM. Grupo controle (DMEM), veículo (0,3% DMSO). n=6 e * $p < 0,01$ (ANOVA, seguido do teste de Tukey).

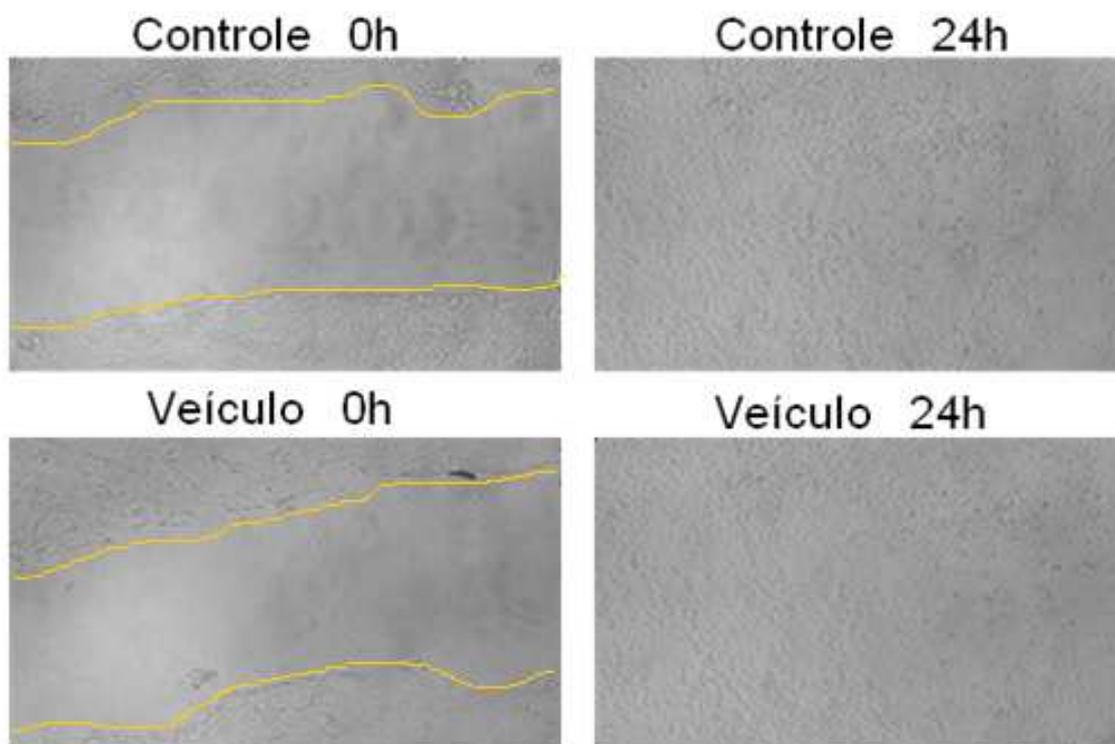


Figura 14: Migração celular em cultura de neuroblastoma B103 observada nos tempos 0 e 24h para o controle e veículo (DMSO 0,3%), 40x.

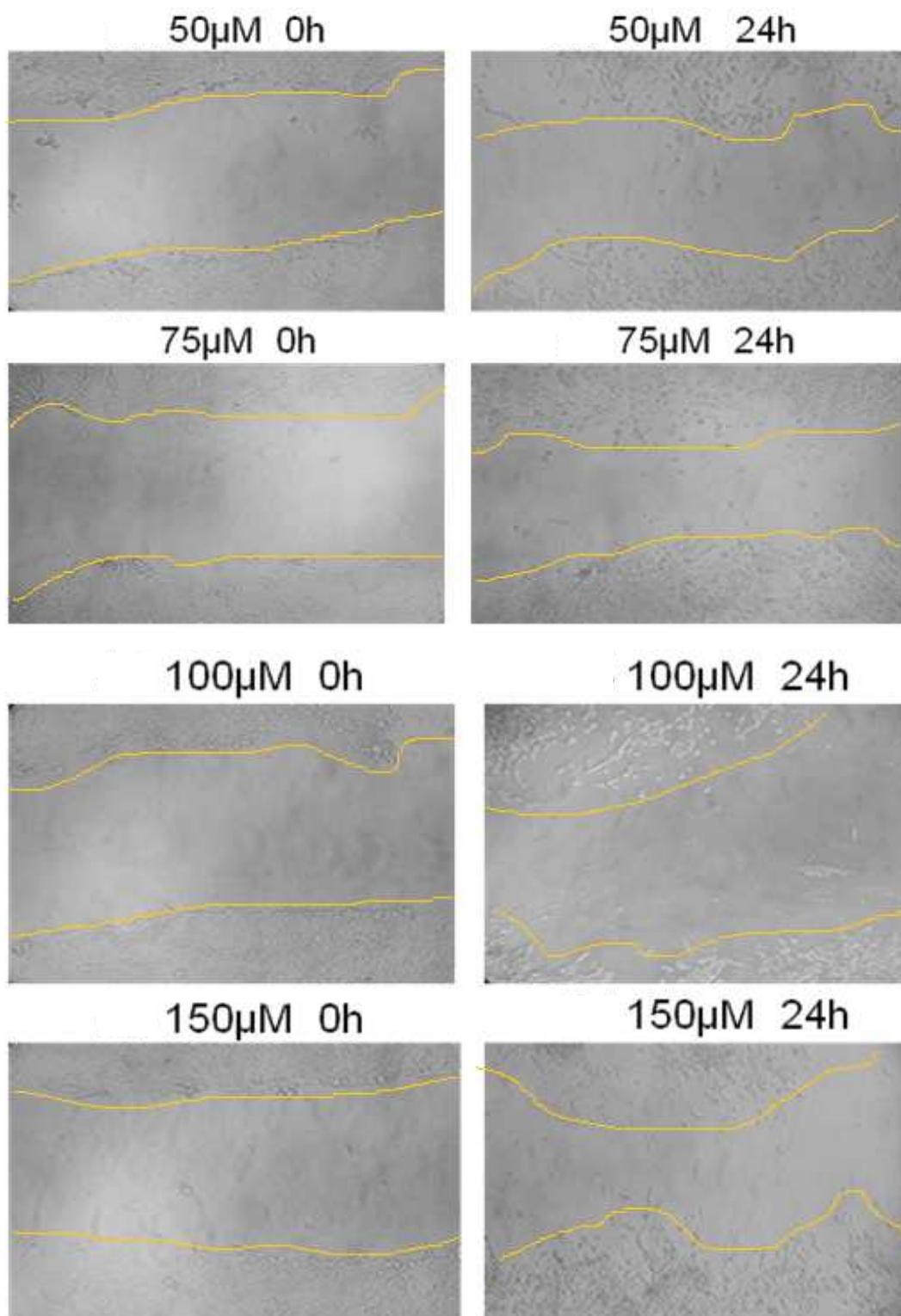


Figura 15: Migração celular em cultura observada nos tempos 0 e 24h de tratamento com a droga 4,2',3',4'-tetrametoxi chalcona nas concentrações de 50, 75, 100 e 150 μM ; 40x.

