



UNIVERSIDADE FEDERAL DE OURO PRETO
ESCOLA DE FARMÁCIA



JOÃO LUCAS MORAES TOLEDO

**ESTUDOS DOS EFEITOS BIOLÓGICOS DE CHALCONAS EM LINHAGENS
TUMORAIS DE BEXIGA E FÍGADO**

Ouro Preto

2026

JOÃO LUCAS MORAES TOLEDO

ESTUDOS DOS EFEITOS BIOLÓGICOS DE CHALCONAS EM LINHAGENS
TUMORAIS DE BEXIGA E FÍGADO

Monografia apresentada ao Curso de Farmácia da Universidade Federal de Ouro Preto como requisito parcial para obtenção do título de bacharel em Farmácia.

Orientadora: Prof^a. Dr^a. Glenda Nicioli da Silva.

Ouro Preto

2026



FOLHA DE APROVAÇÃO

João Lucas Moraes Toledo

Estudo dos efeitos biológicos de chalconas em linhagens tumorais de bexiga e fígado

Monografia apresentada ao Curso de Farmácia da Universidade Federal de Ouro Preto como requisito parcial para obtenção do título de Farmacêutico

Aprovada em 02 de Março de 2026

Membros da banca

[Dra.] - Glenda Nicioli da Silva - Orientadora (Universidade Federal de Ouro Preto)

[Dra.] - Lívia da Cunha Agostini - (Universidade Federal de Ouro Preto)

Mariane Stér Teixeira da Silva - (Universidade Federal de Ouro Preto)

Glenda Nicioli da Silva, orientadora do trabalho, aprovou a versão final e autorizou seu depósito na Biblioteca Digital de Trabalhos de Conclusão de Curso da UFOP em 06/03/2026



Documento assinado eletronicamente por **Glenda Nicioli da Silva, DIRETOR(A) DA ESCOLA DE FARMÁCIA**, em 04/03/2026, às 19:49, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no art. 6º, § 1º, do [Decreto nº 8.539, de 8 de outubro de 2015](#).



A autenticidade deste documento pode ser conferida no site http://sei.ufop.br/sei/controlador_externo.php?acao=documento_conferir&id_orgao_acesso_externo=0, informando o código verificador **1069560** e o código CRC **C5F13A83**.

AGRADECIMENTOS

Agradeço à Universidade Federal de Ouro Preto (UFOP) e à Escola de Farmácia pela sólida formação acadêmica e humana proporcionada ao longo da graduação. Esta instituição, marcada pelo compromisso com a excelência no ensino, na pesquisa e na extensão, foi fundamental para o meu crescimento profissional e pessoal, oferecendo estrutura, oportunidades e um ambiente propício ao desenvolvimento científico.

Expresso minha gratidão aos órgãos de fomento Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de Minas Gerais (FAPEMIG), Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) e Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq), pelo apoio financeiro e incentivo à pesquisa científica no Brasil. O investimento dessas instituições foi essencial para a realização deste trabalho e para o fortalecimento da ciência e da formação de novos pesquisadores.

Ao Laboratório de Pesquisas Clínicas da UFOP (LPC) e ao Grupo de Estudos e Pesquisas Toxicogenéticas, Epidemiológicas e Clínicas (G-TEC), agradeço pelo acolhimento, pela infraestrutura disponibilizada e pela convivência acadêmica enriquecedora. O ambiente colaborativo, as discussões científicas e a troca constante de conhecimentos foram determinantes para o desenvolvimento deste estudo e para minha formação como pesquisador.

Registro meus agradecimentos à Professora Dra. Glenda Nicioli da Silva, minha orientadora, pela confiança, dedicação, rigor científico e constante incentivo ao longo de toda a pesquisa. Sua orientação foi fundamental para a construção deste trabalho e para meu amadurecimento acadêmico. À Kamila de Fátima da Anunciação, minha co-orientadora, agradeço pelo apoio, disponibilidade, paciência e contribuições valiosas, que foram essenciais para o aprimoramento deste estudo. Sou profundamente grato pelo aprendizado, pela orientação cuidadosa e por todo o suporte oferecido durante essa trajetória.

À minha família, minha base e meu alicerce, expresso minha mais profunda gratidão. Aos meus pais, Kátia e Alaeste, por todo amor, esforço e dedicação ao longo de toda a minha vida. Obrigado por acreditarem em mim, por me apoiarem incondicionalmente e por nunca medirem esforços para que eu pudesse chegar até

aqui. À minha irmã, Luana, agradeço pelo companheirismo, pelas conversas, pelo carinho e por sempre torcer pelo meu sucesso. Esta conquista também é de vocês.

Aos meus amigos da vida: Saymon, Gabriel, Aline e Naara, agradeço por permanecerem presentes mesmo diante da distância e da rotina intensa da graduação. A amizade de vocês é sinônimo de lealdade, apoio e acolhimento. Obrigado por celebrarem minhas conquistas, por me incentivarem nos momentos difíceis e por serem um porto seguro em qualquer circunstância.

Aos meus primeiros amigos em Ouro Preto: Pintcher, Júlia, Iolanda, Manuela, Hugo, Raiane, Maria Júlia e Sabrina, deixo minha gratidão por terem tornado essa jornada mais leve e especial. Vocês fizeram com que uma nova cidade se transformasse em lar. As experiências compartilhadas, os desafios superados e os momentos vividos juntos ficarão para sempre marcados na minha história.

Aos amigos que conheci ao longo dessa trajetória em Ouro Preto: Alice (Sandra), Mavie, Iago, Wander, Jon, Alice (Cancelada) e Kauleu, agradeço pela parceria, pelas risadas, pelo apoio diário e por tornarem essa caminhada mais leve e divertida. Cada encontro, conversa e momento compartilhado contribuíram para que essa fase fosse inesquecível.

Por fim, agradeço aos grupos acadêmicos dos quais tive a honra de fazer parte: à Formulare (empresa júnior), ao CALF-JB (Centro Acadêmico Livre de Farmácia - José Badini) e à LAFITec (Liga Acadêmica de Farmácia Industrial e Tecnologia). Essas experiências foram fundamentais para minha formação além da sala de aula, proporcionando aprendizado prático, desenvolvimento de liderança, trabalho em equipe e crescimento pessoal. Cada desafio enfrentado nesses espaços contribuiu significativamente para a construção do profissional que me tornei.

RESUMO

O câncer permanece como uma das principais causas de mortalidade global, com destaque para os cânceres de bexiga e fígado, que apresentam elevada incidência, letalidade e limitações terapêuticas. Nesse contexto, compostos naturais de origem vegetal têm despertado interesse no desenvolvimento de novas estratégias antineoplásicas, sendo as chalconas uma classe promissora de flavonoides fenólicos caracterizados pela estrutura 1,3-diaril-2-propen-1-ona. Essas moléculas, amplamente distribuídas em diferentes espécies vegetais, apresentam diversidade estrutural e propriedades farmacológicas relevantes, incluindo efeitos antiproliferativos, indutores de apoptose, moduladores do ciclo celular e inibidores de vias de sinalização associadas à progressão tumoral. Evidências recentes demonstram sua eficácia em linhagens de câncer de bexiga e hepatocelular, reforçando seu potencial como candidatos a novos fármacos. Diante disso, o presente estudo teve como objetivo investigar os efeitos biológicos da metilchalcona em linhagens tumorais de bexiga (T24) e fígado (HepG2). Para isso, foram empregados o ensaio colorimétrico MTT para determinação da viabilidade celular, a técnica de cicatrização de feridas para análise de migração, o ensaio de sobrevivência clonogênica para analisar interferência na formação de colônias, a microscopia de contraste de fase para observação de mudanças morfológicas, a citometria de fluxo para estudo da cinética do ciclo celular e a marcação com anexina V e iodeto de propídio para detecção de apoptose/necrose. Os resultados indicaram que o composto inibiu de forma significativa a proliferação e a migração celular, induziu alterações morfológicas e modulou a morte e o ciclo celular de maneira dependente da linhagem. Além disso, o composto foi seletivo e demonstrou efeito citostático na linhagem HepG2 e pró-apoptótico na linhagem T24. A elucidação do potencial terapêutico desse composto poderá contribuir para o desenvolvimento de terapias mais eficazes e menos tóxicas, oferecendo novas perspectivas para o tratamento dessas neoplasias.

Palavras-chave: metilchalcona, câncer de bexiga, câncer de fígado, ação antitumoral, agentes antineoplásicos, chalcona.

ABSTRACT

Cancer remains one of the leading causes of global mortality, with bladder and liver cancers standing out due to their high incidence, lethality, and therapeutic limitations. In this context, natural plant-derived compounds have attracted interest in the development of new antineoplastic strategies, with chalcones being a promising class of phenolic flavonoids characterized by the 1,3-diaryl-2-propen-1-one structure. These molecules, widely distributed in different plant species, have structural diversity and relevant pharmacological properties, including antiproliferative effects, apoptosis inducers, cell cycle modulators, and inhibitors of signaling pathways associated with tumor progression. Recent evidence demonstrates its efficacy in bladder and hepatocellular cancer cell lines, reinforcing its potential as a candidate for new drugs. Given this, the present study aimed to investigate the biological effects of methylchalcone on bladder (T24) and liver (HepG2) tumor cell lines. For this purpose, the MTT colorimetric assay was used to determine cell viability, the wound healing technique to analyze migration, the clonogenic survival assay to analyze interference in colony formation, phase contrast microscopy to observe morphological changes, flow cytometry to study cell cycle kinetics, and annexin V and propidium iodide staining to detect apoptosis/necrosis. The results indicated that the compound significantly inhibited cell proliferation and migration, induced morphological changes, and modulated cell death and the cell cycle in a lineage-dependent manner. In addition, the compound was selective and demonstrated cytostatic effects in the HepG2 cell line and proapoptotic effects in the T24 cell line. Elucidation of the therapeutic potential of this compound may contribute to the development of more effective and less toxic therapies, offering new perspectives for the treatment of these neoplasms.

Keywords: methylchalcone, bladder cancer, liver cancer, antitumor action, antineoplastic agents, chalcone.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 - Estrutura química do composto (E)-3-(2,3-dimetoxi-5-propilfenil)-1-(p-tolil)prop-2-en-1-ona (Metilchalcona).....	12
Figura 2 - Alterações morfológicas nas linhagens celulares Hep-G2 (A) e T24 (B) após tratamento com a metilchalcona.....	28
Figura 3 - Efeito da metilchalcona na migração das linhagens celulares HepG2 (A, C) e T24 (B, D).....	29
Figura 4 - Efeito da metilchalcona na viabilidade clonogênica das linhagens celulares HepG2 (A) e T24 (B).....	30
Figura 5 - Análise do efeito da metilchalcona na distribuição do ciclo celular das células HepG2 (A, C) e T24 (B, D).....	31
Figura 6 - Percentagem de células HepG2 (A) e T24 (B) viáveis, apoptóticas e necróticas após o tratamento com chalcona 3 durante 48 h.....	32

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - Atividades citotóxicas das chalconas obtidas contra células MRC-5, HepG2 e T24.....	27
--	----

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO.....	10
2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA.....	13
2.1 Justificativa.....	21
3. OBJETIVOS.....	22
3.1. Objetivo Geral.....	22
3.2. Objetivos Específicos.....	22
4. MATERIAIS E MÉTODOS.....	23
4.1 Linhagens celulares e compostos químicos.....	23
4.2 Ensaio de citotoxicidade.....	23
4.3 Morfologia Celular.....	24
4.4 Migração celular.....	24
4.5 Sobrevivência clonogênica.....	24
4.6 Análise do ciclo celular.....	25
4.7 Avaliação de apoptose/necrose.....	26
5. RESULTADOS.....	27
5.1 Ensaio de citotoxicidade.....	27
5.2 Morfologia celular.....	28
5.3 Migração celular.....	28
5.4 Sobrevivência clonogênica.....	29
5.5 Análise do ciclo celular.....	30
5.6 Avaliação de apoptose/necrose.....	32
6. DISCUSSÃO.....	33
7. CONCLUSÃO.....	39
8. ANEXOS.....	40
9. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	41

1. INTRODUÇÃO

O câncer constitui um dos principais problemas de saúde pública em escala global, caracterizando-se como uma das principais causas de morbimortalidade em diferentes regiões do mundo. De acordo com estimativas recentes, observa-se um crescimento contínuo na incidência de neoplasias malignas, impulsionado por fatores como envelhecimento populacional, exposição ambiental a agentes carcinogênicos, hábitos de vida inadequados e desigualdades no acesso ao diagnóstico e ao tratamento (GLOBOCAN, 2025). Nesse contexto, o desenvolvimento de estratégias terapêuticas mais eficazes, seguras e acessíveis permanece como um dos grandes desafios da oncologia contemporânea.

Entre os diferentes tipos de câncer, destacam-se o câncer de bexiga e o câncer de fígado, ambos associados a elevada carga clínica e impacto significativo na qualidade de vida dos pacientes. O câncer de bexiga figura entre as neoplasias urológicas mais frequentes, apresentando altas taxas de recorrência e progressão, especialmente nas formas não músculo-invasivas, o que exige acompanhamento contínuo e intervenções terapêuticas repetidas. O câncer de fígado, particularmente o carcinoma hepatocelular, está entre as principais causas de morte por câncer no mundo, sendo frequentemente diagnosticado em estágios avançados e associado a doenças hepáticas crônicas, como cirrose, hepatites virais e esteatose hepática não alcoólica (GLOBOCAN, 2025).

