

Universidade de Ribeirão Preto - UNAERP

Pós-graduação em Biotecnologia Aplicada à Saúde

**Análise molecular do efeito do inibidor transcricional da
topoisomerase 2A trans-Chalcona na linhagem de
osteossarcoma humano U2OS**

Gabriel da Silva

Ribeirão Preto

2017

Universidade de Ribeirão Preto - UNAERP

Biotecnologia Aplicado à Saúde

**Análise molecular do efeito do inibidor transcricional da topoisomerase
2A trans-Chalcona na linhagem de osteossarcoma humano U2OS**

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

Orientador: Prof. Dr. Mozart Marins

Ribeirão Preto

2017

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

- Universidade de Ribeirão Preto -

Silva, Gabriel da, 1989-

S586a Análise molecular do efeito do inibidor transcricional da
topoisomerase 2A trans-Chalcona na linhagem de osteossarcoma
humano U2OS / Gabriel da Silva. - - Ribeirão Preto, 2017.
55 f.: il. color.

Orientador: Prof. Dr. Mozart de Azevedo Marins

Tese (doutorado) - Universidade de Ribeirão Preto, UNAERP,
Biotecnologia aplicada à saúde. Ribeirão Preto, 2017.

1. Osteossarcoma. 2. Trans-Chalcona. 3. Apoptose. I. Título.

CDD 660

GABRIEL DA SILVA

**ANÁLISE MOLECULAR DO EFEITO DO INIBIDOR TRANSCRICIONAL DA
TOPOISOMERASE 2A TRANS-CHALCONA NA LINHAGEM DE
OSTEOSSARCOMA HUMANO U2OS**

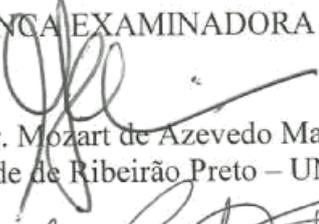
Tese de Doutorado apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia da Universidade de Ribeirão Preto, para obtenção do título de Doutor em Biotecnologia.

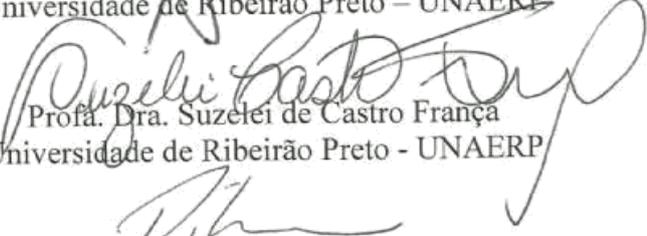
Área de Concentração: Biotecnologia Aplicada à Saúde

Data da defesa: 11 de agosto de 2017

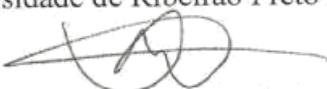
Resultado: Aprovado

BANCA EXAMINADORA


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


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


Prof. Dra. Rita de Cássia Viu Carrara
Universidade de Ribeirão Preto - UNAERP


Prof. Dra. Larissa Moreira Spínola C. Raucci
Universidade de Ribeirão Preto - UNAERP


Prof. Dra. Ana Lúcia Fachin Saltoratto
Universidade de Ribeirão Preto - UNAERP

RIBEIRÃO PRETO
2017

Dedico

A minha família pelo apoio em
todos os momentos.

AGRADECIMENTOS

- ∞ A minha família pelo amor, carinho e suporte em todos os momentos, e pelo apoio para a realização deste trabalho, meu muito obrigado.
- ∞ A meu orientador prof. Dr. Mozart de Azevedo Marins, por sua atenção, dedicação e orientação durante todo este trabalho, meu muito obrigado.
- ∞ A minha co-orientadora profa. Dra. Ana Lúcia Fachin Saltoratto, pelos ensinamentos e suporte, meu muito obrigado.
- ∞ Ao Dr. Seung Joon Baek por me aceitar em seu laboratório na Universidade do Tennessee, pela disponibilidade de sempre ajudar e contribuição para a realização da maioria dos experimentos presentes neste trabalho, meu muito obrigado.
- ∞ Aos amigos, Mariana Heizen, Bruna Aline, Vitor Caressato, Thaís Mesquita, Tayná Minervina, Igor Sawasaki, Yasmin Crivelenti, Tatiana Cruz, Gabriela Segura e Monise Fazolin, obrigado pelos bons momentos vividos no laboratório, apesar das cantorias da senhorita Mariana.
- ∞ Aos amigos, muito especiais, Tatiana Takahasi Komoto, Tamires Bitencourt, Felipe Teixeira Lima e Viviane Seba, obrigado pelo convívio, amizade, paciência, e pelos ótimos momentos e ensinamentos compartilhados. Levarei vocês sempre comigo.
- ∞ A Unaerp e aos demais colegas e professores da Unidade de Biotecnologia, em especial profa. Dra. Suzelei de Castro França
- ∞ A CAPES pelo suporte financeiro.

“Se não sabes, aprende; se já sabes, ensina”

“Não há lugar para a sabedoria onde não há paciência”

RESUMO

O osteossarcoma é o câncer ósseo mais comum e afeta principalmente crianças e adolescentes. Embora o surgimento das terapias multidrogas tenha melhorado o tratamento, aproximadamente 30% dos pacientes com osteossarcoma desenvolvem metástase. As chalconas, metabólitos da classe dos flavonoides, têm demonstrado diversas propriedades antitumorais. Em trabalho anterior foi identificado que a *trans*-Chalcona inibe a expressão gênica da enzima topoisomerase 2A, que tem sua expressão regulada pelos fatores de transcrição p53 e Sp1, ambos alvos de drogas anticarcinogênicas. Deste modo, o objetivo do trabalho foi verificar se os efeitos da *trans*-Chalcona, em células de osteossarcoma humano U2OS, estavam relacionados com a regulação dos fatores de transcrição p53 e Sp1, que são responsáveis por controlarem a transcrição de diversos genes envolvidos em processos celulares como: arrasto do ciclo celular, reparo do DNA e indução de apoptose. Após tratamento com *trans*-Chalcona, a viabilidade celular foi avaliada pelo ensaio de MTT e a apoptose através de citometria de fluxo, coloração com DAPI e detecção da atividade de caspases. A expressão de Sp1 e p53 foi mensurada por Western Blot. A regulação transcricional e pós-traducional foram avaliadas por RT-PCR, ensaio da luciferase e experimentos com inibidores de proteossoma. O efeito da *trans*-Chalcona sobre o transcriptoma da linhagem U2OS foi avaliado por RNA-Seq. Identificou-se que o crescimento celular foi inibido pela *trans*-Chalcona de forma dose e tempo dependente, com significativa inibição a 10 μ M após 48 horas de tratamento. A *trans*-Chalcona também induziu apoptose de forma dose dependente, aumentando o número de células apoptóticas em 1,9 e 3,6 vezes nas concentrações de 10 μ M e 50 μ M, respectivamente. Análises de Western Blot e RT-PCR indicaram que a *trans*-Chalcona reduziu Sp1 em nível transcricional e pós-traducional e aumentou a expressão de p53 em nível pós-traducional. Esses resultados foram confirmados pelo ensaio da luciferase de promotores Sp1, Top2A e MDM2, e por ensaio de degradação proteossomal. A análise de RNA-seq demonstrou que a *trans*-Chalcona modulou diversas vias importantes no desenvolvimento do câncer, tais como: as vias de apoptose, sinalização da p53 e WNT/catenina. Além disso, observou-se que a estabilização da proteína p53 e indução de apoptose promovida pela *trans*-Chalcona é

mediada parcialmente pela indução da proteína Hsp40. Assim, identificou-se que a *trans*-Chalcona inibe o crescimento celular e induz apoptose em células de osteossarcoma humano. Estes efeitos, pelo menos em parte, estão relacionados com a supressão da proteína oncogênica Sp1, indução do supressor de tumor p53 e regulação transcricional de diversos genes alvos de Sp1/p53.

Palavras Chaves: p53, Sp1, osteossarcoma, *trans*-Chalcona, apoptose

ABSTRACT

Osteosarcoma is the most common bone cancer and mainly affects children and adolescents. Although the emergence of multidrug therapies has improved treatment, approximately 30% of patients with osteosarcoma develop metastasis. Chalcones, metabolites of the flavonoid class, have demonstrated several antitumor properties. In previous work it was identified that *trans*-Chalcone inhibits topoisomerase 2A gene expression, which has its expression regulated by the transcription factors p53 and Sp1, both targets of anticarcinogenic drugs. Based on this, the aim of the work was to verify in human U2OS osteosarcoma cells if the *trans*-Chalcone's effects were related to the regulation of transcription factors p53 and Sp1, which are responsible for controlling the transcription of several genes involved in cellular processes, such as cell cycle arrest, DNA repair and apoptosis induction. After treatment with *trans*-Chalcone, cell viability was assessed by MTT assay and apoptosis by flow cytometry, DAPI staining and detection of caspase activity. Expression of Sp1 and p53 was measured by Western Blot. Transcriptional and post-translational regulation were evaluated by RT-PCR, luciferase assay and experiments with proteasome inhibitors. The effect of *trans*-Chalcone on U2OS transcriptome was evaluated by RNA-Seq. Cell growth was inhibited by *trans*-Chalcone in a dose-dependent manner, with significant inhibition at 10 μ M after 48 hours of treatment. *Trans*-Chalcone also induced apoptosis in a dose-dependent manner, increasing the number of apoptotic cells by 1.9 and 3.6 fold at concentrations of 10 μ M and 50 μ M, respectively. Western Blot and RT-PCR analysis indicated that *trans*-Chalcone reduced Sp1 at the transcriptional and post-translational levels, and increased p53 expression at post-translational level. These results were confirmed by the luciferase assay of Sp1, Top2A and MDM2 promoters, and by proteasome degradation assay. RNA-Seq analysis demonstrated that *trans*-Chalcone modulated several important pathways in the cancer development, such as apoptosis and p53 and WNT/catenin signaling pathways. Furthermore, it has been observed that the stabilization of p53 protein and induction of apoptosis promoted by *trans*-Chalcone is partially mediated by the induction of the Hsp40 protein. Thus, in this work, was found that *trans*-Chalcone inhibits cell growth and induces apoptosis in human osteosarcoma cells. These effects, at least in part, are related

to suppression of the Sp1 oncogenic protein, induction of the p53 tumor suppressor, and transcriptional regulation of Sp1/p53 target genes.

Key Words: p53, Sp1, osteosarcoma, trans-chalcone, apoptosis

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

- Figura 1. Célula de origem do osteossarcoma. Os subtipos de osteossarcoma se originam de células da via de diferenciação de células tronco mesenquimais para osteoblasto. Adaptado: (Mutsaers e Walkley, 2014)..... 3
- Figura 2. Modelo de estabilização da proteína p53. Sinais de estresse celular levam a ativação de genes que provocam modificações pós-traducionais na proteína p53, tais como: metilação, acetilação e principalmente fosforilação. Estas modificações impedem que a proteína MDM2 provoque a ubiquitinação da p53 e, conseqüentemente, a sua degradação pelo proteossoma. A proteína p53 estabilizada pode ligar-se na região promotora dos seus genes alvos e regular a transcrição dos mesmos e, assim, desencadear os processos de arraste do ciclo celular, apoptose, entre outros..... 8
- Figura 3. Domínios da proteína Sp1. (DAT) domínio de transativação. O domínio carregado auxilia a ligação dos motivos “zinc fingers” no DNA. O domínio de multimerização (Multi) facilita a interação entre diversas moléculas de Sp1, permitindo a superativação de genes que contém vários sítios para a ligação de Sp1. 9
- Figura 4. Inibição do crescimento das células U2OS tratadas com trans-Chalcona e merbarone. A. Estrutura química dos compostos trans-Chalcona e merbarone. B. Células U2OS foram tratadas com DMSO (0,01%) ou 1, 10, e 100 μ M de trans-Chalcona e merbarone por 0, 1, 2 e 4 dias, então o crescimento celular foi avaliado pelo ensaio de MTT. * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$ e *** $p < 0.001$ (DMSO vs tratamento). 25
- Figura 5. Indução de apoptose em células U2OS tratadas com trans-Chalcona e merbarone. A. Células foram tratadas com DMSO (0,01%) ou 10 e 50 μ M de trans-Chalcona e merbarone por 24 horas, em seguida, a apoptose foi avaliada com dupla marcação (Anexina/PI) através de citometria de fluxo. B. Condensação da cromatina foi visualizada por coloração com DAPI após tratamento das células com trans-Chalcona e merbarone por 24 e 48 horas. C. Células U2OS foram tratadas com 50 μ M de trans-Chalcona por 24 horas e a atividade das caspases3/7 no lisado celular (50 μ g de proteínas) foi mensurada através da detecção de luminescência. * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$ e *** $p < 0.001$ 26
- Figura 6. Efeito da trans-Chalcona e merbarone sobre os níveis de proteínas Sp1 e p53 em células tumorais humanas. A e B. Análises de Western Blot do efeito dose e tempo

dependente da trans-Chalcona e merbarone sobre a expressão das proteínas Sp1, Sp3 e p53 em células U2OS. C. Os níveis de proteínas Sp1 e p53 em diferentes células tumorais foram analisados após o tratamento com 50 μ M de trans-Chalcona por 24 horas. D. As células U2OS foram tratadas durante 24 horas com trans-Chalcona e 4-Hidroxicalcona e, então, o efeito sobre a expressão de Sp1 e p53 foi comparado..... 29

Figura 7. Trans-Chalcona e merbarone alteram a atividade de promotores regulados por Sp1 e p53. A. O repórter Sp1-Luciferase foi transfectado nas células U2OS após o tratamento com 50 μ M de trans-Chalcona por 24 horas, a atividade da luciferase foi detectada em luminômetro. B. Células U2OS foram transfectadas com vetor contendo o promotor natural Top2A (repórter Top2A-Luciferase) e tratadas durante 24 horas com 50 μ M de trans-Chalcona e, então, a atividade da luciferase foi analisada. C. Após transfecção com repórter MDM2-Luciferase e tratamento durante 24 horas com 50 μ M de trans-Chalcona e merbarone, a atividade da luciferase foi avaliada. * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$ e *** $p < 0.001$. (DMSO vs tratamento). 30

Figura 8. Efeito da trans-Chalcona e merbarone sobre os níveis de RNAm Sp1 e p53 e de genes regulados por Sp1/p53. Células U2OS foram tratadas com DMSO ou trans-Chalcona nas concentrações indicadas por 24 horas, depois o RT-PCR foi realizado usando primers para Sp1, p53 e seus genes alvos, e para o gene constitutivo GADPH. Foto representativa de um gel (à esquerda) e análise de densitometria de pelos menos 3 experimentos (à direita). * $p < 0.05$ e ** $p < 0.01$. (DMSO vs tratamento). 31

Figura 9. Efeito da trans-Chalcona sobre a regulação transcricional de Sp1. A. Células U2OS foram pré-tratadas com actinomicina D, depois co-tratadas com trans-Chalcona. O RNA foi isolado em diferentes tempos e RT-PCR foi realizado para mensurar o efeito sobre a estabilidade do RNAm. B. O DNA extraído de células tratadas com 50 μ M de trans-Chalcona por 24 horas foi convertido com bissulfito, amplificado com primers específicos para o promotor Sp1 e, por fim, sequenciado. C. Células U2OS foram transfectadas com promotores Sp1-Luciferase e tratadas durante 24 horas com 50 μ M de trans-Chalcona e, então, a atividade da luciferase foi analisada. * $p < 0.05$ e $p < 0.001$. (DMSO vs tratamento) 33

Figura 10. Efeito da trans-Chalcona sobre a regulação pós-traducional de Sp1 e p53. A. Células U2OS foram pré-tratadas com trans-Chalcona (50 μ M) por 12 horas, seguido do co-tratamento com cicloheximida. Os lisados de células foram obtidos em diferentes

tempos e WB foi realizado para mensurar a degradação de Sp1 e p53. B. Células U2OS foram pré-tratadas com inibidores do proteossoma: MG132 (10 μ M), epoxomicina (1 μ M) e lactacistina (5 μ M) por 1 hora e co-tratadas com trans-Chalcona por 24 horas. C. Os lisados de células U2OS tratadas com trans-Chalcona e merbarone foram submetidos à WB com anticorpos fosfo-p53. D. 50 μ g do lisado de células tiveram as 3 atividades do proteossoma 20S mensuradas por detecção de luminescência. * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$ e *** $p < 0.001$. (DMSO vs tratamento)..... 35

Figura 11. Superexpressão da Sp1 e silenciamento da p53 afetam a ação da trans-Chalcona. A. Células U2OS foram transfectadas com vetores expressando Sp1 ou LacZ, seguido do tratamento com 50 μ M de trans-Chalcona por 24 horas. Em seguida, o RNA foi isolado e análises de RT-PCR realizadas. B. Vetores expressando shRNA controle ou shRNA p53 foram co-transfectados com o vetor expressando MDM2-luciferase nas células U2OS, e a atividade da luciferase foi mensurada após o tratamento com trans-Chalcona (50 μ M) por 24 horas. C. Vetores expressando Sp1 ou shRNA p53 foram co-transfectados com o vetor expressando promotor Top2A-luciferase nas células U2OS, e a atividade da luciferase foi mensurada após o tratamento com trans-Chalcona (50 μ M) por 24 horas. D. Após a superexpressão da Sp1 e silenciamento da p53, as células U2OS foram tratadas com 10 μ M de trans-Chalcona por 24 horas e, então, a viabilidade celular foi avaliada pelo ensaio de MTT. * $p < 0.05$ e *** $p < 0.001$ 37

Figura 12. Validação por RT-PCR de genes modulados pela trans-Chalcona indentificados no experimento de RNA-Seq. Células U2OS foram tratadas com 0,01 % de DMSO ou 50 μ M de trans-Chalcona por 24 horas, depois o RT-PCR foi realizado usando primers para cada gene e para o gene constitutivo GADPH..... 38

Figura 13. Efeito da trans-Chalcona sobre a expressão de Hsp40 e ATF3 em células tumorais humanas. A. Células U2OS foram tratadas com trans-Chalcona na concentração indicada por 24 horas, depois o RT-PCR foi realizado usando primers para Hsp40, ATF3 e para o gene constitutivo GADPH. B. Células U2OS foram tratadas com trans-Chalcona por 24 horas e, então, a expressão das proteínas Hsp40 e ATF3 foi avaliada por Western Blot. C. Os níveis de proteínas Hsp40 e ATF3 em diferentes células tumorais foram analisados após o tratamento com 50 μ M de trans-Chalcona por 24 horas 44

Figura 14. A indução de Hsp40 pela trans-Chalcona contribui para a estabilização e atividade da p53. A. A expressão de p53 e Hsp40 foi detectada por Western Blot. B. As

células U2OS foram tratadas com 50 μ M de trans-Chalcona durante 24 horas e os lisados celulares foram isolados com tampão RIPA modificado. Os lisados celulares foram imunoprecipitados com 2 μ g de anticorpo para p53 ou IgG usando A/G PLUS-agarose e depois submetidos a Western Blot utilizando o anticorpo Hsp40. C. As células U2OS foram transfectadas com 30 nM de siHsp40 ou siRNA controle por 24 horas, seguido pelo tratamento com 50 μ M de trans-Chalcona durante 24 h. Em seguida, os lisados das células foram sujeitos a análise de Western Blot. D. O vector contendo o promotor MDM2-Luc foi co-transfectado com siHsp40 ou siRNA controle em células U2OS e as células foram tratadas com 50 μ M de trans-Chalcona durante 24 h. A atividade da luciferase foi medida. E. As células U2OS foram transfectadas com siHsp40 ou siRNA controle, seguido por tratamento com 50 μ M de trans-Chalcona durante 24 h. O RNA foi isolado e submetido a análise de RT-PCR. 47

Figura 15. Uma proposta de modelo para a ação do trans-Chalcona em osteossarcoma. 48

LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Os cinco principais termos da análise de OG para os genes induzidos pela <i>trans</i> -Chalcona em linhagem U2OS (PB – processo biológico, FM – função molecular e CC – componente celular).....	36
Tabela 2. As cinco principais vias obtidas pela análise de enriquecimento para os genes induzidos pela <i>trans</i> -Chalcona em linhagem U2OS.....	36
Tabela 3. Os cinco principais termos da análise de OG para os genes reprimidos pela <i>trans</i> -Chalcona em linhagem U2OS (PB – processo biológico, FM – função molecular e CC – componente celular).....	38
Tabela 4. As cinco principais vias obtidas pela análise de enriquecimento para os genes reprimidos pela <i>trans</i> -Chalcona em linhagem U2OS.....	38
Tabela 5. Nível de modulação (fold) induzido pela <i>trans</i> -Chalcona de genes regulados por p53/Sp1 que possuem envolvimento no surgimento, sobrevivência e proliferação de células tumorais.....	39

LISTA DE ABREVIACOES

- APAF1** - *apoptotic peptidase activating factor 1*
- ATP** - Adenosina Trifosfato
- BAG3** - BCL2 associated athanogene 3
- CXCL14** - *C-X-C motif chemokine ligand 14*
- DAPI** - *4',6-diamidino-2-phenylindole*
- DAPK1** - *death associated protein kinase 1*
- DMSO** - *Dimethyl sulfoxide*
- DNA** - *deoxyribonucleic acid*
- FAS** - *Fas cell surface death receptor*
- FZD1** - *frizzled class receptor 1*
- Gadd45a** - *growth arrest and DNA damage inducible alpha*
- GAPDH** - *glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase*
- GAS6** - *growth arrest specific 6*
- IGFBP5** - *insulin like growth factor binding protein 5*
- ITGAV** - *integrin subunit alpha V*
- ITGA11** - *integrin subunit alpha 11*
- LAMA4** - *laminin subunit alpha 4*
- L1CAM** - *L1 cell adhesion molecule*
- MEIS1** - *Meis homeobox 1*
- ml** - mililitro
- mm** - milmetro
- mRNA** - *Messenger RNA*
- nm** - nanmetro
- nM** - nanomolar
- NOXA** - *PMAIP1 (Phorbol-12-myristate-13-acetate-induced protein)*
- PAQR3** - *progesterin and adipoQ receptor family member 3*
- PARP** - *poly(ADP-ribose) polymerase 1*
- PBS** - *Phosphate-buffered saline*
- PERP** - *PERP, TP53 apoptosis effector*
- PHLDA1** - *pleckstrin homology like domain family A member 1*

PUMA - *p53 upregulated modulator of apoptosis*
P21- *CDKN1A (cyclin dependent kinase inhibitor 1A)*
RASGRP3 - *RAS, guanyl releasing protein 3*
RIPA - *Radioimmunoprecipitation assay buffer*
RNA - *ribonucleic acid*
SDS - *Sodium dodecyl sulfate*
siRNA - *small interfering RNA*
SERPINE2 - *serpin family E member 2*
SLC14A1 - *solute carrier family 14 member 1 (Kidd blood group)*
SMOC1 - *SPARC related modular calcium binding 1*
SOX6 - *SRY-box 6*
Sp1 - *Specificity protein 1*
Sp3 - *Specificity protein 3*
Sp4 - *Specificity protein 4*
μM - micromolar
μg - micrograma
TP53 - *tumor protein 53*
TOP2A - *topoisomerase (DNA) II alpha*
WNT - *wingless-type MMTV integration site family*
WNT5A - *Wnt family member 5A*
14-3-3 - *(tyrosine 3-monooxygenase/tryptophan 5-monooxygenase activation protein theta)*

SUMÁRIO

LISTA DE ILUSTRAÇÕES	i
LISTA DE TABELAS	v
LISTA DE ABREVIACÕES	vi
1. INTRODUÇÃO	1
1.1. Câncer	1
1.2. Osteossarcoma	2
1.3. Osteossarcoma: bases moleculares	3
1.4. Osteossarcoma: quimioterapia	4
1.5. Alvos da terapia anticâncer: p53 e Sp1	5
1.6. Sp1, p53 e topoisomerases	10
1.7. Chalconas: a ação sobre p53, Sp1 e topoisomerase	11
2. HIPÓTESE	13
3. OBJETIVOS	14
3.1. Objetivo Geral	14
4. MATERIAIS E MÉTODOS	15
4.1. Compostos	15
4.2. Promotores e vetores de expressão	15
4.3. Linhagens celulares	15
4.4. Ensaio de citotoxicidade	15
4.5. Análise de apoptose por citometria de fluxo	16
4.6. Análise de apoptose por coloração com DAPI	16
4.7. Análise da atividade das caspases 3/7	17
4.8. Western Blot	17
4.8.1. Western Blot: análise da estabilidade das proteínas Sp1 e p53	18

4.9. Ensaio do Proteossoma 20S.....	18
4.10. Reação em cadeia da polimerase com transcrição reversa (RT-PCR).....	19
4.10.1. RT-PCR: Análise da estabilidade do RNA mensageiro	21
4.11. Análise da metilação em região promotora do gene Sp1	21
4.12. Transfecção das Células.....	22
4.13. Sequenciamento de RNA (RNA-seq).....	23
4.13.1. Preparação da biblioteca e sequenciamento de nova geração (NGS).....	23
4.13.2. Análise dos dados de NGS.....	23
4.13.3. Análise de enriquecimento funcional	24
4.15. Análise Estatística.....	24
5. RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	25
5.1. Trans-Chalcona e merbarone inibem o crescimento e induzem apoptose na linhagem de osteossarcoma U2OS	25
5.2. Efeito da trans-Chalcona e merbarone sobre a expressão de proteínas relacionadas à oncogênese.....	27
5.3. Efeito da trans-Chalcona e merbarone sobre atividade de promotores regulados por Sp1 e p53	29
5.4. Efeito da trans-Chalcona e merbarone sobre a transcrição de Sp1 e p53 e seus genes alvos.....	30
5.5. Efeito da trans-Chalcona sobre a regulação transcricional de Sp1	32
5.6. Efeito pós-traducional da trans-Chalcona sobre as proteínas Sp1 e p53..	34
5.7. Efeito da superexpressão da Sp1 e silenciamento da p53 na ação da trans-Chalcona.....	36
5.8. RNA-seq: efeito da trans-Chalcona sobre o transcriptoma da linhagem U2OS.....	37

5.9. RNA-seq: Análise funcional e de enriquecimento de vias	39
5.10. RNA-seq: genes controlados por p53/Sp1 modulados pela trans-Chalcona.....	43
6. CONCLUSÃO.....	48
7. REFERÊNCIAS	49

1. INTRODUÇÃO

1.1. Câncer

O câncer é um conjunto de mais de 100 doenças caracterizadas pela presença de células com taxas de crescimento e proliferação anormais, capazes de invadirem e danificarem tecidos saudáveis. O surgimento destas células ocorre como consequência de alterações genéticas (mutações no DNA) e/ou epigenéticas (modificações químicas no DNA), que podem provocar uma desregulação na função ou na expressão dos chamados “genes do câncer” (Bertram, 2000; Choi e Lee, 2013).