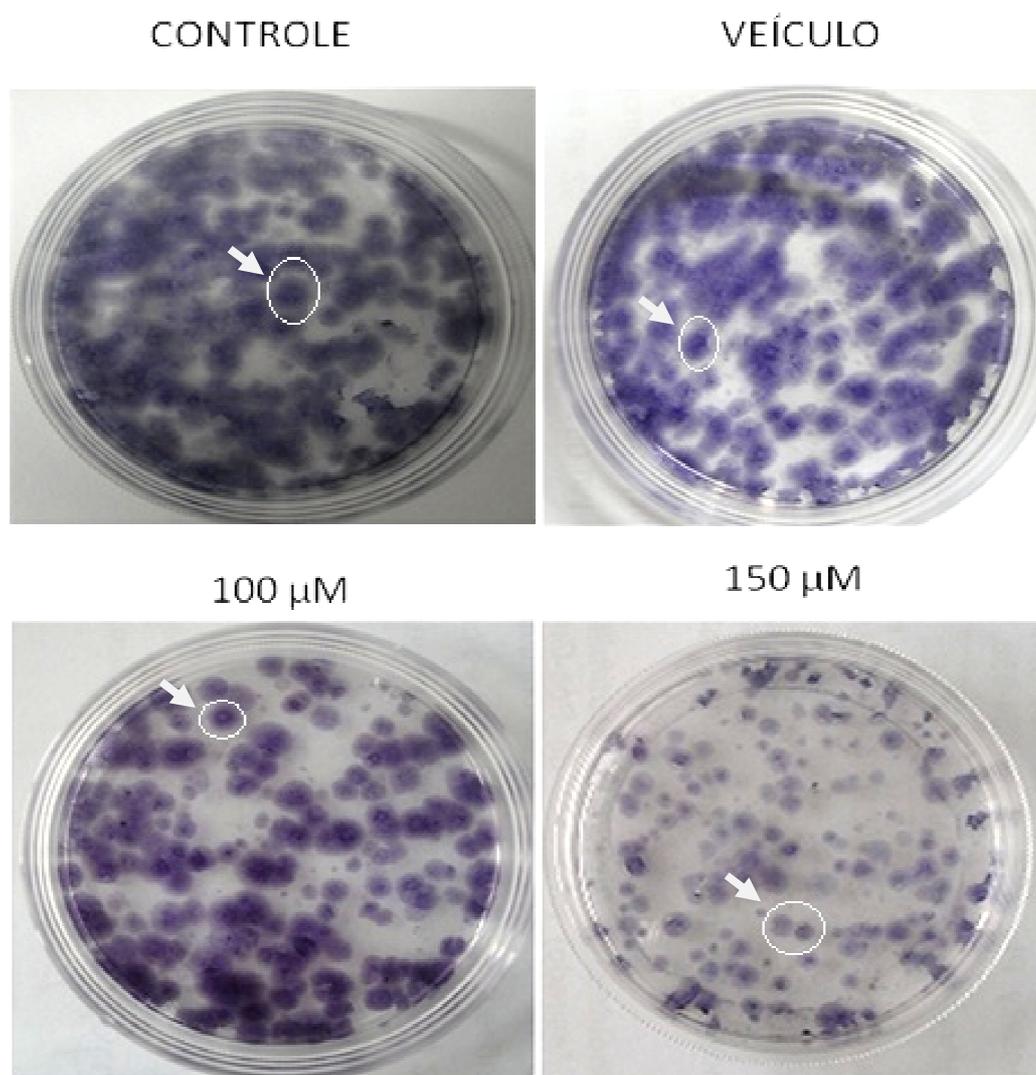


Figura 16: Capacidade de formação de colônia de células da linhagem de neuroblastoma B103 após o tratamento prévio por 24h com o composto 4,2',3',4'-tetrametoxichalcona a 100 e 150 μM . Análise realizada após 14 dias de cultivo.

4. DISCUSSÃO

Apesar dos protocolos de tratamento agressivo, incluindo altas doses de quimioterapia e ampla ressecção cirúrgica, a sobrevivência a longo prazo de pacientes com câncer localizado permanece entre 60-70% durante as duas últimas décadas (FRIEDRICH, 2013). Embora tenha havido um aumento da dose máxima de quimioterapia utilizada no tratamento, ainda não existe um ganho significativo na melhora do estado clínico do paciente. O uso de drogas anti-tumorais, tais como doxorrubicina e metotrexato, é geralmente limitada devido à sua toxicidade sistêmica e à falta de especificidade (FOTIA, 2012).

As terapias convencionais causam efeitos colaterais graves e, na melhor das hipóteses, apenas prolongam a vida útil do paciente por alguns anos. Neste contexto, torna-se imperativo a necessidade de encontrar, desenvolver, e introduzir novas modalidades terapêuticas mais eficientes que possam oferecer aos pacientes com câncer, oportunidades reais de cura (REDDY, 2003).

A história dos medicamentos anticâncer está intimamente relacionada aos produtos naturais, sendo que mais de 60% dos medicamentos utilizados tem em alguma instância sua origem relacionada a uma fonte natural. Dados da literatura sugerem que compostos naturais podem ser eficazes no tratamento do câncer (HO, 2013; GULLETT, 2010; REDDY, 2003).

Considerando o potencial citotóxico de muitos produtos naturais, a síntese de compostos derivados da estrutura básica das chalconas pode ser uma estratégia no desenvolvimento de novos fármacos antitumorais. As chalconas representam uma importante classe de compostos que possuem atividades citotóxicas e antineoplásicas (LETAFAT, 2013). Em busca de novas chalconas com atividade antineoplásica, realizou-se uma triagem com três diferentes chalconas utilizando cultura de células do córtex de rato e a linhagem celular de neuroblastoma B103 de rato.

Neste trabalho demonstramos o efeito citotóxico das chalconas 2'-hidroxichalcona, dibenzalacetona e 4,2',3',4'-tetrametoxichalcona em culturas de células normais do córtex de rato.

Usando um modelo *in vitro*, demonstramos que as chalconas 2'-hidroxichalcona e dibenzalacetona em concentrações de 100 e 150 μ M, reduziram de forma significativa a viabilidade de células normais do córtex de rato, conforme mostrado nas Figuras 10 e 11. Diferentemente, quando tratamos as células normais do córtex de rato com o composto 4,2',3',4'-tetrametoxichalcona nas concentrações de 100 e 150 μ M não houve redução da viabilidade celular (Figura 12).

Nossos resultados sugerem um efeito citotóxico da 2'-hidroxichalcona em células normais. Estudo de ECHEVERRIA *et al.* (2009) demonstrou o efeito desse composto sobre o crescimento celular, citotoxicidade e o padrão de morte por apoptose em linhagem de hepatocarcinoma HepG2, entretanto, o efeito do composto não foi demonstrado em células normais. Outros estudos descrevem a importância das moléculas não apresentarem citotoxicidade em células normais, uma vez que, podem trazer graves efeitos colaterais aos pacientes, por esses agentes não diferenciarem câncer de células normais (LETAFAT, 2013; SIERRA, 2010; ECKHARDT, 2002).

A dibenzalacetona possui uma estrutura química semelhante às chalconas. No presente trabalho, procuramos observar se, além da semelhança estrutural, a dibenzalacetona possui uma semelhança atuando como agente citotóxico. Por isso fazendo uma comparação com outros estudos, que demonstram a utilização de chalconas e seus derivados exibem uma ampla diversidade de atividades farmacológica incluindo, entre outros, citotóxica, antineoplásica, antivirais e antiprotozoaria (QUINTIN, 2009; GO, 2005). No entanto, a dibenzalacetona nas concentrações utilizadas de 100 e 150 μ M mostrou-se citotóxica para células normais, deixando de ser interessante no tratamento da doença, uma vez que causaria danos ao tecido normal.