Apesar dos avanços obtidos nas últimas décadas, as opções terapêuticas atualmente disponíveis para esses cânceres ainda apresentam limitações relevantes. Os tratamentos convencionais, como quimioterapia sistêmica, terapias intravesicais, imunoterapia, terapias-alvo e abordagens locorregionais, estão frequentemente associados a toxicidade significativa, desenvolvimento de resistência tumoral, eficácia limitada em determinados subgrupos de pacientes e elevados custos. Além disso, a heterogeneidade molecular dessas neoplasias dificulta a obtenção de respostas terapêuticas duradouras, reforçando a necessidade de novas abordagens que atuem de forma mais seletiva e multialvo (LÓPEZ-BELTRAN et al., 2024; MORIS et al., 2025).

Nesse cenário, os produtos naturais têm despertado crescente interesse como fontes promissoras para o desenvolvimento de novos agentes anticâncer.

Historicamente, uma parcela expressiva dos fármacos utilizados na oncologia teve origem direta ou indireta em metabólitos secundários produzidos por organismos naturais, especialmente plantas. A diversidade estrutural e funcional desses compostos confere vantagens importantes, como a possibilidade de modular múltiplas vias envolvidas na carcinogênese, menor toxicidade sistêmica e potencial para atuar como agentes adjuvantes às terapias convencionais, contribuindo para a superação da resistência tumoral (MUHAMMAD et al., 2022).

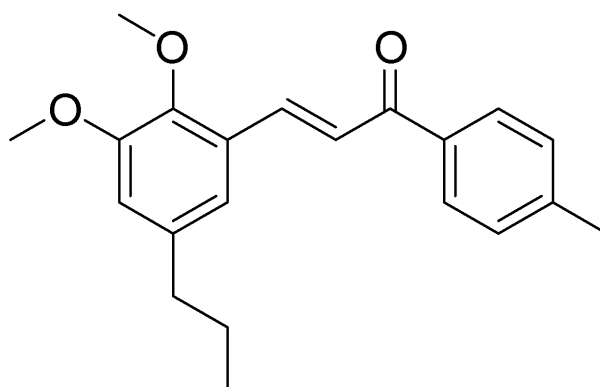
As chalconas, pertencentes à classe dos flavonoides e caracterizadas por sua estrutura α,β -insaturada, emergem como um grupo de metabólitos secundários de grande relevância farmacológica. Compostos dessa classe podem ser encontrados naturalmente em diversas espécies vegetais ou obtidos por modificações sintéticas, o que possibilita a otimização de suas propriedades físico-químicas e biológicas. Estudos pré-clínicos têm demonstrado que as chalconas apresentam amplo espectro de atividades anticâncer, incluindo efeitos antiproliferativos, pró-apoptóticos, anti-inflamatórios e antiangiogênicos, além da capacidade de modular vias de sinalização cruciais para a sobrevivência e progressão tumoral (JASIM et al., 2021).

No contexto específico dos cânceres de bexiga e fígado, evidências experimentais indicam que chalconas e seus derivados são capazes de reduzir a viabilidade de células tumorais, interferir no ciclo celular e promover morte celular programada, frequentemente com menor impacto sobre células não neoplásicas. Ademais, o caráter multialvo dessas moléculas sugere um potencial diferencial frente às terapias convencionais, especialmente no enfrentamento da resistência farmacológica e na redução de efeitos adversos (HONG et al., 2019; MICHALKOVÁ et al., 2023).

Apesar desses achados promissores, a maioria das evidências disponíveis ainda se restringe a estudos *in vitro* e *in vivo*, havendo lacunas importantes quanto à caracterização do perfil de seletividade, segurança e aplicabilidade dessas substâncias. Nesse sentido, a investigação de derivados específicos, incluindo chalconas sintéticas, representa uma estratégia relevante para aprofundar o conhecimento sobre seu potencial terapêutico e contribuir para o desenvolvimento de novas alternativas no tratamento de neoplasias de alta prevalência e difícil manejo clínico (NAEEM et al., 2022).

Assim, o presente trabalho insere-se no contexto da busca por novas abordagens terapêuticas para o câncer de bexiga e o câncer de fígado, fundamentando-se nas limitações dos tratamentos atualmente disponíveis e no potencial descrito na literatura para as chalconas como agentes anticâncer. A avaliação de compostos sintéticos, como a metilchalcona (Figura 1), surge como uma proposta para ampliar o arsenal terapêutico oncológico e fornecer subsídios científicos para futuras aplicações translacionais.

Figura 1 - Estrutura química do composto (E)- 3-(2,3-dimetoxi-5-propilfenil)-1-(p-tolil)prop-2-en-1-ona (Metilchalcona).



Fonte: Autoria própria.

2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

O câncer é um conjunto de mais de cem doenças marcadas pela proliferação anormal e desordenada de células, capazes de invadir tecidos adjacentes ou se disseminar para outras regiões do organismo por meio da metástase. Esse processo forma tumores e compromete o funcionamento normal dos órgãos, em decorrência de mutações genéticas que desregulam o ciclo celular e levam células normais a se tornarem malignas (OMS, 2025).

Os números de casos de câncer seguem aumentando em escala mundial, impondo uma grande pressão física, emocional e financeira sobre indivíduos, famílias e sistemas de saúde. Dados do Global Cancer Observatory (GLOBOCAN, 2025), estimaram a incidência global de 21,3 milhões de casos e 10,4 milhões de mortes por câncer em 2025. No Brasil, o Instituto Nacional de Câncer (INCA) estima que, para cada ano do triênio 2023-2025, ocorram cerca de 704 mil novos casos de câncer. O câncer de pele não melanoma permanece como o mais incidente (220 mil novos casos anuais), seguido pelos cânceres de mama (74 mil), próstata (72 mil), cólon e reto (46 mil), pulmão (32 mil) e estômago (21 mil) (INCA, 2022).

Em âmbito global, o câncer de bexiga é o 10º tipo de câncer mais frequente, com cerca de 656 mil novos casos e 234 mil mortes em 2025. É aproximadamente quatro vezes mais comum em homens, nos quais figura como o 6º câncer mais incidente. O câncer de fígado ocupa a posição de 6º mais diagnosticado no mundo e representa a 3ª principal causa de morte por câncer, evidenciando seu elevado impacto na mortalidade (GLOBOCAN, 2025). No Brasil, o INCA estima, para o período de 2023-2025, a ocorrência anual de 11.370 novos casos de câncer de bexiga e cerca de 10.700 novos casos de câncer de fígado, sendo ambos mais frequentes na população masculina (INCA, 2022). O câncer de bexiga está principalmente relacionado ao tabagismo e à exposição ocupacional a aminas aromáticas, enquanto o câncer de fígado associa-se sobretudo às infecções crônicas pelas hepatites B e C, consumo excessivo de álcool, cirrose e exposição a aflatoxinas (WILD; WEIDERPASS; STEWART, 2020).

Cerca de metade dos casos de câncer de bexiga está associada ao tabagismo (FREEDMAN et al., 2011). Um estudo de coorte envolvendo 422.010 indivíduos evidenciou um aumento de duas a três vezes no risco de

desenvolvimento dessa neoplasia entre fumantes (JACOB et al., 2018). Estudos epidemiológicos reforçam que o tabagismo é o fator de risco comportamental mais impactante para o crescimento de casos da doença (LAAKSONEN et al., 2020). A fumaça do tabaco contém aminas aromáticas que, após metabolização hepática e excreção urinária, induzem danos ao DNA das células uroteliais por meio da formação de adutos de DNA, um processo que está associado à carcinogênese da bexiga (BESARATINIA et al., 2013; TURESKY; SMITH, 2018).

Além do tabaco, a exposição ocupacional em indústrias de corantes, tintas e borracha constitui um fator de risco estabelecido e evitável (IARC, 2012; CUMBERBATCH et al., 2016). Aproximadamente uma em cada cinco ocorrências de carcinoma urotelial está ligada à exposição no ambiente de trabalho. Esse risco é mais acentuado em profissionais de áreas industriais que lidam diretamente com substâncias químicas, com destaque para os setores de produção de pigmentos, processamento de derivados de petróleo e metalurgia (Burger et al., 2013). Por fim, a predisposição genética e as alterações moleculares são fundamentais para explicar o surgimento desta neoplasia. No câncer urotelial, destacam-se alterações nos genes FGFR3, RB1, HRAS e TP53, além de perdas no cromossomo 9 como eventos precoces (KNOWLES; HURST, 2015; NORDENTOFT et al., 2018).

O câncer de bexiga é classificado principalmente com base no tipo histológico, sendo o carcinoma urotelial o mais frequente, responsável por cerca de 90% dos casos, originando-se do urotélio que reveste internamente a bexiga (JONOSKY; ADAM; WADEE, 2025). Esse tipo pode apresentar-se como não invasivo, quando permanece restrito à mucosa ou à lâmina própria, incluindo lesões papilíferas não invasivas, carcinoma in situ, caracterizado por lesão plana de alto potencial maligno, e tumores T1, nos quais há invasão da lâmina própria sem acometimento muscular; ou como invasivo, quando ocorre infiltração da camada muscular própria, condição associada a maior agressividade, risco de metástases e pior prognóstico (BABJUK et al., 2021).

Além da profundidade de invasão, o carcinoma urotelial é classificado quanto ao grau histológico, sendo os tumores de baixo grau menos agressivos, com crescimento mais lento e menor risco de progressão, enquanto os de alto grau apresentam maior atipia celular, maior probabilidade de invasão muscular e

disseminação metastática (CLAPS et al., 2024). Outros tipos histológicos menos comuns incluem o carcinoma espinocelular, frequentemente associado a inflamação crônica e infecções persistentes, como a esquistossomose (HOEGGER et al., 2023), o adenocarcinoma, de comportamento geralmente mais agressivo, e formas raras como o carcinoma de pequenas células, altamente maligno (KWON et al., 2025).

O diagnóstico do câncer de bexiga baseia-se na associação entre avaliação clínica, exames de imagem, análise citológica da urina e, principalmente, na confirmação histopatológica (AHMADI; DUDDALWAR; DANESHMAND, 2021). A presença de hematúria, especialmente indolor, constitui o principal sinal clínico inicial e geralmente motiva a investigação (WAISBROD et al., 2021). A cistoscopia é considerada o exame padrão-ouro para a detecção de lesões vesicais, permitindo a visualização direta da mucosa e a realização de biópsias ou ressecção transuretral da bexiga (RTU-B), procedimento essencial para confirmação diagnóstica, estadiamento inicial e classificação histológica do tumor (DEVLIES et al., 2023).

Métodos de imagem, como a ultrassonografia, a tomografia computadorizada e a ressonância magnética, são utilizados como exames complementares, auxiliando na avaliação da extensão tumoral, do comprometimento da parede vesical e da presença de metástases (AHMADI; DUDDALWAR; DANESHMAND, 2021). A citologia urinária, embora apresente maior sensibilidade para tumores de alto grau e carcinoma in situ e menor sensibilidade para tumores de baixo grau, desempenha papel adjuvante no diagnóstico e no acompanhamento da doença (FIGAROA et al., 2023).

O tratamento do câncer de bexiga é definido principalmente de acordo com o estágio da doença, especialmente pela presença ou não de invasão da camada muscular, além de características histológicas e risco de recorrência (WITJES et al., 2020). Nos tumores não músculo-invasivos, a abordagem inicial consiste, em geral, na ressecção transuretral da bexiga (RTU-B), que tem finalidade diagnóstica e terapêutica (MCNALL et al., 2024). Em muitos casos, essa estratégia é complementada por terapia intravesical, com destaque para a instilação de quimioterápicos ou do bacilo de Calmette-Guérin (BCG), indicada para reduzir o risco de recorrência e progressão tumoral, sobretudo em pacientes classificados como de risco intermediário ou alto (LÓPEZ-BELTRAN et al., 2024).

Nos casos de câncer de bexiga músculo-invasivo, o tratamento padrão envolve a cistectomia radical, associada à linfadenectomia pélvica, frequentemente precedida por quimioterapia neoadjuvante à base de platina, que demonstrou benefício em sobrevida. Em situações selecionadas, estratégias de preservação vesical podem ser consideradas, combinando RTU-B, quimioterapia e radioterapia (WITJES et al., 2020). Para doença localmente avançada ou metastática, o manejo inclui quimioterapia sistêmica, imunoterapia com inibidores de checkpoint imunológico e, mais recentemente, terapias-alvo, ampliando as opções terapêuticas e permitindo abordagens mais individualizadas conforme o perfil clínico e biológico do tumor (WANG et al., 2025).

No que tange ao câncer de fígado, o carcinoma hepatocelular (HCC) é o tipo mais prevalente e está fortemente ligado a processos de lesão crônica e inflamação. As infecções pelos vírus das hepatites B e C (HBV e HCV) são os principais determinantes de risco (WANG et al., 2025). Somado a isso, o consumo excessivo de álcool, que pode levar a doença hepática alcoólica e cirrose (um estado de fibrose hepática que predispõe ao câncer) e a exposição a aflatoxinas (toxinas fúngicas em alimentos contaminados) potencializam a carcinogênese, especialmente quando em conjunto com o HBV (LIU et al., 2018; WANG et al., 2025).

Nas últimas décadas, fatores metabólicos como obesidade, diabetes e doença hepática gordurosa não alcoólica (NAFLD) emergiram como riscos cada vez mais importantes à medida que se tornam mais prevalentes globalmente. A NAFLD, que pode evoluir para esteato-hepatite e cirrose, está associada a um aumento do risco de HCC mesmo em ausência de cirrose franca, implicando mecanismos metabólicos inflamatórios e resistência à insulina na carcinogênese hepática (WANG et al., 2025; YIN et al., 2024). Além disso, o HCC apresenta mutações em CTNNB1 (β -catenina), AXIN1 e TERT (LLOVET et al., 2021; ZUCCHINI et al., 2022).