Os “genes do câncer” são divididos basicamente em oncogenes, supressores de tumor e genes de integridade do genoma. Modificações nestes genes permitem que células tumorais adquiram as características necessárias para sustentarem seu desenvolvimento. Estas características compõem os “marcadores do câncer” (Hanahan e Weinberg, 2000; 2011; Giancotti, 2014), que são:

1. Autossuficiência em sinais de crescimento (estimulação autócrina, hipersensibilidade a fatores de crescimento);
2. Insensibilidade a sinais de anticrescimento (inibição da proteína supressora de tumor retinoblastoma);
3. Imortalidade replicativa (superexpressão da telomerase);
4. Resistência à apoptose (indução e repressão de genes pró e antiapoptóticos, respectivamente);
5. Indução de angiogênese (superexpressão de fatores que estimulam a formação de novos vasos sanguíneos);
6. Invasão tecidual e metástase (indução de enzimas que degradam a matriz extracelular);
7. Instabilidade genômica (deficiência nos mecanismos de reparo de DNA);
8. Reprogramação metabólica (aumento da glicólise);
9. Evasão do sistema imune.

O câncer é a segunda causa de morte no mundo, responsável por 8,8 milhões de mortes em 2015. De acordo com estimativa da Organização Mundial de Saúde (OMS), em 2025 serão 19,3 milhões de novos casos de câncer e aproximadamente 11,4 milhões de mortes ao redor do mundo. Ainda segundo a OMS, os custos com o câncer no ano de 2010 chegaram a aproximadamente 1,16 trilhões de dólares. No Brasil, dados do Instituto

Nacional do Câncer (INCA), apontam 600 mil novos casos entre 2016 e 2017 (INCA, 2015).

1.2. Osteossarcoma

Dentre os diversos tipos de cânceres, o câncer ósseo destaca-se por ocorrer predominantemente em crianças acima de 5 anos, adolescentes e adultos jovens. O osteossarcoma é o câncer ósseo mais comum, representando aproximadamente 60% dos casos, em seguida, aparecem o sarcoma de Ewin e o condrosarcoma (Bishop *et al.*, 2016).

O osteossarcoma apresenta baixa incidência, cerca de 5-10 casos por milhão de habitante a cada ano, entretanto, é extremamente agressivo e metastático, e apresenta elevada capacidade de invadir e destruir tecidos moles (Bishop *et al.*, 2016). O osteossarcoma é responsável por aproximadamente 9% das mortes relacionadas ao câncer em adolescentes e adultos jovens (Ottaviani e Jaffe, 2009).

O osteossarcoma é caracterizado pela presença de células malignas de origem mesenquimal-osteogênica (Figura 1), que promovem a produção e o depósito anormal da matriz osteóide (Dai *et al.*, 2011). Esse tipo de sarcoma desenvolve-se preferencialmente em tecidos ósseos em fase de rápido crescimento. Por isso, seu pico de incidência é dos 10-14 anos de idade durante o surto de crescimento puberal (Mirabello *et al.*, 2009), sendo que, aproximadamente 42% dos casos de osteossarcoma ocorrem nas regiões do fêmur próximas ao joelho, enquanto que 19% e 10% dos casos ocorrem nas regiões da tíbia e do úmero, respectivamente (Ottaviani e Jaffe, 2010).

O osteossarcoma é dividido em diferentes subtipos de sarcomas de baixo, intermediário e alto grau de crescimento. O osteossarcoma de alto grau é o mais prevalente, ele apresenta elevada taxa de crescimento e desdiferenciação. Seus subtipos mais comuns são o osteoblástico, condroblástico e fibroblástico, refletindo o tipo de matriz predominante (osteóide, condroide e fibrosa, respectivamente). O osteossarcoma de alto grau espalha-se pelo organismo, predominantemente por meio da via hematogênica, atingindo preferencialmente os pulmões, que é o sítio mais comum para metástase (85-90% dos casos) derivada desse sarcoma (Kuijjer *et al.*, 2013).

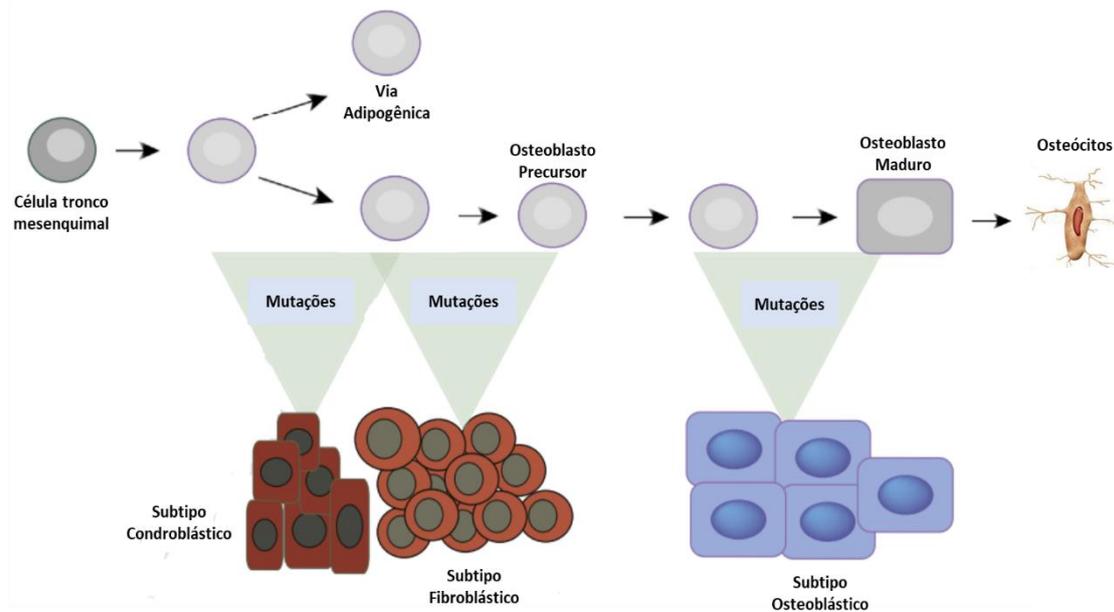


Figura 1. Célula de origem do osteossarcoma. Os subtipos de osteossarcoma se originam de células da via de diferenciação de células tronco mesenquimais para osteoblasto. Adaptado: (Mutsaers e Walkley, 2014)

1.3. Osteossarcoma: bases moleculares

As causas genéticas do osteossarcoma, melhor estabelecidas, são mutações nos genes supressores de tumor retinoblastoma (Rb) e TP53. A incidência do osteossarcoma é até 500 vezes maior em pessoas portadoras de mutações no gene Rb do que em não-portadoras (Geller e Gorlick, 2010). A inativação da proteína RB está presente em até 60% dos casos de osteossarcoma e é considerada um fator preditivo de resposta ineficiente dos pacientes aos tratamentos (Feugeas *et al.*, 1996).

A frequência de mutações no gene TP53 é de 40-60% nos osteossarcomas de alto grau e 1% nos de baixo grau. Além das mutações, a proteína p53 também é inativada em osteossarcomas através da superexpressão da proteína MDM2 (“mouse double murine 2”) que, por meio da ubiquitinação, marca a p53 para a degradação proteossomal. Em osteossarcomas o gene MDM2 é amplificado em 17% dos casos e sua superexpressão está ligada aos casos de metástases (Kansara e Thomas, 2007).

Alguns oncogenes como o MYC (“V-Myc Myelocytomatosis Viral Oncogene Homolog”) e c-Fos (“FBJ murine osteosarcoma viral oncogene homolog”) são superexpressos em osteossarcomas e estão associados com a proliferação, diferenciação e transformação. Fatores e receptores de crescimento, tais como: IGF1 e IGF2 (“insulin-like growth factor”) e IGF1R (“insulin-like growth factor 1 receptor”), também são

superexpressos em osteossarcoma e podem induzir a proliferação e resistência à apoptose através da constante ativação das vias de sinalização PI3K (“phosphoinositide-3-Kinase”) e MAPK (“Mitogen-Activated Protein Kinase”). A alta expressão de MMPs (“matrix metalloproteinases”), enzimas capazes de degradar a matriz extracelular, está relacionada com o potencial metastático do osteossarcoma. A superexpressão da MMP-2 e MMP-9 já foi identificada em linhagens celulares de osteossarcoma (Broadhead *et al.*, 2011).

1.4. Osteossarcoma: quimioterapia

O advento das terapias multidrogas no final dos anos 70 propiciou uma melhora significativa no tratamento do osteossarcoma, reduziu em mais de 80% a necessidade de amputações e aumentou a sobrevivência em mais de 70%. Atualmente, a terapia antiosteossarcoma emprega diversas drogas, como a doxorrubicina, cisplatina, metotrexato, epirubicina, ifosfamida, ciclofosfamida, etoposídeo, gemcitabina e topotecano, tanto antes quanto após a remoção cirúrgica do tumor (Jaffe, 2014).

O tratamento neoadjuvante (pré-operatório) é importante para reduzir o tamanho do tumor e assim facilitar a remoção cirúrgica do mesmo (Mucke *et al.*, 2014; Xu *et al.*, 2014). Além disso, a resposta do paciente ao tratamento neoadjuvante tem valor prognóstico, pacientes com mais de 90% de necrose tumoral são considerados mais susceptíveis ao tratamento e tem melhor prognóstico do que aqueles que apresentam <90% de necrose tumoral (Bielack *et al.*, 2002). Esta informação é importante para decidir qual o regime quimioterápico que deverá ser utilizado na fase pós-operatória.

No momento, o regime de tratamento mais utilizado é a associação de doxorrubicina, cisplatina e metotrexato. A doxorrubicina atua principalmente através da intercalação ao DNA, que resulta em quebras no DNA mediadas pela ação da topoisomerase II (Lyu *et al.*, 2007). A cisplatina também se intercala ao DNA, ela interfere na replicação e transcrição, e pode provocar apoptose através da indução de quebras irreparáveis no DNA (Cepeda *et al.*, 2007). O metotrexato, por sua vez, é um inibidor da enzima DHFR (*dihydrofolate reductase*) e provoca a inibição da síntese do DNA (Neradil *et al.*, 2015).

Apesar da boa eficácia da associação dessas drogas, elas causam sérios efeitos colaterais. A doxorrubicina induz cardiotoxicidade, enquanto a cisplatina provoca nefrotoxicidade, neurotoxicidade e pode levar ao surgimento de neoplasias secundárias.

O metotrexato, além de problemas renais, hepáticos e neurológicos, também pode provocar mielossupressão (Carvalho *et al.*, 2014; Zhu *et al.*, 2015; Bravo Toledo, 2017).

Outro problema das drogas antiosteossarcoma utilizadas atualmente é o surgimento da resistência, especialmente nos casos de metástase. A resistência a cisplatina tem sido relacionada ao aumento nos mecanismos de reparo do DNA e superexpressão da enzima GSTP1 (“glutathione S-transferase P1”), que metaboliza e inativa drogas anticâncer. Os casos de resistência a doxorrubicina, estão relacionados com a alta expressão da GSTP1 e do gene MDR1 (multidrug-resistant), que codifica a proteína P-GP (“membrane pump P-glycoprotein”) responsável por exportar substâncias para fora da célula (He *et al.*, 2014). Por sua vez, os mecanismos de resistência ao metotrexato, envolvem redução na absorção da droga e o aumento dos níveis da enzima DHFR através da amplificação do gene DHFR (Jaffe, 2014).

Nos últimos 20-30 anos, devido a esses problemas de toxicidade e resistência, poucos resultados foram obtidos na tentativa de reduzir os casos de metástase (20-30%), aumentar a sobrevivência e melhorar a qualidade de vida de pacientes portadores de osteossarcoma metastático, o que demonstra a relevância de se identificar novos compostos e formas de tratamento.

1.5. Alvos da terapia anticâncer: p53 e Sp1

No cenário atual, existe grande enfoque na identificação de moléculas que possam atuar em diferentes alvos cruciais para o surgimento, crescimento e sobrevivência das células tumorais. Dois destes alvos são os fatores de transcrição p53 e Sp1, pois eles são capazes de regular a transcrição de genes envolvidos em praticamente todos os “marcadores do câncer”, tais como: progressão do ciclo celular, reparo do DNA, angiogênese, invasão tecidual e apoptose (Farnebo *et al.*, 2010; Safe *et al.*, 2014).

O gene supressor de tumor TP53 expande-se por 20 Kb de DNA no braço curto do cromossomo 17 (17p13) e possui 11 exons que, após processamento e tradução, originam a proteína p53 composta por 393 aminoácidos. A forma ativa de p53 trabalha como um tetrâmero composto de 4 subunidades idênticas, as quais em sua forma selvagem possuem um arranjo modular com quatro domínios principais funcionais. Na região N-terminal está o domínio de ativação transcricional (TAD) e na região central está o domínio de ligação específica ao DNA (DBD). Na região C-terminal estão localizados o domínio de

tetramerização (DO) e o domínio de regulação da atividade de ligação ao DNA (REG) (Gu e Zhu, 2012).

A função da proteína p53 pode ser afetada por mutações em diversos pontos da sequência do gene TP53 e algumas destas possuem um grande impacto para o desenvolvimento do câncer. Estas mutações estão presentes em mais de 50% dos diferentes tipos de câncer conhecidos e, em alguns tipos de câncer, elas ocorrem com alta frequência, como o câncer de ovário com 95% de frequência de mutações, o carcinoma espinocelular com 84%, o câncer de cabeça e pescoço com 67% e o adenocarcinoma esofágico com 65 % (Olivier *et al.*, 2010; Bouaoun *et al.*, 2016). As mutações em TP53 acarretam majoritariamente substituições de um aminoácido e podem afetar a função da proteína p53 de diferentes formas, dependendo da posição e o impacto que possuem na estrutura da proteína. Há mutações que acarretam a perda da atividade supressora de tumor de p53, mutações que podem gerar proteínas p53 mutantes com atividade dominante negativa sobre a proteína selvagem ou proteínas com novas propriedades oncogênicas (Olivier *et al.*, 2010).

A regulação de p53 ocorre principalmente a nível de estabilidade da proteína, dentro de uma rede de regulação em que a p53 sofre poliubiquitinação mediada pelo seu principal inibidor, a proteína MDM2 e, subsequentemente, degradação pelo proteossoma (Shadfai *et al.*, 2012). Em resposta a sinais de estresse celular, a proteína p53 é estabilizada e ativada por modificações pós-tradução, e a sua ligação em sequência consenso, contendo repetições de 10 pb (5'- RRRCWWGYYY-3', R= G ou A. W= T ou A e Y=C ou T) presente em regiões promotoras ou introns dos seus genes alvo, pode induzir ou reprimir a expressão destes genes (Figura 2) (Mirza *et al.*, 2003).

No processo de apoptose, a p53 ativa genes pró-apoptóticos como BAX, NOXA e PUMA e também reprime a transcrição de genes de sobrevivência como o BCL-2. Em muitos tipos de câncer, além das mutações, a p53 é frequentemente inativada através da degradação proteossomal mediada por ubiquitinação, translocação para fora do núcleo e repressão transcricional de p53-associada à cromatina (Gu e Zhu, 2012). A metilação do DNA influencia a ligação da p53 em regiões envolvendo o seu sítio de ligação. Em osteossarcoma, o gene Gadd45a, um alvo da p53, pode ser epigeneticamente inativado por meio de hipermetilação em ilhas CpG, e a desmetilação nessas regiões reestabelece a

expressão do Gadd45a induzida pela p53 e desencadeia a apoptose (Al-Romaih *et al.*, 2008).

Atualmente, algumas drogas são estudadas visando a reativação da p53 em células tumorais, entre elas estão a Nutlina-3a, PRIMA-1 e RITA (Zawacka-Pankau e Selivanova, 2015). O composto Nutlina-3a, uma pequena molécula capaz de se ligar a proteína MDM2 e impedir a sua associação com a p53, reativa a via da p53 e induz apoptose em células tumorais que possuem a versão selvagem da p53, entretanto, parece incapaz de produzir o mesmo efeito em células que carregam versões mutantes da p53 (Villalonga-Planells *et al.*, 2011). A PRIMA-1, por outro lado, pode reativar a p53 mutante através da alquilação de grupos tióis no centro da p53, que facilita a restauração da conformação ativa (selvagem) da p53 (Lambert *et al.*, 2009). O composto RITA é capaz de se ligar a proteína p53 e induzir um estado de conformação que possui menor afinidade para ligação de inibidores como a proteína MDM2, causando o acúmulo da p53 e consequente ativação de vias apoptóticas dependentes da p53 (Issaeva *et al.*, 2004). A maioria dos compostos reativadores da p53 estão em fase pré-clínica de desenvolvimento, apenas os compostos RG7112 (análogo da Nutlina) e AP4-246 (análogo da PRIMA-1) estão em fase clínica (Fase I) (Zawacka-Pankau e Selivanova, 2015).

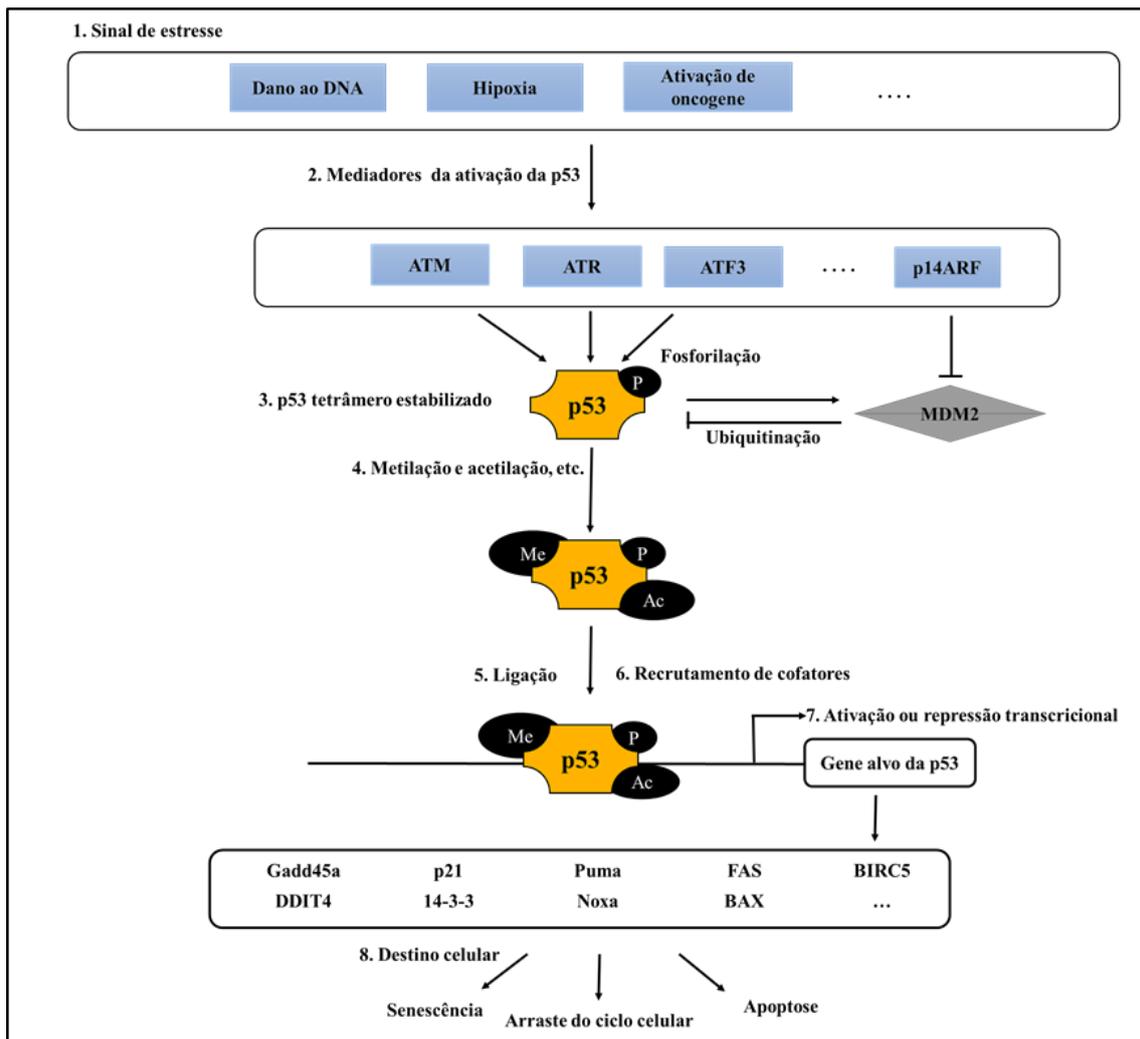


Figura 2. Modelo de estabilização da proteína p53. Sinais de estresse celular levam à ativação de genes que provocam modificações pós-traducionais na proteína p53, tais como: metilação, acetilação e, principalmente, fosforilação. Estas modificações impedem que a proteína MDM2 provoque a ubiquitinação da p53 e, conseqüentemente, a sua degradação de pelo proteossoma. A proteína p53 estabilizada pode ligar-se na região promotora dos seus genes alvos e regular a transcrição dos mesmos e, assim, desencadear os processos de arraste do ciclo celular, apoptose, entre outros.