Em nosso modelo de estudo demonstramos que o composto 4,2',3',4'-tetrametoxichalcona se apresenta como possível candidato para terapia

anticâncer uma vez que não promoveu redução da viabilidade de células normais do córtex de rato. Estudos anteriores mostram que as chalconas possuem atividade antineoplásicas, via inibição da proliferação celular, carcinogenesis e metástase (JI, 2013; JHOO, 2006; ZI & SIMONEAU, 2005; STEINER, 2000). Estudos recentes mostraram que as chalconas são indutores de apoptose e agentes anticancerígenos (ZHANG, 2013; SYAM, 2012).

Utilizando linhagens de células neoplásicas, diversos estudos demonstram que as chalconas inibem o crescimento de células cancerosas e induzem a apoptose, como no estudo de Ji *et al.* (2013) com a Flavokawaina B, uma chalcona da kava, inibindo o crescimento de células de osteossarcoma humano através da parada do ciclo celular em G2 / M e promovendo a apoptose.

Os dados obtidos neste trabalho com células de neuroblastoma B103 de rato, tratadas com o composto 4,2',3',4'-tetrametoxichalcona em diferentes concentrações de 50, 75,100 e 150µM, para realização do ensaio de motilidade e invasão, apoiam o uso desse composto como um possível candidato ao tratamento anticancerígeno, impedindo a migração e invasão de células neoplásicas. A inibição da motilidade e invasão foi dependente da concentração utilizada. Estes dados estão em acordo com os resultados obtidos por Ji *et al.* (2013) quando utilizando a Flavokawaina B (FKB), inibiu a migração e invasão de células de osteossarcoma humano.

Uma das principais características da metástase de células neoplásica é a capacidade de alterar a aderência entre as células e a matriz extracelular, que está associada com a invasão e migração de células tumorais (COUSSENS, 2002). Liao *et al.* (2012) investigaram o mecanismo das propriedades anticancer do ácido gálico sobre a migração de células de osteossarcoma, demonstrou que o ácido galico inibi a migração destas células, diminuindo a expressão das metaloproteinases de matriz (MMPs) do tipo 2 e 9.

O aumento da expressão das MMPs em células metásticas, demonstram estarem envolvidas na invasão e metástase de varias

neoplásias. É bem definido que a inibição da atividade enzimática de MMPs é alvo inicial para prevenir a metástase do câncer. Tanto MMP-2 e MMP9 estão envolvidas na capacidade de células tumorais sofrerem metástase (ZHANG, 2004; COUSSENS, 2002; HIMELSTEIN, 1998). Nosso resultado mostrou claramente que o composto 4,2',3',4'-tetrametoxichalcona inibe a migração e invasão de células de neuroblastoma B103 de rato *in vitro*, o qual pode ser utilizado para inibir a metástase desta neoplasia.

Os resultados do ensaio de formação de colônia de células de neuroblastoma B103, tratadas com o composto 4,2',3',4'-tetrametoxichalcona por 24 horas, mostrou uma significativa redução no número e no tamanho das colônias. O resultado sugere ainda que o tratamento das células de neuroblastoma B103 com a 4,2',3',4'-tetrametoxichalcona produziu uma inibição significativa do crescimento de maneira dependente da concentração.

Muitos dos tratamentos de câncer, causam pequenos danos ao DNA de células, sem selectividade específica para células doentes, o que leva os pacientes a sofrerem os efeitos colaterais, devido à perda de células saudáveis. Percepções anti-cancer derivadas de pesquisas sobre ciclo celular, deu inicio a idéia de revogação do checkpoint em G2 do ciclo celular como uma terapia específica de células de câncer, baseada na descoberta de que muitas células cancerosas têm um posto de controle G1 defeituosa, resultando em uma dependência do checkpoint G2 durante a replicação celular (KAWABE, 2004). Varios estudos revelam que chalconas podem induzir um congelamento do ciclo celular G2/M (ESKANDER, 2012; KO, 2011; KUO, 2010).

Os nossos resultados demonstraram que a tetrametoxi chalcona usada inibiu a proliferação de uma forma dependente da dose, e que este efeito anti-proliferativo pode ser associado com uma parada na fase G2/M. Estes dados estão de acordo com estudos anteriores que demonstram a capacidade de temozolomida, choque térmico, ou a ativação do receptor de neurotrofina TrkA, induzem uma parada em G2 / M do ciclo celular e autofagia em células de glioma maligno (HANSEN, 2007; KANZAWA, 2004).

Dados da literatura sugerem que o bloqueio do ciclo celular pode estar associado com uma redução nos níveis de ciclina B1, Cdc25C e aumento Myt1, e fosforilação Cdc2. Durante G2, o complexo Cdc2/ciclina B é mantido inativo pela fosforilação feita pela Myt1 quinase (ZHAO, 2005; WELLS, 1999). No início da mitose, os resíduos são desfosforilado por Cdc25C (KRISTJÁNSDÓTTIR, 2004; DRAETTA, 1997). Repressão a ciclina B1 e Cdc2 impõe uma parada G2 / M. A fosforilação inibitória de Cdc2 é essencial para a detenção em G2 independente de p53 que ocorre em resposta a danos no DNA, e é dependente da proteína quinases Atm e Atr. A Cdc2 é inativada pela Atm e Atr através do aumento da fosforilação dos resíduos de tirosina, que causam parada em G2 em resposta a danos no DNA (TAYLOR & STARK, 2001).

Bandgar *et al* (2010), relataram a síntese e atividade biológica de metoxi chalconas como agentes anti-câncer, anti-inflamatório e anti-oxidante. Mostraram ainda o efeito da 2,4-dimetoxi chalcona inibindo o crescimento de cinco linhagens diferentes de câncer. A 2,4-dimetoxi chalcona apresentou atividade anti-câncer inibindo 90-95% o crescimento das células. Sugerindo que adição de mais grupos metoxi em um composto, é benéfico a sua atividade anti-mitótica observada em células HeLa.

Entre os agentes anti-tumorais atualmente identificados, as chalconas representam uma importante classe de moléculas que são abundantes plantas comestíveis (frutas e legumes) e que são facilmente sintetizados por diversos métodos químicos. A atividade antineoplásica de certas chalconas pode ser um resultado da ligação à tubulina e impedindo a polimerização dos microtúbulos (LAWRENCE, 2006). A Tubulina é um heterodímero de duas subunidades homólogo α e β . Este dímero pode se combinar para fazer protofilamentos que consistem da alternância das unidades α e β , 12 ou mais protofilamentos podem, então, se unir para formar estruturas chamadas de microtúbulos. Estas estruturas desempenham um papel importante em vários processos bioquímicos vitais à sobrevivência celular e ao crescimento, um deles é a formação do fuso mitótico, sem o qual a mitose não seria possível.

Tubulina e microtúbulos são os alvos de uma série de drogas anticâncer clinicamente úteis, tais como produtos naturais de paclitaxel e vincristina. Outro importante ligante é a colchicina. Muitas moléculas pequenas são conhecidos por se ligarem no local de ligação da colchicina com a tubulina. Estes incluem combretastatina A4. Os compostos causam danos seletivos a vascularização do tumor, um efeito que está relacionado com sua propriedade de ligação com a tubulina (LI, 2002; TORZER, 2005). Dessa forma os tumores estão sem suprimentos de oxigênio e nutrientes e as suas células constituintes morrerem. Compostos como estes que têm como alvo a vasculatura tumoral representam possíveis tratamentos clínicos do câncer. A molécula de tubulina tem três sítios de ligação conhecidos, os quais são identificados pelos produtos naturais conhecidos por se ligarem a eles: Taxol e os seus derivados se ligam a um local e evitam a despolimerização de microtúbulos, alcalóides vinca, tais como vincristina ligam-se a um outro local e colchicina se liga ao terceiro. As chalconas, que são estruturalmente semelhantes a colchicina, acredita-se que se ligam a este último.