Um evento genético compartilhado é a mutação no promotor do gene TERT, que contribui para a reativação da telomerase e a imortalização celular em ambos os tipos tumorais (KINDE et al., 2013; NAULT; ZUCMAN-ROSSI, 2016). O gene TP53 exerce papel central como "guardião do genoma". Mutações nesse gene estão entre as mais comuns na oncogênese humana, levando à perda da capacidade de reparo ou apoptose (YAN et al., 2025). No HCC, mutações em TP53 associam-se a agentes

ambientais como a aflatoxina B1 e indicam pior prognóstico (VILLANUEVA, 2019). Contudo, a linhagem celular HepG2 é um exemplo de HCC que mantém o TP53 selvagem, sendo útil para estudos de resposta funcional ao dano (LLOVET et al., 2021). Em contrapartida, no câncer de bexiga, mutações em TP53 são frequentes em tumores de alto grau, como observado na linhagem T24, refletindo um fenótipo mais agressivo e invasivo (KNOWLES; HURST, 2015). Esses fatores combinados, infecções virais, lesões hepáticas crônicas, intoxicações ambientais e condições metabólicas, explicam a maior parte da etiologia do câncer de fígado na população mundial.

O câncer de fígado também é classificado de acordo com o tipo histológico, como dito anteriormente, o carcinoma hepatocelular (CHC) é o mais frequente, responsável por aproximadamente 75-85% dos casos (CHOI; THUNG, 2023). Outros tipos relevantes incluem o colangiocarcinoma intra-hepático, que se desenvolve a partir do epitélio dos ductos biliares (SARCOGNATO et al., 2021), além de neoplasias mais raras, como o hepatoblastoma, predominante na infância (JIAO; SAXENA; MOROTTI, 2025), e os tumores mistos hepatocolangiocelulares (carcinoma hepatocelular-colangiocarcinoma combinado) (BEAUFRÈRE; CALDERARO; PARADIS, 2021).

Do ponto de vista morfológico, o CHC pode manifestar-se sob a forma de lesões nodulares únicas, multinodulares ou infiltrativas, sendo estas últimas associadas a maior agressividade biológica e pior prognóstico, em razão de maior extensão tumoral e invasão vascular (CALDERARO et al., 2019). Assim como no câncer de bexiga, o câncer de fígado também pode ser classificado quanto ao grau, usualmente descrito em baixo ou alto grau, informação que contribui para a compreensão de seu comportamento biológico e de diferenças na evolução da doença entre os pacientes (CHOI; THUNG, 2023). A avaliação conjunta do tipo histológico, do padrão de lesão e do grau tumoral é fundamental para a definição da conduta terapêutica e para a estimativa do prognóstico em pacientes com esses cânceres.

O diagnóstico do câncer de fígado baseia-se na integração de dados clínicos, laboratoriais, de imagem e, em situações específicas, histopatológicos (CANDITA et al., 2023). Em pacientes com doença hepática crônica ou cirrose, métodos de

imagem como a ultrassonografia, a tomografia computadorizada e a ressonância magnética com contraste desempenham papel central, permitindo a identificação de lesões focais com padrões vasculares característicos, especialmente no carcinoma hepatocelular (DE LA IGLESIA; GUERRERO, 2024). Marcadores séricos, como a alfafetoproteína, podem ser utilizados como ferramenta complementar, embora apresentem sensibilidade e especificidade limitadas (ZHAO et al., 2024). A biópsia hepática é reservada para casos em que os achados de imagem não são conclusivos ou quando há suspeita de tumores menos frequentes, sendo fundamental para a confirmação diagnóstica e caracterização histológica da neoplasia (BRUSSET et al., 2023).

No carcinoma hepatocelular, as opções terapêuticas com intenção curativa incluem a ressecção cirúrgica, indicada para tumores iniciais em pacientes com função hepática preservada (ALLAIRE et al., 2020), e o transplante hepático, recomendado em casos selecionados que atendem a critérios específicos de tamanho e número de lesões, como os critérios de Milão (MEHTA et al., 2020). Para pacientes não candidatos à cirurgia, técnicas locorregionais, como a ablação por radiofrequência ou micro-ondas e a quimioembolização transarterial, desempenham papel central no controle da doença em estágios intermediários (MAKARY et al., 2020).

Em estágios avançados, ou quando há progressão após terapias locorregionais, o tratamento baseia-se principalmente em terapias sistêmicas, incluindo agentes alvo-moleculares e imunoterapia, que têm demonstrado melhora na sobrevida e no controle tumoral (TSUNG; QUINN; EJAZ, 2024). Para outros tumores hepáticos primários, como o colangiocarcinoma, a ressecção cirúrgica permanece a principal estratégia com potencial curativo (ORCUTT; ANAYA, 2018), sendo frequentemente complementada por quimioterapia adjuvante (SUN et al., 2024), enquanto, em casos irresssecáveis, priorizam-se abordagens sistêmicas e paliativas (TSUNG; QUINN; EJAZ, 2024).

Tanto no câncer de bexiga quanto no câncer de fígado, as terapias atualmente disponíveis apresentam limitações clínicas e toxicológicas significativas. No câncer de bexiga, procedimentos como a ressecção transuretral e a cistectomia radical podem implicar em morbidade cirúrgica elevada e impacto na qualidade de

vida (LÓPEZ-BELTRAN et al., 2024), enquanto terapias intravesicais e quimioterápicas convencionais frequentemente exibem recorrência tumoral e resistência medicamentosa, reduzindo sua eficácia a longo prazo (LI; YOUSSEF; BUANZ, 2022). No câncer de fígado, opções curativas como ressecção hepática e transplante são restritas a pacientes com doença inicial e função hepática preservada, com muitos indivíduos sendo inaptos a esses procedimentos (MORIS et al., 2025). Além disso, terapias sistêmicas e locorregionais podem apresentar eficácia limitada e toxicidade sistêmica, sem controle satisfatório da progressão tumoral em estágios avançados. Esses pontos negativos destacam a necessidade de abordagens terapêuticas mais eficazes, específicas e com menor perfil de efeitos adversos (SADRINASAB et al., 2025).

O uso de produtos naturais no tratamento do câncer tem sido amplamente investigado devido às vantagens que essas substâncias oferecem no desenvolvimento de novas estratégias terapêuticas (NAEEM et al., 2022). Compostos de origem natural representam uma fonte vasta e quimicamente diversa de metabólitos secundários produzidos por plantas, microrganismos e outros organismos, como alcaloides, terpenoides e compostos fenólicos como os flavonoides, associadas à inibição da proliferação celular, indução de apoptose, regulação do ciclo celular e modulação de vias de sinalização envolvidas na carcinogênese, angiogênese e progressão tumoral (MUHAMMAD et al., 2022).

Além disso, produtos naturais podem atuar como agentes adjuvantes às terapias convencionais, aumentando a sensibilidade das células tumorais aos tratamentos padrão e auxiliando na superação de mecanismos de resistência tumoral, como já demonstrado em diversos estudos pré-clínicos e alguns clínicos com fitoquímicos que revertem quimiorresistência e reduzem toxicidade induzida por quimioterapia (CASTAÑEDA et al., 2022). Esses achados sugerem fortemente os produtos naturais como fontes estratégicas para o desenvolvimento de agentes anticâncer, embora sejam necessários mais estudos clínicos para consolidar sua eficácia e segurança em larga escala (HUANG; LU; DING, 2021).

As chalconas constituem uma importante classe de compostos fenólicos pertencentes ao grupo dos flavonoides, amplamente distribuídas em alimentos de origem vegetal e em diversas plantas usadas tradicionalmente como fitoterápicos,

com destaque para alcaçuz, Angelica, fingerroot, lúpulo e várias leguminosas (RUDRAPAL et al., 2021). Estruturalmente, são caracterizadas por um sistema α,β -insaturado de cetona aromática (1,3-diaril-2-propen-1-ona), o que lhes confere elevada reatividade e versatilidade para modificações estruturais, facilitando a síntese de numerosos derivados com propriedades farmacológicas otimizadas (JASIM et al., 2021).

No contexto oncológico, chalconas naturais e sintéticas exibem um amplo espectro de atividades antitumorais em modelos *in vitro* e *in vivo*, incluindo inibição da proliferação, indução de morte celular programada e parada do ciclo celular (LEITE et al., 2023). Adicionalmente, chalconas exibem efeitos anti-inflamatórios, antiangiogênicos e antimetastáticos, inibindo etapas da angiogênese tumoral, a invasão celular e a formação de metástases em modelos pré-clínicos (ADHIKARI et al., 2025). Em linhagens de câncer de bexiga, a licochalcona A inibiu a proliferação celular por meio de parada de ciclo (predominantemente em G2/M), aumento de p21/p27, redução de ciclinas e Cdc2, e indução de apoptose via via mitocondrial, com aumento de Bax/Bak, redução de Bcl-2/Bcl-xL, liberação de citocromo c e ativação de caspases-9 e -3, muitas vezes associadas a estresse oxidativo e inibição de NF- κ B (HONG et al., 2019).

Em modelos de carcinoma hepatocelular, diversos derivados de chalcona reduzem a viabilidade de células tumorais com baixa toxicidade para células não neoplásicas, promovendo parada de ciclo (G0/G1 ou SubG1), disfunção mitocondrial, produção de espécies reativas de oxigênio, ativação de p53 ou p21, e morte celular por apoptose ou autofagia (SAHIN et al., 2020). Além disso, chalconas podem modular vias centrais na carcinogênese hepática, como PI3K/Akt, NF- κ B e STAT3, suprimindo sinais de sobrevivência, proliferação e inflamação em células de carcinoma hepatocelular (MICHALKOVÁ et al., 2023).

Diante das limitações associadas às terapias atualmente disponíveis para os cânceres de bexiga e fígado, bem como dos potenciais antineoplásicos atribuídos às chalconas em estudos pré-clínicos, a literatura aponta para a necessidade de aprofundar a investigação de novas moléculas com esse perfil químico. Nesse contexto, compostos sintéticos, como a metilchalcona, surgem como candidatos de interesse para avaliação antitumoral.

2.1 Justificativa

O câncer de bexiga e o câncer de fígado figuram entre as neoplasias de maior impacto clínico e epidemiológico, sendo frequentemente associados a opções terapêuticas limitadas, elevada toxicidade sistêmica e desenvolvimento de resistência aos tratamentos convencionais, especialmente em estágios avançados da doença. Nesse contexto, os produtos naturais e seus derivados têm se destacado como fontes relevantes para a descoberta de novos agentes antineoplásicos, com destaque para as chalconas, uma classe de flavonoides amplamente descrita na literatura por seu potencial antitumoral e pela capacidade de modular múltiplas vias envolvidas na carcinogênese. Alguns estudos pré-clínicos demonstram que chalconas apresentam atividade citotóxica seletiva, indução de morte celular e interferência em processos relacionados à proliferação e sobrevivência tumoral em diferentes tipos de câncer. No entanto, apesar desses achados, ainda são escassos os estudos que investigam de forma sistemática o potencial de chalconas sintéticas, como a metilchalcona, nos cânceres de bexiga e fígado. Diante dessa lacuna, o presente trabalho justifica-se pela necessidade de aprofundar a avaliação do perfil antitumoral dessa molécula, visando contribuir para a identificação de novas alternativas terapêuticas mais eficazes e seguras no tratamento dessas neoplasias.

3. OBJETIVOS

3.1. Objetivo Geral

Investigar o potencial antineoplásico do composto Metilchalcona em linhagens celulares tumorais de câncer de bexiga e de fígado.

3.2. Objetivos Específicos

- Avaliar a seletividade da Metilchalcona frente às linhagens celulares selecionadas;
- Investigar os efeitos citotóxicos e antiproliferativos da metilchalcona;
- Observar as alterações morfológicas induzidas pela metilchalcona;
- Examinar a influência do composto sobre a migração celular;
- Verificar o impacto do tratamento na formação de colônias;
- Analisar como o composto modula o ciclo celular;
- Determinar o tipo de morte celular induzido pela metilchalcona.

4. MATERIAIS E MÉTODOS

4.1 Linhagens celulares e compostos químicos

As linhagens celulares T24 (tumor de bexiga) e HepG2 (hepatoma) foram obtidas da Universidade Federal do Rio de Janeiro e a linhagem MRC-5 foi prontamente doada pelo Prof Geraldo Célio Brandão (UFOP). A linhagem MRC-5, células normais de fibroblastos de pulmão humano, foi empregada para análise de seletividade (Índice de seletividade superior a 2), ou seja, da capacidade do composto de ser citotóxico somente para células tumorais em determinadas concentrações.

Essas células foram armazenadas em nitrogênio líquido (-195 °C), em alíquotas contendo 1×10^6 células/ml em solução de congelamento com 10% de DMSO. Para os experimentos, as células foram descongeladas e cultivadas em monocamadas, utilizando os meios DMEM e HAM F10 (Sigma), suplementados com 10% de soro fetal bovino (Cultilab), 1% de penicilina (Sigma) e 1% de estreptomicina (Sigma), mantidas em incubadora a 37 °C com 5% de CO₂ até atingirem a confluência (DA SILVA et al., 2012).