O gene SP1 em humanos localiza-se no cromossomo 12, lócus 12q13.13 e codifica uma proteína com 785 aminoácidos (Chang e Hung, 2012). A proteína Sp1 é um fator de transcrição expresso em todos os tecidos, que reconhece sequências consenso no DNA ricas em CG (5'-(G/T)GGGCGG(G/A)(G/A)(C/T)-3') e liga-se a estas sequências através de três *motifs* “zinc fingers” (Cys₂His₂), localizados na sua porção C-terminal (Vizcaino *et al.*, 2015). Sp1 também pode ligar-se em sequências ricas em CT e GT, mas

com afinidade três e seis vezes menor, respectivamente, do que em sequências ricas em CG. A estimativa é de que o genoma humano possua pelo menos 12000 sítios de ligação de Sp1 (Wierstra, 2008).



Figura 3. Domínios da proteína Sp1. (DAT) domínio de transativação. O domínio carregado auxilia a ligação dos motivos “zinc fingers” no DNA. O domínio de multimerização (Multi) facilita a interação entre diversas moléculas de Sp1, permitindo a superativação de genes que contêm vários sítios para a ligação de Sp1.

O fator de transcrição Sp1 é considerado uma proteína oncogênica, que regula diversos genes envolvidos nas características marcadoras do câncer. Interessantemente, assim como a p53, a proteína Sp1 também é alterada em osteossarcoma [17-19].

A superexpressão do fator Sp1 provoca o aumento da transcrição dos genes IGF1R, IGF, EGFR (epidermal growth factor receptor), EGF (epidermal growth factor) e FGF (fibroblast growth factor), que participam da ativação de vias que induzem e sustentam a proliferação celular. Sp1 também regula positivamente a expressão da enzima TERT (telomerase reverse transcriptase) permitindo que as células tumorais adquiram potencial replicativo ilimitado. Além disso, a proteína Sp1 induz fatores importantes na promoção da angiogênese, entre eles o VEGF (vascular endothelial growth factor) e o PDGF (platelet-derived growth factor), e também induz as enzimas MMP-2 e MMP-9, que degradam a matriz extracelular e facilitam a migração das células tumorais para outros tecidos. Quanto a evasão da apoptose, a Sp1 pode atuar de muitas maneiras, por exemplo, através da repressão de receptores que transmitem sinais apoptóticos, como o TNFRSF10B (tumor necrosis factor receptor superfamily, member 10b), ou através da ativação de proteínas anti-apoptóticas, como a XIAP (X-linked inhibitor of apoptosis), Bcl-2 (B-cell CLL/lymphoma 2) e BIRC5 (baculoviral IAP repeat-containing 5) (Beishline e Azizkhan-Clifford, 2015).

A inibição da Sp1 é um mecanismo promissor para reestabelecer o padrão normal de expressão dos genes regulados por este fator de transcrição e, assim, reverter algumas das características malignas das células tumorais. Diferentes alternativas para a inibição da Sp1 já foram estudadas, por exemplo, o composto antitumoral mitramicina A inibe a

atividade transcricional da Sp1. A mitramicina pode intercalar-se no DNA em regiões ricas em GC e impedir a ligação da Sp1 nestas regiões, ou então deslocar as proteínas que já tenham se ligado ao DNA (Jia *et al.*, 2010; Seznec *et al.*, 2011). Outros compostos, como a curcumina, podem provocar a degradação proteossomal da Sp1 (Chadalapaka *et al.*, 2008), ou induzir a expressão de proteínas repressoras da Sp1, como a ZBTB10 (zinc finger and BTB domain containing 10) (Gandhy *et al.*, 2012).

1.6. Sp1, p53 e topoisomerasas

Os fatores p53 e Sp1 controlam juntos diversos genes responsáveis por decidirem o destino celular e que estão envolvidos na tumorigênese. Por exemplo, tanto Sp1 quanto a p53 são capazes de interagir com a região promotora da topoisomerase IIa e ativar ou reprimir a sua transcrição, respectivamente (Wang *et al.*, 1997; Williams *et al.*, 2007). A p53 também é capaz de sequestrar a proteína Sp1 impedindo-a de se ligar a regiões promotoras (Bocangel *et al.*, 2009).

Muitas drogas anticâncer utilizadas clinicamente têm como alvo o DNA ou enzimas como as topoisomerasas, que participam das maquinarias de transcrição e replicação. As topoisomerasas são enzimas que provocam rupturas transitórias no DNA, para aliviar o estresse topológico durante os processos de transcrição, duplicação do DNA e segregação dos cromossomos.

Os inibidores de topoisomerase são divididos em “venenos de topoisomerase” e inibidores catalíticos. Os venenos, como doxorrubicina e etoposídeo, estão entre as drogas mais utilizadas na oncologia. Estas drogas estabilizam o complexo topoisomerase II/DNA clivado (complexo de clivagem) e tornam as quebras transitórias no DNA em lesões persistentes (Yang *et al.*, 2014), que disparam mecanismos de morte celular regulados por fatores de transcrição como o p53 e Sp1 (Tang *et al.*, 2004; Wang *et al.*, 2004; Jiang *et al.*, 2006; Esteve *et al.*, 2007; Grandela *et al.*, 2007; Niina *et al.*, 2007; Song *et al.*, 2009; Yang *et al.*, 2013). Os inibidores catalíticos, como merbarone e ICRF193, não estabilizam o complexo de clivagem, eles agem sobre os domínios catalíticos da topoisomerase, impedindo a ligação ao DNA ou a hidrólise do ATP necessária para as alterações na conformação da topoisomerase (Larsen *et al.*, 2003). Eles evitam o relaxamento do DNA promovido pela topoisomerase, resultando na inibição da condensação e segregação dos cromossomos, o que pode causar o bloqueio do ciclo

celular e posteriormente ativar vias de apoptose dependentes da p53 (Wang e Eastmond, 2002; Clifford *et al.*, 2003).

1.7. Chalconas: a ação sobre p53, Sp1 e topoisomerase

A *trans*-Chalcona é a mais simples das chalconas (1,3-difenil-2-propen-1-onas), que são flavonoides de cadeia aberta nos quais os dois anéis aromáticos são unidos por um sistema carbonilo de três carbonos α , β -insaturado. As chalconas são moléculas precursoras na biossíntese dos demais membros da classe dos flavonoides e estão presentes em especiarias, chás, cerveja, frutas cítricas e legumes (Orlikova, B. *et al.*, 2011).

Nos últimos anos, as chalconas têm recebido grande atenção por demonstrarem diversas propriedades biológicas, que incluem, atividades anti-inflamatória (Yadav *et al.*, 2011), antioxidante e quimioterapêuticas (Orlikova, Barbora *et al.*, 2011), e por atuarem sobre vias importantes no câncer, tais como: ciclo celular, apoptose e multirresistência a drogas (Jandial *et al.*, 2014). Algumas chalconas, como a isoliquiritigenina, demonstram induzir arrasto do ciclo celular e/ou apoptose através da indução da p53 e ativação de genes dependentes da p53, como o p21 (Hsu *et al.*, 2005; Rao *et al.*, 2010; Zhang *et al.*, 2012). Ao que parece, chalconas podem atuar como inibidores da proteína MDM2, dificultando a interação entre p53/MDM2 e, conseqüentemente, evitando que a proteína p53 seja marcada (ubiquitinada) para a degradação (Stoll *et al.*, 2001).

Chalconas também já demonstraram induzir apoptose em células tumorais através da inibição da expressão de Sp1. A licochalcona A, por exemplo, é capaz de reprimir a expressão da proteína Sp1 e regular a expressão de genes pró ou anti-apoptóticos dependentes da Sp1, como ciclina D1, survivina, p21, BAX e Bcl-x (Cho *et al.*, 2014; Kim *et al.*, 2015).

Estudos também demonstram que chalconas, como a 4-hidroxiclericina, licochalconas A e E, tiranil-metoxichalcona e oxiranil-metoxichalcona, são capazes de inibir as topoisomerasas e, parte do efeito citotóxico dessas chalconas em células tumorais, é dependente desta inibição (Yoon *et al.*, 2007; Akihisa *et al.*, 2011; Na e Nam, 2011). Em trabalho anterior, foi identificado que o flavonoide *trans*-Chalcona reprimiu consideravelmente a transcrição da topoisomerase 2A (Top2A), que é regulada transcricionalmente pela p53 e Sp1 (Silva *et al.*, 2013).

Moléculas como a *trans*-Chalcona possuem potenciais redox relativamente baixos e com uma maior probabilidade de sofrerem reações de transferência de elétrons devido à presença de ligações duplas conjugadas em sua estrutura. Esta propriedade da *trans*-Chalcona, juntamente com sua lipofilicidade, aumenta a sua atividade biológica e com uma característica interessante de baixo efeito genotóxico associado ao grupo amino de ácidos nucleicos, que a maioria das drogas antitumorais em uso possuem (Dimmock *et al.*, 1999). Desta forma, a *trans*-Chalcona é considerada um composto intermediário apropriado para a síntese de vários derivados heterocíclicos que exibem várias propriedades biológicas (Zhou e Xing, 2015).

Deste modo, o intuito deste trabalho foi avaliar, em linhagem de osteossarcoma tratada com *trans*-Chalcona, a expressão dos fatores de transcrição Sp1 e p53, e a participação deles na regulação transcricional do gene top2A promovida pela *trans*-Chalcona. Assim como, por meio da análise do transcriptoma, identificar outros genes e vias importantes para o câncer modulados pela *trans*-Chalcona.

2. HIPÓTESE

A modulação da expressão gênica exercida pela *trans*-Chalcona sobre a topoisomerase IIA é mediada pela regulação da expressão e atividade dos fatores de transcrição Sp1 e p53, os quais possuem sítios na região promotora do gene Top2A.

3. OBJETIVOS

3.1. Objetivo Geral

Investigar os mecanismos moleculares envolvendo os fatores de transcrição p53 e Sp1 na atividade biológica da *trans*-Chalcona.

3.2. Objetivos específicos

1. Análise do efeito citotóxico e apoptótico da *trans*-Chalcona sobre a linhagem de osteossarcoma U2OS.
2. Análise do efeito da *trans*-Chalcona sobre a expressão dos fatores de transcrição Sp1 e p53 na linhagem U2OS.
3. Análise dos mecanismos de ação da *trans*-Chalcona sobre a regulação dos fatores Sp1 e p53.
4. Caracterização do transcriptoma da linhagem U2OS tratada com *trans*-Chalcona.

4. MATERIAIS E MÉTODOS

4.1. Compostos

Os compostos *trans*-Chalcona, merbarone e hidroxichalcona (Alfa Aesar) foram dissolvidos em DMSO (Sigma Aldrich). Em todos os experimentos a concentração final de DMSO foi $\leq 0,01\%$. Por isso, 0,01% de DMSO foi utilizado como controle negativo em todos os experimentos. Todos os ensaios foram realizados em triplicata.

4.2. Promotores e vetores de expressão

Vetores contendo promotor de Sp1 humano (pGL3FOR4, pGL3FOR2 e pGL3FOR1) foram gentilmente cedidos pelo Dr. Steve Safe (Texas A&M University). O promotor Top2A foi fornecido pela Dr. Kathryn Stowell (Massey University, New Zealand). O promotor contendo 6 cópias de sítios de ligação para Sp1 (pGAGC6) (Kambe *et al.*, 2008), promotor pMDM2-Luc (Zhong *et al.*, 2010), vetor full-length Sp1 e vetor de expressão LacZ (Invitrogen) foram descritos previamente (Baek *et al.*, 2001).

4.3. Linhagens celulares

Todas as linhagens celulares foram obtidas da American Type Culture Collection (Manassas, VA, USA). As linhagens U2OS (osteossarcoma humano) e HCT-116 (carcinoma de cólon humano) foram cultivadas em meio McCoy's 5A (Corning), enquanto as linhagens FaDu (carcinoma de hipofaringe humano) e A549 (carcinoma de pulmão humano) em meio EMEM e DEMEM/F12 (Corning), respectivamente. Todos os meios foram suplementados com 10% de soro fetal bovino (SFB) (Corning), 100 U/mL de penicilina e 100 $\mu\text{g/mL}$ de estreptomicina (Sigma Aldrich) e as células foram mantidas a 37°C sob uma atmosfera umidificada com 5% de CO₂.

4.4. Ensaio de citotoxicidade

A determinação da citotoxicidade foi realizada pelo método do brometo de 3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difeniltetrazólio (MTT). As células U2OS foram semeadas em placas de 96 poços (1×10^3 células/poço) e após a adesão celular, foram tratadas com 0, 1, 10 e 100 μM de *trans*-Chalcona e merbarone (controle positivo) em meio contendo 10% de SFB por 0, 1, 2, ou 4 dias. Após o tratamento, para mensurar a proliferação celular, 20 μL de CellTiter 96 Aqueous One Solution (Promega) foram adicionados a cada poço, seguido da incubação por 2 horas a 37°C. Finalmente, a absorbância (490 nm) do controle

e dos tratamentos foi mensurada em leitora de microplacas ELx800 (Bio-Tek Instruments).

Através do ensaio de MTT constatou-se a elevada citotoxicidade da concentração de 100 μM , especialmente para a *trans*-Chalcona, o que poderia inviabilizar alguns experimentos, assim, nos demais ensaios foram utilizadas as concentrações de 0 até 50 μM .

4.5. Análise de apoptose por citometria de fluxo

A determinação de células apoptóticas por citometria de fluxo foi feita com dupla marcação (Anexina V/iodeto de propídio) utilizando o kit TACS® Annexin V-Biotin (Trevigen). Basicamente, células U2OS foram semeadas em placas de 12 poços ($2,5 \times 10^5$ células/poço) e após 18 horas foram tratadas com 0, 10 e 50 μM de *trans*-Chalcona e merbarone em meio contendo 10% de SFB por 24 horas. As células aderidas e flutuantes foram coletadas, centrifugadas a 300 x g por 5 minutos (4°C) e lavadas com 1 mL de PBS 1X (4°C). Em seguida, as células sedimentadas por centrifugação foram ressuspensas em 100 μL de tampão de ligação contendo anexina-biotina (0,01:0,025 molar) e 5 $\mu\text{g}/\text{mL}$ de iodeto de propídio (PI) e incubadas por 15 minutos a temperatura ambiente no escuro. Após serem centrifugadas e lavadas, as células foram ressuspensas em 100 μL de tampão de ligação contendo 10 $\mu\text{g}/\text{mL}$ de estreptavidina e incubadas por 15 minutos a temperatura ambiente no escuro. Por fim, foram adicionados 400 μL de tampão de ligação e realizada a análise em citômetro de fluxo Attune® Acoustic Focusing (Applied Biosystems). Os testes foram realizados em triplicata.

4.6. Análise de apoptose por coloração com DAPI

Células apoptóticas também foram identificadas por meio de marcação com DAPI. Células U2OS foram semeadas em placas de 12 poços ($2,5 \times 10^5$ células/poço) e após 18 horas foram tratadas com 0, 10 e 50 μM de *trans*-Chalcona. Após 24 ou 48 horas de tratamento, as células aderidas e não aderidas foram coletadas, centrifugadas a 300 x g por 5 minutos e lavadas com 1 mL de solução formaldeído-PBS (2% de formaldeído em PBS). Em seguida, as células foram fixadas por 10 minutos no escuro com 1 mL de formaldeído-PBS contendo 2 $\mu\text{g}/\text{mL}$ de DAPI (Roche Diagnostics). Após serem sedimentadas e lavadas novamente, as células foram ressuspensas em formaldeído-PBS e uma alíquota (30-50 μL) foi aplicada sobre lâmina de vidro contendo meio de montagem

aquoso Supermount™ (BioGenex). A lâmina foi coberta com uma lamínula e as células apoptóticas foram observadas em microscópio de fluorescência (350 nm).

4.7. Análise da atividade das caspases 3/7

Para a *trans*-Chalcona, também se avaliou a capacidade de induzir a atividade das caspases 3/7, para isso foi escolhida a concentração de 50 µM, pois esta induziu elevados níveis de apoptose nos experimentos anteriores.

A atividade enzimática das caspases 3/7 foi mensurada através do Apo-ONE Homogenous Caspase-Glo 3/7 Assay (Promega). Basicamente, as células U2OS foram cultivadas até 80% de confluência em placas de 60 mm e, após serem tratadas com 0 ou 50 µM de *trans*-Chalcona por 24 horas, elas foram coletadas em tampão RIPA (50 mM Tris-HCl, 150mM NaCl, 1% Nonidet P-40, 0,5% de deoxicholato de sódio e 0,1% SDS) contendo 1 % de Protease Inhibitor Cocktail (EMD Biosciences) e lisadas por sonicação. Os lisados de células (50 µg de proteínas) foram distribuídos em placas de 96 poços “black-walled” e misturados com o mesmo volume de reagente caspase-Glo 3/7. As placas foram incubadas por 1 hora em temperatura ambiente no escuro e a luminescência foi detectada em uma leitora de microplaca FLx800 (Bio-Tek Instruments). Os experimentos foram executados em triplicata.

4.8. Western Blot

Células foram crescidas até 80-90% de confluência em placas de 60 mm e então tratadas com 0, 1, 10 e 50 µM de *trans*-Chalcona e merbarone em meio sem soro fetal bovino (SFB), por diferentes períodos de tempos (0, 3, 6, 12 e 24 horas). As células foram lavadas com PBS e coletadas em tampão RIPA (4°C) contendo 1 mM de fluoreto de fenilmetilsulfonilo, 153 nM de aprotinina, 2,3 µM de leupeptina, 0,1 nM de ortovanadato de sódio e 25 mM de fluoreto de sódio. As células foram submetidas à sonicação (3x5 segundos) e o lisado celular foi centrifugado a 14000 x g por 20 minutos (4°C). O sobrenadante foi coletado e a concentração de proteínas totais determinada utilizando o reagente Pierce®BCA Protein Assay (Thermo Scientific). 30 µg de proteínas totais foram misturadas com uma alíquota de tampão SDS 4X (250 mM Tris-HCl, 8% SDS, 40% glicerol, 8% bME e 0,02% de bromofenol) e aquecidas a 95°C por 5 minutos. Em seguida, foram centrifugadas a 14000 x g por 5 minutos (4°C) e submetidas a eletroforese em gel SDS-PAGE (12%) por 90 minutos (100 volts, 360 mAmp). Após a eletroforese, as

proteínas foram submetidas à transferência para membrana de nitrocelulose (PALL Corporation, Pensacola, FL, USA) por 1 hora (100 volts, 360 mA) a 4°C. As membranas foram bloqueadas com tampão TBST (25 mM Tris, 3 mM KCl, 0,14 M NaCl, 0,05 % Tween 20) contendo 5% de leite sem gordura, durante 30-60 minutos em temperatura ambiente. Posteriormente, as membranas foram incubadas overnight (4°C) com os anticorpos primários Sp1 (Millipore), Sp3, p53 ou β -actina (Santa Cruz Biotechnology, Santa Cruz, CA, USA) diluídos em tampão TBST-leite (1:1000). Após serem lavadas com TBST (3 x 10 minutos), as membranas foram incubadas por 1 hora com anticorpo secundário conjugado a peroxidase diluído em TBST-leite (1:5000) e então lavadas com TBST (4 x 10 minutos). As proteínas foram visualizadas através da detecção da quimiluminescência utilizando o reagente ECL™ Western Blotting Detection (Amersham Biosciences) em um analisador de luminescência LAS4000 (FujiFilm Medical Systems).

4.8.1. Western Blot: análise da estabilidade das proteínas Sp1 e p53

Para a análise do efeito da *trans*-Chalcona sobre a estabilidade de proteínas (Sp1 e p53), duas estratégias foram utilizadas. Na primeira, as células U2OS foram pré-tratadas com 0 ou 50 μ M de *trans*-Chalcona por 12 horas, em seguida, co-tratadas com *trans*-Chalcona mais 35 μ M do inibidor de síntese proteica cicloheximida (Sigma) durante diversos períodos de tempo (1-24 horas). Na segunda estratégia, as células U2OS foram pré-tratadas por 1 hora com diferentes inibidores do proteossoma 20S, 10 μ M de MG132, 1 μ M de epoxomicina ou 5 μ M de lactacistina (Sigma) e, posteriormente, co-tratadas com mais 50 μ M de *trans*-Chalcona por 24 horas. Ao final dos respectivos tratamentos as células foram coletadas em tampão RIPA e processadas de acordo com o protocolo descrito anteriormente para a análise de Western Blot.

4.9. Ensaio do Proteossoma 20S

As células U2OS foram tratadas com 10 e 50 μ M de *trans*-Chalcona e merbarone em meio sem soro durante 24 horas, em seguida, os lisados celulares foram obtidos conforme o protocolo descrito para o Western Blot. A atividade do proteossoma 20S foi avaliada com Proteasome-Glo Assay Systems Kit (Promega), que permite detectar separadamente três diferentes atividades proteolíticas do proteossoma: quimiotripsina, tripsina e caspase. Para isso, 40 μ L dos lisados de células (50 μ g proteínas) foram

distribuídos em triplicata em placas de 96 poços “black-walled”. Em seguida, adicionou-se 40 µL dos substratos (quimiotripsina, tripsina e caspase) por poço e as placas foram incubadas por 1 hora em temperatura ambiente no escuro. A luminescência para as três atividades proteossomais foi detectada em uma leitora de microplaca FLx800 (Bio-Tek Instruments).

4.10. Reação em cadeia da polimerase com transcrição reversa (RT-PCR)

As células U2OS cultivadas em placas de 60 mm (80% de confluência) foram tratadas com 10 e 50 µM de *trans*-Chalcona e merbarone em meio sem soro durante 24 horas. O RNA total foi isolado utilizando o GeneJET RNA Purification Kit (Thermo Scientific) e tratado com Optizyme Recombinant DNase I (Fisher Scientific). Um micrograma do RNA tratado foi reversamente transcrito usando Verso cDNA synthesis Kit (Thermo Scientific). A PCR foi realizada com GoTaq Green Master Mix PCR Mixture (Promega). As reações foram submetidas às condições de ciclagem mostradas a seguir:

94°C por 2 minutos
 94°C por 30 segundos
 60°C por 30 segundos
 72°C por 30 segundos
 72°C por 10 minutos
 4°C ∞

} 25 ciclos

Os primers utilizados nas reações de PCR são listados abaixo:

Sp1_F	5'-TGCAGCAGAATTGAGTCACC-3'	246 pb
Sp1_R	5'-CACAACTACTGCCACCAG-3'	
Sp3_F	5'-TCCAGTCAGCAGATGGTCAG-3'	227 pb
Sp3_R	5'-TTGGGTTTGACCAGGAAAAG-3'	
Sp4_F	5'-CCAGAATCTCCCTCCTCCAC-3'	253 pb
Sp4_R	5'-CAATTTGCACCTGCTGAAGA 3'	
p53_F	5'-GCGCACAGAGGAAGAGAATC-3'	331 pb
p53_R	5'-TGAGTCAGGCCCTTCTGTCT-3'	
Top2A_F	5'-GTCCCTCCACGAGAAACAGA-3'	217 pb
Top2A_R	5'-CAGCTCAAGGTCTGACACG-3'	
MMP-2_F	5'-TTCCCCTTCTTGTTC AATGG-3'	376 pb
MMP-2_R	5'-ATTTGTTGCC CAGGAAAGTG-3'	
p21_F	5'-GCGACTGTGATGCGTAAT-3'	400 pb
p21_R	5'-TAGGGCTTCCTCTTGGAGAA-3'	

Gadd45a_F	5'-GGAGGAAGTGCTCAGCAAAG-3'	378 pb
Gadd45a_R	5'-TCCCGGCAAAAACAAATAAG-3'	
GAPDH_F	5'-GACCACAGTCCATGCCATCACT-3'	453 pb
GAPDH_R	5'-TCCACCACCCTGTTGCTGTAG-3'	
CXCL14_F	5'-GGACCCAAGATCCGCTACAG-3'	187 pb
CXCL14_R	5'-TCTCGTCCAGGCGTTGTAC-3'	
IGFBP5_F	5'-TCCCCACGTGTGTTTCATCTG-3'	288 pb
IGFBP5_R	5'-ACCATCTCCCTCTGCCATCT-3'	
SOX6_F	5'-GCAGCAAGGTTCAACAGTGG-3'	279 pb
SOX6_R	5'-ATTCCCCTCCTTCTCCTCCC-3'	
SLC14A1_F	5'-ACAACCCCGTCAGTGGAATC-3'	231 pb
SLC14A1_R	5'-CAGGGAGTAACAGCCACCAG-3'	
ITGA11_F	5'-AGCCTCCACTTTGAGCCATC-3'	316 pb
ITGA11_R	5'-AGAAGGTCAGTGGCTTCACG-3'	
MEIS1_F	5'-ATATCATGAGGGCGTGGCTG-3'	274 pb
MEIS1_R	5'-CCACTCATAGGTCCTGGTGC-3'	
SMOC1_F	5'-ACTGGTCCCCTCCTCAGATC-3'	203 pb
SMOC1_R	5'-CTTTCTCCAGGACAGCAGGG-3'	
DAPK1_F	5'-CAGTGGACAGTTTGCGGTTG-3'	170 pb
DAPK1_R	5'-TGACATTGGGGTGCTGGATC-3'	
BAG3_F	5'-ACTTGGGTGGAGGCAAAACA-3'	218 pb
BAG3_R	5'-CCATCTACCCCTCCAGTCCA-3'	
RASGRP3_F	5'-CGACAAAACCACCCTAGTTCTC-3'	200 pb
RASGRP3_R	5'-CGATGTTAGTGCCTAGTGGTGA-3'	
PHLDA1_F	5'-CTCATGTCATTCCCTGAGAACA-3'	202 pb
PHLDA1_R	5'-ACATTAGAGAATCCCAGCTTGC-3'	
Hsp40 (DNAJB1)_F	5'-TCACTTTGTGGGTCACACTCTT-3'	200 pb
Hsp40 (DNAJB1)_R	5'-TCCACAGTGCTCCTGTAATCAG-3'	
PAQR3_F	5'-GTCTGTATGCTTTGCTCTGTGG-3'	200 pb
PAQR3_R	5'-AGGATCATAGCAAGCACTGTGA-3'	
ATF3_F	5'-GTTTGAGGATTTTGCTAACCTGAC-3'	211 pb
ATF3_R	5'-AGCTGCAATCTTATTTCTTCTCGT-3'	
DDIT3_F	5'-CAGAACCAGCAGAGGTCACA-3'	316 pb
DDIT3_R	5'-CCAATTGTTTCATGCTTGGTG-3'	

Os produtos de PCR foram visualizados em gel de agarose (1,5%) corado com brometo de etídeo (5 µg/mL) (Sigma). A intensidade das bandas foi analisada por densitometria utilizando a banda de GAPDH (gene constitutivo) como referência.