Estudos que avaliaram o mecanismo de regulação do efeito apoptótico da chalcona FKB em células de osteossarcoma, mostraram que a apoptose é controlada pelas vias mitocondrial e receptores de morte presentes na membrana plasmática. A proteína de pró – sobrevivência Bcl - 2 , combinado com a Bax , pode regular a apoptose. A Bax induz a liberação de citocromo c e ativa a via mitocôndrial iniciada por Bax e a via de apoptose dependente de caspase 3. A proteína Bcl - 2 inibe a liberação de citocromo c contra Bax . O desbalanço entre as proteínas Bcl-2/Bax tem sido reconhecida como um fator que contribui para apoptose induzida pro FKB (ZHAO, 2011; KO, 2011; HSU, 2006) . A via extrínseca é iniciada pela ligação de receptores transmembrana de morte, incluindo Fas (CD95) , TRAIL e receptores TNFR (ZIMMERMANN, 2001) . A ativação do receptor Fas leva a formação de um complexo de sinalização que induz a morte celular, que resulta na ativação de procaspase -8. Tornando-se caspase-8 ativa que pode então iniciar o gatilho da cascata de caspases envolvidas na apoptose.

5. CONCLUSÃO

Este trabalho demonstrou o efeito citotóxico seletivo do composto 4,2',3',4-tetrametoxi chalcona sobre a linhagem de neuroblastoma B103 de rato. O composto reduz a capacidade de crescimento, migração e invasão das células da linhagem B103, sem, contudo, alterar a viabilidade de células normais do córtex cerebral de ratos *in vitro*.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ALISON, M.R. Cancer. **Encyclopedia of Life Sciences. Nature Publishing Group, 1-8**. 2001. Disponível em: www.els.net.
- ALMEIDA, V.L.; LEITÃO, A.; REINA, L.C.B.; MONTANARI, C.A.; DONNIC, C.L. Câncer e Agentes Antineoplásicos Ciclo Celular Específicos e Ciclo Celular não Específicos que Interagem com o Dna: Uma Introdução. **Quimica Nova** **28**(1):118-129, 2005.
- ALVES, R.R.L. Síndrome de Opsoclonus-mioclonus-ataxia: relato de caso. **PEDIATRIA (SÃO PAULO)** **29**(2) (Opsoclonus-myoclonus-ataxia syndrome: case report Síndrome de Opsoclonus-mioclonus-ataxia: relato de caso):150-3. 2007.
- ANTONSSON, B. Mitochondria and the Bcl-2 family proteins in apoptosis signaling pathways. **Molecular and Cellular Biochemistry** **256/257**:141-155, 2004.
- ÁVILA, H. P.; SMÂNIA, E. F. A; MONACHE, F. D.; SMÂNIA JÚNIOR, A. Structureactivity Relationship of Antibacterial Chalcones. **Bioorganic & Medicinal Chemistry** **16**:9790-9794, 2008.
- BAN, H.S.; SUZUKI, K.; LIM, S.S.; JUNG, S.H.; LEE, S.; JI, J.; LEE, H.S.; LEE, Y.S.; SHIN, K.H.; OHUCHI, K. Inhibition of lipopolysaccharide-induced expression of inducible nitric oxide synthase and tumor necrosis factor-alpha by 2'-hydroxychalcone derivatives in RAW 264.7 cells. **Biochemical Pharmacology** **67**(8):1549-1557, 2004.
- BANDGAR, B.P.; GAWANDE, S.S. Synthesis and biological screening of a combinatorial library of beta-chlorovinyl chalcones as anticancer, anti-inflammatory and antimicrobial agents. **Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters** **18**(5):2060-2065, 2010.
- BAYLY, A. C.; ROBERTS, R. A.; DIVE, C. Mechanisms of apoptosis. In: BITTAR, E. E. **Advances in molecular and cell biology** **20**:183-229, 1997.

- BELIZÁRIO, J. E.; ALVES, J.; OCCHIUCCI, J. M.; GARAY-MALPARTIDA, M.; SESSO, A. **Brazilian Journal Of Medical and Biological Research** 40: 1011-1024, 2007.
- BENEDETTI, E.; CIMINI, A. PPARs in Human Neuroepithelial Tumors: PPAR Ligands as Anticancer Therapies for the Most Common Human Neuroepithelial Tumors. Hindawi Publishing Corporation. **PPAR Research**. Article ID 427401, 2010.
- BERGANTINI, A. P. F.; CASTRO, F. A.; SOUZA, A. M.; FETT-CONTE, A. C. Leucemia mielóide crônica e o sistema Fas-FasL. **Revista Brasileira de Hematologia e Hemoterapia** 27:120-125, 2005.
- BHAT, B. A.; DHAR, K. L.; PURI, S. C.; SAXENA, A. K.; HANMUGAVEL, M.; QAZI, G. N. Synthesis and biological evaluation of chalcones and their derived pyrazoles as potential cytotoxic agents. **Bioorganic & Medicinal Chemistry** 15:3177-3180, 2005.
- BOUJRAD, H.; GUBKINA O.; ROBERT N.; KRANTIC S.; SUSIN S. A. AIF-Mediated Programmed Necrosis: A Highly Regulated Way to Die. **Cell Cycle** 6(21):2612-2619, 2007.
- BOUMENDJEL, A.; BOCCARD, J.; CARRUPT, P.A.; NICOLLE, E.; BLANC, M.; GEZE, A.; CHOISNARD, L.; WOUESSIDJEW, D.; MATERA, E.L.; DUMONTET C. Antimitotic and antiproliferative activities of chalcones: forward structure-activity relationship. **Journal of Medicinal Chemistry** 51(7):2307-2310, 2008.
- BRAS, M.; QUEENAN, B.; SUSIN, S. A. Programmed cell death via mitochondria: different modes of dying. **Biochemistry** 70(2):231-239, 2005.
- BRODEUR, G.M. Neuroblastoma: biological insights into a clinical enigma. **Nature Reviews. Cancer** 3(3):203-216, 2003.
- CHAN, S. L.; YU, V. C. Proteins of the bcl-2 family in apoptosis signalling: from mechanistic insights to therapeutic opportunities. **Clinical and Experimental Pharmacology and Physiology** 31:119-128, 2004.