No subcultivo, o meio foi descartado, seguido pela adição de 5 ml de solução de Hanks 1X (0,4 g de KCl, 0,06 g de KH₂PO₄, 0,04 g de Na₂HPO₄, 0,35 g de NaHCO₃, 1 g de glicose, 8 g de NaCl, H₂O q.s.p. 1000 ml) por 2 minutos. Após a retirada da solução de Hanks, foram adicionados 2 ml de solução de tripsina/EDTA 0,25% 1X (Invitrogen) por 5 minutos, até que as células se desprendessem.

Os experimentos foram conduzidos com células em fase de crescimento exponencial. As células foram tratadas com uma metilchalcona sintética, a (E)-3-(2,3-dimetoxi-5-propilfenil)-1-(p-tolil)prop-2-en-1-ona, derivada do 2-metoxi-4-propilfenol, em concentrações definidas previamente nos ensaios de citotoxicidade.

4.2 Ensaio de citotoxicidade

A citotoxicidade foi avaliada por meio do método de redução do MTT (brometo de 3-[4,5-dimetiltiazol-2-il]-2,5-difenil tetrazólio). As células foram cultivadas em placas de 96 poços e, após 24 horas, foram expostas a diferentes concentrações do

composto por períodos de 24 e 48 horas. Células não tratadas serviram como controle, e os resultados foram apresentados como a porcentagem de viabilidade celular (MOSMANN, 1983). Neste teste, foram determinados os valores de IC₅₀, IC₇₅ e IC₉₀, que indicam as concentrações a serem empregadas nos experimentos subsequentes, além do tempo ideal de tratamento.

4.3 Morfologia Celular

Para investigar o potencial dos compostos em induzir alterações na morfologia celular, 1×10^5 células foram semeadas em placas de 24 poços. Após 24 horas de incubação, as células foram tratadas com o composto por um período de 48 horas. Como controle (CNT), foram utilizadas células não tratadas.

Ao final do tratamento, as células foram examinadas utilizando um microscópio invertido com contraste de fase, sob aumento de 200x. As alterações morfológicas observadas foram registradas por meio de fotografias, capturadas com uma câmera digital acoplada ao microscópio por um adaptador específico.

4.4 Migração celular

A migração celular foi avaliada por meio do ensaio de cicatrização de feridas. Para isso, 1×10^5 células foram semeadas em placas de 24 poços. Após 24 horas, a monocamada formada foi raspada com uma ponteira estéril de 200 μ L, criando uma "ferida". Em seguida, as células foram lavadas, fotografadas e tratadas com o composto por 48 horas. Células não tratadas serviram como controle (CNT).

Ao final do tratamento, a migração celular foi registrada por meio de fotografias. A quantificação da motilidade foi realizada utilizando o software ImageJ (version 1.54), medindo a distância entre as frentes invasoras das células em três campos escolhidos de forma aleatória.

4.5 Sobrevivência clonogênica

Cerca de 1×10^5 células foram semeadas em placas de 24 poços e, após 24 horas para aderência, foram tratadas com o composto por 48 horas. Após o período de tratamento, as células foram lavadas, removidas com tripsina e aproximadamente 1×10^3 células foram redistribuídas em placas de 12 poços para realização de três

experimentos independentes. As placas foram incubadas em uma estufa a 37 °C por um período de 7 a 10 dias, até que os poços de controle (sem tratamento) atinjam a confluência.

Em seguida, o meio de cultura foi descartado, as células foram lavadas novamente com solução de Hanks, fixadas em formaldeído 4% por 20 minutos, hidratadas com metanol 100% por 20 minutos e coradas com violeta cristal a 0,5% dissolvida em metanol 25%. O excesso de corante foi removido utilizando uma solução de ácido acético a 33%. A absorbância foi medida em um espectrofotômetro a 570 nm, e os resultados foram apresentados como a porcentagem de colônias em relação ao controle (células não tratadas) (Huang et al., 2018).

$$\text{EFC} = \frac{\text{n}^\circ \text{ de colônias após o tratamento}}{\text{n}^\circ \text{ de colônias no controle}} \times 100$$

4.6 Análise do ciclo celular

Para analisar a cinética do ciclo celular, foram plaqueadas 1×10^5 células em placas de 12 poços. Após 24 horas, as células foram expostas a diferentes concentrações do composto por 48 horas. Após o tratamento, elas foram lavadas com solução de Hanks, destacadas com tripsina e centrifugadas a 1000 rpm por 10 minutos. O sedimento celular obtido foi fixado em etanol a 70% e armazenado a -20 °C por pelo menos 12 horas (NAKAO et al., 2023).

Antes da análise, o etanol foi removido por centrifugação a 1100 rpm por 10 minutos, seguido de lavagem com solução de Hanks. As células foram centrifugadas novamente e ressuspensas em 200 µL de uma solução de marcação composta por 0,0914 g de cloreto de magnésio, 0,0774 g de citrato de sódio, 0,04766 g de hepes, 10 µL de Triton-X, 0,5 mL de iodeto de propídeo e 9,490 mL de água.

As células foram mantidas no gelo e protegidas da luz por pelo menos 30 minutos antes da análise. A distribuição percentual das células nas fases G0/G1, S e G2/M foi determinada por citometria de fluxo (BD FACSCalibur) e os dados foram analisados com o software FlowJo. Foram avaliados 20.000 eventos, e as análises foram realizadas em triplicata.

4.7 Avaliação de apoptose/necrose

Células em fase de crescimento exponencial foram semeadas em placas de 12 poços, na densidade de 1×10^5 células por poço, utilizando-se 3 mL de meio de cultura completo. Paralelamente aos grupos experimentais, foram incluídos quatro grupos controle: células não marcadas, células marcadas exclusivamente com iodeto de propídio (IP), células marcadas apenas com Anexina V e células marcadas simultaneamente com IP e Anexina V.

Após 24 horas de incubação, os grupos experimentais foram tratados com o composto em concentrações de 2.15, 4.62 e 9.25 μM para a linhagem HepG2 e 4.62, 9.25 e 18.50 μM para a linhagem T24, por um período de 48 horas. Decorrido o tratamento, o sobrenadante de cada poço foi coletado em tubos apropriados para citometria e centrifugado a 1.100 rpm por 10 minutos. As células aderentes remanescentes foram lavadas com 1 mL de solução de Hanks, seguidas da adição de 500 μL de tripsina para promover o destacamento celular. A ação da tripsina foi neutralizada pela adição de 500 μL de meio de cultura completo, sendo o material celular obtido combinado ao sobrenadante previamente centrifugado e novamente centrifugado sob as mesmas condições. Após a centrifugação, o sobrenadante foi descartado.

Para a etapa de marcação, o tampão de ligação da Anexina V (1x) foi preparado pela diluição de 1 mL da solução concentrada (componente C, 5x) em 5 mL de água destilada. A solução de trabalho de iodeto de propídio (100 $\mu\text{g}/\text{mL}$) foi obtida pela diluição de 5 μL do estoque a 1 mg/mL (componente B) em 45 μL do tampão 1x. As células de cada amostra foram ressuspensas em 100 μL do tampão 1x, seguidas da adição de 5 μL de Anexina V conjugada ao FITC (componente A) e 1 μL da solução de IP. Os tubos foram brevemente homogeneizados em vórtex e incubados por 15 minutos à temperatura ambiente, em condições de proteção da luz. Ao término da incubação, adicionaram-se 100 μL adicionais do tampão 1x, as amostras foram homogeneizadas e mantidas em gelo até a aquisição dos dados por citometria de fluxo.

5. RESULTADOS

Os resultados desse trabalho foram publicados em Hermenegildo AM, Nakao IA, Vaz LBA, Coutinho GG, Toledo JLM, Almeida TC, Roquete Amparo T, Anunciação KF, da Silva GN, Brandão GC, Braga SFP, de Souza TB. Design and Synthesis of Novel Chalcone Derivatives Targeting Bladder and Liver Cancer: Cytotoxicity Evaluation and Preliminary Mechanistic Studies. ACS Omega. 2025 Dec 2;10(49):60612-60626. doi: 10.1021/acsomega.5c08480 (Anexo 1).

5.1 Ensaio de citotoxicidade

A atividade citotóxica da nova chalcona foi avaliada contra duas linhagens celulares cancerosas HepG2 e T24, e uma linhagem celular não tumoral, a MRC-5 (fibroblastos pulmonares humanos), a fim de determinar o perfil de seletividade. Os resultados foram expressos como concentração citotóxica capaz de reduzir 50% da viabilidade celular (CC50, em μM), com respectivos desvios-padrão, bem como índices de seletividade (SI) e são apresentados na tabela 1.

Tabela 1: Atividades citotóxicas das chalconas obtidas contra células MRC-5, HepG2 e T24 (concentração citotóxica de 50 % - CC 50), desvios-padrão (n = 3) e índices de seletividade (SI).

CC ₅₀ μM					
Composto	MRC-5	HepG2	SI	T24	SI
Metilchalcona	55.5 \pm 1.2	4.5 \pm 1.2	12.2	5.0 \pm 1.6	11.1

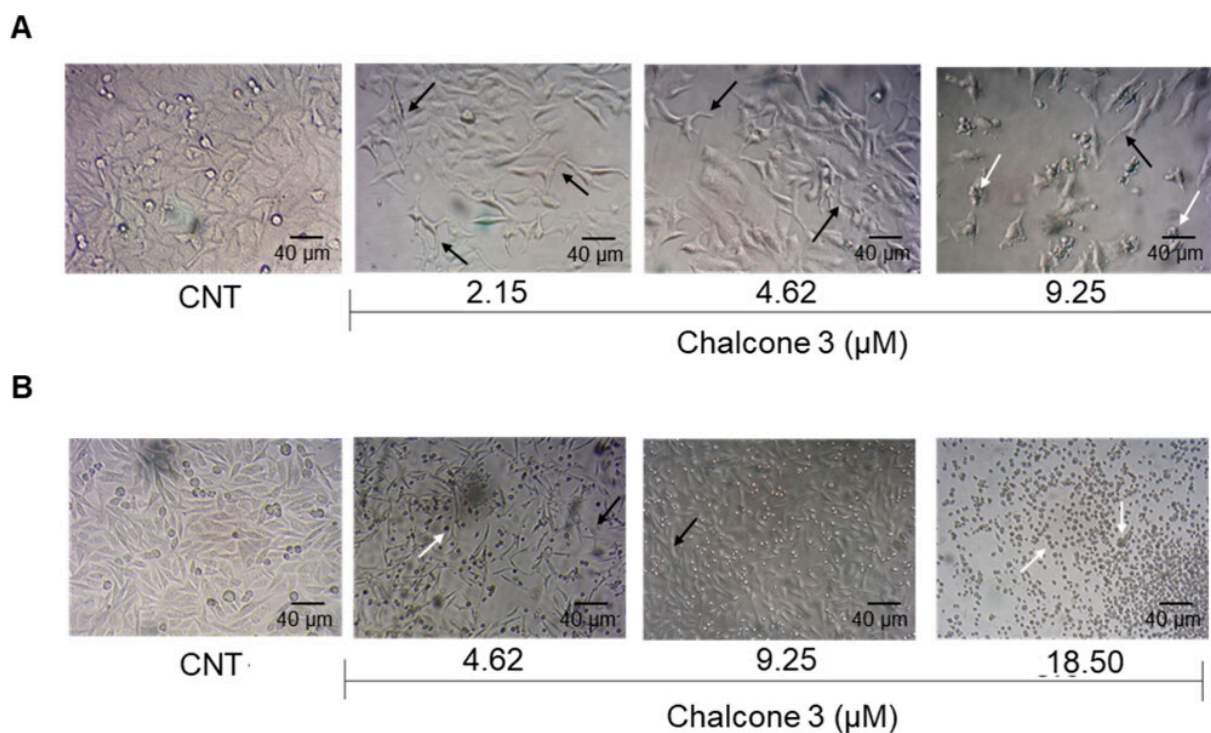
Fonte: autoria própria

Com base nos valores de CC50 apresentados na Tabela 1, foram realizados os cálculos do índice de seletividade (SI), a partir dos quais foram definidas as concentrações a serem utilizadas nos experimentos subsequentes. Para a linhagem HepG2, foram estabelecidas as concentrações de 2.15 μM , 4.62 μM e 9.25 μM . Para a linhagem T24, foram definidas as concentrações de 4.62 μM , 9.25 μM e 18.50 μM . O tempo de tratamento adotado foi de 48 horas para ambas as linhagens celulares, sendo essas condições padronizadas e mantidas em todos os experimentos que se seguem.

5.2 Morfologia celular

A análise morfológica por microscopia de contraste de fase demonstrou alterações significativas nas células Hep-G2 e T24 após o tratamento com a metilchalcona. As células apresentaram perda da adesão ao substrato, redução do volume citoplasmático, arredondamento e presença de corpos apoptóticos, características que se tornaram mais evidentes à medida que a concentração do composto aumentava. Em contrapartida, as células do grupo controle mantiveram morfologia típica, com adesão e alongamento característicos.

Figura 2 - Alterações morfológicas nas linhagens celulares Hep-G2 (A) e T24 (B) após tratamento com a metilchalcona.



As setas brancas são restos celulares, indicando morte celular; as setas pretas são células alongadas, sugerindo alterações no citoesqueleto.