4.10.1. RT-PCR: Análise da estabilidade do RNA mensageiro

Para avaliar o efeito da *trans*-Chalcona sobre a estabilidade do RNA mensageiro foi utilizado o composto actinomicina D para bloquear a transcrição antes do tratamento com *trans*-Chalcona.

Após serem cultivadas em placas de 60 mm (80-90% de confluência) as células U2OS foram pré-tratadas por 1 hora com 1,5 μ M de actinomicina D (Enzo Life Sciences) e, posteriormente, co-tratadas com 0 ou 50 μ M de *trans*-Chalcona por até 24 horas. O RNA total foi isolado em diferentes tempos de tratamento (0, 1, 2, 4, 8 e 24 horas) e as reações de RT-PCR para mensurar o efeito da *trans*-Chalcona sobre a estabilidade de RNAs mensageiros foram realizadas conforme descrito anteriormente.

4.11. Análise da metilação em região promotora do gene Sp1

Para analisar o efeito da *trans*-Chalcona sobre a metilação do DNA no promotor Sp1, foi utilizado o método de sequenciamento de DNA convertido com bissulfito de sódio. O tratamento do DNA com bissulfito de sódio converte todas as citosinas não metiladas em uracila, enquanto que as citosinas metiladas não são alteradas. Assim, uma vez convertido, o perfil de metilação do DNA pode ser analisado através da amplificação por PCR seguido do sequenciamento do DNA.

As células U2OS foram tratadas em placas de 60 mm com 50 μ M de *trans*-Chalcona por 24 horas. Após o tratamento, o DNA das células foi extraído com GeneJET Genomic DNA Purification Kit (Thermo Scientific). Em seguida, 200 ng de DNA foram convertidos com bissulfito de sódio utilizando o EZ DNA Methylation-Direct™ Kit (Zymo Research). A reação de conversão foi executada com as seguintes condições de ciclagem: 98°C por 8 minutos e 64°C por 3,5 horas.

O DNA convertido foi utilizado nas reações de PCR realizadas com GoTaq Green Master Mix PCR Mixture (Promega). As reações foram submetidas às seguintes condições de ciclagem:

94°C por 2 minutos	} 40 ciclos
94°C por 30 segundos	
58°C por 30 segundos	
72°C por 30 segundos	
72°C por 10 minutos	

Os primers utilizados nas reações estão listados abaixo e foram desenhados para amplificar a região promotora do gene Sp1.

Sp1 F1 mephy	5'-GGTTGTTTGTGGATTGTTTGGTTT-3'	346 pb
Sp1 R1 mephy	5'-TCCAATAACAAAACACTCACTACTCTCCA-3'	

Após a amplificação, os produtos de PCR foram purificados com GeneJET PCR Purification Kit (Thermo Scientific) e sequenciados, utilizando o Applied Biosystems 3730 capillary electrophoresis DNA analyzer (Applied Biosystems) no laboratório MBRF (Molecular Biology Resource Facility) da Universidade do Tennessee. As sequências de DNA obtidas das diferentes amostras (DMSO e *trans*-Chalcona) foram alinhadas e analisadas com o programa Clustal Omega (The European Bioinformatics Institute).

4.12. Transfecção das Células

Células U2OS cultivadas em placas de 60 mm (80% de confluência), foram transfectadas utilizando o PolyJet Reagent (SignaGen) com 2,5 µg de plasmídeo expressando Sp1 ou LacZ. Após 16-18 horas de transfecção, as células foram tratadas com 50 µM de *trans*-Chalcona em meio sem soro durante 24 horas. Depois do tratamento, as células foram coletadas, o RNA foi isolado e reações de RT-PCR foram realizadas. Para o ensaio de atividade da luciferase, as células foram co-transfectadas com uma mistura de 2,5 µg de plasmídeo contendo construções repórteres promotor-luciferase e 0,25 µg de plasmídeo pRL-null. Após a transfecção e tratamento com 50 µM de *trans*-Chalcona e merbarone por 24 horas, as células foram coletadas em tampão de lise passiva 1X (Promega), sonicadas (3 x 10 segundos) e centrifugadas a 14000 rpm por 20 minutos (4°C). O sobrenadante foi recolhido e a concentração de proteínas totais determinada utilizando o reagente Pierce®BCA Protein Assay. A atividade dos repórteres-luciferase, em 50 µg de proteínas, foi mensurada e normalizada pela atividade luciferase do pRL-null utilizando o DualGlo Luciferase Assay Kit (Promega), de acordo com as instruções do fabricante. A detecção da luminescência foi executada em luminômetro TD-20/20 DLRready (Turner BioSystems, Sunnyvale).

4.13. Sequenciamento de RNA (RNA-seq)

4.13.1. Preparação da biblioteca e sequenciamento de nova geração (NGS)

As células U2OS foram crescidas em placas de 10 cm até 80% de confluência, em seguida, foram tratadas com 50 μ M de *trans*-Chalcona em meio sem soro durante 24 horas. O RNA foi isolado, utilizando o GeneJET RNA Purification Kit (Thermo Scientific), quantificado e a qualidade e integridade analisadas. O Illumina TruSeq RNA Kit (Illumina) foi usado para preparação da biblioteca de mRNA-Seq, de acordo com as instruções do fabricante. Basicamente, mRNAs (poliA+) foram purificados a partir de 1 μ g de RNA total utilizando “beads” magnéticas poli-T. Os RNAs mensageiros foram fragmentados no tamanho desejado, por incubação a elevada temperatura (94°C), durante 8 minutos, na presença de íons metálicos. RNAs mensageiros foram usados para síntese da primeira e segunda fitas de cDNAs, que foram subsequentemente sujeitas a reparo das extremidades, adição de cauda poli-A na extremidade 3’, ligação de adaptadores e amplificação através de 15 ciclos de PCR. Durante a PCR, individuais barcodes foram incorporados dentro das respectivas amostras, para permitir o “pooling” das amostras durante o subsequente sequenciamento do DNA. Foram realizados 100 ciclos de sequenciamento “paired-end” (2 x 100 ciclos) das bibliotecas de RNA-seq preparadas em Illumina HiSeq 2500. O experimento de RNA-seq foi realizado no Centro para Recursos Biotecnológicos do FDA (Food and Drug Administration, Maryland, USA)

4.13.2. Análise dos dados de NGS

As sequências obtidas foram processadas utilizando o Tuxedo suite (Baltimore, MD, USA). Resumidamente, arquivos fastq foram alinhados ao genoma humano de referência (hg19), usando o programa TopHat v.2.0.6. As sequências alinhadas foram processadas no Cufflinks v.2.2.1, para produzir transcritos individuais, seguido da análise pelo Cuffmerge, para integrar ao genoma humano de referência (anotações de transcrição GTF da Illumina iGenomes). Com base na distribuição do valor FPKM (“Fragments Per Kilobase Million”) dos transcritos, uma lista de genes expressos foi definida para incluir apenas transcritos com FPKM > 1 em pelo menos um dos tratamentos (Yoon *et al.*, 2007; Akihisa *et al.*, 2011; Na e Nam, 2011). Uma lista de genes diferencialmente expressos em resposta ao tratamento com *trans*-Chalcona foi obtida depois que os arquivos de saída do Cuffmerge foram passados para o programa Cuffdiff2. Genes com “fold change” > 2,0,

usando um valor p-limite de 0,001 foram considerados biologicamente relevantes e selecionados para análises subsequentes.

4.13.3. Análise de enriquecimento funcional

Os genes diferencialmente expressos entre as células U2OS tratadas e não tratadas com *trans*-Chalcona foram categorizados de acordo com ontologia gênica (OG) usando a ferramenta EnrichR (<http://amp.pharm.mssm.edu/Enrichr/>). Análise de enriquecimento de vias dos genes modulados pela *trans*-Chalcona foi realizada utilizando as ferramentas “Gene List Analysis” (<http://pantherdb.org/tools/index.js>) e KEGG Mapper-Search Pathway” (<http://www.genome.jp/kegg/tool>). Um valor $p < 0,05$ foi considerado para indicar uma diferença estatisticamente significativa e foi definido como o corte.

4.14. Imunoprecipitação

Para a análise de imunoprecipitação, incubaram-se 300 µg de lisados de proteína recolhidos em tampão RIPA modificado (Tris-Cl a 25 mM pH 7,4, NaCl 150 mM, NP-40 a 1% e glicerol a 5%) com 2 µg de anticorpo primário durante 2 h a 4°C numa plataforma rotativa, seguido pela adição de 20 µL de proteína A / G PLUS-agarose (Santa Cruz Biotechnology) e incubação durante 18 h a 4°C. Os imunoprecipitados foram recolhidos por centrifugação a 2000 x g durante 5 min a 4°C. Após lavagem, 10 vezes com PBS 1X gelado, os sedimentos foram ressuspensos com 40 µL de tampão SDS-PAGE 4X e aquecidos a 95°C durante 5 min. As amostras imunoprecipitadas foram então analisadas por Western Blot.

4.15. Análise Estatística

Análises estatísticas foram realizadas com o teste t de Student não pareado. Os dados são expressos como média \pm desvio padrão de no mínimo três experimentos independentes. Os resultados foram considerados estaticamente significativos para * $P < 0,05$, ** $P < 0,01$ e *** $P < 0,001$ (0,01% DMSO vs tratamento).

5. RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.1. *Trans*-Chalcona e merbarone inibem o crescimento e induzem apoptose na linhagem de osteossarcoma U2OS

Foram utilizados diferentes tempos e doses de tratamento para investigar os efeitos da *trans*-Chalcona e merbarone (Fig. 4A), inibidores transcricional e catalítico da topoisomerase 2A, respectivamente, sobre o crescimento das células U2OS. Ambos os compostos inibiram significativamente o crescimento celular de forma dose e tempo dependente (Fig. 4B), com destaque para a *trans*-Chalcona, que se mostrou efetiva na concentração de 10 μ M, inibindo o crescimento celular após 1, 2 e 4 dias de tratamento, em aproximadamente 24%, 58% e 90%, respectivamente.

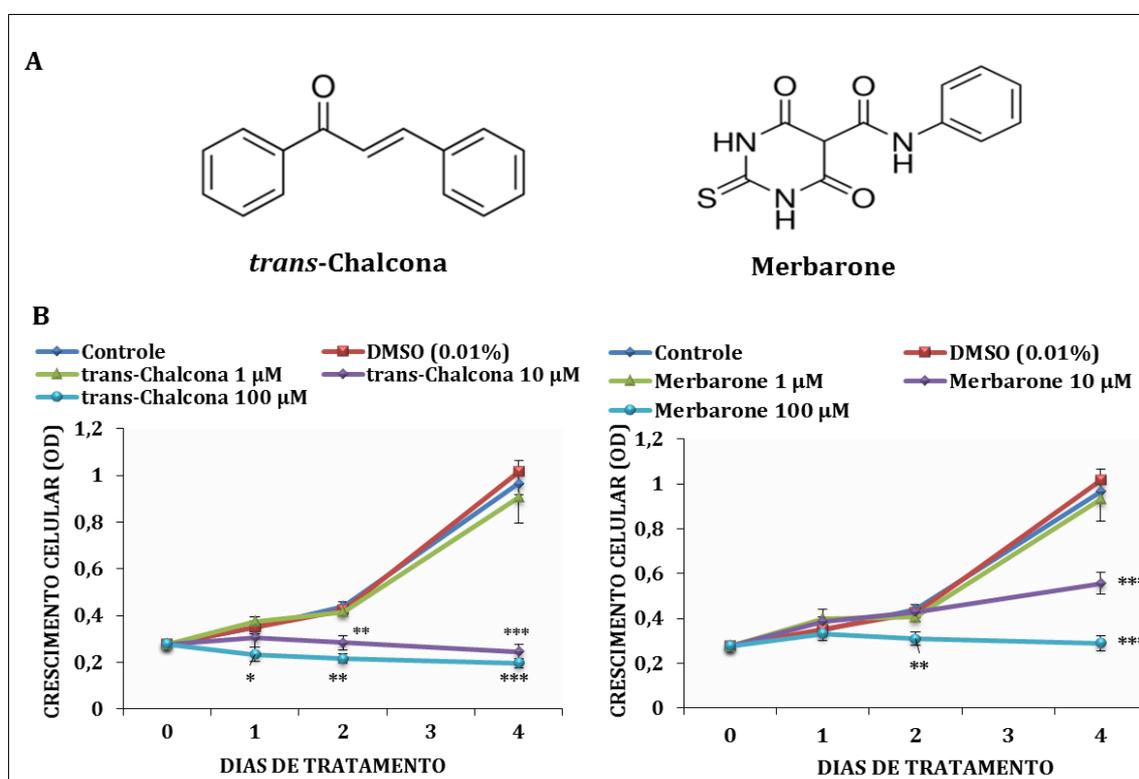


Figura 4. Inibição do crescimento das células U2OS tratadas com *trans*-Chalcona e merbarone. **A.** Estrutura química dos compostos *trans*-Chalcona e merbarone. **B.** Células U2OS foram tratadas com DMSO (0,01%) ou 1, 10, e 100 μ M de *trans*-Chalcona e merbarone por 0, 1, 2 e 4 dias, então, o crescimento celular foi avaliado pelo ensaio de MTT. * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$ e *** $p < 0.001$ (DMSO vs tratamento).

A fim de averiguar se a inibição do crescimento das células U2OS estava relacionada com indução de apoptose, a presença de células apoptóticas foi avaliada por 3 métodos: detecção da externalização de fosfatidilserina (fase inicial da apoptose) por citometria de fluxo, visualização da condensação da cromatina (fase tardia da apoptose)

com coloração com DAPI e avaliação da atividade enzimática das caspases 3/7 (apenas para *trans*-Chalcona). Novamente, ambos os compostos demonstraram efeito dose-dependente (Fig. 5A e 5B) e tempo dependente (Fig. 5B). Sendo que, a *trans*-Chalcona apresentou maior efeito que o merbarone após 24 horas de tratamento, aumentando o número de células apoptóticas comparado ao controle em 1,9 e 3,6 vezes nas concentrações de 10 e 50 μ M, respectivamente (Fig. 5A). Conforme exposto na figura 3C, também foi observado que a *trans*-Chalcona induziu a atividade das caspases efetoras 3/7.

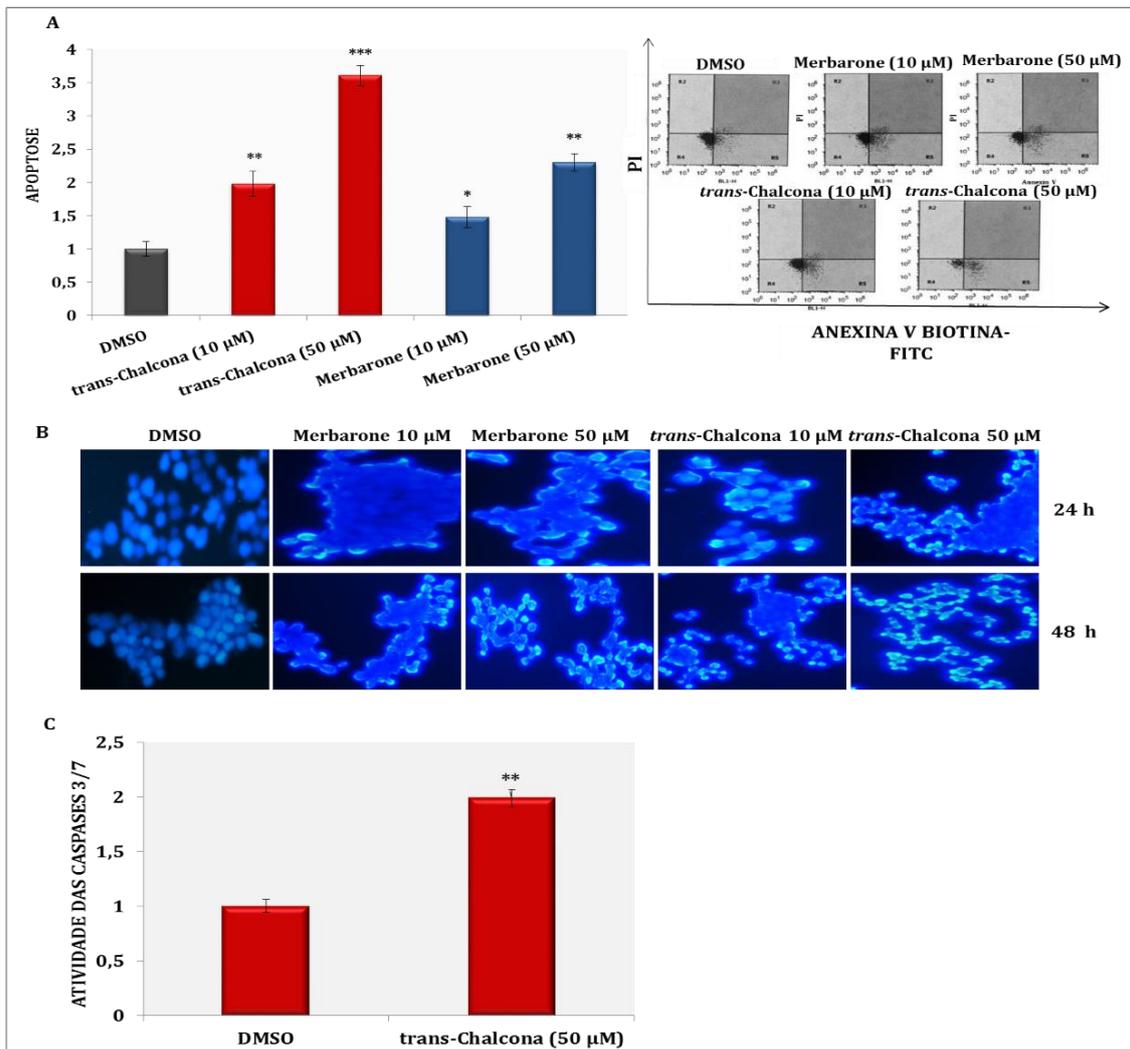


Figura 5. Indução de apoptose em células U2OS tratadas com *trans*-Chalcona e merbarone. **A.** Células foram tratadas com DMSO (0,01%) ou 10 e 50 μ M de *trans*-Chalcona e merbarone por 24 horas, em seguida, a apoptose foi avaliada com dupla marcação (Anexina/PI) através de citometria de fluxo. **B.** Condensação da cromatina foi visualizada por coloração com DAPI após tratamento das células com *trans*-Chalcona e merbarone por 24 e 48 horas. **C.** Células U2OS foram tratadas com 50 μ M de *trans*-Chalcona por 24 horas, e a atividade das caspases 3/7 no lisado celular (50 μ g de proteínas) foi mensurada através da detecção de luminescência. * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$ e *** $p < 0.001$

5.2. Efeito da *trans*-Chalcona e merbarone sobre a expressão de proteínas relacionadas à oncogênese

A fim de elucidar os mecanismos moleculares pelos quais a *trans*-Chalcona e merbarone induziram inibição do crescimento celular e reativação de apoptose na linhagem de osteossarcoma U2OS, foi investigado o efeito destes compostos na expressão das proteínas Sp1, Sp3 e p53, que estão envolvidas no controle da progressão do ciclo celular e apoptose, e na regulação transcricional da topoisomerase 2A.

Verificou-se por meio do Western Blot que a *trans*-Chalcona reduziu significativamente os níveis de proteínas de especificidade, especialmente Sp1, numa concentração de 50 μ M após 24 horas de tratamento nas células U2OS (Fig. 6A e 6B). A *trans*-Chalcona também reduziu os níveis da proteína Sp1 nas linhagens tumorais FaDu, A549 e HCT-116 (Fig. 6C). O merbarone, por outro lado, não reduziu os níveis de proteínas Sp na linhagem U2OS (Fig. 6A e 6B).

As proteínas de especificidade (Sp1, Sp3 e Sp4) são fatores transcricionais superexpressos em diversos tipos de tumores. Estas proteínas, especialmente a Sp1, por meio da regulação de diversos proto-oncogenes e supressores de tumor estão relacionadas com a capacidade de células tumorais escaparem da apoptose, induzirem angiogênese e invadirem outros tecidos (Li e Davie, 2010). Tem sido demonstrado, *in vitro* e *in vivo*, que a redução do fator de transcrição Sp1, tanto pela ação de compostos naturais (Mertens-Talcott *et al.*, 2013) quanto pelo silenciamento via RNA de interferência (Zhao *et al.*, 2013), pode provocar a inibição da proliferação, indução de apoptose e diminuição da resistência (inibição de MDR1) em células e tecidos tumorais (Noratto *et al.*, 2013).

Através de Western Blot, também se identificou que a *trans*-Chalcona aumentou os níveis da proteína supressora de tumor p53 na linhagem U2OS (Fig. 6A e 6B). Na concentração de 50 μ M, a *trans*-Chalcona já foi capaz de incrementar os níveis de p53 após 3 horas de tratamento (Fig. 6B). A *trans*-Chalcona também induziu a p53 nas linhagens FaDu, A549 e HCT-116 (Fig. 6C). O merbarone, assim como a *trans*-Chalcona, também induziu a p53, demonstrando efeito até mesmo na concentração de 10 μ M (Fig. 6A). Também foi comparado o efeito da *trans*-Chalcona sobre os níveis das proteínas Sp1 e p53 com o da 4-hidroxicalcona. A 4-hidroxicalcona demonstrou suprimir Sp1 e induzir a p53 nas células U2OS, porém, a indução da p53 foi consideravelmente menor do que a provocada pela *trans*-Chalcona (Fig. 6D).