- CHIARADIA, L. D.; DOS SANTOS, R.; VITOR, C. E.; VIEIRA, A. A.; LEAL, P. C.; NUNES, R. J.; CALIXTO, J. B.; YUNES, R. A. Synthesis and Pharmacological Activity of Chalcones Derived from 2,4,6-trimethoxyacetophenone in RAW 264.7 Cells Stimulated by LPS: Quantitative Structure-activity Relationships. **Bioorganic & Medicinal Chemistry** 16:658-667, 2008.
- COHEN, G. M. Caspases: The executioners of apoptosis. **Biochemical Journal** 326:1–16, 1997.
- COLON, N.C. & CHUNG, D.H. Neuroblastoma. **Advances in Pediatrics** 58(1):297–311, 2011.
- COTRAN, R. S.; VINAY KUMAR, M. V.; COLLINS, T. Patología celular I: lesão e morte da célula. In: COTRAN, R.S.; VINAY KUMAR, M.V.; COLLINS, T. **Patologia estrutural da célula e funcional**. 6ª ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2000. p. 1-26.
- COUSSENS, L. M.; FINGLETON, B.; MATRISIAN, L. M. Matrix metalloproteinase inhibitors and cancer: trials and tribulations. **Science** 295(5564):2387-2392, 2002.
- DANIELS, J.L.; OLSHAN, A.F.; TESCHKE, K.; HERTZ-PICCIOTTO, I.; SAVITZ, D.A.; BLATT, J.; BONDY, M.L.; NEGLIA, J.P.; POLLOCK, B.H.; COHN, S.L.; LOOK, A.T.; SEEGER, R.C.; CASTLEBERRY, R.P. Residential pesticide exposure and neuroblastoma. **Epidemiology** 12(1):20-27, 2001.
- DANTAS, E.L.R.; SÁ, F.L.R.; CARVALHO, S.M.F.; ARRUDA, A.P.; RIBEIRO, E.M.; RIBEIRO, E.M. Genética do Câncer Hereditário. **Revista Brasileira de Cancerologia** 55(3):263-269, 2009.
- DAVIDOFF, A.M. Neuroblastoma. **Seminars in Pediatric Surgery** 21(1):2-14, 2012.
- DAVIS, S.; ROGERS, M.A.; PENDERGRASS, T.W. The incidence and epidemiologic characteristics of neuroblastoma in the United States. **American Journal of Epidemiology** 126(6):1063-1074, 1987.

- DE ROOS, A.J.; OLSHAN, A.F.; TESCHKE, K.; POOLE, C.; SAVITZ, D.A.; BLATT, J.; BONDY, M.L.; POLLOCK, B.H. Parental occupational exposures to chemicals and incidence of neuroblastoma in offspring. **American Journal of Epidemiology** 154(2):106-114, 2001.
- DESAGHER, S.; MARTINOU, J. C. Mitochondria as the central control point of apoptosis. **Trends in Cell Biology** 10(9):369-377, 2000.
- DEVITA, V. T. & CHU, E. A History of Cancer Chemotherapy. **Cancer Research** 68(21):8643–8653, 2008.
- DOBASHI, Y. Cell cycle regulation and its aberrations in human lung carcinoma. **Pathology international** 55:95-105. 2005.
- DRAETTA, G.; ECKSTEIN, J. Cdc25 protein phosphatases in cell proliferation. **Biochimica et Biophysica Acta** 1332:M53–M63, 1997.
- DRIKS, P.B.; RUTKA, J.T. Current concepts in neuro-oncology: the cell cycle – a review. **Neurosurgery** 40(5):100-113, 1997.
- DUCKI, S. The development of chalcones as promising anticancer agents. **IDrugs**,10:42-46, 2007.
- DUCKI, S.; FORREST, R.; HADFIELD, J. A.; KENDALL, A.; LAWRENCE, N. J.; McGROWN, A. T.; RENNISON, D. Potent antimitotic and cell growth inhibitory properties of substituted chalcones. **Bioorganic & Medicinal Chemical Letters** 8:1051-1056, 1998.
- EARNSHAW, W.; MARTINS, L. M.; KAUFMANN, S. Mammalian caspases: structure, activation, substrates and functions during apoptosis. **Annual Review of Biochemistry** 68:383-424, 1999.
- ECHEVERRIA, C.; SANTIBANEZ, J.S.; DONOSO-TAUDA, O.; ESCOBAR, C.A.; RAMIREZ-TAGLE, R. Structural antitumoral activity relationships of synthetic chalcones. **International Journal of Molecular Sciences** 10:221–231, 2009.
- ECKHARDT, S. Recent progress in the development of anticancer agents. **Current Medicinal Chemistry - Anti-Cancer Agents** 419–439, 2002.

- ENARI, M.; SAKAHIRA, H.; HOKOYAMA, H.; OKAMA, K.; IWAMATSU A.; NAGATA,S. A caspase-activated DNase that degrades DNA during apoptosis and its inhibitor ICAD. **Nature** 391:43-50, 1998.
- ESKANDER, R.N.; RANDALL, L.M.; SAKAI, T.; GUO, Y.; HOANG, B.; ZI, X. Flavokawain B, A Novel Naturally Occuring Chalcone, Exhibits Robust Apoptotic Effects and Induces G2/M Arrest of a Uterine Leiomyosarcoma Cell Line. **Journal of Obstetrics and Gynaecology Research** 38(8):1086–1094, 2012.
- FOSTER, I. Cancer: A cell cycle defect. **Radiography** 14:144-149, 2008.
- FOTIA, C.; AVNET, S.; GRANCHI, D.; BALDINI, N.; The natural compound Alizarin as an osteotropic drug for the treatment of bone tumors. **Journal of Orthopaedic Research** 30:1486–1492, 2012.
- FRANKS, L.M.; BOLLEN, A.; SEEGER, R.C.; STRAM, D.O.; MATTHAY, K.K. Neuroblastoma in adults and adolescents: an indolent course with poor survival. **Cancer** 79:2028-35, 1997.
- FRIEDRICH, P.; ORTIZ, R., STRAIT, K., FUENTES,,S.; GAMBOA, Y.; ARAMBU, I.; AH-CHU-SANCHEZ, M.; LONDON, W.; RODRIGUEZ-GALINDO, C., ANTILLON-KLUSSMANN, F.; BAEZ, F. Pediatric sarcoma in Central America: Outcomes, challenges, and plans for improvement. **Cancer** 119:871–879, 2013.
- GEORGE, R.E.; LONDON, W.B.; COHN, S.L.; MARIS, J.M.; KRETSCHMAR, C.; DILLER, L.; BRODEUR, G.M.; CASTLEBERRY, R.P.; LOOK, A.T. Hyperdiploidy Plus Nonamplified *MYCN* Confers a Favorable Prognosis in Children 12 to 18 Months Old With Disseminated Neuroblastoma: A Pediatric Oncology Group Study. **Journal of Clinical Oncology** 23:6466-6473, 2005.
- GHANEI, M. & HARANDI, A.A. Long term consequences from exposure to sulfur mustard: a review. **Inhalation Toxicology** 19(5): 451-456, 2007.
- GO M, L.; WU, X.; LIU, X. L. Chalcones: an update on cytotoxic and chemoprotective properties. **Current Medicinal Chemistry** 12(4):481-99, 2005.