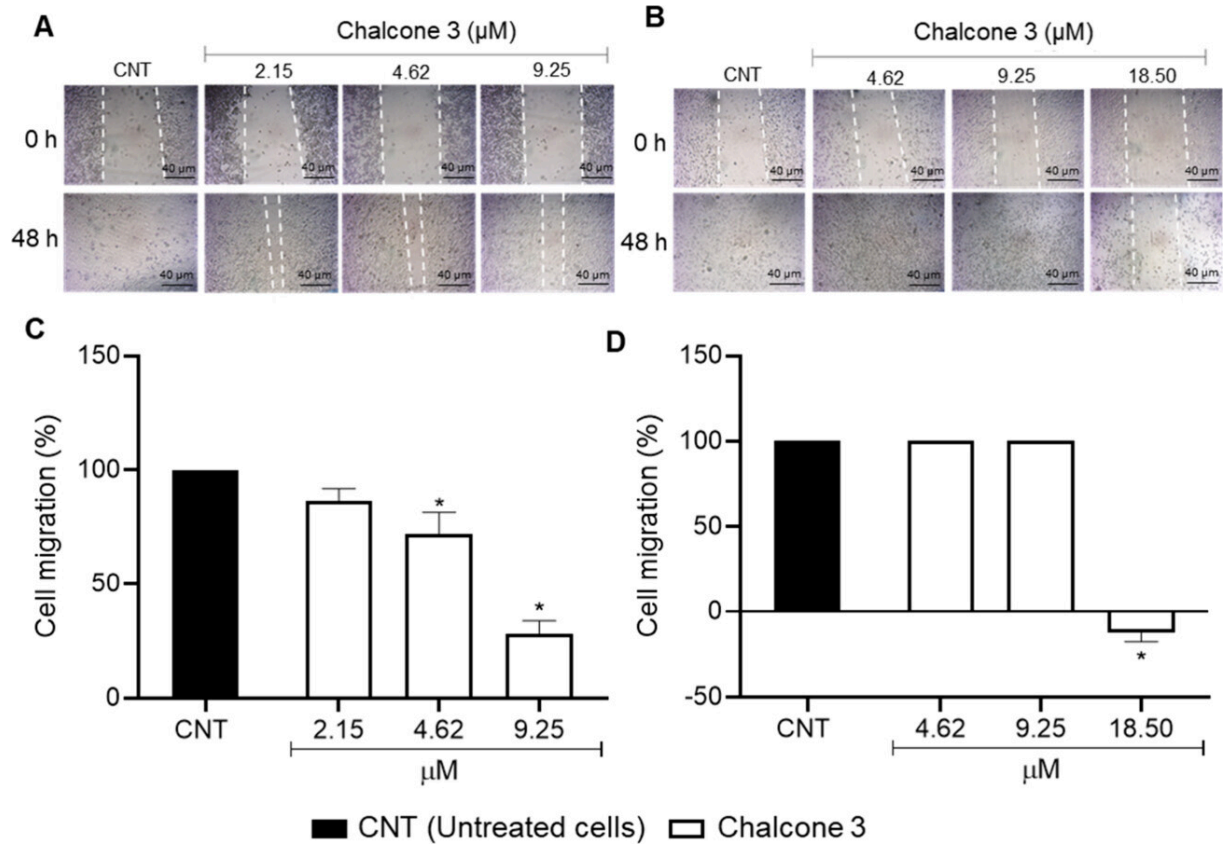
Fonte: Autoria própria.

5.3 Migração celular

A atividade antimigratória da metilchalcona foi avaliada pelo ensaio de cicatrização de feridas nas linhagens Hep-G2 e T24. Os resultados demonstraram que ela reduziu de forma significativa a migração celular em ambas as linhagens, em comparação com os grupos controle. Após 24 horas de incubação, a taxa de

fechamento da ferida foi consideravelmente menor nas células tratadas com a metilchalcona, especialmente nas concentrações mais elevadas.

Figura 3. Efeito da metilchalcona na migração das linhagens celulares HepG2 (A, C) e T24 (B, D).



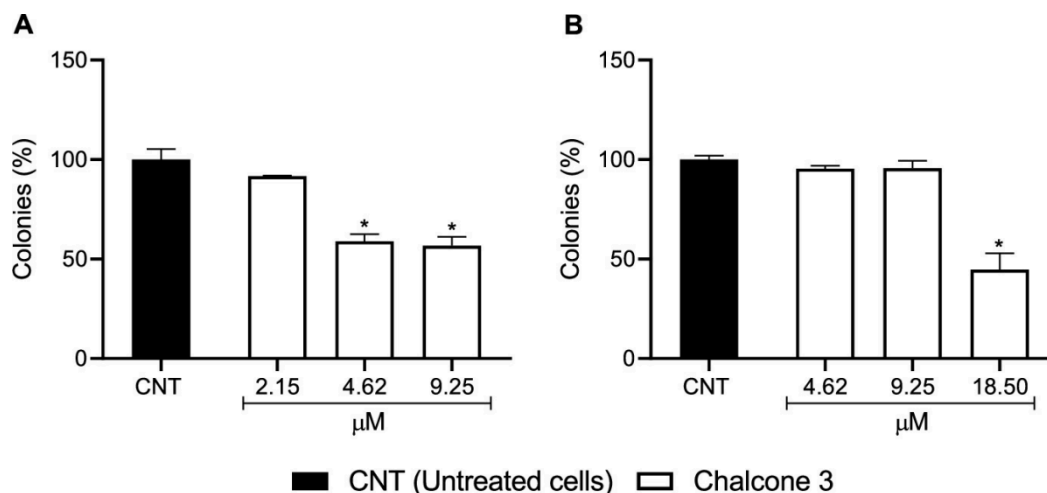
* $p < 0,05$ em comparação com as células não tratadas (CNT), determinado por ANOVA de uma via seguida pelo teste post-hoc de Dunnett. Os experimentos foram realizados em triplicata e os resultados são expressos como média e desvio padrão (barras).

Fonte: Autoria própria.

5.4 Sobrevivência clonogênica

Os resultados mostraram uma redução na formação de colônias em células Hep-G2 nas concentrações de 4.62 μ M e 9.25 μ M. Para as células T24, um efeito significativo foi observado somente na concentração máxima testada (18.50 μ M).

Figura 4 - Efeito da metilchalcona na viabilidade clonogênica das linhagens celulares HepG2 (A) e T24 (B).



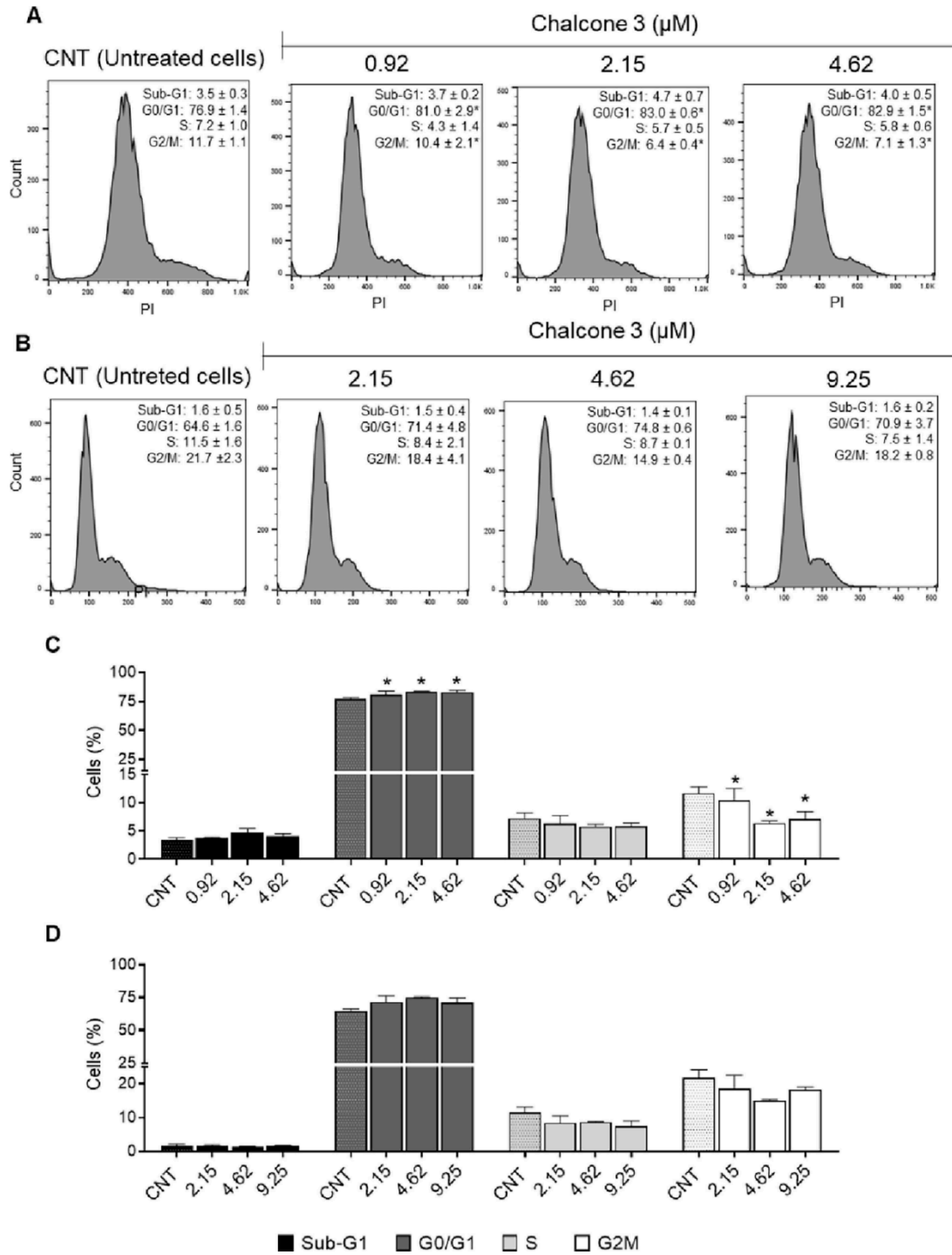
* $p < 0,05$ em comparação com as células não tratadas (CNT), determinado por ANOVA de uma via seguida pelo teste post-hoc de Dunnett. Os experimentos foram realizados em triplicata e os resultados são expressos como média e desvio padrão (barras).

Fonte: Autoria própria.

5.5 Análise do ciclo celular

Nas células HepG2, observou-se um aumento significativo na população de células na fase G0/G1 em todas as concentrações testadas (0.92-4.62 µM), acompanhado por uma redução correspondente na fase G2/M. Notavelmente, a fração de células na fase subG1 (indicativa de apoptose) permaneceu estável. Em contraste, as células T24 apresentaram um perfil de resposta distinto; nenhuma diferença foi observada após o tratamento.

Figura 5 - Análise do efeito da metilchalcona na distribuição do ciclo celular das células HepG2 (A, C) e T24 (B, D).



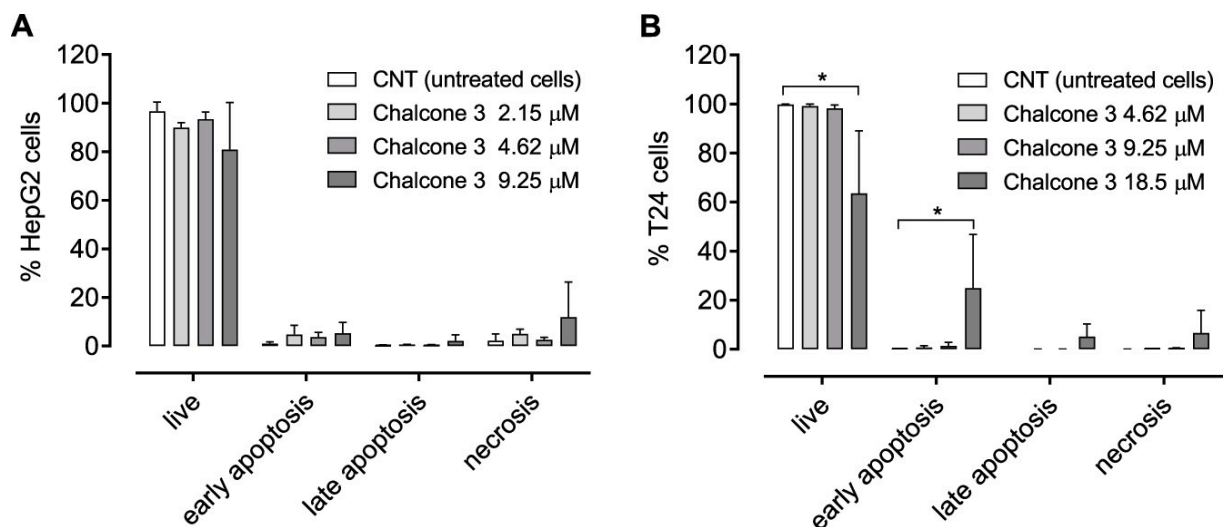
* $p < 0,05$ em comparação com as células não tratadas (CNT), determinado por ANOVA de uma via seguida pelo teste post-hoc de Dunnett. Os experimentos foram realizados em triplicata e os resultados são expressos como média e desvio padrão (barras).

Fonte: Autoria própria.

5.6 Avaliação de apoptose/necrose

Consistente com as observações sobre a progressão do ciclo celular, a modalidade de morte celular induzida pela metilchalcona foi dependente da linhagem celular. Em células HepG2, o tratamento com a metilchalcona em concentrações de 2.15, 4.62 ou 9.25 μM não resultou em um aumento significativo na porcentagem de células apoptóticas ou necróticas. Por outro lado, nas células T24, a metilchalcona, na dose de 18.5 μM , reduziu a porcentagem de células viáveis e aumentou a porcentagem de células em apoptose precoce.

Figura 6 - Porcentagem de células HepG2 (A) e T24 (B) viáveis, apoptóticas e necróticas após o tratamento com metilchalcona durante 48 h.



