



**UNIVERSIDADE FEDERAL DE SERGIPE
PRÓ-REITORIA DE PÓS-GRADUAÇÃO E PESQUISA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS DA SAÚDE**

EDMILSON WILLIAN PROPHETA DOS SANTOS

**ESTUDO DO POTENCIAL CITOTÓXICO DE DERIVADOS DE LAUSONA EM
LINHAGENS TUMORAIS**

ARACAJU

2022

EDMILSON WILLIAN PROPHETA DOS SANTOS

**ESTUDO DO POTENCIAL CITOTÓXICO DE DERIVADOS DE LAUSONA EM
LINHAGENS TUMORAIS**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências da Saúde da Universidade Federal de Sergipe como requisito parcial à obtenção do grau de Mestre em Ciências da Saúde.

Orientadora: Prof.^a Dr^a Cristiane Bani Correa

Co-orientador: Prof. Dr Ricardo Scher

ARACAJU

2022

**FICHA CATALOGRÁFICA ELABORADA PELA BIBLIOTECA DA SAÚDE – BISAU
UNIVERSIDADE FEDERAL DE SERGIPE**

S237e	Santos, Edmilson Willian Propheta dos Estudo do potencial citotóxico de derivados de lausona em linhagens tumorais / Edmilson Willian Propheta dos Santos ; orientadora Cristiane Bani Correa. – Aracaju, 2022. 47f. : il. Dissertação (mestrado em Ciências da Saúde) – Universidade Federal de Sergipe, 2022. 1. Lawsonia (Planta). 2. Neoplasias. 3. Produtos naturais. I. Correa, Cristiane Bani, orient. II. Título. CDU 616-006
-------	---



UNIVERSIDADE FEDERAL DE SERGIPE
PRÓ-REITORIA DE PÓS-GRADUAÇÃO E PESQUISA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS DA SAÚDE

Ata da sessão de Defesa de Dissertação
de **EDMILSON WILLIAN**
PROPHETA DOS SANTOS
Área de Concentração: Estudos Clínicos E
Laboratoriais Em Saúde

Ao vigésimo sétimo dia do mês de maio de dois mil e vinte e dois, com início às quatorze horas, pautada na PORTARIA Nº 36, DE 19 DE MARÇO DE 2020/CAPES e PORTARIA Nº 413 de 27 de Maio de 2020/UFS, aconteceu virtualmente, através Plataforma virtual Google Meet: <https://meet.google.com/hfm-serm-arx>, a sessão pública de defesa de dissertação de mestrado em Ciências da Saúde de **EDMILSON WILLIAN PROPHETA DOS SANTOS** sob o título: **"Estudo Do Potencial Citotóxico De Derivados De Lausona Em Linhagens Tumoriais"**, presidida pela Profa. Dra. Cristiane Bani Correa, na qualidade de orientadora, que por sua vez passou a palavra ao candidato para proceder à apresentação do seu trabalho. Logo após, a primeira examinadora, Profa. Dra. Pollyanna Domeny Dos Santos, arguiu o candidato que teve igual período para defesa. O mesmo aconteceu com o segundo examinador Prof. Dr. Daniel Pereira Bezerra. Em seguida, a Profa. Dra. Cristiane Bani Correa, orientadora do aluno, teceu comentários sobre o trabalho apresentado. Encerrada a apresentação, retirou-se do recinto a banca examinadora para avaliação. Após discussão, a banca decidiu considerar o candidato "aprovado". Foram atendidas as exigências da Resolução nº 04/2021/CONEPE que regula a apresentação e defesa de dissertação na UFS. Nada mais havendo a tratar, a Banca Examinadora elaborou esta ata que será assinada pela presidente da banca e terá como anexos as fichas de avaliação dos examinadores.

Aracaju, 27 de maio de 2022.

Cristiane Bani Correa

Profa. Dra. Cristiane Bani Correa
Presidente da Banca Examinadora

Profa. Dra. Pollyanna Domeny Dos Santos
1ª Examinadora – webconferência

Prof. Dr. Daniel Pereira Bezerra
2º Examinador - webconferência

Edmilson Willian Propheta Dos Santos
Mestrando - webconferência

RESUMO

O câncer de pulmão é o tipo de câncer mais mortal do mundo e o segundo mais incidência. Esse tipo de câncer é causado principalmente pelo tabagismo e sua agressividade está relacionada à sua predileção por metástase. A quimioterapia é um dos principais tratamentos para o câncer, embora os medicamentos utilizados não sejam eficazes contra alguns tipos de câncer e apresentem diversos efeitos colaterais. Existe a necessidade de buscar compostos com atividade antitumoral e as plantas são uma grande fonte de compostos com atividade biológica. Lausona é uma naftoquinona encontrada em plantas do gênero *Lawsonia* que apresentam alto efeito citotóxico em linhagens de células cancerígenas e seus derivados apresentam um aumento do efeito citotóxico. Assim, o objetivo deste trabalho foi avaliar o potencial citotóxico de derivados de lausona contra linhagens de células cancerígenas. Uma alta inibição do crescimento foi observada em todas as linhagens celulares testadas. Dentre os derivados avaliados, o FMO-1 foi o que apresentou maior efeito citotóxico, portanto, foi selecionado para as seguintes análises em células A549. O ensaio clonogênico mostrou que o composto foi capaz de reduzir a formação de colônias em todas as concentrações testadas. O composto também foi capaz de inibir a migração celular na concentração de 4,4 μM no ensaio de migração. As alterações morfológicas e a análise citometria mostram que o composto induz apoptose e necrose nas células A549 na maior concentração testada. Estes resultados mostram que a FMO-1, bem como outros derivados de lausona, apresentam um alto efeito inibitório e podem induzir apoptose em diversas linhagens de células cancerígenas. Assim, o FMO-1 foi o mais promissor dos compostos testados e possui grande potencial no tratamento do câncer.