- GOLDEN, C.B.; FEUSNER, J.H. Malignant abdominal masses in children: quick guide to evaluation and diagnosis. **Pediatric Clinics of North America** 49(6):1369-92, 2002.
- GOODMAN, S.N. Neuroblastoma screening data. An epidemiologic analysis. **The American Journal of Diseases of Children** 145(12):1415-22. 1991.
- GREEN, D.; KROEMER, G. The central executioners of apoptosis: caspases or mitochondria. **Trends in Cell Biology** 8:267–271, 1998.
- GRIVICICH, I.; REGNER, A.; ROCHA, A. B. Morte celular por apoptose. **Revista Brasileira de Cancerologia** 53:335-343, 2007.
- GULLETT, N. P.; RUHUL AMIN, A. R. M.; BAYRAKTAR, S. Cancer prevention with natural compounds. **Seminars in Oncology** 37(3):258–281, 2010.
- GURNEY, J.G.; DAVIS, S.; SEVERSON, R.K.; FANG, J.Y.; ROSS, J.A.; ROBISON, L.L. Trends in cancer incidence among children in the U.S. **Cancer** 78(3):532-41. 1996.
- HAIL J. R, N.; CARTER B. Z.; KONOPLEVA, M.; ANDREEFF, M. Apoptosis effector mechanisms: A requiem performed in different keys. **Apoptosis** 11:889–904, 2006.
- HAJRA, K. M.; LIU, J. R. Apoptosome dysfunction in human cancer. **Apoptosis** 9:691-704, 2004.
- HANSEN, K.; WAGNER, B.; HAMEL, W.; SCHWEIZER, M.; HAAG, F.; WESTPHAL, M.; LAMSZUS, K. Autophagic cell death induced by TrkA receptor activation in human glioblastoma cells. **Journal of Neurochemistry** 103: 259–275, 2007.
- HASEGAWA, T.; HIROSE, T.; AYALA, A.G.; ITO, S.; TOMARU, U.; MATSUNO, Y. Adult neuroblastoma of the retroperitoneum and abdomen: clinicopathologic distinction from primitive neuroectodermal tumor. **The American Journal of Surgical Pathology** 25:918-924, 2005.
- HENGARTNER, M. O. The biochemistry of apoptosis. **Nature** 407(6805):685-687, 2000.

- HIMELSTEIN, B. P.; ASADA, N.; CARLTON, M. R.; COLLINS, M. H. Matrix metalloproteinase-9 (MMP-9) expression in childhood osseous osteosarcoma. *Medical and Pediatric Oncology* 31:471–474, 1998.
- HO, Y. F.; KARSANI, S. A.; YONG, W. K.; ABD MALEK, S. N. Induction of apoptosis and cell cycle blockade by helichrysetin in a549 human lung adenocarcinoma cells. **Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine**. ID 857257, 2013.
- HSU, Y.L.; KUO, P.L.; TZENG, W.S.; LIN, C.C. Chalcone inhibits the proliferation of human breast cancer cell by blocking cell cycle progression and inducing apoptosis. *Food and Chemical Toxicology* 44: 704–713, 2006.
- HUNT, T.; NASMYTH, K.; NOVÁK, B. The cell cycle. **Philosophical Transactions – The Royal Society. Biological sciences** 37: 366-371, 2011.
- HYEONSEOK, K.O.; YOUNG-JOO, K.; AMOR, E.C.; LEE, J.W.; KIM, H-C.; KIM, H.J.; YANG, H.O. Induction of Autophagy by Dimethyl Cardamonin Is Associated With Proliferative Arrest in Human Colorectal Carcinoma HCT116 and LOVO Cells. *Journal of Cellular Biochemistry*, 112: 2471–2479, 2011.
- INCA. ABC do câncer: abordagens básicas para o controle do câncer/ Instituto Nacional de Câncer José Alencar Gomes da Silva, Coordenação Geral de Ações Estratégicas, Coordenação de Educação. Rio de Janeiro: **INCA**, 2012. 129 p.
- INCA. Estimativa 2014: Incidência de Câncer no Brasil / Instituto Nacional de Câncer José Alencar Gomes da Silva, Coordenação de Prevenção e Vigilância. Rio de Janeiro: **INCA**, 2014. 124p.
- JENNINGS, RW.; LAQUAGLIA, MP.; LEONG, K.; HENDREN, WH.; ADZICK, NS. Fetal neuroblastoma: prenatal diagnosis and natural history. *Journal of Pediatric Surgery* 28 (9):1168-74 1993.
- JHOO, J. W.; FREEMAN, J. P.; HEINZE, T. M.; MOODY, J. D.; SCHNACKENBERG, L. K.; BEGER, R. D.; DRAGULL, K.; TANG, C. S.;

- ANG, C. Y. In vitro cytotoxicity of nonpolar constituents from different parts of kava plant (*Piper methysticum*). **Journal of Agricultural and Food Chemistry** 54:3157–3162, 2006.
- JI, T.; LIN, C.; KRILL, L. S.; ESKANDER, R.; GUO, Y.; ZI, X.; HOANG, B. H. Flavokawain B, a kava chalcone, inhibits growth of human osteosarcoma cells through G2/M cell cycle arrest and apoptosis. **Molecular Cancer** 12:55, 2013.
- JIANG, M.; STANKE, J.; LAHTI, J.M. The Connections Between Neural Crest Development and Neuroblastoma. **Current Topics in Developmental Biology** 94:77-127, 2011.
- KACHADOURIAN, R.; DAY, B.J. Flavonoid-induced glutathione depletion: potential implications for cancer treatment. **Free Radical Biology & Medicine** 41(1):65-76, 2006.
- KANZAWA, T.; GERMANO, I.M.; KOMATA, T.; ITO, H.; KONDO, Y.; KONDO, S. Role of autophagy in temozolomide-induced cytotoxicity for malignant glioma cells. **Cell Death and Differentiation** 11:448-457, 2004.
- KAPLAN, S.J.; HOLBROOK, C.T.; MCDANIEL, H.G.; BUNTAIN, W.L.; CRIST, W.M. Vasoactive intestinal peptide secreting tumors of childhood. **The American Journal of Diseases of Children** 1:21-24, 1980.
- KAWABE, T. G2 checkpoint abrogators as anticancer drugs. **Molecular Cancer Therapeutics** 3:513-519, 2004.
- KEDAR, A.; GLASSMAN, M.; VOORHESS, M.L.; FISHER, J.; ALLEN, J.; JENIS, E. *et al.* Severe hypertension in a child with ganglioneuroblastoma. **Cancer** 47(8):2077-2080, 1981.
- KERR, J. F.R.; GOBE, G. C.; WINTERFORD, C. M.; HARMON, B. V. Anatomical methods in cell death. **Methods in Cell Biology** 46:1-27, 1995.
- KONTOGIORGIS, C.; MANTZANIDOU, M.; HADJIPAVLOU-LITINA, D. Chalcones and their Potential Role in Inflammation. **Mini-Reviews in Medicinal Chemistry** 8:1224-1242, 2008.