A p53 é a mais importante proteína supressora de tumor e normalmente está inativada em células tumorais. A ativação da p53 envolve a estabilização da proteína, aumento da atividade transcricional e ligação ao DNA (Haupt *et al.*, 2003). Uma vez estabilizada, a p53 pode acumular-se no núcleo e desencadear a ativação de diversos genes alvos como p21, 14-3-3, GADD45, Bax, Bid, Puma, Noxa, FAS, PERP e APAF-1, provocando interrupção do ciclo celular, senescência e/ou apoptose, processos fundamentais para a inibição da proliferação de células com danos no DNA e de células tumorais ou com potencial neoplásico (Zuckerman *et al.*, 2009).

Portanto, assim como a supressão da proteína oncogênica Sp1, a ativação da p53 tem importante implicação no bloqueio da oncogênese. O que demonstra que os efeitos aqui encontrados da *trans*-Chalcona (inibição do crescimento, indução de apoptose, supressão da Sp1 e indução da p53) em células U2OS são bastante promissores, visto que ela atuou em dois importantes alvos para desenvolvimento de drogas para terapia anticâncer.

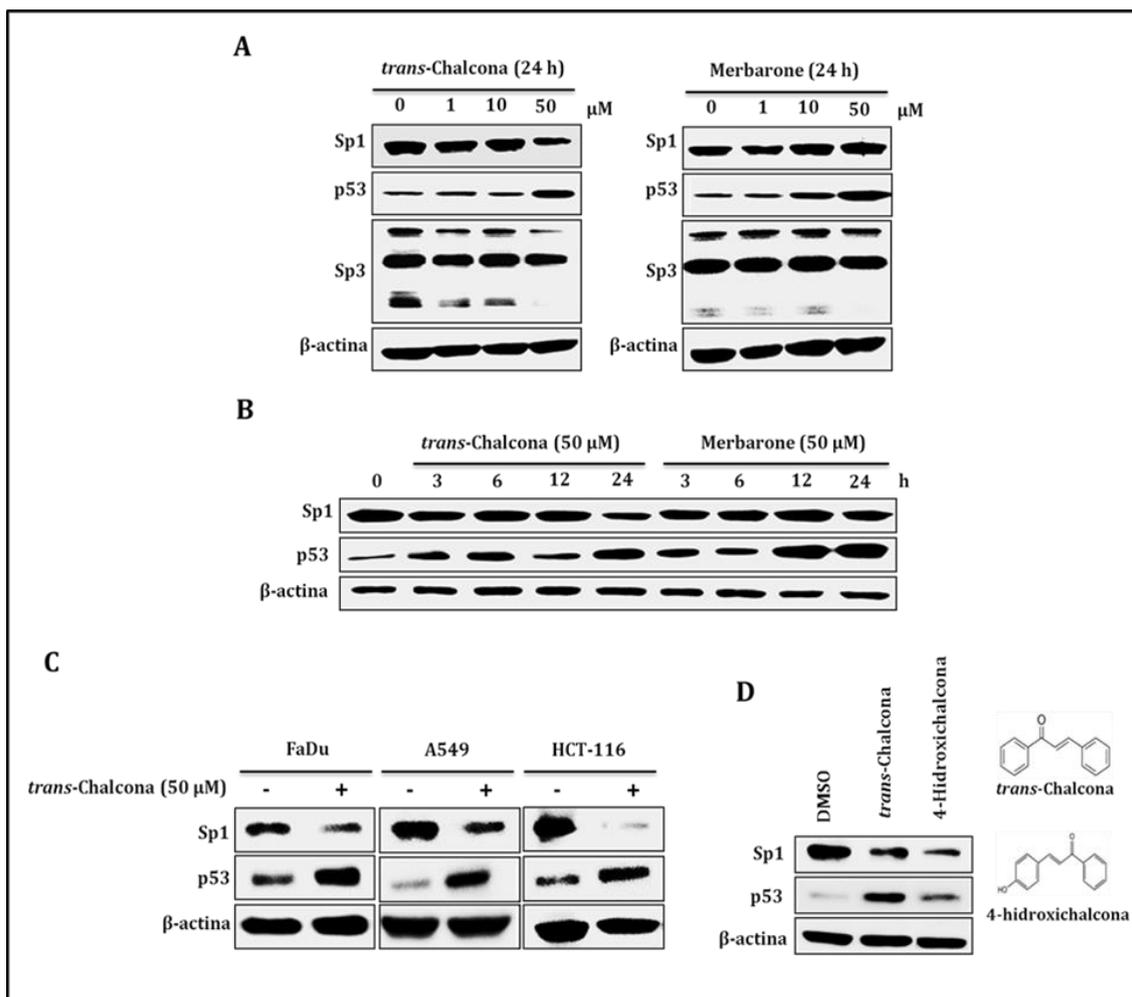


Figura 6. Efeito da *trans*-Chalcona e merbarone sobre os níveis de proteínas Sp1 e p53 em células tumorais humanas. **A e B.** Análises de Western Blot do efeito dose e tempo dependente da *trans*-Chalcona e merbarone sobre a expressão das proteínas Sp1, Sp3 e p53 em células U2OS. **C.** Os níveis de proteínas Sp1 e p53 em diferentes células tumorais foram analisados após o tratamento com 50 μM de *trans*-Chalcona por 24 horas. **D.** As células U2OS foram tratadas durante 24 horas com *trans*-Chalcona e 4-Hidroxi-chalcona e, então, o efeito sobre a expressão de Sp1 e p53 foi comparado.

5.3. Efeito da *trans*-Chalcona e merbarone sobre atividade de promotores regulados por Sp1 e p53

Diante dos resultados obtidos nas análises de Western Blot, ou seja, redução de Sp1 e indução de p53, foi analisado através do ensaio de luciferase o efeito dos tratamentos sobre a atividade de promotores ativados por Sp1 e p53. Para a análise de Sp1, células U2OS foram transfectadas com vetor contendo promotor artificial carregando 6 sítios para ligação de Sp1 (repórter Sp1-Luciferase) ou com repórter Top2A-luciferase contendo dois sítios para Sp1. Em seguida, as células foram tratadas com *trans*-

Chalcona por 24 horas e a atividade dos promotores foram analisadas através da detecção de luminescência. Para a análise de p53, células U2OS foram transfectadas com vetor carregando o promotor natural MDM2 (repórter MDM2-Luciferase), que contém 2 sítios para a ligação de p53 e, posteriormente, as células foram tratadas por 24 horas, tanto com *trans*-Chalcona quanto com merbarone. Conforme o esperado, o tratamento com *trans*-Chalcona ao reduzir os níveis da proteína Sp1, provocou a inibição da atividade dos promotores regulados por Sp1 (Fig. 7A e 7B). Por sua vez, a indução de p53 causada pela *trans*-Chalcona e pelo merbarone, provocou um aumento da atividade do promotor MDM2 regulado por p53 (Fig. 7C). O merbarone apresentou maior efeito sobre a atividade do promotor MDM2, em conformidade com os resultados de Western Blot, nos quais ele apresentou maior indução de p53 em comparação com a *trans*-Chalcona.

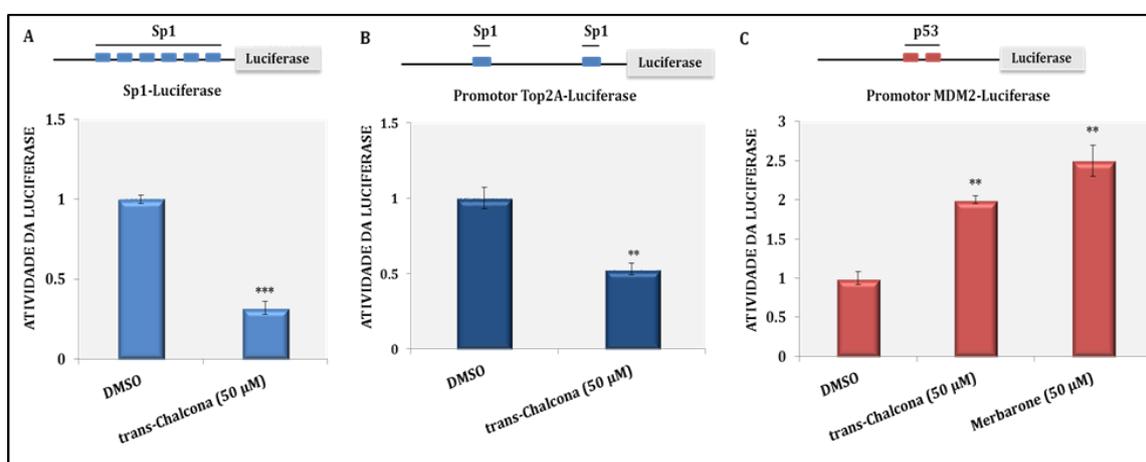


Figura 7. *Trans*-Chalcona e merbarone alteram a atividade de promotores regulados por Sp1 e p53. **A.** O repórter Sp1-Luciferase foi transfectado nas células U2OS após o tratamento com 50 μM de *trans*-Chalcona por 24 horas, a atividade da luciferase foi detectada em luminômetro. **B.** Células U2OS foram transfectadas com vetor contendo o promotor natural Top2A (repórter Top2A-Luciferase) e tratadas durante 24 horas com 50 μM de *trans*-Chalcona e, então, a atividade da luciferase foi analisada. **C.** Após transfecção com repórter MDM2-Luciferase e tratamento durante 24 horas com 50 μM de *trans*-Chalcona e merbarone, a atividade da luciferase foi avaliada. * p<0.05, ** p<0.01 e *** p<0.001. (DMSO vs tratamento).

5.4. Efeito da *trans*-Chalcona e merbarone sobre a transcrição de Sp1 e p53 e seus genes alvo

Análises de RT-PCR foram conduzidas para mensurar os níveis de RNA mensageiros (RNAm) após as células U2OS serem tratadas com 10 e 50 μM de *trans*-Chalcona e merbarone durante 24 horas, com a finalidade de compreender melhor como a *trans*-Chalcona induz e reprime a expressão das proteínas p53 e Sp1, respectivamente.

O merbarone não influenciou significativamente na transcrição de Sp1 e p53 (Fig. 9), por outro lado, a *trans*-Chalcona na concentração de 50 μ M reduziu os níveis do RNAm Sp1, assim como, de Sp3 e Sp4 (Fig. 8). Os efeitos da *trans*-Chalcona e merbarone sobre a transcrição de genes regulados por Sp1 e p53 também foram avaliados. Ambos os compostos induziram a transcrição de p21 e Gadd45a, dois genes que possuem nas suas regiões promotoras sítios de ligação para a proteína p53 e são normalmente ativados transcricionalmente por ela (Riley *et al.*, 2008). Assim, a indução de p21 e Gadd45a observada, provavelmente é consequência do aumento dos níveis da proteína p53 causados tanto pela *trans*-Chalcona quanto pelo merbarone.

A *trans*-Chalcona também reprimiu a transcrição da topoisomerase 2 alfa (Top2A) (Fig. 8). Em estudo anterior, identificou-se que a *trans*-Chalcona reduziu os níveis do RNAm Top2A em células tumorais caninas (Silva *et al.*, 2013). O gene Top2A possui “CG boxes” no seu promotor, a Sp1 pode ligar-se a estes domínios e ativar a sua transcrição (Zhou *et al.*, 2009). Diante disto, é provável que a *trans*-Chalcona tenha inibido a expressão da Top2A ao reduzir os níveis da proteína Sp1. Um dos outros efeitos atribuídos à inibição da Sp1 é a diminuição da capacidade invasiva de células tumorais. Isso parece estar relacionado com a redução na expressão de metaloproteinases, como a MMP-2 (“matrix metalloproteinase-2”) (Guan *et al.*, 2012). Aqui também se observou que o MMP-2 foi outro gene transcricionalmente inibido pela *trans*-Chalcona nas células U2OS (Fig. 8), possivelmente como mais uma consequência da supressão da Sp1.

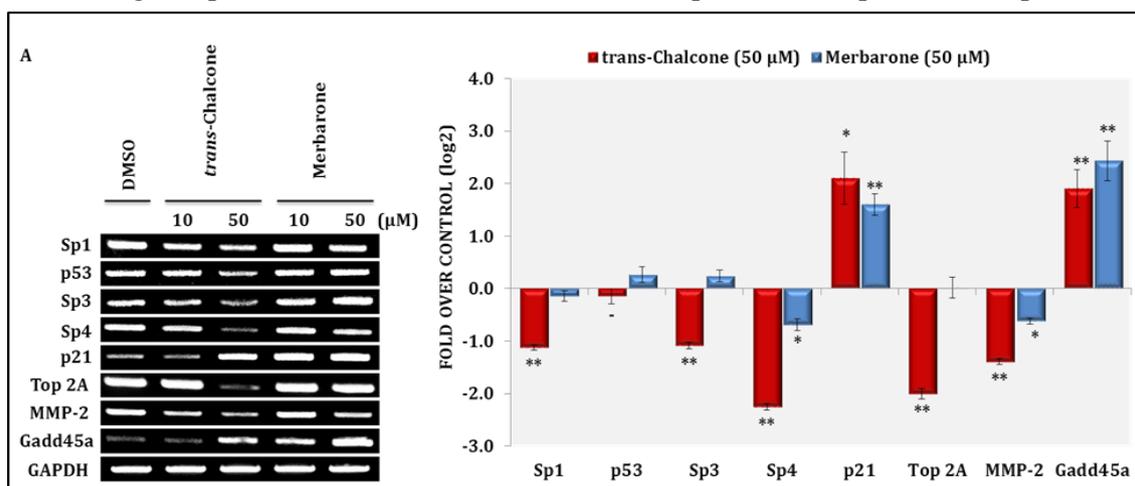


Figura 8. Efeito da *trans*-Chalcona e merbarone sobre os níveis de RNAm Sp1 e p53 e de genes regulados por Sp1/p53. Células U2OS foram tratadas com DMSO ou *trans*-Chalcona nas concentrações indicadas por 24 horas, depois o RT-PCR foi realizado usando primers para Sp1, p53 e seus genes alvos, e para o gene constitutivo GAPDH. Foto representativa de um gel (à esquerda) e análise de densitometria de pelos menos 3 experimentos (à direita). * $p < 0.05$ e ** $p < 0.01$. (DMSO vs tratamento).

5.5. Efeito da *trans*-Chalcona sobre a regulação transcricional de Sp1

Com o intuito de compreender como a *trans*-Chalcona reduzia os níveis do RNAm de Sp1, foram avaliados os seguintes parâmetros: a estabilidade do RNA mensageiro, metilação da região promotora e atividade do promotor Sp1.

Primeiramente, foi analisado se a *trans*-Chalcona reduzia os níveis de Sp1 mediante degradação do RNAm. Para isso, o processo de transcrição nas células U2OS foi bloqueado através do tratamento com actinomicina D e a estabilidade do RNAm mensurada por RT-PCR. Como demonstrado na figura 10A, a *trans*-Chalcona não reduziu a estabilidade do RNAm Sp1, pelo contrário, ela provocou estabilização a partir de 4 horas de co-tratamento com actinomicina D. A *trans*-Chalcona demonstrou pronunciado efeito após 24 horas de tratamento, pois inibiu a total degradação do RNAm de Sp1 promovida pelo tratamento com actinomicina D. A *trans*-Chalcona também induziu a estabilização dos RNAs mensageiros p53 e Sp3 (Fig. 9A).

O promotor de Sp1 contém algumas regiões com dinucleotídeos CpG. DNA metiltransferases podem adicionar grupos metil (CH₃) nas citosinas destes dinucleotídeos, inibindo a transcrição ao dificultar a ligação de fatores de transcrição ao promotor (Blattler e Farnham, 2013). Uma vez que a inibição de Sp1 provocada pela *trans*-Chalcona não se mostrou relacionada com a degradação do RNA mensageiro, foi investigado se estava envolvida com a metilação do DNA na região promotora do gene Sp1, utilizando o método de sequenciamento do DNA convertido com bissulfito de sódio.

As sequências de DNA obtidas a partir das células tratadas e não tratadas com *trans*-Chalcona foram alinhadas com o programa Clustal Omega e comparadas com a sequência referência do promotor Sp1, obtida no EPD (The Eukaryotic Promoter Database), onde todas as citosinas foram trocadas por timinas. Como observado na figura 9B, não ocorreu diferenças significativas nas regiões passíveis de serem metiladas. Todas as citosinas destas posições foram convertidas, indicando que elas não estavam metiladas, ou seja, a *trans*-Chalcona não induziu metilação nesta região do promotor Sp1.

Posteriormente, foi avaliado o efeito da *trans*-Chalcona sobre a atividade do promotor Sp1 através do ensaio de luciferase. As células U2OS foram transfectadas com vetores contendo 3 diferentes promotores Sp1-luciferase, tratadas com 50 µM de *trans*-Chalcona, em seguida, a atividade da luciferase foi mensurada através da detecção da luminescência. Como demonstrado na figura 10C, a *trans*-Chalcona inibiu a atividade dos promotores Sp1. O promotor Sp1 contém sítios de ligação para a própria proteína

Sp1. Já foi demonstrado que o gene Sp1 é positivamente autorregulado, ou seja, proteínas Sp1 podem ligar-se ao promotor e ativar a sua transcrição (Nicolas *et al.*, 2001; Nicolas *et al.*, 2003), por isso, a inibição dos promotores Sp1, provocada pela *trans*-Chalcona, deve ser resultado da diminuição nos níveis da proteína Sp1. Foi possível observar que a *trans*-Chalcona provocou maior inibição do promotor que contém 8 sítios para Sp1, em relação aos promotores que possuem 2 ou nenhum sítio para a ligação da Sp1 (Fig. 9C).

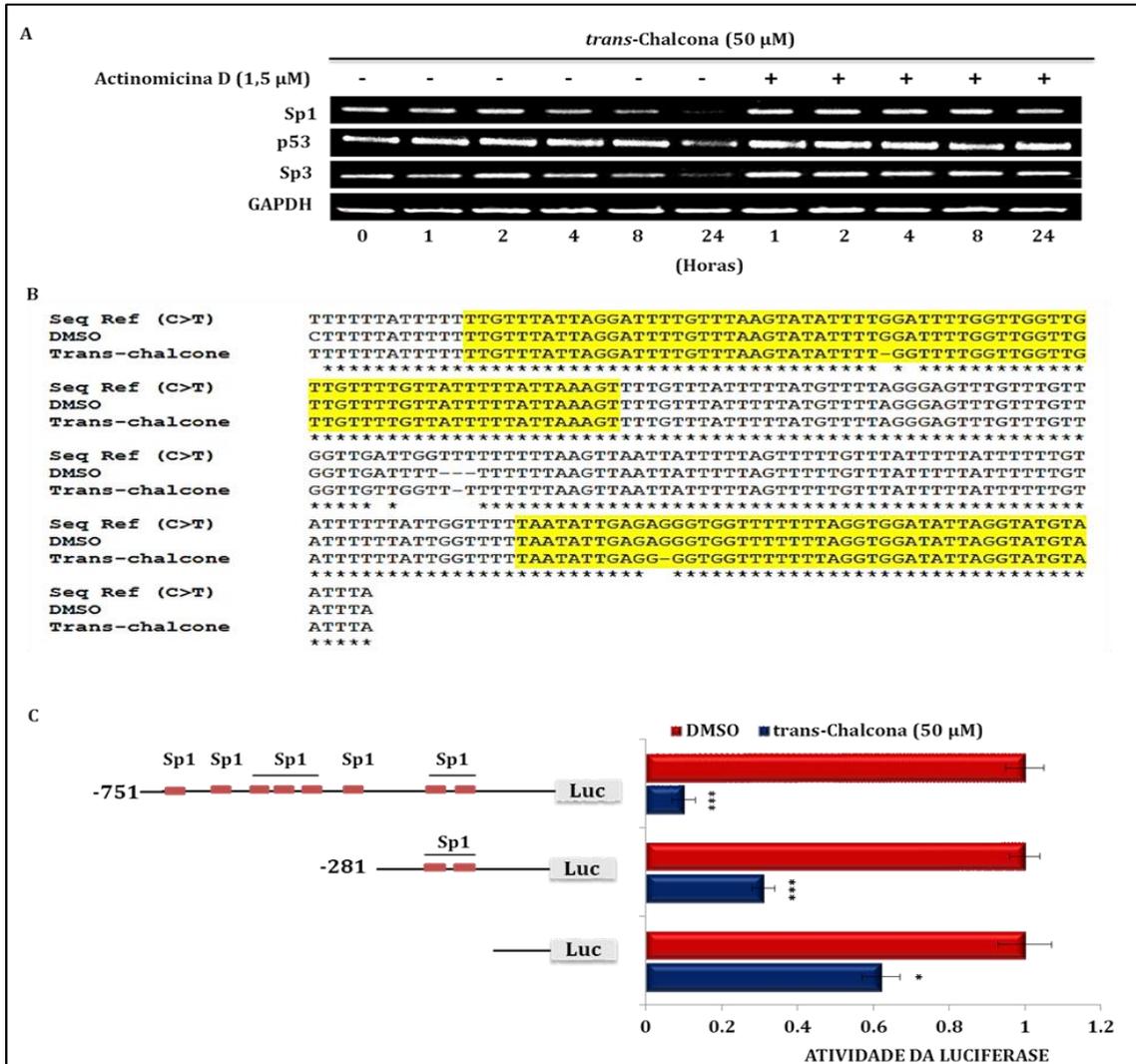


Figura 9. Efeito da *trans*-Chalcona sobre a regulação transcricional de Sp1. **A.** Células U2OS foram pré-tratadas com actinomicina D, depois co-tratadas com *trans*-Chalcona. O RNA foi isolado em diferentes tempos e RT-PCR foi realizado para mensurar o efeito sobre a estabilidade do RNAm. **B.** O DNA extraído de células tratadas com 50 μM de *trans*-Chalcona por 24 horas foi convertido com bissulfito, amplificado com primers específicos para o promotor Sp1 e, por fim, sequenciado. **C.** Células U2OS foram transfectadas com promotores Sp1-Luciferase e tratadas durante 24 horas com 50 μM de *trans*-Chalcona e, então, a atividade da luciferase foi analisada. * $p < 0.05$ e $p < 0.001$. (DMSO vs tratamento)

5.6. Efeito pós-traducional da *trans*-Chalcona sobre as proteínas Sp1 e p53

Também se verificou o efeito pós-traducional da *trans*-Chalcona sobre a expressão de Sp1 e p53. Para isso, as células U2OS foram pré-tratadas por 12 horas com *trans*-Chalcona e, em seguida, a síntese de proteínas foi bloqueada pelo tratamento com cicloheximida por diferentes períodos de tempo. Conforme mostrado na figura 11A, a proteína Sp1 foi estável ao tratamento apenas com cicloheximida, mas na presença de *trans*-Chalcona mais cicloheximida ela foi rapidamente degradada, demonstrando que a *trans*-Chalcona diminui a estabilidade da proteína Sp1. A proteína p53, por outro lado, foi extremamente instável ao tratamento apenas com cicloheximida, sendo degradada com apenas 1-3 horas de tratamento. Entretanto, na presença de *trans*-Chalcona, a p53 não foi degradada nem mesmo após 24 horas de exposição à cicloheximida, indicando que a *trans*-Chalcona provocou uma forte estabilização da proteína p53 (Fig. 10A). Esses resultados sugerem que a *trans*-Chalcona pode regular a Sp1 e p53 à nível pós-traducional.

A degradação de proteínas é predominantemente mediada pelo proteossoma 26S. Por isso, foi analisado o efeito da *trans*-Chalcona sobre a Sp1 e p53, após as células U2OS serem pré-tratadas com três diferentes inibidores do proteossoma: MG132, epoxomicina e lactacistina. A redução de Sp1 causada pela *trans*-Chalcona não foi inibida por nenhum dos inibidores testados (Fig. 10B), o que indica que a degradação de Sp1 induzida pela *trans*-Chalcona é independente do proteossoma. Contrariamente, o efeito da *trans*-Chalcona sobre a p53 foi influenciado pelo tratamento com os inibidores do proteossoma (Fig. 10B), sugerindo que este efeito é mediado pela ação sobre o proteossoma.