Palavras-chaves: lausona; câncer; produtos naturais; derivados sintéticos.

ABSTRACT

Lung cancer is the deadliest type of cancer in the world and the second most incidence. This type of cancer is mainly caused by smoking and its aggressivity is related to its predilection to metastasis. Chemotherapy is one of the main treatments for cancer, although the drugs used are not effective against some types of cancer and show several side effects. There is a need to search for compounds with antitumor activity and plants are a great source of compounds with biological activity. Lausona is a naphthoquinone found in plants from the *Lawsonia* genus that show a high cytotoxic effect in cancer cell lines and its derivatives seems to show an even higher cytotoxic effect. Thus, the aim of this work was to evaluate the cytotoxic potential of lawsone derivatives against cancer cell lines. A high growth inhibition was observed in all the cell lines tested. Among the derivatives evaluated, FMO-1 was the one with the highest cytotoxic effect, therefore, it was selected for the following analysis in A549 cells. The clonogenic assay showed that the compound was able to reduce colony formation in all the concentrations tested. The compound was also able to inhibit cell migration at 4.4 μ M in the wound-healing assay. Morphological changes and cytometry analysis shows that the compound induces apoptosis and necrosis in A549 cells in the highest concentration tested. These results show that FMO-1 as well as other lawsone derivatives display a high inhibitory effect and may induce apoptosis in several cancer cell lines. Thus, FMO-1 was the most promising of the compounds tested and has great potential in the treatment of cancer.

Keywords: lawsone; cancer; natural products; synthetic derivatives.

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 – Nomenclatura segundo a União Internacional de Química Pura e Aplicada dos derivados de lausona.....	23
Tabela 2 - Resultados da IC ₅₀ calculados com base no ensaio de SRB.....	29

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1 - Incidência do câncer em homens e mulheres no Brasil.....	13
Figura 2 - Diferença entre proto-oncogene e gene supressor no câncer.....	14
Figura 3 - Estrutura química dos derivados de lausona.....	23
Figura 4 - Porcentagem do Grau de Inibição dos Derivados Sintéticos de Lausona.	28
Figura 5 - Aspectos morfológicos das linhagens tumorais após o tratamento de 24 horas com o composto FMO-1.....	30
Figura 6 - Redução da formação de colônias de A549 pelo composto FMO-1.....	31
Figura 7 - Porcentagem de células de A549 em apoptose e necrose após tratamento com FMO-1.	33

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

A549 - adenocarcinoma pulmonar
ACTA2 - actin alpha 2
Apaf-1 - *apoptotic protease activating factor 1*
ATG1 - *autophagy-related 1*
ATM - *ataxia-telangiectasia mutated*
ATR - *rad3-related*
B16-F10 - linhagem de melanoma
BAX - *bcl2 associated x protein*
Bcl-2 - *b-cell lymphoma-2*
C6 - linhagem de glioma
CDKs - proteínas-quinase dependentes de ciclinas
CEM/ADR5000 - linhagem de leucemia
CPCNP - câncer de pulmão de células não pequenas
CPCP - câncer de pulmão de células pequenas
DISC - complexo de sinalização de morte
DLD-1 - linhagem de câncer de colo
DMEM - *dulbeccos's modified eagle medium*
DMSO - dimetilsulfóxido
DNA - *deoxyribonucleic acid*
Du-145 - linhagem de câncer de próstata
EDTA - *ethylenediamine tetraacetic acid*
ERCC1 - *ERCC excision repair 1, endonuclease non-catalytic subunit*
FADD - *fas associated via death domain*
HCT15 - linhagem de câncer de colon
HL60 - linhagem de leucemia mieloide
HT1080 - linhagem de fibrosarcoma
IC - *inhibitory concentration*
IUPAC - *International Union of Pure and Applied Chemistry*
MCF-7 - linhagem câncer de mama
MDA-MB-231 – linhagem de câncer de mama
NF- κ B – *factor nuclear kappa B*
PBS – *phosphate buffer saline*
PI - propidium iodete
RAS - *rat sarcoma*
ROS – *Reactive oxygen species*
SBF - soro fetal de bovino
SKBR-3 – linhagem câncer de mama
SK-MEL-2 – linhagem de melanoma
SKOV-3 – linhagem de câncer de ovário
SNU-638 – linhagem de câncer de estomago
SRB - sulforodamina B
XF48 – linhagem de câncer de cérebro