- KRISTJÁNSDÓTTIR, K.; RUDOLPH, J. Cdc25 Phosphatases and Cancer Review. **Chemistry & Biology** 11:1043-1051, 2004.
- KROEMER, G.; GALLUZZI, L.; BRENNER, C. Mitochondrial Membrane Permeabilization in Cell Death. **Physiological Reviews** 87:99-163, 2007.
- KUO, Y-F.; SU, Y-Z.; TSENG, Y-H.; WANG, S-Y.; WANG, H-M.; CHUEH, P.J. Flavokawain B, a novel chalcone from *Alpinia pricei* Hayata with potent apoptotic activity: Involvement of ROS and GADD153 upstream of mitochondria-dependent apoptosis in HCT116 cells. **Free Radical Biology & Medicine** 49:214-226, 2010.
- KUTUK, O.; BASAGA, H. Bcl-2 protein family: Implications in vascular apoptosis and atherosclerosis. **Apoptosis** 11:1661-1675, 2006.
- KUWANA, T.; NEWMAYER, D. D. Bcl-2-family proteins and the role of mitochondria in apoptosis. **Current Opinion in Cell Biology** 15:691-699, 2003.
- LARANJEIRO, R.; TAMAI, T. K.; PEYRIC, E.; KRUSCHE, P.; WHITMORE, D. Cyclin-dependent kinase inhibitor p20 controls circadian cell-cycle timing. **Proceedings of the National Academy of Sciences** 110(17):6835–6840, 2013.
- LAVIN, M. R. Neuroleptic-induced extrapyramidal side effects. **The American Journal of Psychiatry** 150:1752-3, 1993.
- LAWRENCE, N. J.; MCGROWN, A. T. The chemistry and biology of antimetabolic chalcones and related enone systems. **Current Pharmaceutical Design** 11:1679-1693, 2005.
- LETAFAT, B.; SHAKERI, R.; EMAMI, S.; NOUSHINI, S.; MOHAMMADHOSSEINI, N.; SHIRKAVAND, N.; KABUDANIAN ARDESTANI, S.; SAFAVI, M.; SAMADIZADEH, M.; LETAFAT, A.; SHAFIEE, A.; FOROUMADI, A. Synthesis and *In Vitro* Cytotoxic Activity of Novel Chalcone-Like Agents. **Iranian Journal of Basic Medical Sciences** 16:1155-1162, 2013.
- LI, Q.; WOODS, K.W.; CLAIBORNE, A.; GWALTNEY, S.L.; BARR, K.J.; GEHRKE, L.; CREDO, B.; JANGLEE, Y.H.H.; WARNER, R.B.; KOVAR,

- P.; NUKKALA, M.A.; ZIELINSKI, N.A.; TAHIR, S.H.; FITZGERALD, M.; KIM, K.H.; MARSH, K.; FROST, D.; CHUNGNG, S.; HINGL, S.R. Synthesis and Biological Evaluation of 2-Indolyloxazolines as a New Class of Tubulin Polymerization Inhibitors. Discovery of A-289099 as an Orally Active Antitumor Agent. **Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters** 12:465–469, 2002.
- LIAO X.; TANG, S.; THRASHER, J. B.; GRIEBLING, T. L.; LI, B. Small-interferingRNA-induced androgen receptor silencing leads to apoptotic cell death in prostatecancer. **Molecular Cancer Therapeutics** 4(4):505-515, 2005.
- LIAO, C.L.; LAI, K. C.; HUANG, A. C.; YANG, J. S.; LIN, J. J.; WU, S. H.; WOOD, G. W.; LIN, J. G.; CHUNG, J. G. Gallic acid inhibits migration and invasion in human osteosarcoma U-2 OS cells through suppressing the matrix metalloproteinase-2/-9, protein kinase B (PKB) and PKC signaling pathways. **Food and Chemical Toxicology** 50:1734–1740, 2012.
- MAHONEY, N.R.; LIU, G.T.; MENACKER, S.J.; HOGARTY, M.D.; MARIS, J.M. Pediatric horner syndrome: etiologies and roles of imaging and urine studies to detect neuroblastoma and other responsible mass lesions. **American Journal of Ophthalmology** 142(4):651-9 2006.
- MARIS, J.M.; HOGARTY, M.D.; BAGATELL, R.; COHN, S.L. Neuroblastoma. **Lancet** 369(9579):2106-2120, 2007.
- MATTHAY, K.K. Neuroblastoma: a clinical challenge and biologic puzzle. **A Cancer Journal for Clinicians** 45(3):179-92 1995.
- MCLEAN, T.W.; ISKANDAR, S.S.; SHIMADA, H.; HALL, M.C. Neuroblastoma in an adult. **Urology** 64:1232, 2004.
- MENEGAUX, F.; OLSHAN, A.F.; NEGLIA, J.P.; POLLOCK, B.H.; BONDY, M.L. Day care, childhood infections, and risk of neuroblastoma. **American Journal of Epidemiology** 159(9):843-851, 2004.
- MESTER, J.; REDEUILH, G. Proliferation of breast cancer cells: regulation, mediators, targets for therapy. **Anti-Cancer Agents in Medicinal Chemistry** 8:872-885, 2008.

- MICHALEK, A.M.; BUCK, G.M.; NASCA, P.C.; FREEDMAN, A.N.; BAPTISTE, M.S.; MAHONEY, M.C. Gravid health status, medication use, and risk of neuroblastoma. **American Journal of Epidemiology** 143(10):996-1001, 1996.
- NCI. NATIONAL CANCER INSTITUTE. Cancer. Disponível em: http://www.cancer.gov/cancer_topics/cancerlibrary/what-is-cancer. Acesso em: 20 de janeiro de 2014.
- OLSHAN, A.F.; SMITH, J.; COOK, M.N.; GRUFFERMAN, S.; POLLOCK, B.H.; STRAM, D.O.; SEEGER, R.C.; LOOK, A.T.; COHN, S.L.; CASTLEBERRY, R.P.; BONDY, M.L. Hormone and fertility drug use and the risk of neuroblastoma: a report from the Children's Cancer Group and the Pediatric Oncology Group. **American Journal of Epidemiology** 150(9):930-938, 1999.
- OZAKI, T.; NAKAGAWARA, A. p53: The attractive tumor suppressor in the cancer research field. **Journal of biomedicine & biotechnology**. doi: [10.1155/2011/603925](https://doi.org/10.1155/2011/603925). 2010.
- PARISI, M.T.; HATTNER, R.S.; MATTHAY, K.K.; BERG, B.O.; SANDLER, E.D. Optimized diagnostic strategy for neuroblastoma in opsoclonus-myoclonus. **Journal of Nuclear Medicine** 34(11):1922-1926, 1993.
- PARK, J.R. Neuroblastoma: Biology, Prognosis, and Treatment. **Pediatric Clinics of North America** 55:97-120, 2008.
- PETROS, A. M.; OLEJNICZAK, E. T.; FESIK, S. W.; Structural biology of the Bcl-2 family of proteins. **Biochimica et Biophysica Acta** 1644:83-94, 2004.
- PETTIT, G.R.; SINGH, S.B.; HAMEL, E.; LIN, C.M.; ALBERTS, D.S.; GARCIA-KENDALL, D. Isolation and structure of the strong cell growth and tubulin inhibitor combretastatin A-4. **Experientia** 45(2):209-211, 1989.
- QUINTIN, J.; DESRIVOT, J.; THORET, S.; LE MENEZ, P.; CRESTEIL, T.; LEWIN, G.: Synthesis and biological evaluation of a series of tangeretin-derived chalcones. **Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters** 19:167-169, 2009.