A p53 pode sofrer diversas modificações pós-traducionais, como a fosforilação, que alteram sua estabilidade (Gu e Zhu, 2012). Assim, o efeito da *trans*-Chalcona sobre a fosforilação da p53 foi avaliado por Western Blot, utilizando anticorpos fosfo-p53. Foi possível detectar fosforilação da serina 392 na p53 após o tratamento com *trans*-Chalcona (Fig. 10C). A fosforilação nesse resíduo é controversa, há relatos que ela é a primeira etapa para estabilização da p53, entretanto, alguns trabalhos sugerem que a fosforilação na serina 392 é apenas uma consequência da estabilização da p53, podendo ser causada por qualquer estímulo que provoque a indução da proteína p53 (Cox e Meek, 2010). Por fim, foi analisado se a estabilização da p53 induzida pela *trans*-Chalcona estava relacionada com a inibição da atividade do proteossoma e constatou-se que, o tratamento

com *trans*-Chalcona, reduziu as atividades proteolíticas quimi tripsina, tripsina e caspase do proteossoma (Fig. 10D).

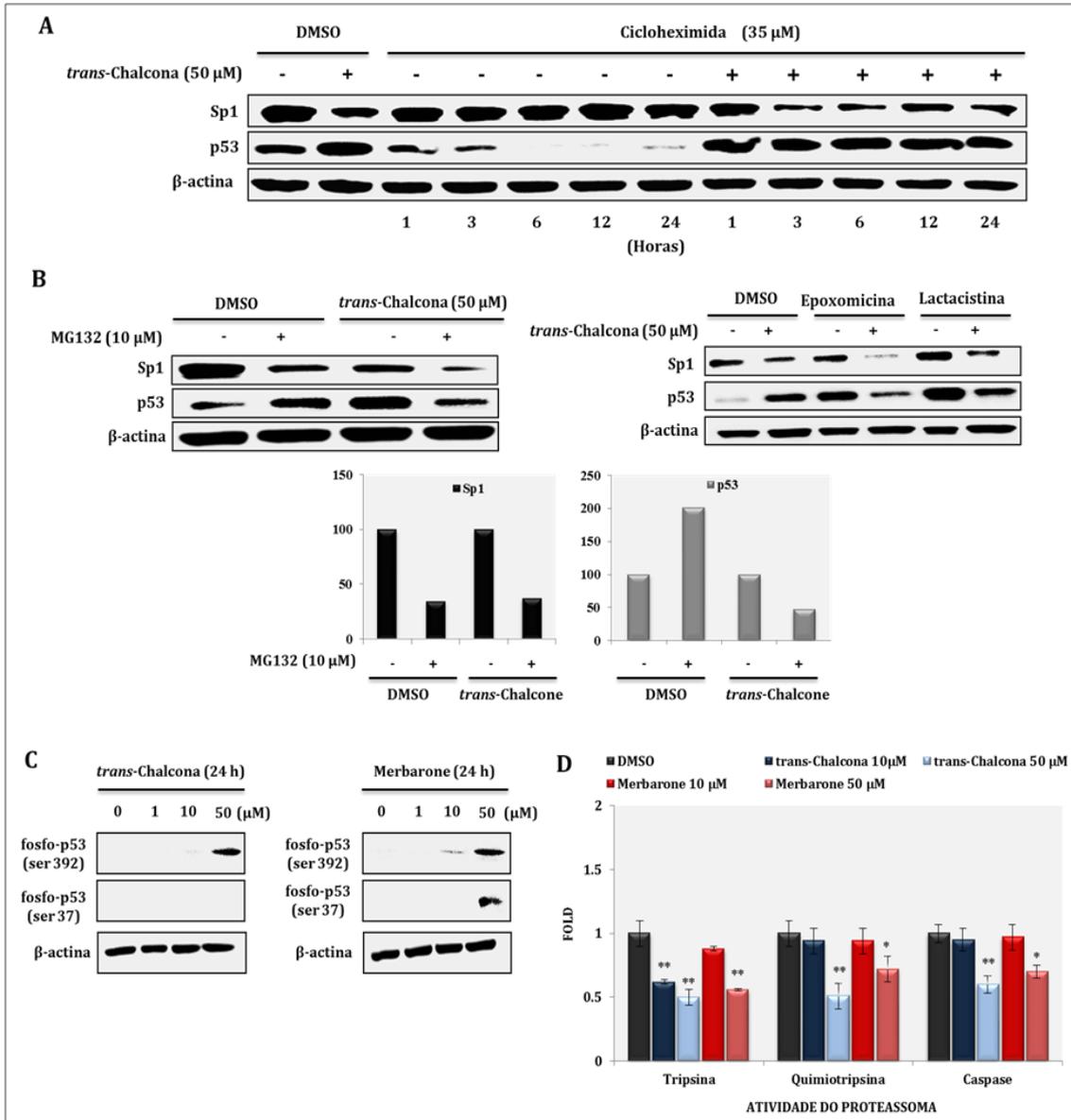


Figura 10. Efeito da *trans*-Chalcona sobre a regulação pós-traducional de Sp1 e p53. **A.** Células U2OS foram pré-tratadas com *trans*-Chalcona (50 μ M) por 12 horas, seguido do co-tratamento com cicloheximida. Os lisados de células foram obtidos em diferentes tempos e WB foi realizado para mensurar a degradação de Sp1 e p53. **B.** Células U2OS foram pré-tratadas com inibidores do proteossoma: MG132 (10 μ M), epoxomicina (1 μ M) e lactacistina (5 μ M) por 1 hora e então co-tratadas com *trans*-Chalcona por 24 horas. **C.** Os lisados de células U2OS tratadas com *trans*-Chalcona e merbarone foram submetidos à WB com anticorpos fosfo-p53. **D.** 50 μ g do lisado de células tiveram as 3 atividades do proteossoma 20S mensuradas por detecção de luminescência. * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$ e *** $p < 0.001$. (DMSO vs tratamento).

5.7. Efeito da superexpressão da Sp1 e silenciamento da p53 na ação da *trans*-Chalcona

Com o propósito de confirmar se os efeitos moleculares da *trans*-Chalcona estavam realmente associados com a inibição de Sp1 e indução da p53, realizou-se a superexpressão e silenciamento da Sp1 e p53, respectivamente. As células U2OS foram transfectadas para superexpressar a proteína Sp1 e tratadas com *trans*-Chalcona. Em seguida, análises de RT-PCR foram realizadas para avaliar a expressão de genes regulados pela Sp1 (Top2A e Sp3). Como demonstrado na figura 11A, a superexpressão da Sp1 restaurou parcialmente a expressão de Top2A e Sp3 na presença da *trans*-Chalcona, indicando que a Sp1 pode ter um papel na inibição da transcrição de Top2A e Sp3 causada pela *trans*-Chalcona. Também transfectou-se as células U2OS com vetor expressando shRNA para p53, com intuito de silenciar a expressão da p53. O silenciamento da p53 reduziu a indução do promotor MDM2-luciferase provada pela *trans*-Chalcona (Fig. 11B), demonstrando que o efeito da *trans*-Chalcona sobre o promotor MDM2 é mediado pela p53.

Tanto o silenciamento da p53 quanto a superexpressão da Sp1 reduziram o efeito da *trans*-Chalcona sobre o promotor Top2A (Fig. 11C), indicando que a inibição da transcrição da Top2A induzida pela *trans*-Chalcona é dependente da ação sobre p53/Sp1. Também foi avaliado o efeito da superexpressão da Sp1 e silenciamento da p53 na citotoxicidade induzida pela *trans*-Chalcona. Após a transfecção, as células foram tratadas com *trans*-Chalcona por 48 horas e então a viabilidade celular mensurada por MTT. Como mostrado na figura 11D, a superexpressão da Sp1 suprimiu parcialmente a citotoxicidade da *trans*-Chalcona, por outro lado, a inibição da p53 não afetou o efeito da *trans*-Chalcona. Isto indica que a citotoxicidade da *trans*-Chalcona sobre as células U2OS pode ser pelo menos em parte dependente da Sp1.

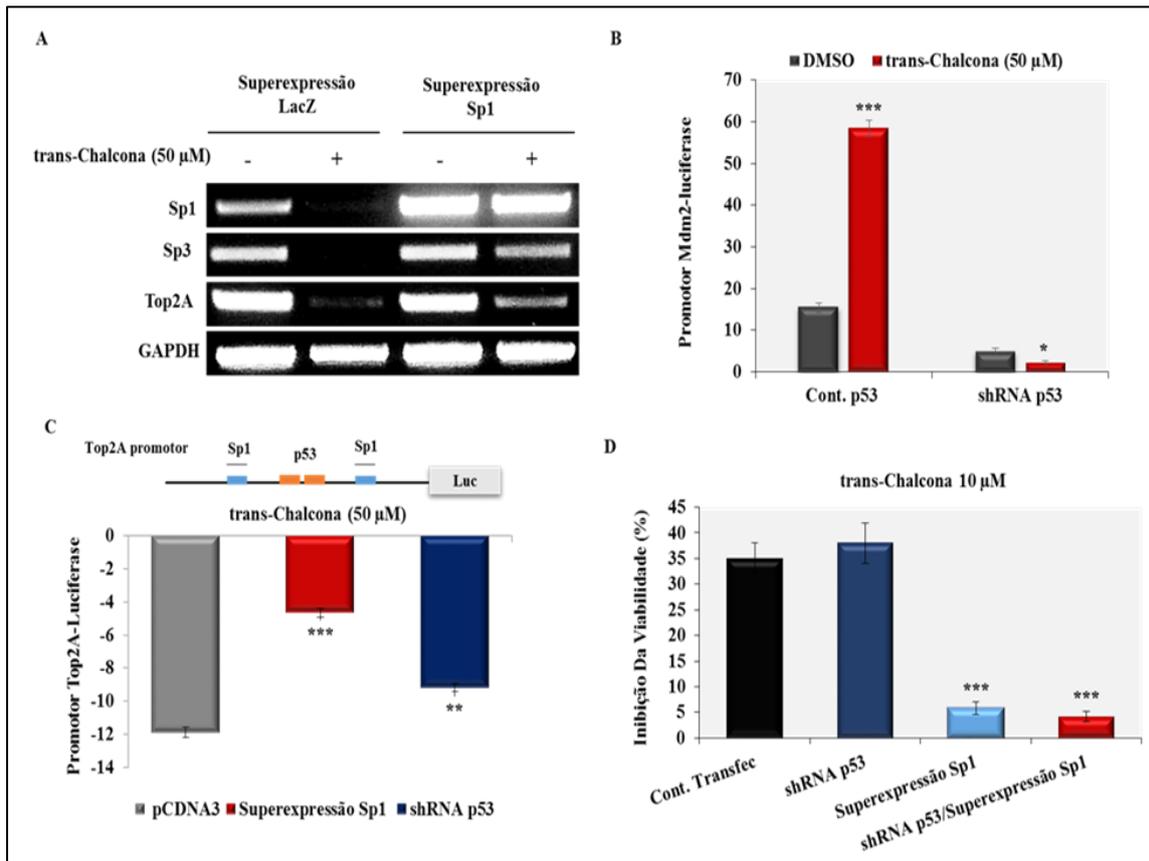


Figura 11. Superexpressão da Sp1 e silenciamento da p53 afetam a ação da *trans*-Chalcona. **A.** Células U2OS foram transfectadas com vetores expressando Sp1 ou LacZ, seguido do tratamento com 50 μM de *trans*-Chalcona por 24 horas. Em seguida, o RNA foi isolado e análises de RT-PCR realizadas. **B.** Vetores expressando shRNA controle ou shRNA p53, foram co-transfectados com o vetor expressando MDM2-luciferase nas células U2OS e a atividade da luciferase foi mensurada após o tratamento com *trans*-Chalcona (50 μM) por 24 horas. **C.** Vetores expressando Sp1 ou shRNA p53, foram co-transfectados com o vetor expressando promotor Top2A-luciferase nas células U2OS e a atividade da luciferase foi mensurada após o tratamento com *trans*-Chalcona (50 μM) por 24 horas. **D.** Após a superexpressão da Sp1 e silenciamento da p53, as células U2OS foram tratadas com 10 μM de *trans*-Chalcona por 24 horas e, então, a viabilidade celular foi avaliada pelo ensaio de MTT. * p<0.05 e *** p<0.001.

5.8. RNA-seq: efeito da *trans*-Chalcona sobre o transcriptoma da linhagem U2OS

A análise do transcriptoma foi realizada por sequenciamento de RNA (RNA-seq). As células U2OS foram tratadas com 50 μM de *trans*-Chalcona durante 24 horas. Após o tratamento, o RNA foi isolado e submetido ao sequenciamento de nova geração.

Um total de 17322 genes tiveram a expressão detectada e foram analisados quanto à expressão diferencial. Tomando como base uma diferença de expressão de pelo menos 100% (“fold change” ≥ 2), 3233 genes foram modulados significativamente, sendo que

1521 foram induzidos e 1712 genes foram reprimidos pelo tratamento com *trans*-Chalcona.

Análises de RT-PCR foram realizadas para validar a modulação promovida pela *trans*-Chalcona de 14 genes detectados no experimento de RNA-seq. Conforme demonstrado na figura 12, os resultados de RT-PCR demonstraram grande concordância com aqueles obtidos através do RNA-seq.

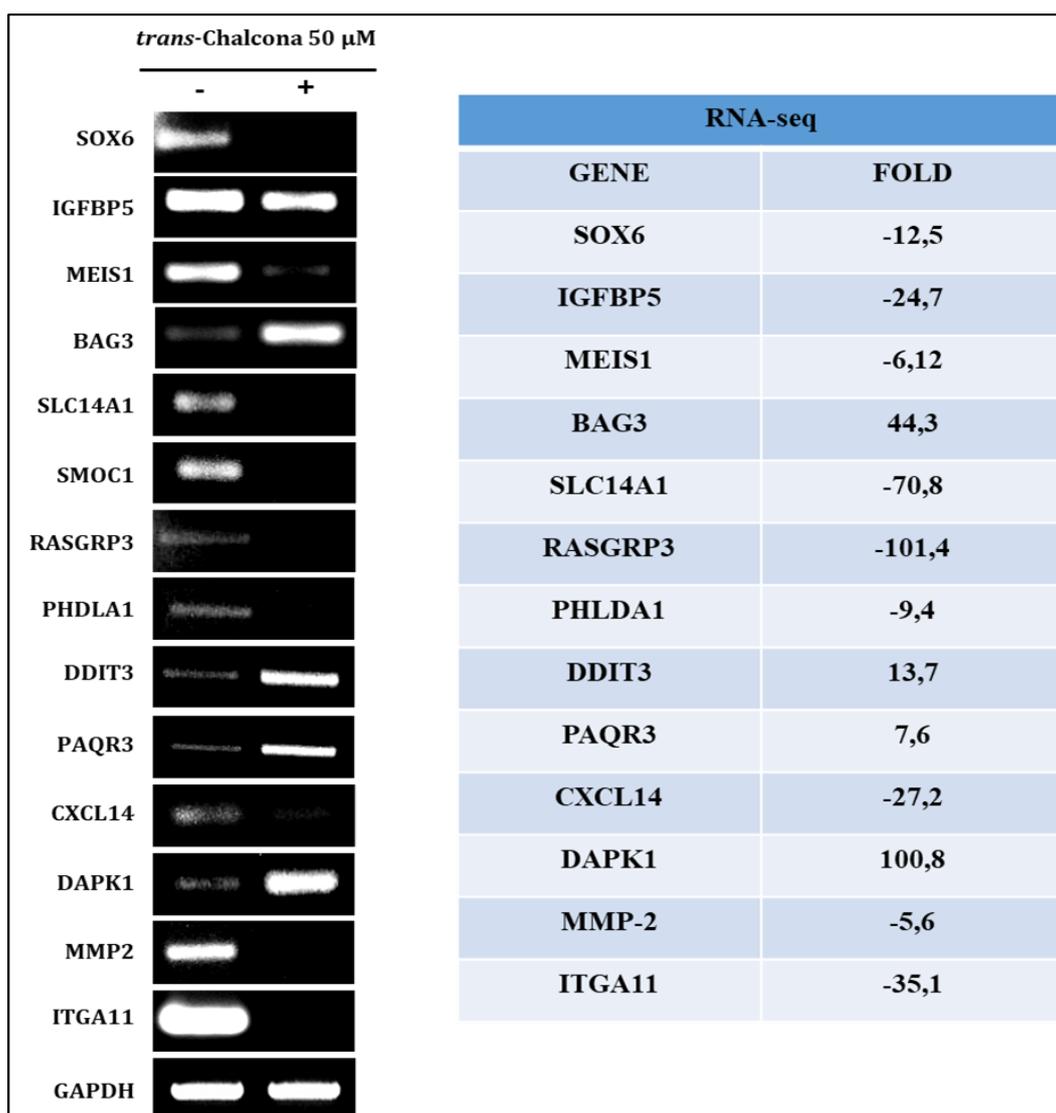


Figura 12. Validação por RT-PCR de genes modulados pela *trans*-Chalcona, identificados no experimento de RNA-Seq. Células U2OS foram tratadas com 0,01 % de DMSO ou 50 μ M de *trans*-Chalcona por 24 horas, depois o RT-PCR foi realizado usando primers para cada gene e para o gene constitutivo GAPDH.

5.9. RNA-seq: Análise funcional e de enriquecimento de vias

Os 3233 genes modulados pela *trans*-Chalcona foram categorizados de acordo com ontologia gênica (OG) usando a ferramenta “EnrichR” para processo biológico (PB), componente celular (CC) e função molecular (FM).

Para os genes induzidos por *trans*-Chalcona, as cinco principais categorias de cada termo de OG são apresentadas na tabela 1. Quanto ao processo biológico, a maioria das categorias são relacionadas ao controle do ciclo celular e transcrição do DNA. Em termos de função biológica, as categorias estão relacionadas principalmente aos processos de ligação a proteínas, ao ATP e ao DNA/RNA. Em relação aos componentes celulares, os genes modulados positivamente foram agrupados predominantemente em categorias ligadas ao núcleo celular.

Análise de enriquecimento de vias dos genes induzidos por *trans*-Chalcona utilizando as ferramentas “Gene List Analysis” e KEGG Mapper-Search Pathway”, indicou o enriquecimento de vias relacionadas ao ciclo celular, apoptose e p53 (tabela 2). Estas últimas, destacam-se, uma vez que a indução de apoptose em células U2OS provocada pela *trans*-Chalcona é parcialmente dependente da estabilização da p53.

Tabela 1. Os cinco principais termos da análise de OG para os genes induzidos pela *trans*-Chalcona em linhagem U2OS. (PB – processo biológico, FM – função molecular e CC – componente celular).

	Nome	Nº Genes	Exemplos de genes	p-value
PB	<i>mitotic cell cycle</i>	82	CDKN1A, CDC6, CDC45	3.4e ⁻¹³
	<i>mitotic cell cycle phase transition</i>	61	CDKN1A, CDC6, CDC45	2.3e ⁻¹¹
	<i>cell cycle phase transition</i>	61	CDKN1A, CDC6, CDC45	3.4e ⁻¹¹
	<i>DNA-templated transcription, termination</i>	30	ZNF473, SLBP, CSTF3	5.3e ⁻¹⁰
	<i>cell cycle G1/S phase transition</i>	40	CDKN1A, CDC6, CDC45	9.1e ⁻¹⁰
FM	<i>unfolded protein binding</i>	27	TOMM20, HSPD1, DNAJB1	2.0e ⁻⁷
	ATP binding	166	EIF4A2, DGKE, EIF4A3	9.5e ⁻⁷
	<i>DNA-dependent ATPase activity</i>	20	POLQ, RFC3, MCM7	1.8e ⁻⁵
	<i>sequence-specific DNA binding RNA polymerase II transcription factor activity</i>	55	ATF1, CSRN1, BTG2	4.5e ⁻⁵
	<i>mRNA binding</i>	23	PIWIL2, SLBP, RBM25	6.3e ⁻⁵
CC	<i>Nucleoplasm</i>	182	ATF1, CCNT2, CCNT1	2.0e ⁻²¹
	<i>Nucleolus</i>	231	ATF1, EIF4A3, PNN, MYC	9.0e ⁻¹⁷
	<i>Cytosol</i>	278	EIF4A2, EIF4A3, DIXDC1	7.4e ⁻⁹
	<i>Spliceosomal complex</i>	29	ZCCHC8, RBM25, EIF4A3	4.4e ⁻⁵
	<i>Microtubule organizing center</i>	56	MLF1IP, TNFAIP3, BRCA2	3.7e ⁻⁴

Tabela 2. As cinco principais vias obtidas pela análise de enriquecimento para os genes induzidos pela *trans*-Chalcona em linhagem U2OS.

Via	Nome	Nº Genes	Exemplo de genes	p-value
KEGG pathway	<i>Spliceosome</i>	28	BUD31, DHX15, PRPF3, HSPA1L	5.4e ⁻⁵
	<i>Cell cycle</i>	26	CDC14A, MDM2, GADD45a, GADD45b,	9.5e ⁻⁵
	<i>TNF signaling pathway</i>	24	FOS, FAS, JUN, CREB5	1.0e ⁻⁴
	<i>p53 signaling pathway</i>	18	BBC3, GADD45a, GADD45b, CDKN1A	1.1e ⁻⁴
Panther pathway	<i>Epstein-Barr virus infection</i>	33	CD44, MDM2, JUN, XPO1	7.2e ⁻⁴
	<i>p53 pathway</i>	19	CDKN1A, GADD45B, GADD45A, TP73	1.5e ⁻⁴
	<i>Apoptosis signaling pathway</i>	22	JUN, HSPA1L, FOS, BAG3	6.4e ⁻⁴

Os genes regulados negativamente pela *trans*-Chalcona, em termos de processo biológico, foram categorizados em grupos relacionados principalmente com adesão celular e matriz extracelular (tabela 3). Exemplo de genes desta categoria são o L1CAM e GAS6, que estão relacionados com à quimiorresistência, migração, proliferação e evasão de apoptose de células tumorais, e encontram-se superexpressos em osteossarcoma (Han *et al.*, 2013; Chong *et al.*, 2014). Em termos de componentes celulares, os genes foram agrupados predominantemente em categorias referentes à matriz extracelular. Dentre eles, pode-se citar o gene LAMA4, cuja a alta expressão está relacionada com o potencial invasivo e metastático de tumores (Huang *et al.*, 2008). Outro gene interessante dentro dessa categoria é o SERPINE2, que apresenta elevada expressão em tecidos de osteossarcoma e está ligado à proliferação celular e resistência às drogas (Mao e Wang, 2016). Como demonstrado na tabela 3, as cinco categorias principais de função molecular estão relacionadas com a atividade de ligação e atividade quinase. Pode-se destacar os genes PDFGB, WNT5A, ITGAV e FZD1, cuja superexpressão em osteossarcoma está relacionada com a proliferação, migração celular, angiogênese e sobrevivência (Kubo *et al.*, 2008; Liu *et al.*, 2014; Zhang *et al.*, 2014; Luo *et al.*, 2016).

Como apresentado na tabela 4, a análise de enriquecimento de vias dos genes reprimidos pela *trans*-Chalcona, revelou a associação destes genes com vias importantes nos processos de migração, invasão e metástase, tais como, as vias de sinalização da catenina e WNT, que são consideradas potenciais alvos para terapia anticâncer (Mohammed *et al.*, 2016; Yang *et al.*, 2016). A desregulação da via WNT/catenina desempenha um papel relevante no desenvolvimento de cânceres ósseos (Cai *et al.*, 2014; Lin *et al.*, 2014) e tem sido demonstrado que, a inibição dessa via, pode reduzir o potencial proliferativo e invasivo de osteossarcoma, assim como, aumentar a sensibilidade aos tratamentos quimioterápicos (Ma *et al.*, 2013; Liu *et al.*, 2015).

Tabela 3. Os cinco principais termos da análise de OG para os genes reprimidos pela *trans*-Chalcona em linhagem U2OS. (PB – processo biológico, FM – função molecular e CC – componente celular).