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO.....	11
2. REVISÃO DE LITERATURA	12
2.1. ASPECTOS GERAIS DO CANCER	12
2.2. BIOLOGIA DO CANCER.....	13
2.3. CÂNCER DE PULMÃO	15
2.4. MORTE CELULAR	17
2.5. TRATAMENTO DO CANCER	18
2.6. PLANTAS MEDICINAIS	20
2.7. LAUSONA E SEUS DERIVADOS	21
3. OBJETIVOS	22
3.1. OBJETIVO GERAL.....	22
3.2. OBJETIVOS ESPECÍFICOS.....	22
4. MATERIAIS E MÉTODOS.....	22
4.1. REAGENTES.....	22
4.2. OBTENÇÃO DOS DERIVADOS DE LAUSONA	23
4.3. CULTIVO DAS LINHAGENS TUMORAIS.....	24
4.4. AVALIAÇÃO DE CITOTOXICIDADE PELA TÉCNICA DE SULFORODAMINA B (SRB).....	24
4.5. ANÁLISE DA MORFOLOGIA CELULAR PELA COLORAÇÃO DE GIEMSA 25	
4.6. ENSAIO CLONOGÊNICO	25
4.7. ENSAIO DE MIGRAÇÃO.....	26
4.8. ENSAIO ANEXINA V/FITC E IODETO DE PROPÍDIO COMO INDICADORES DE MORTE POR APOPTOSE E NECROSE	26
4.9. ANÁLISE ESTATÍSTICA.....	27
5. RESULTADOS	27
5.1. DERIVADOS DE LAUSONA MOSTRAM ALTA PORCENTAGEM DE INIBIÇÃO DE CRESCIMENTO.....	27
5.2. FMO-1 INDUZ ALTERAÇÕES MORFOLÓGICAS SEMELHANTES À APOPTOSE	29
5.3. FMO-1 INIBE A PROLIFERAÇÃO CELULAR REDUZINDO A FORMAÇÃO DE COLÔNIAS	30
5.4. FMO-1 REDUZ A MIGRAÇÃO CELULAR APÓS O TRATAMENTO	31
5.5. FMO-1 INDUZ APOPTOSE E NECROSE EM CÉLULAS DE A549 APÓS O TRATAMENTO	32
6. DISCUSSÃO.....	34
7. CONCLUSÃO.....	37
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	37

1. INTRODUÇÃO

O câncer é uma doença caracterizada pelo crescimento desordenado de células, que podem invadir órgãos e tecidos (INCA, 2018a). No cenário mundial, o câncer lidera a segunda posição nas causas de morte no mundo e é considerado um grande problema de saúde pública (SIEGEL; MILLER; JEMAL, 2019). No mundo são estimados 19,3 milhões de novos casos de câncer e cerca de 10 milhões de mortes no ano de 2020 (SUNG et al., 2021). No Brasil estima-se 625 novos mil casos de câncer para o triênio 2020-2022, dentre os mais comuns são o de próstata (66 mil) e mama (66 mil) (INCA, 2019a). O alto número de incidência de casos de câncer, nos últimos anos, pode estar relacionado com constante exposição a carcinógenos e aumento da expectativa de vida (SUNG et al., 2019; WILD et al., 2019).

A quimioterapia é o um dos principais tratamentos utilizados contra o câncer e apesar da ampla utilização dos quimioterápicos existentes, eles não são capazes de tratar alguns tipos de tumores, principalmente os tumores sólidos (AHMED et al., 2015; ZHONG et al., 2018). Ademais, os tumores podem desenvolver resistência ao tratamento com os quimioterápicos utilizados (DE MELO et al., 2011; MARIN et al., 2009). Nesse contexto, novas estratégias de tratamento são necessárias e alguns estudos mostram que produtos naturais tem potencial para tratar tumores resistentes (EFFERTH et al., 2019).

As plantas são uma grande fonte de compostos com atividade biológica. Esses compostos presentes nas plantas, possuem grande potencial para o tratamento do câncer (FITSIOU et al., 2016, 2018; GUESMI et al., 2017). Cerca de 65% dos fármacos aprovados com atividade antitumoral são produtos naturais ou derivados de produtos naturais (NEWMAN; CRAGG, 2020). Diversas classes de compostos presentes em plantas como quinonas, terpenos e alcaloides são a fonte de quimioterápicos que já são utilizados no tratamento do câncer, são exemplos a doxorrubicina, a mitomicina C e a vimblastina (DEMAIN; VAISHNAV, 2011; VERMA, 2006).

A lausona é uma quinona, que pertence a classe das naftoquinonas, e demonstra ter grande atividade antibacteriana, antifúngica, antimalárica e antitumoral (LÓPEZ et al., 2014). É o principal componente pigmentante da espécie *Lawsonia inermis* Linn, uma planta popularmente conhecida como henna (WANG; TAO; LI, 2017). Os estudos com derivados sintéticos de lausona, mostram um aumento da

atividade citotóxica em linhagens tumorais (DE GRANDIS et al., 2019; OLIVEIRA et al., 2017).

A derivação de compostos naturais através da alteração da estrutura química, abre a oportunidade para o desenvolvimento de fármacos que possam tratar o câncer de forma mais eficaz (EFFERTH et al., 2019). Dentre esses, a lausona destaca-se por ser uma importante fonte para a síntese de novos compostos (OTTONI et al., 2020). Dessa forma, o objetivo desse trabalho foi avaliar o potencial citotóxico de derivados sintéticos de lausona em diferentes linhagens tumorais.