$p < 0,05$ em comparação com as células não tratadas (CNT), determinado por ANOVA de uma via seguida pelo teste post-hoc de Dunnett. Os experimentos foram realizados em triplicata e os resultados são expressos como média e desvio padrão (barras).

Fonte: Autoria própria.

6. DISCUSSÃO

Os protocolos terapêuticos atualmente empregados no tratamento do câncer de bexiga e do carcinoma hepatocelular, embora tenham proporcionado avanços significativos na sobrevida dos pacientes, ainda apresentam limitações clínicas importantes.

No câncer de bexiga músculo-invasivo, a quimioterapia baseada em cisplatina permanece como padrão terapêutico, especialmente em esquemas neoadjuvantes e no contexto metastático. Contudo, sua elevada toxicidade, associada a efeitos adversos como nefrotoxicidade, neurotoxicidade e mielossupressão, restringe sua utilização em parcela significativa dos pacientes. Estima-se que uma proporção expressiva dos indivíduos seja considerada inelegível para esquemas à base de cisplatina devido a comorbidades, função renal comprometida ou fragilidade clínica, limitando as opções terapêuticas disponíveis e impactando negativamente o prognóstico (JIANG et al., 2021).

De forma semelhante, no carcinoma hepatocelular, as estratégias terapêuticas com potencial curativo, como ressecção cirúrgica e transplante hepático, são restritas a pacientes diagnosticados em estágios iniciais e com função hepática preservada. Em fases mais avançadas, o tratamento baseia-se predominantemente em terapias sistêmicas, incluindo inibidores multiquinase e imunoterapia (SINGAL; KUDO; BRUIX, 2023). Embora essas abordagens tenham ampliado as perspectivas terapêuticas, sua eficácia ainda é limitada, além de estarem associadas a custos elevados, toxicidade sistêmica e desenvolvimento de resistência tumoral (CHAKRABORTY; SARKAR, 2022). Esses fatores evidenciam a necessidade contínua de novas estratégias terapêuticas que apresentem maior seletividade, menor toxicidade e capacidade de modular múltiplos alvos moleculares envolvidos na progressão tumoral.

Nesse contexto, produtos naturais desempenham papel central no desenvolvimento de agentes antineoplásicos. Diversos fármacos atualmente utilizados na oncologia têm origem direta ou indireta em metabólitos secundários vegetais, como o paclitaxel, derivado de *Taxus brevifolia*, e os alcaloides da vinca, como a vincristina, extraída de *Catharanthus roseus* (ASMA et al., 2022).

Entre as classes de compostos fenólicos com potencial antitumoral, as chalconas destacam-se por sua versatilidade estrutural e ampla gama de atividades biológicas. Compostos como licochalcona A, xanthohumol e flavokawain A vêm sendo amplamente investigados em diferentes modelos tumorais, incluindo cânceres urológicos e hepáticos, apresentando efeitos antiproliferativos e pró-apoptóticos. Alguns desses derivados já avançaram para estudos clínicos iniciais em oncologia, reforçando o potencial translacional dessa classe (YANG et al., 2021).

No presente estudo, a metilchalcona foi avaliada nas linhagens T24 e HepG2, modelos experimentais amplamente utilizados para investigação de mecanismos moleculares no câncer de bexiga e no carcinoma hepatocelular, respectivamente. A linhagem T24, caracterizada por perfil mais agressivo e mutação inativadora em *TP53*, representa um modelo relevante para análise de compostos com potencial pró-apoptótico independente de p53 (ALMEIDA et al., 2019). Já a linhagem HepG2, que mantém *TP53* funcional, permite avaliar respostas associadas à regulação do ciclo celular e mecanismos citostáticos dependentes de vias clássicas de checkpoint (CONSTANTINESCU; LUNGU, 2021). A utilização desses dois modelos possibilita compreender de maneira comparativa como compostos derivados de chalconas podem atuar em diferentes contextos moleculares tumorais.

A avaliação da citotoxicidade teve como objetivo verificar o efeito antiproliferativo da metilchalcona em células tumorais e seu potencial de seletividade frente a células não neoplásicas. Observou-se redução significativa da viabilidade nas linhagens HepG2 e T24 após 24 horas de tratamento, enquanto a MRC-5 apresentou menor sensibilidade, padrão consistente com a maior susceptibilidade de células tumorais a derivados de chalcona em comparação a células normais (NIKOLIĆ et al., 2025). Os índices de seletividade obtidos indicam que concentrações cerca de doze vezes maiores foram necessárias para reduzir a viabilidade das células saudáveis. Esses valores são considerados elevados em estudos *in vitro*, especialmente quando comparados a SIs relatados na literatura para chalconas seletivas ($\approx 3-10$) (SAFWAT et al., 2021), sugerindo perfil citotóxico diferencial favorável.

A seletividade é fundamental no desenvolvimento de agentes antineoplásicos, visto que terapias convencionais frequentemente apresentam toxicidade sistêmica

devido à baixa distinção entre células tumorais e normais. Compostos como chalcone-tienopirimidinas, híbridos triazoloquinoxalina-chalcona e chalconas O-alkiladas apresentam potente atividade antiproliferativa e índices de seletividade entre aproximadamente 5 e 10 (SAFWAT et al., 2021; VILLENA et al., 2021), reforçando que os valores observados para HepG2 e T24 são compatíveis com um perfil seletivo desejável em agentes antitumorais em fase pré-clínica.

As análises morfológicas das linhagens HepG2 e T24 tratadas com a metilchalcona revelaram alterações celulares pronunciadas. Em ambas as linhagens, observou-se uma redução na densidade celular, presença de detritos (indicando morte celular) e o aparecimento de células alongadas, sugerindo alterações no citoesqueleto. Notavelmente, a linhagem HepG2 exibiu essas alterações de forma gradual e dose-dependente em todas as concentrações testadas, enquanto a linhagem T24 apresentou mudanças morfológicas significativas apenas na concentração máxima.

Essas observações são consistentes com a capacidade de derivados de chalcona de induzir morte celular e alterações estruturais em células tumorais, como demonstrado, por exemplo, pelo composto prenilado xanthohumol, que promove morte celular e profunda remodelação morfofuncional em células neoplásicas humanas, incluindo desorganização de estruturas celulares essenciais (FUJII; KAWADA; JSG-NAFLD, 2020).

A migração celular desempenha papel central no processo de invasão e metástase tumoral, sendo determinante para a progressão do câncer. Esse fenômeno pode ser avaliado por meio do ensaio de cicatrização de ferida, que permite analisar a capacidade das células de se deslocarem e preencherem uma área previamente delimitada em monocamada (MIGLIACCIO et al., 2023).

No presente estudo, a metilchalcona demonstrou efeito antimigratório. Para a linhagem HepG2, a redução na migração foi observada em todas as concentrações estudadas, enquanto para as células T24 a inibição significativa ocorreu exclusivamente na concentração mais elevada, evidenciando sensibilidade diferencial entre as linhagens avaliadas, fenômeno também descrito para diferentes linhagens tumorais frente a compostos antitumorais e antimigratórios (PAPACHRISTOU et al., 2021).

A variação na resposta entre HepG2 e T24 pode estar relacionada às particularidades moleculares de cada linhagem, incluindo diferenças em vias associadas à adesão celular, reorganização do citoesqueleto e sinalização proliferativa (CHASTNEY et al., 2024). Achados semelhantes já foram descritos para outras chalconas e seus derivados, que apresentam inibição da migração e invasão em diferentes modelos tumorais, com sensibilidade variável entre linhagens, como observado em osteossarcoma, câncer de pulmão e glioblastoma, nos quais respostas distintas a compostos da mesma classe foram documentadas (ÇEVİK et al., 2022). Esses efeitos têm sido associados à modulação de proteínas envolvidas na dinâmica do citoesqueleto, na expressão de metaloproteinases de matriz (MMPs) e em vias de sinalização relacionadas à progressão tumoral (HAMIDI; IVASKA, 2018).

A capacidade de formar colônias é um parâmetro fundamental para avaliar o potencial proliferativo e a sobrevivência a longo prazo de células tumorais após exposição a agentes antineoplásicos, sendo o ensaio de sobrevivência clonogênica amplamente utilizado para esse fim. No presente estudo, o efeito antiproliferativo da metilchalcona foi confirmado por esse ensaio, evidenciando redução na formação de colônias pela linhagem HepG2 em todas as concentrações testadas, em consonância com relatos de chalconas que reduzem viabilidade, proliferação e clonogenicidade em modelos de câncer, incluindo hepatocarcinoma (MICHALKOVÁ et al., 2021). Em contraste, para a linhagem T24, a inibição significativa da clonogenicidade foi observada apenas na concentração máxima, indicando diferença de sensibilidade entre as linhagens avaliadas, fenômeno bem descrito para chalconas e outros agentes antineoplásicos em diferentes tipos celulares (YANG et al., 2021).

A maior sensibilidade da linhagem HepG2 pode estar relacionada à sua elevada capacidade metabólica, característica de células hepáticas, que pode favorecer a biotransformação da metilchalcona em metabólitos biologicamente mais ativos, potencializando o efeito antiproliferativo. Estudos prévios demonstram que compostos fenólicos, incluindo chalconas e flavonoides, podem ter sua atividade modulada por enzimas de metabolização hepática, resultando em efeitos citotóxicos mais pronunciados em linhagens derivadas de fígado quando comparadas a outros modelos tumorais (YANG et al., 2021).

Esses achados reforçam que a metilchalcona não apenas reduz a viabilidade celular em ensaios de curta duração, mas também compromete a capacidade de sobrevivência e proliferação a longo prazo, especialmente em células HepG2. A inibição da formação de colônias é considerada um indicador relevante de eficácia antitumoral, pois reflete a perda da capacidade de uma única célula tumoral originar uma população clonal, característica associada à progressão e recorrência tumoral (FRANKEN et al., 2006). Dessa forma, os resultados obtidos sugerem que a metilchalcona apresenta potencial antiproliferativo sustentado, com resposta dependente do tipo celular.

A avaliação da progressão do ciclo celular por citometria de fluxo revelou um mecanismo de ação distinto e dependente da linhagem. Na linhagem HepG2, o tratamento com a metilchalcona induziu um bloqueio no ponto de checagem G1/S, resultando em um aumento significativo da população de células na fase G0/G1 em todas as concentrações testadas, acompanhado por uma redução correspondente na fase G2/M, padrão típico de fármacos que promovem parada em G1/S (KANDEEL et al., 2025). É importante destacar que a fração de células em sub-G1 (um marcador de apoptose) manteve-se estável, indicando que o efeito primário nesta linhagem é citostático nas concentrações avaliadas, o que é compatível com compostos que causam parada de ciclo sem aumento de sub-G1 em HepG2 e outras linhagens (CRISPO et al., 2025).

Em contraste, a linhagem T24 não apresentou alterações significativas na distribuição das fases do ciclo celular após o tratamento, mostrando relativa resistência a este efeito, fenômeno amplamente descrito para inibidores de ciclo celular, nos quais diferentes linhagens exibem perfis de sensibilidade distintos ao mesmo agente (KUMARASAMY et al., 2020). Esta disparidade na resposta evidencia diferenças intrínsecas na regulação do ciclo celular entre as linhagens, conforme documentado na literatura para outros inibidores, em que variações em vias de checkpoint, CDKs, p53/p21 e plasticidade do ciclo determinam sensibilidade ou resistência a bloqueios em G1/S ou G2/M (CHEN et al., 2012).

Por fim, a análise do perfil de morte celular por citometria de fluxo (anexina V/IP) corroborou a natureza dependente do contexto da ação da metilchalcona. Nas células HepG2, o tratamento não resultou em um aumento significativo nas

populações apoptóticas ou necróticas, reforçando a conclusão de que a morte nessas células, nas concentrações testadas, pode ocorrer por outros mecanismos, como autofagia ou ferroptose, tal como observado para outros derivados de chalconas e flavonoides que induzem morte não exclusivamente apoptótica, incluindo autofago-morte e necroptose (DA SILVA SIQUEIRA et al., 2020).

Em oposição, na linhagem T24, a metilchalcona reduziu significativamente a porcentagem de células viáveis e aumentou a população em apoptose precoce, em concordância com estudos que mostram que chalconas induzem apoptose em células de câncer de bexiga T24 detectada por anexina V/IP (SHEN et al., 2007) e em múltiplas linhagens tumorais por via mitocondrial e ativação de caspases (NIKOLIĆ et al., 2025). Este efeito é particularmente notável por ocorrer de forma independente da p53, uma vez que as células T24 abrigam uma mutação inativadora no gene *TP53*, e diversas chalconas conseguem ativar vias pró-apoptóticas mesmo em contextos de p53 mutante ou de modulação da via p53/MDM2 (MICHALKOVÁ et al., 2022).

Em conjunto, os resultados demonstram que a metilchalcona atua de forma multifacetada, inibindo a migração e a proliferação celular, induzindo alterações morfológicas e modulando vias de morte e ciclo celular de maneira dependente do contexto celular. Seu efeito citostático em HepG2 e pró-apoptótico em T24, aliado à sua baixa toxicidade para células normais (alto índice de seletividade), reforça seu potencial como candidato para o desenvolvimento de novas terapias antineoplásicas.

7. CONCLUSÃO

O presente estudo demonstrou que a metilchalcona atua como um agente antineoplásico promissor contra linhagens tumorais de bexiga e fígado, exibindo uma ação multifacetada e seletiva. Os resultados indicam que o composto inibiu de forma significativa a proliferação e a migração celular, induziu alterações morfológicas e modulou a morte e o ciclo celular de maneira dependente da linhagem. Notavelmente, o composto demonstrou um efeito citostático na linhagem HepG2 e pró-apoptótico na linhagem T24, reforçando seu possível potencial terapêutico.