	Nome	Nº Genes	Exemplos de genes	p-value
PB	<i>homophilic cell adhesion via plasma membrane adhesion molecules</i>	70	PCDHGB7, CLSTN2, CLSTN3	3.4e ⁻¹³
	<i>cell-cell adhesion via plasma-membrane adhesion molecules</i>	73	PCDHGB7, CLSTN2, CLSTN3	2.3e ⁻¹¹
	<i>cell-cell adhesion</i>	73	PCDHGB7, CLSTN2, CLSTN3	3.4e ⁻¹¹
	<i>extracellular matrix organization</i>	73	PTPRS, ITGB3, TNC	5.3e ⁻¹⁰
	<i>extracellular structure organization</i>	73	PTPRS, ITGB3, ELN	9.1e ⁻¹⁰
FM	<i>Calcium ion binding</i>	125	CLSTN2, CLSTN3, CELSR2	2.0e ⁻⁷
	<i>Growth factor binding</i>	32	NRP1, PDGFB, LTBP2	9.5e ⁻⁷
	<i>Transmembrane receptor protein kinase activity</i>	23	EPHA5, PDGFRB, PDGFRA	1.8e ⁻⁵
	<i>Wnt-protein binding</i>	12	FZD1, FZD3, WNT5A	4.5e ⁻⁵
	<i>Transforming growth factor beta binding</i>	9	TGFB3, ITGAV, LTBP3	6.3e ⁻⁵
CC	<i>Extracellular matrix</i>	72	LGALS3BP, SERPINE2, TNC	2.0e ⁻²¹
	<i>Golgi membrane</i>	58	ARF3, NUMA1, SPPL2B	9.0e ⁻¹⁷
	<i>Extracellular matrix part</i>	30	COL11A1, LAMA4, ELN	7.4e ⁻⁹
	<i>Proteinaceous extracellular matrix</i>	45	LGALS3BP, TNC, LTBP2,	4.4e ⁻⁵
	<i>Cell surface</i>	64	NRP1, CD40, ITGB3	3.7e ⁻⁴

Tabela 4. As cinco principais vias obtidas pela análise de enriquecimento para os genes reprimidos pela *trans*-Chalcona em linhagem U2OS.

Via	Nome	Nº Genes	Exemplo de genes	p-value
KEGG pathway	<i>Axon guidance</i>	31	EPHA4, EPHA5, L1CAM, PAK3	4.3e ⁻⁷
	<i>Pathways in cancer</i>	58	CEBPA, SOS2, WNT5A, MMP2	2.6e ⁻⁵
	<i>Glycosaminoglycan biosynthesis</i>	10	CHPF, CHPF2, CHST12, UST	3.7e ⁻⁵
	<i>Focal adhesion</i>	35	BCAR1, SOS2, ITGA11, SRC	6.2e ⁻⁵
	<i>Basal cell carcinoma</i>	16	FZD1, WNTB5, WNT5A, WNT6	4.8e ⁻⁵
Panther pathway	<i>ECM-receptor interaction</i>	18	ITGAV, ITGA4, FN1, ITGA11	3.6e ⁻⁴
	<i>Cadherin signaling pathway</i>	64	FAT1, FAT3, CDH11, GSK3B	5.6e ⁻¹⁶
	<i>Wnt signaling pathway</i>	79	ARID1A, WNT6, BCL9, EDN1	1.19e ⁻¹¹

5.10. RNA-seq: genes controlados por p53/Sp1 modulados pela *trans*-Chalcona

Inicialmente, foi avaliada por RT-PCR, a expressão de genes alvos da p53 e Sp1 e observou-se que p21 e Gadd45a foram induzidos, enquanto Top2A e MMP-2 foram reprimidos pela *trans*-Chalcona (Fig. 8), em concordância com a indução de p53 e repressão de Sp1 causadas pela *trans*-Chalcona (Fig. 6). Na análise de RNA-seq, foram encontrados os mesmos resultados, ou seja, indução de p21 e Gadd45a e repressão de Top2A e MMP-2. Os níveis de modulação (fold) destes e de outros genes regulados por p53 e Sp1 e que possuem relação com o processo de carcinogênese são apresentadas na tabela 5.

Tabela 5. Nível de modulação (fold) induzido pela *trans*-Chalcona de genes regulados por p53/Sp1 que possuem envolvimento no surgimento, sobrevivência e proliferação de células tumorais.

Gene ID	Nome	Fold
Hsp40 (DNAJB1)	<i>DnaJ heat shock protein family (Hsp40) member B1</i>	58.63
ATF3	<i>activating transcription factor 3</i>	25.9
PUMA	<i>BCL2 binding component 3 (BBC3)</i>	2.73
p21	<i>cyclin-dependent kinase inhibitor 1A (CDKN1A)</i>	9.93
NOXA	<i>phorbol-12-myristate-13-acetate-induced protein 1 (PMAIP1)</i>	2.12
GADD45A	<i>growth arrest and DNA-damage-inducible, alpha</i>	31.64
FAS	<i>Fas cell surface death receptor</i>	6.07
TP63	<i>tumor protein p63</i>	2.22
TP73	<i>tumor protein p73</i>	2.32
DR5	<i>tumor necrosis factor receptor superfamily, member 10b</i>	2.32
p19	<i>cyclin-dependent kinase inhibitor 2D (CDKN2D)</i>	3.28
PIDD	<i>p53-induced death domain protein 1</i>	2.59
MMP2	<i>matrix metalloproteinase 2</i>	-5.6
MMP14	<i>matrix metalloproteinase 14</i>	-2.4
FGF1	<i>fibroblast growth factor 1 (acidic)</i>	-4
PDGFC	<i>platelet derived growth factor C</i>	-2.85
PDGFRA	<i>platelet-derived growth factor receptor, alpha polypeptide</i>	-25.1
PDGFRB	<i>platelet-derived growth factor receptor, beta polypeptide</i>	-5.06
PDGFB	<i>platelet-derived growth factor beta polypeptide</i>	-4.1
ERBB2	<i>erb-b2 receptor tyrosine kinase 2</i>	-2.95
TGFA	<i>transforming growth factor, alpha</i>	-2.5
RRM2B	<i>ribonucleotide reductase M2 B (TP53 inducible)</i>	2.76
JUND	<i>jun D proto-oncogene</i>	-2.4
FOS	<i>FBJ murine osteosarcoma viral oncogene homolog</i>	16.55
IGF2	<i>insulin-like growth factor 2</i>	-2.2
e-cadherin	<i>cadherin 1, type 1, E-cadherin (epithelial) (CDH1)</i>	11.7
ITGAV	<i>integrin, alpha V</i>	-2.28
TIMP1	<i>TIMP metalloproteinase inhibitor 1</i>	-2
PIK3CA	<i>phosphatidylinositol-4,5-bisphosphate 3-kinase, subunit alpha</i>	-2.1
MAP2K6	<i>mitogen-activated protein kinase kinase 6</i>	-16.6
MAPK14	<i>mitogen-activated protein kinase 14</i>	-2

A análise de RNA-seq revelou que os genes Hsp40 e ATF3 foram altamente induzidos pela *trans*-Chalcona. Estes resultados foram confirmados por RT-PCR e por Western Blot (Fig. 13).

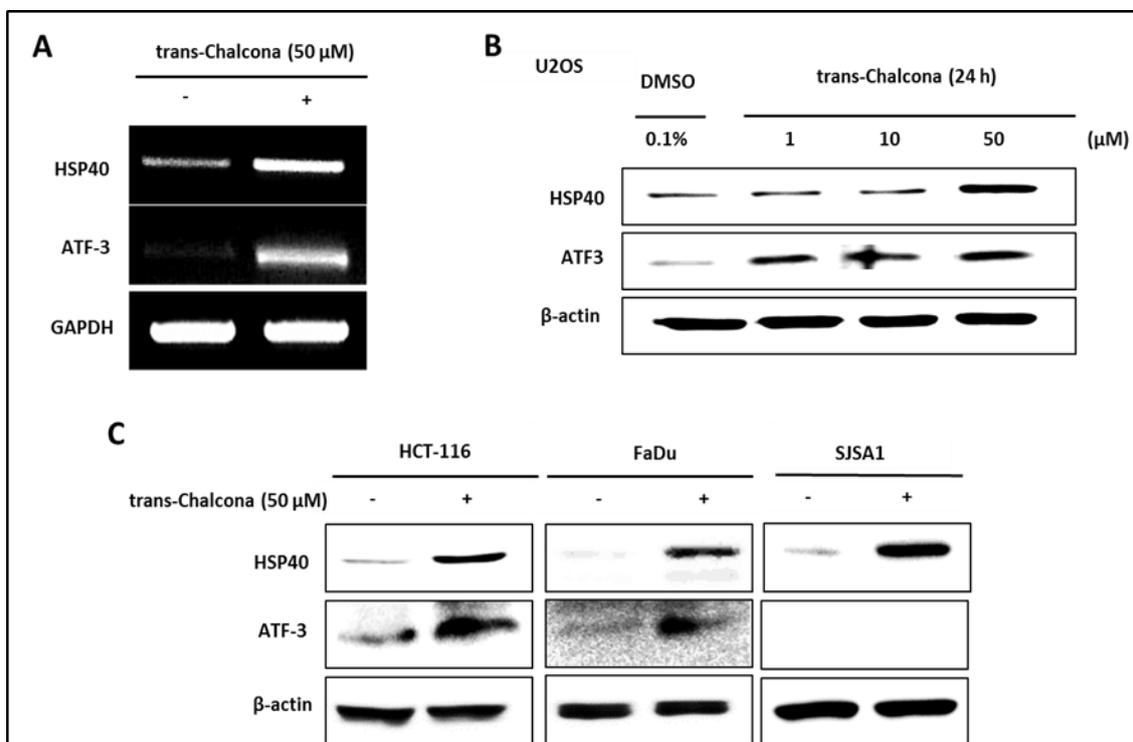


Figura 13. Efeito da *trans*-Chalcona sobre a expressão de Hsp40 e ATF3 em células tumorais humanas. **A.** Células U2OS foram tratadas com *trans*-Chalcona na concentração indicada por 24 horas, depois o RT-PCR foi realizado usando primers para Hsp40, ATF3 e para o gene constitutivo GAPDH. **B.** Células U2OS foram tratadas com *trans*-Chalcona por 24 horas e então a expressão das proteínas Hsp40 e ATF3 foi avaliada por Western Blot. **C.** Os níveis de proteínas Hsp40 e ATF3 em diferentes células tumorais foram analisados após o tratamento com 50 μM de *trans*-Chalcona por 24 horas

A regulação de p53 ocorre principalmente a nível de estabilidade da proteína dentro de uma rede de regulação, em que a p53 sofre poliubiquitinação mediada pelo seu principal inibidor, a proteína MDM2 e, subsequentemente, degradação pelo proteossoma (Shadfan *et al.*, 2012). Outros estudos têm mostrado que a estabilidade e a ativação de p53 pode ser reforçada por bloqueio da sua ubiquitinação, mediada por MDM2, através da interação de MDM2 com proteínas, tais como DNAJB1, um membro da família Hsp40; ou a ligação direta de p53 com o fator de ativação de transcrição 3 (ATF3); um fator de transcrição da família ATF/CREB (Yan *et al.*, 2005; Qi *et al.*, 2014). Ao formar complexos com a p53, a ATF3 também pode atuar como um cofator de transcrição na

ativação de genes alvos da p53, como no caso do gene DR5 (Death receptor 5) (Taketani *et al.*, 2012). Além disso, a ATF3 é capaz de ligar-se a formas mutantes da p53 (R175H e R273H) e suprimir as funções oncogênicas e, assim, reduzir a migração e invasão celular de células carregando essas versões mutantes da p53 (Wei *et al.*, 2014). A Hsp40, por sua vez, também tem demonstrado capacidade de se ligar a formas mutantes da p53, especialmente naquelas carregando a mutação R175H, e provocar o restabelecimento da conformação selvagem da p53 (Hiraki *et al.*, 2015).

Uma vez que a proteína Hsp40 possui a capacidade de auxiliar na manutenção da conformação nativa da p53 e foi induzida pela *trans*-Chalcona em todas as linhagens testadas (Fig. 13B e 13C), foi avaliado se a indução de Hsp40 tinha influência na estabilização da p53 promovida pela *trans*-Chalcona. Primeiramente, verificou-se que a p53 e Hsp40 foram concomitantemente induzidas pela *trans*-Chalcona (Fig. 14A). Posteriormente, experimentos de imunoprecipitação, demonstraram que o tratamento com *trans*-Chalcona aumentou significativamente a ligação de Hsp40 e p53 (Fig. 14B), indicando a possível participação da Hsp40 na estabilização da p53. Para confirmar esta possibilidade foi realizado o silenciamento da Hsp40 utilizando siRNA.

As células U2OS foram transfectadas com 30 nM de siRNA Hsp40 ou de siRNA controle negativo por 24 horas e, posteriormente, tratadas com *trans*-Chalcona e submetidas a análises de RT-PCR e Western Blot. Como demonstrado na figura 15C, a indução de p53 causada pela *trans*-Chalcona resultou no aumento da expressão das formas clivadas da caspase-3 e da PARP, indicando assim a indução de apoptose pela *trans*-Chalcona. Entretanto, o silenciamento da Hsp40 bloqueou parcialmente a indução de p53 promovida pela *trans*-Chalcona, demonstrando o envolvimento da Hsp40 na estabilização da p53 mediada pela *trans*-Chalcona (Fig. 14C).

O silenciamento da Hsp40 também resultou no bloqueio parcial da clivagem de PARP e caspase-3 induzida pela *trans*-Chalcona, indicando a participação da Hsp40 na indução de apoptose pela *trans*-Chalcona (Fig. 14C). Também se observou que a Hsp40 influenciava a atividade transcricional da p53. O promotor MDM2-luciferase contendo sítios de ligação de p53, foi co-transfectado com siRNA controle ou siRNA Hsp40 em células U2OS. Conforme ilustrado na Fig. 14D, a indução da atividade do promotor MDM2 causada pela *trans*-Chalcona foi significativamente reduzida pelo silenciamento de Hsp40. Este resultado foi confirmado por RT-PCR, para avaliar a expressão de genes alvo de p53. Conforme indicado na figura 14E, o silenciamento de HSP40 bloqueou o

aumento da expressão de p21 e Gadd45a promovido pela *trans*-Chalcona, sugerindo que a indução de HSP40 pela *trans*-Chalcona contribui para a atividade transcricional da p53, provavelmente mediante o aumento da estabilidade de p53.

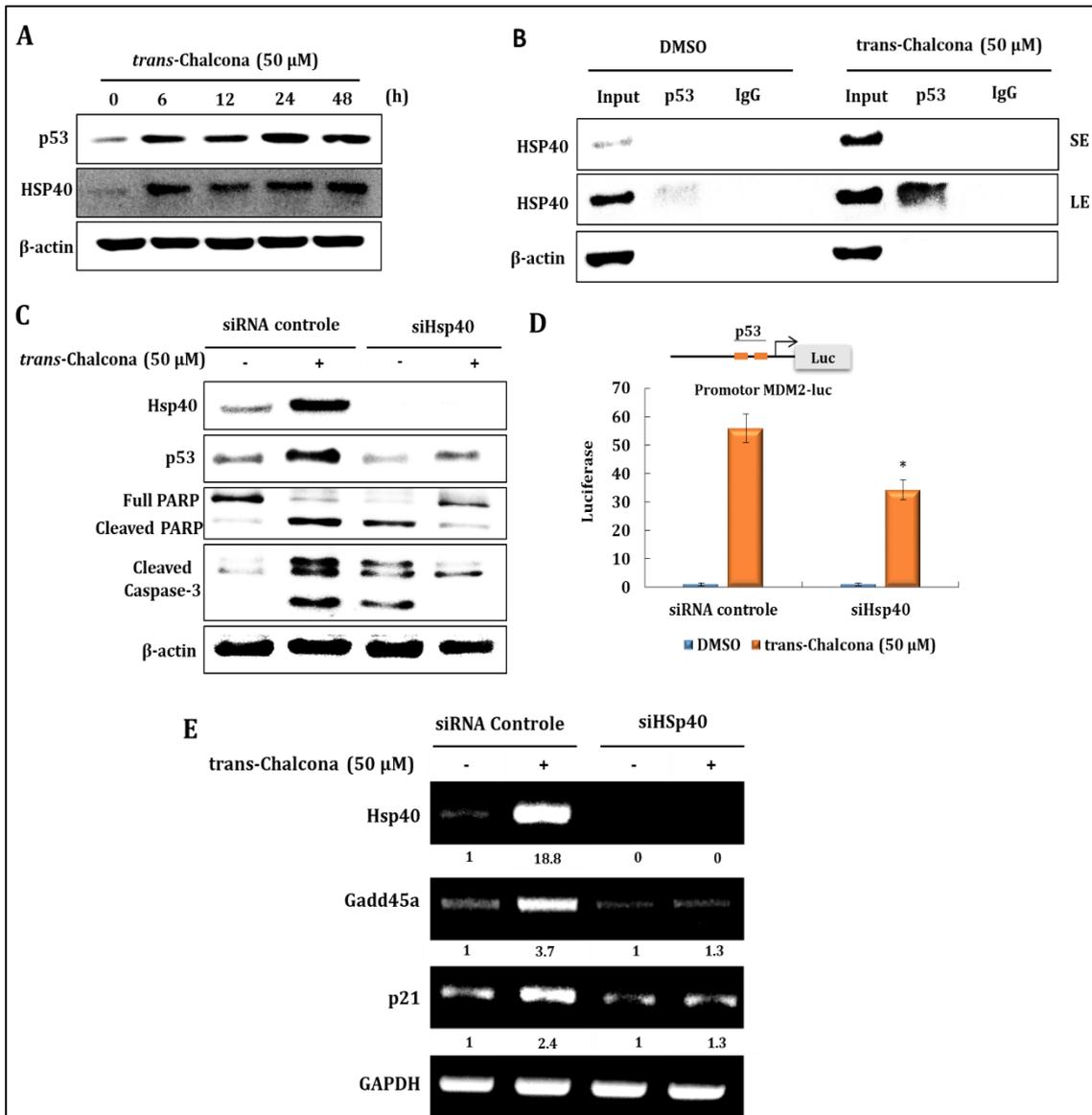


Figura 14. A indução de Hsp40 pela *trans*-Chalcona contribui para a estabilização e atividade da p53. **A.** A expressão de p53 e Hsp40 foi detectada por Western Blot. **B.** As células U2OS foram tratadas com 50 μ M de *trans*-Chalcona durante 24 horas e os lisados celulares foram isolados com tampão RIPA modificado. Os lisados celulares foram imunoprecipitados com 2 μ g de anticorpo para p53 ou IgG usando A/G PLUS-agarose e depois submetidos a Western Blot utilizando o anticorpo Hsp40. **C.** As células U2OS foram transfectadas com 30 nM de siHsp40 ou siRNA controle por 24 horas, seguido pelo tratamento com 50 μ M de *trans*-Chalcona durante 24 h. Em seguida, os lisados das células foram sujeitos a análise de Western Blot. **D.** O vector contendo o promotor MDM2-Luc foi co-transfectado com siHsp40 ou siRNA controle em células U2OS, e as células foram tratadas com 50 μ M de *trans*-Chalcona durante 24 h. A atividade da luciferase foi medida. **E.** As células U2OS foram transfectadas com siHsp40 ou siRNA controle, seguido por tratamento com 50 μ M de *trans*-Chalcona durante 24 h. O RNA foi isolado e submetido a análise de RT-PCR.

6. CONCLUSÃO

A *trans*-Chalcona suprime o crescimento e induz apoptose mediante a ativação das caspases 3/7 em linhagem de osteossarcoma humano U2OS. Em nível molecular, a *trans*-Chalcona reprime Sp1 e induz a p53, duas proteínas que desempenham um importante papel na tumorigênese. Conseqüentemente, estas mudanças também afetam a expressão de genes alvos de Sp1/p53, tais como p21, Gadd45a, PUMA, NOXA, FAS, Top2A, MMP-2, MMP-9, PDGFC, PDGFRB. A repressão transcricional da topoisomerase IIA promovida pela *trans*-Chalcona é dependente tanto da indução da p53 quanto da supressão da Sp1. A *trans*-chalcona estabiliza e aumenta a atividade transcricional da p53 via indução da proteína Hsp40, e a regulação desse eixo p53/Hsp40 parece afetar a indução de apoptose provocada pela *trans*-Chalcona (Figura 15). O fato da *trans*-Chalcona afetar múltiplas vias moleculares desreguladas no câncer, tais como: via de apoptose, ciclo celular, via de sinalização da p53 e WNT/catenina, faz com que ela e seus derivados sejam candidatos para o desenvolvimento de drogas antitumorais.

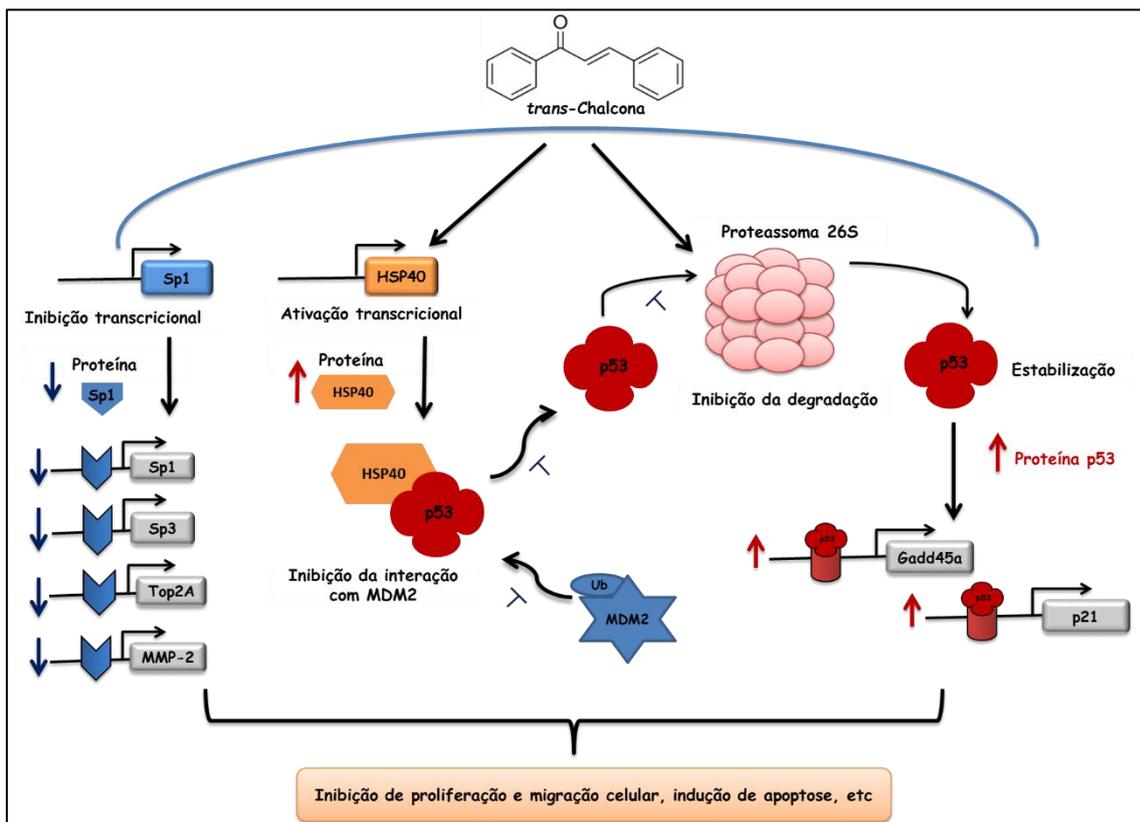


Figura 15. Uma proposta de modelo para a ação do *trans*-Chalcona em osteossarcoma.

7. REFERÊNCIAS

AKIHISA, T. et al. 4-Hydroxyderricin from *Angelica keiskei* roots induces caspase-dependent apoptotic cell death in HL60 human leukemia cells. **J Oleo Sci**, v. 60, n. 2, p. 71-7, 2011.

AL-ROMAIIH, K. et al. Decitabine-induced demethylation of 5' CpG island in GADD45A leads to apoptosis in osteosarcoma cells. **Neoplasia**, v. 10, n. 5, p. 471-80, May 2008.

BAEK, S. J.; HOROWITZ, J. M.; ELING, T. E. Molecular Cloning and Characterization of Human Nonsteroidal Anti-inflammatory Drug-activated Gene Promoter: BASAL TRANSCRIPTION IS MEDIATED BY Sp1 AND Sp3. **Journal of Biological Chemistry**, v. 276, n. 36, p. 33384-33392, September 7, 2001 2001.