2. REVISÃO DE LITERATURA

2.1. ASPECTOS GERAIS DO CANCER

O câncer é um conjunto de mais de 100 doenças que tem em comum o crescimento desordenado de células, que podem invadir órgãos e tecidos (INCA, 2018a). O surgimento está associado a fatores genéticos ou ambientais, como exposição a poluição, radiação, má alimentação, uso de álcool e outras drogas, chamados de carcinógenos (KRISHNAMURTHI, 2007). Por exemplo, o câncer de esôfago pode ser causado pela associação do consumo de álcool, tabagismo e má alimentação ao longo da vida (PARKIN; BOYD; WALKER, 2011). São raros os casos de desenvolvimento do câncer com apenas um fator iniciando o processo de carcinogênese assim como pré-disposição genética oferece risco numa minoria dos casos (HILL, 2019).

O câncer é a segunda maior causa de mortes no mundo, ficando atrás apenas das doenças cardiovasculares. No ano de 2020 foram estimados cerca de 19,3 milhões de novos casos e 10 milhões de mortes no mundo. Os tipos mais comuns de câncer no mundo são os cânceres de mama, pulmão e cólon e reto. Os tipos de câncer que mais afetam os homens são câncer de pulmão, câncer de próstata e câncer de cólon e reto. Enquanto que para as mulheres, os tipos de câncer mais comuns são o câncer de mama, câncer de cólon e reto e câncer de pulmão (SUNG et al., 2021). No Brasil foram estimados 625 novos mil casos de câncer para o biênio 2020-2022, sendo os mais comuns os cânceres de próstata (66 mil), mama (66 mil), cólon e reto (41 mil), pulmão (30 mil) e estômago (21 mil). Para homens, os tipos de maior incidência são os de cânceres de próstata, cólon e reto, pulmão, estômago e cavidade oral. Para mulheres, os cânceres de mama, cólon e reto, colo do útero, pulmão e tireoide são os de maior incidência (INCA, 2019a) (Figura 1). A alta incidência de casos de câncer

nos últimos anos, pode estar associada com o desenvolvimento urbano que aumenta a exposição aos carcinógenos, assim como o aumento da expectativa de vida em países em desenvolvimento (WILD et al., 2019).

Figura 1 - Incidência do câncer em homens e mulheres no Brasil

Localização Primária	Casos	%	Homens	Mulheres	Localização Primária	Casos	%
Próstata	65.840	29,2%			Mama feminina	66.280	29,7%
Cólon e reto	20.520	9,1%			Cólon e reto	20.470	9,2%
Traqueia, brônquio e pulmão	17.760	7,9%			Colo do útero	16.590	7,4%
Estômago	13.360	5,9%			Traqueia, brônquio e pulmão	12.440	5,6%
Cavidade oral	11.180	5,0%			Glândula tireoide	11.950	5,4%
Esôfago	8.690	3,9%			Estômago	7.870	3,5%
Bexiga	7.590	3,4%			Ovário	6.650	3,0%
Linfoma não Hodgkin	6.580	2,9%			Corpo do útero	6.540	2,9%
Laringe	6.470	2,9%			Linfoma não Hodgkin	5.450	2,4%
Leucemias	5.920	2,6%			Sistema nervoso central	5.220	2,3%

*Números arredondados para múltiplos de 10.