- RAO, Y.K.; FANG, S.H.; TZENG, Y.M. Differential effects of synthesized 2'-oxygenated chalcone derivatives: modulation of human cell cycle phase distribution. **Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters** 12(10):2679-2686, 2004.
- RAVITS, M.J.; WENNER, C.E. Cyclin-dependent kinase regulation during G₁ phase and cell cycle regulation by TGF.β. **Advances in Cancer Research** 71:165-207. 1997.
- REDDY, L.; ODHAV, B., BHOOLA, K. D. Natural products for cancer prevention: a global perspective. **Pharmacology and Therapeutics** 99(1):1–13, 2003.
- RICH, J. N.; EYLER, C. E. Cancer stem cells in brain tumor biology. **Cold Spring Harbor Symposia on Quantitative Biology** 73:411-420,2008.
- ROBERT, J. Gene polymorphisms. **Bulletin du cancer** 97(11):1253-64, 2010.
- SCHWAB, M.; SHIMADA, H.; JOSHI, V.; BRODEUR In: . GM. Neuroblastic tumours of adrenal gland and sympathetic nervous system. **World Health Organization, IARC, Lyon, France Pathology and Genetics of Tumours of the Nervous System**, Kleihues, P, Cavenee, WK, Eds, :153. 2000.
- SCHWAB, M.; TONINI, G. P.; and BERNARD, J. Human Neuroblastoma. Recent Advances in Clinical and Genetic Analysis, **Harwood Academic Publishers**, Chur, Switzerland, 1993.
- SCOTT, R. B. Cancer Chemotherapy-The First Twenty-five Years. **British Medical Journal** 4:259-265, 1970.
- SIERRA J. R.; CEPERO ,V.; GIORDANO, S. Molecular mechanisms of acquired resistance to tyrosine kinase targeted therapy. **Molecular Cancer** 9:75–88, 2010.
- SINGH, M.; ARORA, P.; SINGH, S.; BOHARA, S.; KHURANA, N.; ZUTSHI, V.; KUMAR, R. Adult neuroblastoma of the ovary: a rare tumor with review of literature. **Journal of Cancer Research and Therapeutics** 6(3):367-369, 2010.
- SRINIVASAN, B.; JOHNSON, T. E.; LAD, R.; XING, C.: Structure – activity relationship studies of chalcone leading to 3-Hydroxy-4,3',4',5'-

- tetramethoxychalcone and its analogues as potent nuclear factor B inhibitors and their anticancer activities. **Journal of Medicinal Chemistry** 52:7228-7235, 2009.
- STEINER G. G. The correlation between cancer incidence and kava consumption. **Hawaii Medical Journal** 59:420–422, 2000.
- SYAM, S.; ABDELWAHAB, S. I.; AL-MAMARY, M. A.; MOHAN, S. Synthesis of chalcones with anticancer activities. **Molecules** 25:17(6):6179-6195, 2002.
- TAYLOR, W.R.; STARK, G.R. Regulation of the G2/M transition by p53. **Oncogene** 20(15):1803-1815, 2001.
- THORBERRY, N. A.; LAZEBNIK, Y. Caspases: Enemies within. **Science** 281:1312-1316, 1998.
- TJALMA, W.; DE CUYPER, E.; WEYLER, J.; VAN MARCK, E.; DE POOTER, C.; ALBERTYN, G.; VAN DAM, P. Expression of bcl-2 in invasive and in situ carcinoma of the uterine cervix. **American Journal of Obstetrics & Gynecology** 178(1):113-117, 1998.
- TONINI, G.P.; LONGO, L.; COCO, S.; PERRI, P. Familial neuroblastoma: a complex heritable disease. **Cancer Letters** 197:41-45, 2003.
- TOZER, G.M.; KANTHOU, C.; BAGULEY, B.C. Disrupting tumour blood vessels. **Nature Reviews – Cancer** 5:423-435, 2005.
- TRUMP B.F.; BEREZESKY I.K.; CHANG S.H.; PHELPS P.C.: The pathways of cell death: oncosis, apoptosis, and necrosis. **Toxicologic Pathology** 25(1):82-8. 1997.
- UCHIYAMA Y. Apoptosis: The history and trends of its studies. **Archives of Histology and Cytology** 58(2):127-37. 1995.
- VENEGAS, L. F. P. Exposição ocupacional a drogas antineoplásicas: condutas para uma manipulação segura. **Revista da AMRIGS** 39(4):269-276, 1995.

- VIALLARD, J.F.; LACOMBE, F.; PALLEGRIN, J.L.; REIFFERS, J. Molecular mechanisms controlling the cell cycle: fundamental aspects and implication for oncology. **Cancer Radiothérapie** 5(2):109-29. 2001.
- VOGEL, A. I. **Vogel's Textbook of Practical Organic Chemistry**, 5 ed. New York: John Wiley & Sons, 1989. p.1017.
- WELLS, N.J.; WATANABE, N.; TOKUSUMI, T.; JIANG, W.; VERDECIA, M.A.; HUNTER, T. The C-terminal domain of the Cdc2 inhibitory kinase Myt1 interacts with Cdc2 complexes and is required for inhibition of G2/M progression. **Journal of Cell Science** 112:3361-3371, 1999.
- YADAV, V. R.; PRASAD, S.; SUNG, B.; AGGARWAL, B. B.: The Role of Chalcones in Suppression of NF- κ B-Mediated Inflammation and Cancer. **International Immunopharmacology** 11(3): 295–309. 2011.
- YANAGIDA, K.; MASAGO, K.; NAKANISHI, H.; KIHARA, Y.; HAMANO, F.; TAJIMA, Y.; TAGUCHI, R.; SHIMIZU, T.; ISHII, S. Identification and characterization of a novel lysophosphatidic acid receptor, p2y5/LPA6. **The Journal of Biological Chemistry** 284(26):17731-17741, 2009.
- YASUHARA, S.; ZHU, Y.; MATSUI, T.; TIPIRNENI, N.; YASUHARA, Y.; KANEKI, M.; ROSENZWEIG, A.; MARTYN, J. A.. Comparison of comet assay, electron microscopy, and flow cytometry for detection of apoptosis. **Journal of Histochemistry & Cytochemistry** 51:873-885, 2003.
- ZHANG, E-H.; WANG, R-F.; GUO, S-Z.; LIU, B.: An Update on Antitumor Activity of Naturally Occurring Chalcones. **Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine**. Article ID 815621, 2013.
- ZHANG, J.; FU X-L.; YANG, N.; WANG, Q-A.: Synthesis and Cytotoxicity of Chalcones and 5-Deoxyflavonoids. **The ScientificWorld Journal, Article ID 649485**, 2013.
- ZHANG, J.; YU, D.; LIU, D.; LIU, Z. Extraction and composition of three naturally occurring anticancer alkaloids in *Camptotheca acuminata* seed and leaf extracts. **Phytomedicine** 14:50-56, 2007.

- ZHANG, L.; SHI, J.; FENG, J.; KLOCKER, H.; LEE, C.; ZHANG, J. Type IV collagenase (matrix metalloproteinase-2 and -9) in prostate cancer. **Prostate cancer and prostatic diseases** 7:327–332, 2004.
- ZHAO, R.Y.; ELDER, R.T. Viral infections and cell cycle G2/M regulation. **Cell Research** 15(3):143-149, 2005.
- ZHAO, X.; CHAO, Y.L.; WAN, Q.B.; CHEN, X.M.; SU, P.; SUN, J.; TANG, Y. Flavokawain B induces apoptosis of human oral adenoid cystic cancer ACC-2 cells via up-regulation of Bim and down-regulation of Bcl-2 expression. **Canadian Journal of Physiology and Pharmacology** 89(12):875-883, 2011.
- ZI, X.; SIMONEAU, A.R. Flavokawain A, a novel chalcone from kava extract, induces apoptosis in bladder cancer cells by involvement of Bax protein-dependent and mitochondria-dependent apoptotic pathway and suppresses tumor growth in mice. **Cancer Research** 65(8):3479-3486, 2005.
- ZIMMERMANN, K.C.; BONZON, C.; GREEN, D.R. The machinery of programmed cell death. **Pharmacology & Therapeutics** 92:57–70, 2001.
- ZUANAZZI, J. A.; TREMEA, V.; LIMBERGER, R.P.; SOBRAL, M.; HENRIQUES A.T. Alkaloids of *Erythroxylum* (Erythroxylaceae) species from Southern Brazil. **Biochemical Systematics and Ecology** 29(8):819-825, 2001.