8. ANEXOS

Artigo completo (acesso aberto): <https://lnkd.in/dFj7N6zZ>.



Open Access

This article is licensed under [CC-BY 4.0](https://creativecommons.org/licenses/by/4.0/)  

<http://pubs.acs.org/journal/acsodf>

Article

Design and Synthesis of Novel Chalcone Derivatives Targeting Bladder and Liver Cancer: Cytotoxicity Evaluation and Preliminary Mechanistic Studies

Aline Mol Hermenegildo, Izadora Amaral Nakao, Luana Beatriz Araújo Vaz, Gabrielly Guimarães Coutinho, João Lucas Moraes Toledo, Tamires Cunha Almeida, Tatiane Roquete Amparo, Kamila de Fatima Anunciação, Glenda Nicioli da Silva, Geraldo Célio Brandão, Saulo Fehelberg Pinto Braga, and Thiago Belarmino de Souza*



Cite This: <https://doi.org/10.1021/acsomega.5c08480>



Read Online

9. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ADHIKARI, S. et al. Pharmacological potential of natural chalcones: recent studies and future perspective. *Frontiers in Pharmacology*, v. 16, 2025. DOI: 10.3389/fphar.2025.1570385.

AHMADI, H.; DUDDALWAR, V.; DANESHMAND, S. Diagnosis and staging of bladder cancer. *Hematology/Oncology Clinics of North America*, v. 35, n. 3, p. 531–541, 2021. DOI: 10.1016/j.hoc.2021.02.004.

ALLAIRE, M. et al. New frontiers in liver resection for hepatocellular carcinoma. *JHEP Reports*, [s. l.], v. 2, 2020. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.jhepr.2020.100134>.

ALMEIDA, T. et al. Antiproliferative and toxicogenomic effects of resveratrol in bladder cancer cells with different TP53 status. *Environmental and Molecular Mutagenesis*, v. 60, 2019. DOI: <https://doi.org/10.1002/em.22297>.

ASMA, S. et al. Natural products/bioactive compounds as a source of anticancer drugs. *Cancers*, v. 14, 2022. DOI: <https://doi.org/10.3390/cancers14246203>.

BABJUK, M. et al. European Association of Urology Guidelines on non-muscle-invasive bladder cancer (Ta, T1, and carcinoma in situ). *European Urology*, 2021. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.eururo.2021.08.010>.

BEAUFRÈRE, A.; CALDERARO, J.; PARADIS, V. Combined hepatocellular-cholangiocarcinoma: an update. *Journal of Hepatology*, 2021. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.jhep.2021.01.035>.

BESARATINIA, A. et al. Genotoxicity of tobacco smoke-derived aromatic amines and bladder cancer: current state of knowledge and future research directions. *FASEB Journal*, v. 27, n. 6, p. 2090–2100, 2013.

BRUSSET, B.; JACQUEMIN, M.; TEYSSIER, Y.; ROTH, G.; STURM, N.; ROUSTIT, M.; BÔNE, A.; GHELFI, J.; COSTENTIN, C.; DECAENS, T. Radiological diagnosis of hepatocellular carcinoma does not preclude biopsy before treatment. *JHEP Reports*, v. 6, 2023. DOI: 10.1016/j.jhepr.2023.100957.

BURGER, Maximilian et al. Epidemiology and risk factors of urothelial bladder cancer. *European urology*, v. 63, n. 2, p. 234-241, 2013.

CALDERARO, J.; ZIOL, M.; PARADIS, V.; ZUCMAN-ROSSI, J. Molecular and histological correlations in liver cancer. *Journal of Hepatology*, 2019. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.jhep.2019.06.001>.

CANDITA, G.; ROSSI, S.; ÓWIKLIŃSKA, K.; FANNI, S.; CIONI, D.; LENCIONI, R.; NERI, E. Imaging diagnosis of hepatocellular carcinoma: a state-of-the-art review. *Diagnostics*, v. 13, 2023. DOI: [10.3390/diagnostics13040625](https://doi.org/10.3390/diagnostics13040625).

CASTAÑEDA, A.; MELÉNDEZ, C.; URIBE, D.; PEDROZA-DÍAZ, J. Synergistic effects of natural compounds and conventional chemotherapeutic agents: recent insights for the development of cancer treatment strategies. *Heliyon*, [s. l.], v. 8, 2022. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.heliyon.2022.e09519>.

ÇEVIK, D. et al. Cytotoxic and antimigratory activity of retrochalcones from *Glycyrrhiza echinata* L. on human cancer cells. *Chemistry & Biodiversity*, v. 20, 2022. DOI: <https://doi.org/10.1002/cbdv.202200589>.

CHAKRABORTY, E.; SARKAR, D. Emerging therapies for hepatocellular carcinoma (HCC). *Cancers*, v. 14, 2022. DOI: <https://doi.org/10.3390/cancers14112798>.

CHASTNEY, M.; KAIVOLA, J.; LEPPÄNEN, V.; IVASKA, J. The role and regulation of integrins in cell migration and invasion. *Nature Reviews Molecular Cell Biology*, v. 26, p. 147–167, 2024. DOI: <https://doi.org/10.1038/s41580-024-00777-1>.

CHEN, T.; STEPHENS, P.; MIDDLETON, F.; CURTIN, N. Targeting the S and G2 checkpoint to treat cancer. *Drug Discovery Today*, v. 17, n. 5–6, p. 194–202, 2012. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.drudis.2011.12.009>.

CHO, Y. et al. NF2 loss in hepatocellular carcinoma: a molecular key to unraveling the Hippo pathway's role in liver carcinogenesis. *Modern Pathology*, v. 36, 2023. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.modpat.2023.100305>.

CHOI, J. H.; THUNG, S. N. Advances in histological and molecular classification of hepatocellular carcinoma. *Biomedicines*, v. 11, 2023. DOI: <https://doi.org/10.3390/biomedicines11092582>.

CLAPS, F. et al. The prognostic significance of histological subtypes in patients with muscle-invasive bladder cancer: an overview of the current literature. *Journal of Clinical Medicine*, v. 13, 2024. DOI: <https://doi.org/10.3390/jcm13154349>.

CONSTANTINESCU, T.; LUNGU, C. Anticancer activity of natural and synthetic chalcones. *International Journal of Molecular Sciences*, v. 22, 2021. DOI: <https://doi.org/10.3390/ijms222111306>.

CRISPO, F. et al. Repurposing HIV-protease inhibitor precursors as anticancer agents: the synthetic molecule RDD-142 delays cell cycle progression and induces autophagy in HepG2 cells with enhanced efficacy via liposomal formulation. *International Journal of Molecular Sciences*, v. 26, 2025. DOI: <https://doi.org/10.3390/ijms262110305>.

CUMBERBATCH, M. G. et al. The Role of Tobacco Smoke in Bladder and Kidney Carcinogenesis: A Comparison of Exposures and Meta-analysis of Incidence and Mortality Risks. *European Urology*, v. 70, n. 3, p. 458–466, 2016.

DA SILVA SIQUEIRA, E. et al. Trans-chalcone induces death by autophagy mediated by p53 up-regulation and β -catenin down-regulation on human hepatocellular carcinoma HuH7.5 cell line. *Phytomedicine*, v. 80, p. 153373, 2020. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.phymed.2020.153373>.

DE LA IGLESIA, S.; GUERRERO, A. Protocolo diagnóstico de las lesiones ocupantes de espacio hepáticas en el hígado cirrótico. *Medicine – Programa de Formación Médica Continuada Acreditado*, 2024. DOI: [10.1016/j.med.2024.05.005](https://doi.org/10.1016/j.med.2024.05.005).

DEVLIES, W. et al. The diagnostic accuracy of cystoscopy for detecting bladder cancer in adults presenting with haematuria: a systematic review from the European Association of Urology Guidelines Office. *European Urology Focus*, 2023. DOI: [10.1016/j.euf.2023.08.002](https://doi.org/10.1016/j.euf.2023.08.002).

FIGAROA, O. et al. Positioning the role of urine cytology within the diagnostic pathway for UTUC: supportive but inconclusive. *World Journal of Urology*, v. 41, p. 3429–3435, 2023. DOI: [10.1007/s00345-023-04689-1](https://doi.org/10.1007/s00345-023-04689-1).

FRANKEN, N.; RODERMOND, H.; STAP, J.; HAVEMAN, J.; BREE, C. Clonogenic assay of cells in vitro. *Nature Protocols*, v. 1, p. 2315–2319, 2006. DOI: <https://doi.org/10.1038/nprot.2006.339>.

FREEDMAN, N. D. et al. Association between smoking and risk of bladder cancer among men and women. *JAMA*, v. 306, n. 7, p. 737–745, 2011.

FUJII, H.; KAWADA, N.; JSG-NAFLD, J. The role of insulin resistance and diabetes in nonalcoholic fatty liver disease. *International Journal of Molecular Sciences*, v. 21, 2020. DOI: <https://doi.org/10.3390/ijms21113863>.

HAMIDI, H.; IVASKA, J. Every step of the way: integrins in cancer progression and metastasis. *Nature Reviews Cancer*, v. 18, p. 533–548, 2018. DOI: <https://doi.org/10.1038/s41568-018-0038-z>.

HOEGGER, M. et al. Urinary bladder masses, rare subtypes, and masslike lesions: radiologic-pathologic correlation. *Radiographics*, v. 43, n. 1, e220034, 2023. DOI: <https://doi.org/10.1148/rg.220034>.

HONG, S. et al. Anti-proliferative and pro-apoptotic effects of licochalcone A through ROS-mediated cell cycle arrest and apoptosis in human bladder cancer cells. *International Journal of Molecular Sciences*, v. 20, 2019. DOI: [10.3390/ijms20153820](https://doi.org/10.3390/ijms20153820).

HUANG, Yanjun; ZHOU, Sichun; HE, Caimei; DENG, Jun; TAO, Ting; SU, Qiongli; DARKO, Kwame Oteng; PENG, Mei; YANG, Xiaoping. Phenformin alone or combined with gefitinib inhibits bladder cancer via AMPK and EGFR pathways. *Cancer Communications*, [S.L.], v. 38, n. 1, p. 50, 27 jul. 2018. Wiley. <http://dx.doi.org/10.1186/s40880-018-0319-7>.

HUANG, M.; LU, J.; DING, J. Natural Products in Cancer Therapy: Past, Present and Future. *Natural Products and Bioprospecting*, [s. l.], v. 11, p. 5–13, 2021. Disponível em: <https://doi.org/10.1007/s13659-020-00293-7>.

INSTITUTO NACIONAL DE CÂNCER (INCA). Estimativa 2023: incidência de câncer no Brasil. Rio de Janeiro: INCA, 2022. Disponível em: <https://www.inca.gov.br/publicacoes/livros/estimativa-2023-incidencia-de-cancer-no-brasil>. Acesso em: 14 jan. 2026.

INTERNATIONAL AGENCY FOR RESEARCH ON CANCER (IARC). Chemical agents and related occupations. Lyon: IARC, 2012. (IARC Monographs on the Evaluation of Carcinogenic Risks to Humans, v. 100F).

JACOB, L. et al. Impact of smoking on the risk of developing 25 different cancers in the UK: a retrospective study of 422,010 patients followed for up to 30 years. *Oncotarget*, v. 9, n. 25, p. 17420–17429, 2018.

JASIM, H. et al. Chalcones: synthetic chemistry follows where nature leads. *Biomolecules*, Basel, v. 11, n. 8, 2021. DOI: 10.3390/biom11081203.

JIAO, J.; SAXENA, R.; MOROTTI, R. Hepatoblastoma: comprehensive review with recent updates. *Advances in Anatomic Pathology*, 2025. DOI: <https://doi.org/10.1097/pap.0000000000000495>.

JIANG, D.; GUPTA, S.; KITCHLU, A.; MERAZ-MUÑOZ, A.; NORTH, S.; ALIMOHAMED, N.; BLAIS, N.; SRIDHAR, S. Defining cisplatin eligibility in patients with muscle-invasive bladder cancer. *Nature Reviews Urology*, v. 18, p. 104–114, 2021. DOI: <https://doi.org/10.1038/s41585-020-00404-6>.

JONOSKY, J.; ADAM, A.; WADEE, R. A histopathological snapshot of bladder cancer: a Johannesburg experience of 1480 histopathology reports. *World Journal of Urology*, v. 43, art. 159, 2025. DOI: <https://doi.org/10.1007/s00345-025-05540-5>.

KANDEEL, M. et al. Design, synthesis, and cytotoxicity evaluation of novel indolin-2-one based molecules on hepatocellular carcinoma HepG2 cells as protein kinase inhibitors. *Molecules*, v. 30, 2025. DOI: <https://doi.org/10.3390/molecules30051105>.

KINDE, I. et al. TERT promoter mutations occur early in urothelial neoplasia and are biomarkers of early disease and disease recurrence in urine. *Cancer Research*, v. 73, n. 24, p. 7162–7167, 2013.

KNOWLES, M. A.; HURST, C. D. Molecular biology of bladder cancer: new insights into pathogenesis and clinical diversity. *Nature Reviews Cancer*, v. 15, n. 1, p. 25–41, 2015.

KUMARASAMY, V. et al. Functional determinants of cell cycle plasticity and sensitivity to CDK4/6 inhibition. *Cancer Research*, v. 81, p. 1347–1360, 2020. DOI: <https://doi.org/10.1158/0008-5472.CAN-20-2275>.