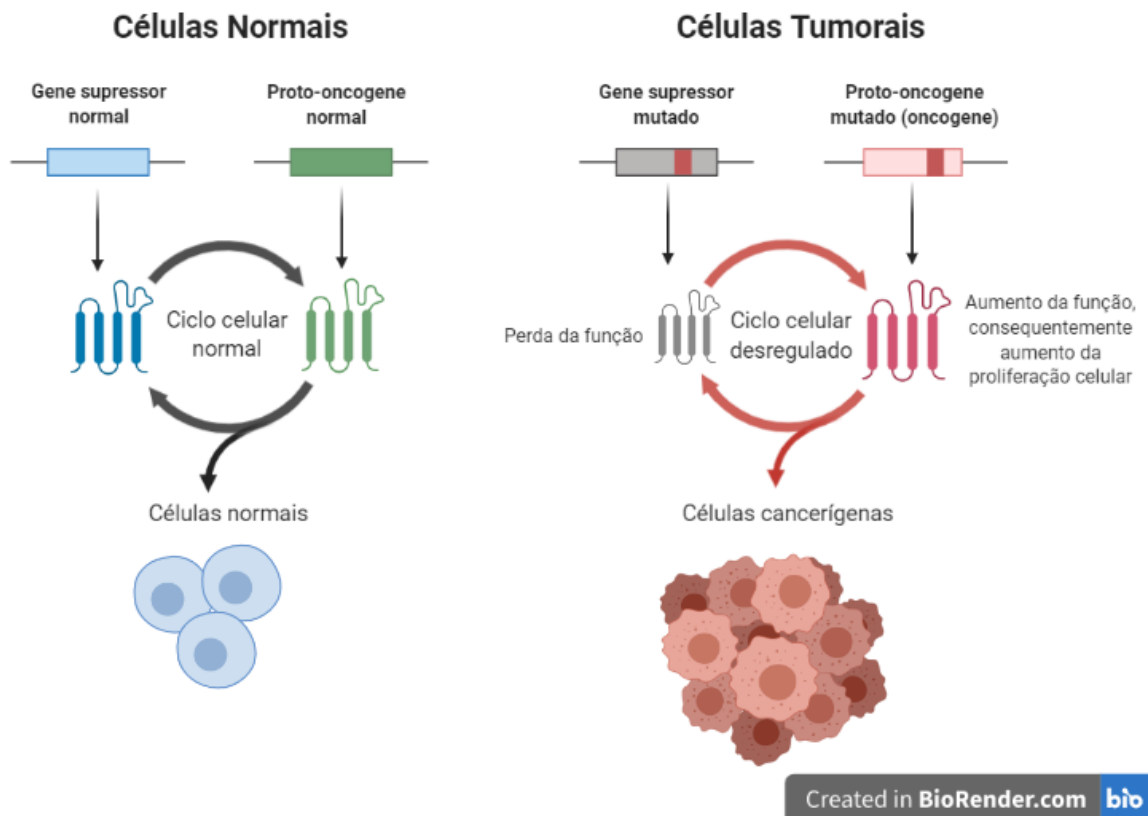
Fonte: INCA, 2019

2.2. BIOLOGIA DO CANCER

A carcinogênese compreende quatro períodos distintos. Um período de iniciação no qual a célula é exposta a um carcinógeno, consequentemente sofrendo mutações. Um período de promoção no qual ocorre a proliferação dessas células mutadas (FILHO; GATTAS, 2001). Por fim os períodos de progressão e a conversão maligna, nos quais as células cancerígenas adquirem a capacidade de proliferar desordenadamente e de se tornarem metastáticas respectivamente (SILVA; SERAKIDES; CASSALI, 2004).

Duas classes de genes são importantes no processo de carcinogênese: proto-oncogenes e os genes supressores de tumor. Os proto-oncogenes são uma classe de genes ligados ao processo de estimulação do crescimento celular. Quando mutados, tornam-se oncogenes e promovem o aumento da expressão de proteínas estimuladoras do crescimento celular (LI; WANG, 2015). Os genes supressores de tumor, são responsáveis pela inibição do processo de divisão celular e durante a carcinogênese sofrem mutações que inibem sua atividade na proliferação celular (Figura 2) (RIVOIRE et al., 2006).

Figura 2 - Diferença entre proto-oncogene e gene supressor no câncer



Fonte: Figura adaptada do site BioRender, acesso em 21 de outubro de 2021

O gene RAS, que é um exemplo de proto-oncogene, possui um papel importante na progressão do ciclo celular, sendo necessário para a quebra da quiescência da célula (MACALUSO et al., 2002). Mutações no gene RAS e a sua super expressão causam o aumento da proliferação celular, supressão de apoptose, alteração no metabolismo, mudanças no microambiente tumoral, evasão do sistema imune e metástase (LANFREDINI; THAPA; O'NEILL, 2019).

A progressão do ciclo celular passa por quatro fases distintas: G1 é a fase em que a célula está suscetível a estímulos de crescimento, S é a fase em que ocorre a síntese de DNA, G2 é a fase em que a célula se prepara para entrar na mitose e por fim a fase M, na qual a célula se divide em duas células filhas. Esse processo é regulado pela ativação de proteínas-quinase dependentes de ciclinas (CDKs) e seus ligantes regulatórios as ciclinas (WILLIAMS; STOEBER, 2012). A passagem da fase G1 para a fase S, inicia-se com estímulos de crescimento, desencadeando o aumento de ciclinas D (D1, D2 e D3). A ciclinas D se ligam as CDK4 ou CDK6, que formam o complexo ciclina-CDK. A forma ativa desse complexo ativa a proteína RB supressora de tumor que induz a ativação de fatores de transcrições da família E2F. O E2F facilita

a ativação da expressão dos genes de ciclinas do tipo E (E1 e E2). As ciclinas E se ligam e ativam CDK2 que são importantes para a síntese de DNA e entrada para a fase S (GOEL et al., 2018). No câncer, o gene Ras mutado induz a super ativação das ciclinas D1 e D3, sendo um dos mecanismos de desregulação do ciclo celular (CRESPO; LEÓN, 2000). Após a síntese de DNA a célula entra na fase G2, nessa fase as ciclinas do tipo A e B regulam a ativação de CDK1 para entrada na fase M. A forma ativa da CDK1 ativa a fosforilação das quinases mitóticas PLK1, Aurora A e Aurora B. As ativações dessas quinases preparam a célula para a separação do DNA e consequente divisão (MATTHEWS; BERTOLI; DE BRUIN, 2021).

Os genes supressores possuem um papel importante na regulação do ciclo celular. Esses genes inibem a ação de proteínas das cascatas de ativação do ciclo celular. Um exemplo, é o gene TP53 que codifica a proteína p53 e controla a expressão de proteínas que interrompem o ciclo celular, senescência celular, reparo no DNA e apoptose (JOYCE; RAYI; KASI, 2018). Danos causados ao DNA durante o ciclo celular são reconhecidos por quinases da família ATM/ATR. Esse reconhecimento é feito no ponto de checagem entre as fases G1-S. As quinases ATM/ATR fosforilam a p53 que em sua forma ativa estimula a expressão do p21 que é um inibidor de CKDs. Caso o dano ao DNA seja irreparável, a p53 ativa a expressão do gene BAX que induz a produção de proteínas pro apoptóticas (CHEN; WANG; EL-DEIRY, 2010). Cerca de 70% dos tumores possuem mutações no gene TP53. Mutações na proteína p53 causa a perda da função regulatória do gene, dessa forma a proteína torna-se incapaz de inibir a formação do câncer (BERTRAM, 2001; MULLER; VOUSDEN, 2013).