BEISHLIN, K.; AZIZKHAN-CLIFFORD, J. Sp1 and the 'hallmarks of cancer'. **Febs j**, v. 282, n. 2, p. 224-58, Jan 2015.

BERTRAM, J. S. The molecular biology of cancer. **Mol Aspects Med**, v. 21, n. 6, p. 167-223, Dec 2000.

BIELACK, S. S. et al. Prognostic factors in high-grade osteosarcoma of the extremities or trunk: an analysis of 1,702 patients treated on neoadjuvant cooperative osteosarcoma study group protocols. **J Clin Oncol**, v. 20, n. 3, p. 776-90, Feb 01 2002.

BISHOP, M. W.; JANEWAY, K. A.; GORLICK, R. Future directions in the treatment of osteosarcoma. **Curr Opin Pediatr**, v. 28, n. 1, p. 26-33, Feb 2016.

BLATTLER, A.; FARNHAM, P. J. Cross-talk between site-specific transcription factors and DNA methylation states. **J Biol Chem**, v. 288, n. 48, p. 34287-94, Nov 29 2013.

BOCANGEL, D. et al. p53-Mediated down-regulation of the human DNA repair gene O6-methylguanine-DNA methyltransferase (MGMT) via interaction with Sp1 transcription factor. **Anticancer Res**, v. 29, n. 10, p. 3741-50, Oct 2009.

BOUAOUN, L. et al. TP53 Variations in Human Cancers: New Lessons from the IARC TP53 Database and Genomics Data. **Hum Mutat**, v. 37, n. 9, p. 865-76, Sep 2016.

BRAVO TOLEDO, R. Methotrexate toxicity: More than just reminders. **Med Clin (Barc)**, Jun 23 2017.

BROADHEAD, M. L. et al. The molecular pathogenesis of osteosarcoma: a review. **Sarcoma**, v. 2011, p. 959248, 2011.

CAI, Y.; CAI, T.; CHEN, Y. Wnt pathway in osteosarcoma, from oncogenic to therapeutic. **J Cell Biochem**, v. 115, n. 4, p. 625-31, Apr 2014.

CARVALHO, F. S. et al. Doxorubicin-induced cardiotoxicity: from bioenergetic failure and cell death to cardiomyopathy. **Med Res Rev**, v. 34, n. 1, p. 106-35, Jan 2014.

CEPEDA, V. et al. Biochemical mechanisms of cisplatin cytotoxicity. **Anticancer Agents Med Chem**, v. 7, n. 1, p. 3-18, Jan 2007.

CHADALAPAKA, G. et al. Curcumin decreases specificity protein expression in bladder cancer cells. **Cancer Res**, v. 68, n. 13, p. 5345-54, Jul 1 2008.

CHANG, W.-C.; HUNG, J.-J. Functional role of post-translational modifications of Sp1

in tumorigenesis. **Journal of Biomedical Science**, v. 19, n. 1, p. 94-94, 11/14.

CHO, J. J. et al. Licochalcone A, a natural chalconoid isolated from *Glycyrrhiza inflata* root, induces apoptosis via Sp1 and Sp1 regulatory proteins in oral squamous cell carcinoma. **Int J Oncol**, v. 45, n. 2, p. 667-74, Aug 2014.

CHOI, J. D.; LEE, J. S. Interplay between Epigenetics and Genetics in Cancer. **Genomics Inform**, v. 11, n. 4, p. 164-73, Dec 2013.

CHONG, Y. et al. MicroRNA-503 acts as a tumor suppressor in osteosarcoma by targeting L1CAM. **PLoS One**, v. 9, n. 12, p. e114585, 2014.

CLIFFORD, B. et al. G2 arrest in response to topoisomerase II inhibitors: the role of p53. **Cancer Res**, v. 63, n. 14, p. 4074-81, Jul 15 2003.

COX, M. L.; MEEK, D. W. Phosphorylation of serine 392 in p53 is a common and integral event during p53 induction by diverse stimuli. **Cell Signal**, v. 22, n. 3, p. 564-71, Mar 2010.

DAI, X. et al. Review of therapeutic strategies for osteosarcoma, chondrosarcoma, and Ewing's sarcoma. **Med Sci Monit**, v. 17, n. 8, p. Ra177-190, Aug 2011.

DIMMOCK, J. R. et al. Bioactivities of chalcones. **Curr Med Chem**, v. 6, n. 12, p. 1125-49, Dec 1999.

ESTEVE, P. O.; CHIN, H. G.; PRADHAN, S. Molecular mechanisms of transactivation and doxorubicin-mediated repression of survivin gene in cancer cells. **J Biol Chem**, v. 282, n. 4, p. 2615-25, Jan 26 2007.

FARNEBO, M.; BYKOV, V. J.; WIMAN, K. G. The p53 tumor suppressor: a master regulator of diverse cellular processes and therapeutic target in cancer. **Biochem Biophys Res Commun**, v. 396, n. 1, p. 85-9, May 21 2010.

FEUGEAS, O. et al. Loss of heterozygosity of the RB gene is a poor prognostic factor in patients with osteosarcoma. **J Clin Oncol**, v. 14, n. 2, p. 467-72, Feb 1996.

GANDHY, S. U. et al. Curcumin and synthetic analogs induce reactive oxygen species and decreases specificity protein (Sp) transcription factors by targeting microRNAs. **BMC Cancer**, v. 12, p. 564, 2012.

GELLER, D. S.; GORLICK, R. Osteosarcoma: a review of diagnosis, management, and treatment strategies. **Clin Adv Hematol Oncol**, v. 8, n. 10, p. 705-18, Oct 2010.

GIANCOTTI, F. G. Dereglulation of cell signaling in cancer. **FEBS Lett**, v. 588, n. 16, p. 2558-70, Aug 19 2014.

GRANDELA, C. et al. p53 is required for etoposide-induced apoptosis of human embryonic stem cells. **Stem Cell Res**, v. 1, n. 2, p. 116-28, Nov 2007.

GU, B.; ZHU, W. G. Surf the post-translational modification network of p53 regulation. **Int J Biol Sci**, v. 8, n. 5, p. 672-84, 2012.

GUAN, H. et al. Sp1 is upregulated in human glioma, promotes MMP-2-mediated cell invasion and predicts poor clinical outcome. **Int J Cancer**, v. 130, n. 3, p. 593-601, Feb 01 2012.

HAN, J. et al. Gas6/Axl mediates tumor cell apoptosis, migration and invasion and predicts the clinical outcome of osteosarcoma patients. **Biochem Biophys Res Commun**,

v. 435, n. 3, p. 493-500, Jun 07 2013.

HANAHAN, D.; WEINBERG, R. A. The hallmarks of cancer. **Cell**, v. 100, n. 1, p. 57-70, Jan 7 2000.

HAUPT, S. et al. Apoptosis - the p53 network. **J Cell Sci**, v. 116, n. Pt 20, p. 4077-85, Oct 15 2003.

HE, H.; NI, J.; HUANG, J. Molecular mechanisms of chemoresistance in osteosarcoma (Review). **Oncol Lett**, v. 7, n. 5, p. 1352-1362, May 2014.

HIRAKI, M. et al. Small-Molecule Reactivation of Mutant p53 to Wild-Type-like p53 through the p53-Hsp40 Regulatory Axis. **Chem Biol**, v. 22, n. 9, p. 1206-16, Sep 17 2015.

HSU, Y. L.; KUO, P. L.; LIN, C. C. Isoliquiritigenin induces apoptosis and cell cycle arrest through p53-dependent pathway in Hep G2 cells. **Life Sci**, v. 77, n. 3, p. 279-92, Jun 3 2005.

HUANG, X. et al. LAMA4, highly expressed in human hepatocellular carcinoma from Chinese patients, is a novel marker of tumor invasion and metastasis. **J Cancer Res Clin Oncol**, v. 134, n. 6, p. 705-14, Jun 2008.

ISSAEVA, N. et al. Small molecule RITA binds to p53, blocks p53-HDM-2 interaction and activates p53 function in tumors. **Nat Med**, v. 10, n. 12, p. 1321-8, Dec 2004.

JAFFE, N. Historical Perspective on the Introduction and Use of Chemotherapy for the Treatment of Osteosarcoma. In: KLEINERMAN, E. (Ed.). **Current Advances in Osteosarcoma**. Switzerland: Springer International Publishing, 2014.

JANDIAL, D. D. et al. Molecular Targeted Approaches to Cancer Therapy and Prevention Using Chalcones. **Current cancer drug targets**, v. 14, n. 2, p. 181-200, 2014.

JIA, Z. et al. Combined treatment of pancreatic cancer with mithramycin A and tolfenamic acid promotes Sp1 degradation and synergistic antitumor activity. **Cancer Res**, v. 70, n. 3, p. 1111-9, Feb 1 2010.

JIANG, J. et al. Down-regulation of beta1,4-galactosyltransferase V is a critical part of etoposide-induced apoptotic process and could be mediated by decreasing Sp1 levels in human glioma cells. **Glycobiology**, v. 16, n. 11, p. 1045-51, Nov 2006.

KAMBE, A. et al. Regulation of EP4 expression via the Sp-1 transcription factor: Inhibition of expression by anti-cancer agents. **Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Molecular Cell Research**, v. 1783, n. 6, p. 1211-1219, 6// 2008.

KANSARA, M.; THOMAS, D. M. Molecular pathogenesis of osteosarcoma. **DNA Cell Biol**, v. 26, n. 1, p. 1-18, Jan 2007.

KIM, K. H. et al. Licochalcone A induces apoptosis in malignant pleural mesothelioma through downregulation of Sp1 and subsequent activation of mitochondria-related apoptotic pathway. **Int J Oncol**, v. 46, n. 3, p. 1385-92, Mar 2015.

KUBO, T. et al. Platelet-derived growth factor receptor as a prognostic marker and a therapeutic target for imatinib mesylate therapy in osteosarcoma. **Cancer**, v. 112, n. 10, p. 2119-29, May 15 2008.

KUIJER, M. L.; HOGENDOORN, P. C.; CLETON-JANSEN, A. M. Genome-wide analyses on high-grade osteosarcoma: making sense of a genomically most unstable tumor. **Int J Cancer**, v. 133, n. 11, p. 2512-21, Dec 01 2013.

- LAMBERT, J. M. et al. PRIMA-1 reactivates mutant p53 by covalent binding to the core domain. **Cancer Cell**, v. 15, n. 5, p. 376-88, May 5 2009.
- LARSEN, A. K.; ESCARGUEIL, A. E.; SKLADANOWSKI, A. Catalytic topoisomerase II inhibitors in cancer therapy. **Pharmacol Ther**, v. 99, n. 2, p. 167-81, Aug 2003.
- LI, L.; DAVIE, J. R. The role of Sp1 and Sp3 in normal and cancer cell biology. **Ann Anat**, v. 192, n. 5, p. 275-83, Sep 20 2010.
- LIN, C. H. et al. Wnt signaling in osteosarcoma. **Adv Exp Med Biol**, v. 804, p. 33-45, 2014.
- LIU, H. et al. Sox9 regulates hyperexpression of Wnt1 and Fzd1 in human osteosarcoma tissues and cells. **Int J Clin Exp Pathol**, v. 7, n. 8, p. 4795-805, 2014.
- LIU, X. et al. Apigenin inhibits the proliferation and invasion of osteosarcoma cells by suppressing the Wnt/beta-catenin signaling pathway. **Oncol Rep**, v. 34, n. 2, p. 1035-41, Aug 2015.
- LUO, Z. et al. Decreased Expression of miR-548c-3p in Osteosarcoma Contributes to Cell Proliferation Via Targeting ITGAV. **Cancer Biother Radiopharm**, v. 31, n. 5, p. 153-8, Jun 2016.
- LYU, Y. L. et al. Topoisomerase IIbeta mediated DNA double-strand breaks: implications in doxorubicin cardiotoxicity and prevention by dexrazoxane. **Cancer Res**, v. 67, n. 18, p. 8839-46, Sep 15 2007.
- MA, Y. et al. Inhibition of the Wnt-beta-catenin and Notch signaling pathways sensitizes osteosarcoma cells to chemotherapy. **Biochem Biophys Res Commun**, v. 431, n. 2, p. 274-9, Feb 08 2013.
- MAO, M.; WANG, W. SerpinE2 promotes multiple cell proliferation and drug resistance in osteosarcoma. **Mol Med Rep**, v. 14, n. 1, p. 881-7, Jul 2016.
- MERTENS-TALCOTT, S. U. et al. Betulinic acid decreases ER-negative breast cancer cell growth in vitro and in vivo: role of Sp transcription factors and microRNA-27a:ZBTB10. **Mol Carcinog**, v. 52, n. 8, p. 591-602, Aug 2013.
- MIRABELLO, L.; TROISI, R. J.; SAVAGE, S. A. Osteosarcoma incidence and survival rates from 1973 to 2004: data from the Surveillance, Epidemiology, and End Results Program. **Cancer**, v. 115, n. 7, p. 1531-43, Apr 01 2009.
- MIRZA, A. et al. Global transcriptional program of p53 target genes during the process of apoptosis and cell cycle progression. **Oncogene**, v. 22, n. 23, p. 3645-54, Jun 5 2003.
- MOHAMMED, M. K. et al. Wnt/beta-catenin signaling plays an ever-expanding role in stem cell self-renewal, tumorigenesis and cancer chemoresistance. **Genes Dis**, v. 3, n. 1, p. 11-40, Mar 2016.
- MUCKE, T. et al. Effect of neoadjuvant treatment in the management of osteosarcomas of the head and neck. **J Cancer Res Clin Oncol**, v. 140, n. 1, p. 127-31, Jan 2014.
- MUTSAERS, A. J.; WALKLEY, C. R. Cells of origin in osteosarcoma: mesenchymal stem cells or osteoblast committed cells? **Bone**, v. 62, p. 56-63, May 2014.
- NA, Y.; NAM, J. M. Synthesis and topoisomerase II inhibitory and cytotoxic activity of oxiranylmethoxy- and thiranylmethoxy-chalcone derivatives. **Bioorg Med Chem Lett**, v. 21, n. 1, p. 211-4, Jan 01 2011.

NERADIL, J. et al. DHFR-mediated effects of methotrexate in medulloblastoma and osteosarcoma cells: the same outcome of treatment with different doses in sensitive cell lines. **Oncol Rep**, v. 33, n. 5, p. 2169-75, May 2015.

NICOLAS, M.; NOE, V.; CIUDAD, C. J. Transcriptional regulation of the human Sp1 gene promoter by the specificity protein (Sp) family members nuclear factor Y (NF-Y) and E2F. **Biochem J**, v. 371, n. Pt 2, p. 265-75, Apr 15 2003.

NICOLAS, M. et al. Cloning and characterization of the 5'-flanking region of the human transcription factor Sp1 gene. **J Biol Chem**, v. 276, n. 25, p. 22126-32, Jun 22 2001.

NIINA, I. et al. DNA topoisomerase inhibitor, etoposide, enhances GC-box-dependent promoter activity via Sp1 phosphorylation. **Cancer Sci**, v. 98, n. 6, p. 858-63, Jun 2007.

NORATTO, G. D. et al. The drug resistance suppression induced by curcuminoids in colon cancer SW-480 cells is mediated by reactive oxygen species-induced disruption of the microRNA-27a-ZBTB10-Sp axis. **Mol Nutr Food Res**, v. 57, n. 9, p. 1638-48, Sep 2013.

OLIVIER, M.; HOLLSTEIN, M.; HAINAUT, P. TP53 Mutations in Human Cancers: Origins, Consequences, and Clinical Use. **Cold Spring Harbor Perspectives in Biology**, v. 2, n. 1, p. a001008, 2010.

ORLIKOVA, B. et al. Dietary chalcones with chemopreventive and chemotherapeutic potential. **Genes & Nutrition**, Berlin/Heidelberg, v. 6, n. 2, p. 125-147, 02/04

ORLIKOVA, B. et al. Dietary chalcones with chemopreventive and chemotherapeutic potential. **Genes Nutr**, v. 6, n. 2, p. 125-47, May 2011.

OTTAVIANI, G.; JAFFE, N. The epidemiology of osteosarcoma. **Cancer Treat Res**, v. 152, p. 3-13, 2009.

OTTAVIANI, G.; JAFFE, N. The Epidemiology of Osteosarcoma. In: JAFFE, N.; BRULAND, O. S., et al (Ed.). **Pediatric and Adolescent Osteosarcoma**: Springer US, v.152, 2010. cap. 1, p.3-13. (Cancer Treatment and Research).

QI, M. et al. DNAJB1 stabilizes MDM2 and contributes to cancer cell proliferation in a p53-dependent manner. **Biochim Biophys Acta**, v. 1839, n. 1, p. 62-9, Jan 2014.

RAO, Y. K. et al. Chalcone HTMC causes in vitro selective cytotoxicity, cell-cycle G1 phase arrest through p53-dependent pathway in human lung adenocarcinoma A549 cells, and in vivo tumor growth suppression. **Bioorg Med Chem Lett**, v. 20, n. 22, p. 6508-12, Nov 15 2010.

RILEY, T. et al. Transcriptional control of human p53-regulated genes. **Nat Rev Mol Cell Biol**, v. 9, n. 5, p. 402-12, May 2008.

SAFE, S. et al. Transcription factor Sp1, also known as specificity protein 1 as a therapeutic target. **Expert Opin Ther Targets**, v. 18, n. 7, p. 759-69, Jul 2014.

SEZNEC, J.; SILKENSTEDT, B.; NAUMANN, U. Therapeutic effects of the Sp1 inhibitor mithramycin A in glioblastoma. **J Neurooncol**, v. 101, n. 3, p. 365-77, Feb 2011.

SHADFAN, M.; LOPEZ-PAJARES, V.; YUAN, Z. M. MDM2 and MDMX: Alone and together in regulation of p53. **Transl Cancer Res**, v. 1, n. 2, p. 88-89, Aug 2012.

SILVA, G. et al. In vitro action of flavonoids in the canine malignant histiocytic cell line DH82. **Molecules**, v. 18, n. 12, p. 15448-63, Dec 12 2013.

SONG, G. et al. Association of p53 with Bid induces cell death in response to etoposide treatment in hepatocellular carcinoma. **Curr Cancer Drug Targets**, v. 9, n. 7, p. 871-80, Nov 2009.

STOLL, R. et al. Chalcone derivatives antagonize interactions between the human oncoprotein MDM2 and p53. **Biochemistry**, v. 40, n. 2, p. 336-44, Jan 16 2001.

TAKETANI, K. et al. Key role of ATF3 in p53-dependent DR5 induction upon DNA damage of human colon cancer cells. **Oncogene**, v. 31, n. 17, p. 2210-21, Apr 26 2012.

TANG, H. J. et al. A modified p53 enhances apoptosis in sarcoma cell lines mediated by doxorubicin. **Br J Cancer**, v. 90, n. 6, p. 1285-92, Mar 22 2004.

VILLALONGA-PLANELLAS, R. et al. Activation of p53 by nutlin-3a induces apoptosis and cellular senescence in human glioblastoma multiforme. **PLoS One**, v. 6, n. 4, p. e18588, 2011.

VIZCAINO, C.; MANSILLA, S.; PORTUGAL, J. Sp1 transcription factor: A long-standing target in cancer chemotherapy. **Pharmacol Ther**, v. 152, p. 111-24, Aug 2015.

WANG, L.; EASTMOND, D. A. Catalytic inhibitors of topoisomerase II are DNA-damaging agents: induction of chromosomal damage by merbarone and ICRF-187. **Environ Mol Mutagen**, v. 39, n. 4, p. 348-56, 2002.

WANG, Q.; ZAMBETTI, G. P.; SUTTLE, D. P. Inhibition of DNA topoisomerase II alpha gene expression by the p53 tumor suppressor. **Mol Cell Biol**, v. 17, n. 1, p. 389-97, Jan 1997.

WANG, S. et al. Doxorubicin induces apoptosis in normal and tumor cells via distinctly different mechanisms. Intermediacy of H₂O₂- and p53-dependent pathways. **J Biol Chem**, v. 279, n. 24, p. 25535-43, Jun 11 2004.

WEI, S. et al. The activating transcription factor 3 protein suppresses the oncogenic function of mutant p53 proteins. **J Biol Chem**, v. 289, n. 13, p. 8947-59, Mar 28 2014.

WIERSTRA, I. Sp1: emerging roles--beyond constitutive activation of TATA-less housekeeping genes. **Biochem Biophys Res Commun**, v. 372, n. 1, p. 1-13, Jul 18 2008.

WILLIAMS, A. O.; ISAACS, R. J.; STOWELL, K. M. Down-regulation of human topoisomerase IIalpha expression correlates with relative amounts of specificity factors Sp1 and Sp3 bound at proximal and distal promoter regions. **BMC Mol Biol**, v. 8, p. 36, 2007.

XU, M.; XU, S.; YU, X. Marginal resection for osteosarcoma with effective neoadjuvant chemotherapy: long-term outcomes. **World J Surg Oncol**, v. 12, p. 341, Nov 11 2014.

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

YAN, C. et al. Activating transcription factor 3, a stress sensor, activates p53 by blocking its ubiquitination. **EMBO J**, v. 24, n. 13, p. 2425-35, Jul 06 2005.

YANG, F. et al. Doxorubicin caused apoptosis of mesenchymal stem cells via p38, JNK and p53 pathway. **Cell Physiol Biochem**, v. 32, n. 4, p. 1072-82, 2013.

YANG, F. et al. Doxorubicin, DNA torsion, and chromatin dynamics. **Biochimica et biophysica acta**, v. 1845, n. 1, p. 84-89, 12/19 2014.

- YANG, K. et al. The evolving roles of canonical WNT signaling in stem cells and tumorigenesis: implications in targeted cancer therapies. **Lab Invest**, v. 96, n. 2, p. 116-36, Feb 2016.
- YOON, G.; KANG, B. Y.; CHEON, S. H. Topoisomerase I inhibition and cytotoxicity of licochalcones A and E from *Glycyrrhiza inflata*. **Arch Pharm Res**, v. 30, n. 3, p. 313-6, Mar 2007.
- ZAWACKA-PANKAU, J.; SELIVANOVA, G. Pharmacological reactivation of p53 as a strategy to treat cancer. **J Intern Med**, v. 277, n. 2, p. 248-59, Feb 2015.
- ZHANG, A. et al. Wnt5a promotes migration of human osteosarcoma cells by triggering a phosphatidylinositol-3 kinase/Akt signals. **Cancer Cell Int**, v. 14, n. 1, p. 15, Feb 14 2014.
- ZHANG, Y. et al. A new chalcone derivative (E)-3-(4-methoxyphenyl)-2-methyl-1-(3,4,5-trimethoxyphenyl)prop-2-en-1-one suppresses prostate cancer involving p53-mediated cell cycle arrests and apoptosis. **Anticancer Res**, v. 32, n. 9, p. 3689-98, Sep 2012.
- ZHAO, Y. et al. Inhibition of the transcription factor Sp1 suppresses colon cancer stem cell growth and induces apoptosis in vitro and in nude mouse xenografts. **Oncol Rep**, v. 30, n. 4, p. 1782-92, Oct 2013.
- ZHONG, Y. et al. Molecular targets of apigenin in colorectal cancer cells: Involvement of p21, NAG-1 and p53. **European Journal of Cancer**, v. 46, n. 18, p. 3365-3374, 12// 2010.
- ZHOU, B.; XING, C. Diverse Molecular Targets for Chalcones with Varied Bioactivities. **Med Chem (Los Angeles)**, v. 5, n. 8, p. 388-404, Aug 2015.
- ZHOU, N. et al. Genistein inhibition of topoisomerase IIalpha expression participated by Sp1 and Sp3 in HeLa cell. **Int J Mol Sci**, v. 10, n. 7, p. 3255-68, Jun 2009.
- ZHU, S. et al. DNA damage response in cisplatin-induced nephrotoxicity. **Arch Toxicol**, v. 89, n. 12, p. 2197-205, Dec 2015.
- ZUCKERMAN, V. et al. Tumour suppression by p53: the importance of apoptosis and cellular senescence. **J Pathol**, v. 219, n. 1, p. 3-15, Sep 2009.