KWON, W. et al. Advances in therapy for urothelial and non-urothelial subtype histologies of advanced bladder cancer: from etiology to current development. *Biomedicines*, v. 13, 2025. DOI: <https://doi.org/10.3390/biomedicines13010086>.

LAAKSONEN, M. A. et al. The future burden of kidney and bladder cancers preventable by behavior modification in Australia: a pooled cohort study. *International Journal of Cancer*, v. 146, n. 3, p. 874-883, 2020.

LEITE, F. H. A. et al. Anticancer activity of chalcones and its derivatives: review and in silico studies. *Molecules*, Basel, v. 28, n. 10, 2023. DOI: [10.3390/molecules28104009](https://doi.org/10.3390/molecules28104009).

LI, Y.; YOUSSEF, S.; BUANZ, A. Intravesical combination therapies for non-muscle invasive bladder cancer: recent advances and future directions. *European Journal of Pharmacology*, v. 175024, 2022. DOI: [10.1016/j.ejphar.2022.175024](https://doi.org/10.1016/j.ejphar.2022.175024).

LIU, Y. et al. Aflatoxin B1 exposure increases the risk of hepatocellular carcinoma: evidence from epidemiological studies. *Frontiers in Oncology*, v. 8, p. 1-12, 2018.

LLOVET, J. M. et al. Hepatocellular carcinoma. *Nature Reviews Disease Primers*, v. 7, n. 6, 2021.

LÓPEZ-BELTRÁN, A.; COOKSON, M.; GUERCIO, B.; CHENG, L. Advances in diagnosis and treatment of bladder cancer. *BMJ*, Londres, v. 384, 2024. DOI: 10.1136/bmj-2023-076743.

LÓPEZ-BELTRAN, A.; COOKSON, M.; GUERCIO, B.; CHENG, L. Advances in diagnosis and treatment of bladder cancer. *BMJ*, [s. l.], v. 384, 2024. Disponível em: <https://doi.org/10.1136/bmj-2023-076743>.

MAKARY, M.; KHANDPUR, U.; CLOYD, J.; MUMTAZ, K.; DOWELL, J. Locoregional Therapy Approaches for Hepatocellular Carcinoma: Recent Advances and Management Strategies. *Cancers*, [s. l.], v. 12, 2020. Disponível em: <https://doi.org/10.3390/cancers12071914>.

MCNALL, S. et al. Treatment Modalities for Non-Muscle Invasive Bladder Cancer: An Updated Review. *Cancers*, [s. l.], v. 16, 2024. Disponível em: <https://doi.org/10.3390/cancers16101843>.

MEHTA, N. et al. Liver Transplantation for Hepatocellular Carcinoma: Working Group Report from the ILTS Transplant Oncology Consensus Conference. *Transplantation*, [s. l.], 2020. Disponível em: <https://doi.org/10.1097/tp.00000000000003174>.

MICHALKOVÁ, R. et al. Anticancer potential of natural chalcones: in vitro and in vivo evidence. *International Journal of Molecular Sciences*, Basel, v. 24, n. 12, 2023. DOI: 10.3390/ijms241210354.

MICHALKOVÁ, R. et al. Molecular mechanisms of antiproliferative effects of natural chalcones. *Cancers*, v. 13, 2021. DOI: <https://doi.org/10.3390/cancers13112730>.

MICHALKOVÁ, R. et al. Programmed cell death alterations mediated by synthetic indole chalcone resulted in cell cycle arrest, DNA damage, apoptosis and signaling pathway modulations in breast cancer model. *Pharmaceutics*, v. 14, 2022. DOI: <https://doi.org/10.3390/pharmaceutics14030503>.

MIGLIACCIO, G. et al. Exploring cell migration mechanisms in cancer: from wound healing assays to cellular automata models. *Cancers*, v. 15, 2023. DOI: <https://doi.org/10.3390/cancers15215284>.

MORIS, D. et al. Advances in the treatment of hepatocellular carcinoma: an overview of the current and evolving therapeutic landscape for clinicians. *CA: A Cancer Journal for Clinicians*, v. 75, p. 498–527, 2025. DOI: 10.3322/caac.70018.

MOSMANN, T. Rapid Colorimetric Assay for Cellular Growth and Survival: Application to Proliferation and Cytotoxicity Assays. *J. Immunol. Methods*, v. 65, n. 1-2, p. 55-63, 1983.

MUHAMMAD, N. et al. The Role of Natural Products and Their Multitargeted Approach to Treat Solid Cancer. *Cells*, [s. l.], v. 11, 2022. Disponível em: <https://doi.org/10.3390/cells11142209>.

NAEEM, A. et al. Natural Products as Anticancer Agents: Current Status and Future Perspectives. *Molecules*, [s. l.], v. 27, 2022. Disponível em: <https://doi.org/10.3390/molecules27238367>.

NAKAO, I. A.; ALMEIDA, T. C.; CARDOSO REIS, A. C.; COUTINHO, G. G.; HERMENEGILDO, A. M.; CORDEIRO, C. F.; DA SILVA, G. N.; DIAS, D. F.; BRANDÃO, G. C.; PINTO BRAGA, S. F.; DE SOUZA, T. B. Discovery of a New Dihydroeugenol-Chalcone Hybrid with Cytotoxic and Anti-Migratory Potential: A Dual-Action Hit for Cancer Therapeutics. *Bioorg. Med. Chem.*, v. 96, n. 117516, 2023.

NAULT, J. C.; ZUCMAN-ROSSI, J. TERT promoter mutations in primary liver tumors. *Clinics and Research in Hepatology and Gastroenterology*, v. 40, n. 1, p. 9–14, 2016.

NIKOLIĆ, I. et al. New O-alkyl chalcone derivative exhibits antiproliferative potential in colorectal and cervical cancer cells by inducing G0/G1 cell cycle arrest and mitochondrial-mediated apoptosis. *Current Medicinal Chemistry*, 2025. DOI: <https://doi.org/10.2174/0109298673317485240827093121>.

NORDENTOFT, I. et al. Mutational context and diverse clonal development in early and late bladder cancer. *Cell Reports*, v. 23, n. 7, p. 2139–2151, 2018.

ORCUTT, S.; ANAYA, D. Liver Resection and Surgical Strategies for Management of Primary Liver Cancer. *Cancer Control: Journal of the Moffitt Cancer Center*, [s. l.], v. 25, 2018. Disponível em: <https://doi.org/10.1177/1073274817744621>.

PAPACHRISTOU, F. et al. Differential effects of cisplatin combined with the flavonoid apigenin on HepG2, Hep3B, and Huh7 liver cancer cell lines. *Mutation Research*, v. 866, p. 503352, 2021. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.mrgentox.2021.503352>.

RUDRAPAL, M. et al. Chalcone scaffolds, bioprecursors of flavonoids: chemistry, bioactivities, and pharmacokinetics. *Molecules*, v. 26, 2021. DOI: [10.3390/molecules26237177](https://doi.org/10.3390/molecules26237177).

SADRINASAB, S. et al. Modern therapeutic approaches for hepatic tumors: progress, limitations, and future directions. *Discover Oncology*, v. 16, 2025. DOI: [10.1007/s12672-025-02773-z](https://doi.org/10.1007/s12672-025-02773-z).

SAFIN, M. et al. Specific mutations in the APC gene determine the pathogenicity of familial adenomatous polyposis. *Modern Pathology*, v. 36, 2023. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.modpat.2023.100195>.

SAFWAT, G. et al. Synthesis, anticancer assessment, and molecular docking of novel chalcone-thienopyrimidine derivatives in HepG2 and MCF-7 cell lines. *Oxidative Medicine and Cellular Longevity*, v. 2021, 2021. DOI: <https://doi.org/10.1155/2021/4759821>.

SAHIN, I. et al. A small library of chalcones induce liver cancer cell death through Akt phosphorylation inhibition. *Scientific Reports*, v. 10, 2020. DOI: [10.1038/s41598-020-68775-9](https://doi.org/10.1038/s41598-020-68775-9).

SARCOGNATO, S. et al. Cholangiocarcinoma. *Pathologica*, v. 113, p. 158–169, 2021. DOI: <https://doi.org/10.32074/1591-951x-252>.

SHEN, K.; CHANG, J.; HSU, Y.; KUO, P. Chalcone arrests cell cycle progression and induces apoptosis through induction of mitochondrial pathway and inhibition of nuclear factor kappa B signalling in human bladder cancer cells. *Basic & Clinical Pharmacology & Toxicology*, v. 101, n. 4, p. 254–261, 2007. DOI: <https://doi.org/10.1111/j.1742-7843.2007.00120.x>.

SILVA, Glenda Nicioli da; CAMARGO, Elaine Aparecida de; SALVADORI, Daisy Maria Favero. Toxicogenomic activity of gemcitabine in two TP53-mutated bladder cancer cell lines: special focus on cell cycle-related genes. *Molecular Biology*

Reports, [S.L.], v. 39, n. 12, p. 10373-10382, 9 out. 2012. Springer Science and Business Media LLC. <http://dx.doi.org/10.1007/s11033-012-1916-1>.

SINGAL, A.; KUDO, M.; BRUIX, J. Breakthroughs in hepatocellular carcinoma therapies. *Clinical Gastroenterology and Hepatology*, 2023. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.cgh.2023.01.039>.

SUNG, H. et al. Global Cancer Statistics 2020: GLOBOCAN Estimates of Incidence and Mortality Worldwide for 36 Cancers in 185 Countries. *CA: A Cancer Journal for Clinicians*, v. 71, n. 3, p. 209–249, 2021.

SUN, Y.; JIANG, W.; DUAN, R.; GUAN, L. Research progress and prospect of postoperative adjuvant therapy for resectable intrahepatic cholangiocarcinoma. *Frontiers in Pharmacology*, [s. l.], v. 15, 2024. Disponível em: <https://doi.org/10.3389/fphar.2024.1432603>.

TSUNG, C.; QUINN, P.; EJAZ, A. Management of Intrahepatic Cholangiocarcinoma: A Narrative Review. *Cancers*, [s. l.], v. 16, 2024. Disponível em: <https://doi.org/10.3390/cancers16040739>.

TURESKEY, R. J.; SMITH, C. A. Targeted and untargeted detection of DNA adducts of aromatic amine carcinogens in human bladder by ultra-performance liquid chromatography-high-resolution mass spectrometry. *Chemical Research in Toxicology*, v. 31, n. 12, p. 1382–1397, 2018.

VILLANUEVA, A. Hepatocellular Carcinoma. *New England Journal of Medicine*, v. 380, n. 15, p. 1450–1462, 2019.

VILLENA, J. et al. Ultrasound assisted synthesis and cytotoxicity evaluation of known 2',4'-dihydroxychalcone derivatives against cancer cell lines. *Food and Chemical Toxicology*, 2021. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.fct.2021.111969>.

WAISBROD, S. et al. Assessment of diagnostic yield of cystoscopy and computed tomographic urography for urinary tract cancers in patients evaluated for microhematuria. *JAMA Network Open*, v. 4, 2021. DOI: [10.1001/jamanetworkopen.2021.8409](https://doi.org/10.1001/jamanetworkopen.2021.8409).

WANG, J. et al. Risk factors for hepatocellular carcinoma: an umbrella review of systematic review and meta-analysis. *Annals of Medicine*, v. 57, n. 1, 2025.

WANG, Y.; HE, M.; LI, J.; LI, L. Immunotherapeutic strategies for invasive bladder cancer: a comprehensive review. *Frontiers in Immunology*, [s. l.], v. 16, 2025. Disponível em: <https://doi.org/10.3389/fimmu.2025.1591379>.

WILD, C. P.; WEIDERPASS, E.; STEWART, B. W. (ed.). *World cancer report: cancer research for cancer prevention*. Lyon: International Agency for Research on Cancer, 2020.

WITJES, J. A. et al. European Association of Urology Guidelines on Muscle-invasive and Metastatic Bladder Cancer: Summary of the 2020 Guidelines. *European Urology*, [s. l.], 2020. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.eururo.2020.03.055>.

WORLD HEALTH ORGANIZATION (WHO). *Cancer - key facts*. Geneva: WHO, 2025. Disponível em: <https://www.who.int/news-room/fact-sheets/detail/cancer>. Acesso em: 14 jan. 2026.

YAN, S. et al. The role of p53 in cancer diagnosis, prognosis, and treatment: a comprehensive review. *Cancer Biology & Therapy*, v. 26, n. 1, 2025.

YANG, O.; LI, J.; CHEN, X.; FU, X.; SUN, S.; WU, Q. Chalcone derivatives: role in anticancer therapy. *Biomolecules*, v. 11, 2021. DOI: <https://doi.org/10.3390/biom11060894>.

YANG, O. et al. Chalcone derivatives: role in anticancer therapy. *Biomolecules*, v. 11, 2021. DOI: <https://doi.org/10.3390/biom11060894>.

YIN, H.; YAN, Z.; ZHAO, F. Risk factors of hepatocellular carcinoma associated with nonalcoholic fatty liver disease: a systematic review and meta-analysis. *Technology and Health Care*, v. 32, n. 6, p. 3943–3954, 2024.

ZHAO, J.; HU, Z.; ZHENG, X.; LIN, Y.; LIU, X.; ZHANG, J.; PENG, J.; GAO, H. Blood biomarkers of hepatocellular carcinoma: a critical review. *Frontiers in Cell and Developmental Biology*, v. 12, 2024. DOI: [10.3389/fcell.2024.1489836](https://doi.org/10.3389/fcell.2024.1489836).

ZUCCHINI, G. et al. Molecular genetics of hepatocellular carcinoma: prognostic and therapeutic implications. *Cancers*, v. 14, n. 3, 2022.