2.3. CÂNCER DE PULMÃO

O câncer de pulmão é uma das neoplasias malignas de maior incidência no mundo. Lidera a primeira posição em mortalidade e representa um total de 18% das causas de morte por câncer no mundo (SUNG et al., 2021). O uso de tabaco é a principal causa do câncer de pulmão e cerca de 80% dos casos estão associados com o seu uso (HERBST; MORGENZTERN; BOSHOFF, 2018). No Brasil, o câncer de pulmão tem os maiores índices de mortalidade com 16.137 óbitos em homens e 11.792 óbitos em mulheres registrados em 2017 (INCA, 2019a). Com progressão ruim após o diagnóstico, apenas 50% dos pacientes sobrevivem no primeiro ano e de 10 a

20% após o quinto ano (SUNG et al., 2021; ZAPPA; MOUSA, 2016). Os principais sintomas do câncer são dispneia, fadiga, insônia e dor (CATALDO; BRODSKY, 2013). Algumas das complicações da doença são resultantes da obstrução dos brônquios que induz a uma pneumonia, invasão e rompimentos de vasos sanguíneos levando a uma hemorragia, tromboembolismo pulmonar e a metástase (NICHOLS; SAUNDERS; KNOLLMANN, 2012).

O câncer de pulmão é dividido de acordo com os tipos histológicos em câncer de pulmão de células pequenas (CPCP) e câncer de pulmão de células não pequenas (CPCNP) (WISTUBA; GAZDAR, 2006). CPCP representa cerca de 15% da incidência do câncer de pulmão e é conhecido por sua alta taxa de proliferação, forte predileção por metástase e apresentar um prognóstico ruim (RUDIN et al., 2021). O CPCNP é dividido em carcinoma de células escamosas, carcinoma de células grandes e adenocarcinoma (WISTUBA; GAZDAR, 2006).

O carcinoma de células escamosas representa cerca de 35% do CPCNP, é originário de células escamosas e se desenvolve majoritariamente nas vias aéreas proximais (BARTIS et al., 2013; FRIEDLAENDER et al., 2019). Os cânceres de células grandes são classificados como os cânceres de pulmão que não derivam de células escamosas ou glandulares como o câncer de células grandes neuroendócrino, carcinoma basaloide escamoso, entre outros (PARDO et al., 2009). O adenocarcinoma compreendem cerca de 60% do CPCNP e é o tipo de câncer de pulmão mais comum em não fumantes (DING et al., 2008; FRIEDLAENDER et al., 2019).

O câncer de pulmão é altamente metastático e comumente migra para o cérebro, fígado, medula óssea e glândulas suprarrenais (HEIDEMANN et al., 2014). A migração celular no câncer de pulmão podem estar relacionado com a alta expressão do gene ACTA2, responsável pela produção da α -actina de músculo liso (POPPER, 2016). A ACTA2 contribui para a manutenção da forma e movimento da célula. Desse modo, a célula tumoral é capaz de alterar a sua forma e desvincular do tumor, invadindo assim outros tecidos (LEE et al., 2013).

O tratamento da doença varia de acordo com o tipo histológico, o estágio da doença e a avaliação do paciente. A cirurgia é indicada nos primeiros estágios e em combinação com a quimioterapia aumentam as chances de sobrevivência do paciente

(COLLINS et al., 2007). Em pacientes com estágios mais avançados ou com a presença de metástase, a quimioterapia é um dos tratamentos mais usados devido a sua eficácia. Os quimioterápicos mais utilizados são doxorrubicina, gencitabina, vinorelbina e irinotecano em conjunto com algum composto de platina como cisplatina ou carboplatina (RECK et al., 2013). Os compostos utilizados no tratamento apresentam diversos efeitos colaterais como náuseas, perda da audição, dispneia, vômito, entre outros (DIMOPOULOU et al., 2006; MARKMAN, 2003). Ademais, o câncer de pulmão desenvolve mecanismos de quimioresistência. Por exemplo, a quimioresistência a compostos de platina, como a cisplatina, está relacionada com a alta expressão de ERCC1, uma proteína de reparo de DNA por excisão (CHANG, 2011).

2.4.MORTE CELULAR

Morte celular é um processo natural de grande importância para manutenção da homeostase (NIRMALA; LOPUS, 2020). Os tipos de morte celular podem ser divididos em necróticos e não necróticos. Os necróticos resultam no rompimento da membrana celular e extravasamento do conteúdo intracelular, consequentemente induzindo um processo inflamatório. Já os não necróticos envolvem um processo mais complexo no qual o conteúdo intracelular não é exposto (HOFMANN, 2020). Necrose e apoptose são os mais estudados e bem caracterizados quanto as alterações morfológicas e sinalização celular (SATO et al., 2020).

A necrose é um processo de morte conhecido pelo aumento do volume celular, degradação das organelas e rompimento da membrana plasmática (YU et al., 2020). As causas derivam da exposição contínua a agentes, como altas temperaturas ou compostos químicos. Este tipo de morte é passivo, pois não requer uma via de ativação (GREEN; LLAMBI, 2015).

A apoptose é um mecanismo de morte celular programada, que ocorre normalmente durante o desenvolvimento humano e serve como um mecanismo para manter a homeostase das populações celulares nos tecidos (ELMORE, 2007). A apoptose é importante no controle do câncer, já que a doença tem como um dos principais problemas a perda da regulação de mecanismos do ciclo celular (CARSON; RIBEIRO, 1993; EVAN; VOUSDEN, 2001). A indução de apoptose possui duas vias de ativação: a via extrínseca que é dependente da ativação dos receptores de morte

celular e a via intrínseca que é ativada a partir de algum estímulo interno como espécies reativas de oxigênio, intercalantes de DNA, entre outros que causam danos na célula e ativam fatores de apoptose (FULDA; DEBATIN, 2006; MEIER; FINCH; EVAN, 2000).

A via extrínseca é iniciada por ligantes de morte tais como ligante Fas (FasL), fator de necrose tumoral (TNF) e ligante indutor de apoptose relacionado a TNF (TRAIL) (MAZZONI; FALCONE, 2008). A ativação de FasL com seu receptor (Fas) monta o complexo de sinalização de morte (DISC), que é composto por Fas, uma proteína adaptadora (FADD) e procaspase 8. Procaspase 8, que é processada em sua forma ativa no DISC, transduz a sinalização de morte por meio de duas vias diferentes. Na primeira via as células produzem grandes quantidades de caspase 8 ativa, que ativa diretamente a caspase 3 efetora (SEGAWA; NAGATA, 2015). Na segunda via a caspase 8 ativa cliva uma proteína BH3-Bid para ativar a via Bax/Bak e acionar a ativação de caspases 3 e 7 efetoras. A via intrínseca é ativada a partir de algum estímulo genotóxico, que ativa as proteínas BH-3 da família Bcl-2 desencadeando a oligomerização Bax/Bak (SEGAWA; NAGATA, 2015). O Bax/Bak oligomerizado faz com que as mitocôndrias liberem citocromo c, que forma um complexo com Apaf-1 para ativação da caspase 9. Isso leva à ativação sequencial das caspases 3 e 7 efetoras (RIEDL; SHI, 2004). Mais de 500 substratos são clivados pelas caspases efetoras, que são responsáveis pela fragmentação do DNA, liberação de nucleotídeos e exposição da fosfatidilserina (FIANDALO; KYPRIANOU, 2012).

2.5. TRATAMENTO DO CANCER

Existem três principais tratamentos para o câncer: a cirurgia; a radioterapia e a quimioterapia. A cirurgia é um tipo de tratamento que é realizado com finalidade de retirar o tumor. Pode ter o propósito de curar o paciente, em diagnósticos precoces, ou paliativo para o alívio de sintomas (INCA, 2018b). Embora seja um tratamento eficiente, a cirurgia é um procedimento invasivo e a realização do procedimento depende das condições fisiológicas e o estágio do câncer que o paciente apresenta (MOLINA et al., 2008; ZEBER et al., 2008).

A radioterapia é feita com a utilização de raios ionizantes que são capazes de atingir as células tumorais destruindo ou impedindo que elas continuem crescendo (INCA, 2019b). A radioterapia pode ser utilizada sozinha ou combinada com algum outro tipo de tratamento. Alguns estudos mostram que a combinação da radioterapia

com tratamentos como a quimioterapia, oferecem melhores resultados sobretudo em relação ao prognóstico do paciente (REBECCA et al., 2003; STUPP et al., 2009).

A quimioterapia é um dos tratamentos que consiste na administração de compostos citotóxicos com o objetivo de induzir a morte celular ou diminuir os sintomas (NYGREN, 2001). Os quimioterápicos são divididos em algumas classes de compostos como: alquilantes, antimetabólitos, antraciclinas, entre outros. De acordo com a sua classificação, os quimioterápicos apresentam diferentes mecanismos de ação (KATZUNG, 2018). Os agentes alquilantes são aqueles que tem como principal mecanismo de ação a alquilação de guaninas, causando a remoção da guanina ou um mau emparelhamento com a timina, que resulta no rompimento da estrutura açúcar-fosfato do DNA e consequentemente impossibilitando a replicação do DNA (ZHAO et al., 2021). Um exemplo de alquilante é a cisplatina, utilizada no tratamento dos cânceres de intestino, mama e colo de útero (FEDERICO et al., 2021; SUN et al., 2021; WANG et al., 2021). Os antimetabólitos são compostos que atuam diretamente na síntese de ácidos nucleicos, purinas e pirimidinas (VALENZUELA; NEIDIGH; WALL, 2014). Um exemplo é o metotrexato que é um antimetabólito utilizado no tratamento dos cânceres de bexiga, pulmão e linfoma (AKBARI et al., 2021; PFISTER et al., 2021). O metotrexato tem alta afinidade com o sítio ativo da diidrofolato redutase, inibindo a síntese de tetraidrofolato que é o principal transportador de carbono nos processos enzimáticos envolvido na síntese de timidilato, nucleotídeos de purina, e os aminoácidos serina e metionina (KATZUNG, 2018). As antraciclinas tem sua atividade citotóxica atribuída a sua capacidade de serem intercalantes de DNA, inibir a ação da topoisomerase II, de induzirem a produção de espécies reativas de oxigênio e ligação a membrana plasmática, alterando o transporte de íons (HORTOBDGYI, 1997; KATZUNG, 2018). A doxorubicina é uma antraciclina muito utilizada no tratamento de diversos tipos de câncer como: mama, pulmão, pele, entre outros (LAI et al., 2021; MEREDITH; DASS, 2016; O'SHAUGHNESSY, 2003; OTTERSON et al., 2010).

Apesar da eficácia, os quimioterápicos utilizados atualmente não são capazes de tratar todos os tipos de tumores conhecidos (AHMED et al., 2015; ZHONG et al., 2018). Além disso, alguns tumores desenvolvem uma resistência ao tratamento dos quimioterápicos através de mecanismos como: mudança na expressão de proteínas alvo do medicamento; perda de mediadores pró-apoptóticos e reparação do DNA previamente danificado. Por exemplo, em tumores gastrointestinais, a resistência à cisplatina é resultado da capacidade da célula tumoral em reparar o DNA danificado

pelo quimioterápico, através do reparo por excisão de nucleotídeos (DE MELO et al., 2011; MARIN et al., 2009). Portanto existe uma necessidade pela busca de novos compostos capazes de tratar o câncer (PUN; JEONG, 2021).

2.6. PLANTAS MEDICINAIS

As plantas medicinais são uma grande fonte de compostos com atividade biológica, sobretudo para o tratamento do câncer (FITSIOU et al., 2016, 2018; GUESMI et al., 2017). Entretanto os estudos dos componentes dessas plantas só começaram a ser feitos a partir do século XIX (DUTRA et al., 2016). Por conta da atividade biológica das plantas, elas despertam interesse por serem uma grande fonte de compostos com propriedades terapêuticas (HARVEY; EDRADA-EBEL; QUINN, 2015). Nesse contexto, as plantas tropicais são conhecidas por possuírem uma variedade de compostos com atividade antitumoral (MANOSROI; DHUMTANOM; MANOSROI, 2006).

Cerca de 35% dos medicamentos aprovados nas últimas décadas são produtos naturais ou derivados. Cerca de 65% dos medicamentos utilizados no tratamento do câncer são produtos naturais ou derivados (NEWMAN; CRAGG, 2020). São exemplos a doxorrubicina, de origem bacteriana, e a vimblastina, de origem vegetal (DEMAIN; VAISHNAV, 2011; NEWMAN; CRAGG, 2012; VERMA, 2006). Uma importante classe de compostos naturais com atividade antitumoral são as quinonas (LU et al., 2013). Alguns dos atuais fármacos utilizados no tratamento do câncer são derivados de quinonas, como a doxorrubicina e a mitomicina C (VERMA, 2006). As quinonas são uma classe de compostos orgânicos, caracterizados pela estrutura de dois grupamentos carbonilas em um anel insaturado de seis átomos de carbono, situados relativamente em posições “orto” (adjacentes) ou “para” (SOUZA; LOPES; ANDRADE, 2016). Subdividida em benzoquinonas, naftoquinonas, antraquinonas e fenantraquinonas, baseada no sistema aromático de origem da quinona (SILVA; FERREIRA; SOUZA, 2003).

Diversos estudos mostram o potencial citotóxico de quinonas frente a linhagens tumorais (CHEN et al., 2002; HUSSAIN; GREEN, 2017). A atividade citotóxica desses compostos está relacionada com o comportamento das estruturas químicas que os compõe (ASCHE, 2005). Esses compostos possuem uma alta capacidade de agir como oxidantes ou desidrogenantes. O lapachol, uma naftoquinona, demonstrou ser capaz de interferir diretamente no ciclo celular induzindo apoptose por inibição da

atividade das topoisomerases I e II em células de glioma (C6) e em um modelo *in vivo* de glioma (XU et al., 2016). Também mostrou alto efeito citotóxico em linhagens de câncer de mama (4T1) (MIRANDA et al., 2021)

2.7. LAUSONA E SEU DERIVADOS

A lausona é uma naftoquinona encontrada nas folhas da planta *Lawsonia inermis* Linn. Essa planta é popularmente conhecida como henna e é utilizada na medicina popular para tratar diversas doenças (MONGA; KUMAR, 2013). A lausona é um composto que tem um valor farmacológico alto devido a inúmeros estudos que mostram sua atividade biológica (JORDÃO et al., 2015). Rahmoun et al. (2012), mostrou a atividade microbiana da lausona em *Escherichia coli*, *Salmonella typhimurium* e *Staphylococcus aureus*, sendo a atividade atribuída pela presença do grupo cetona em sua composição. Também apresentando atividade antifúngica, contra *Fusarium oxysporum*, devido a capacidade induzir a produção de espécies reativas de oxigênio (ROS) e aumento da expressão de genes como ATG1 e ATG8, indicando possível morte por autofagia (DANANJAYA et al., 2017). Quanto a atividade antitumoral a lausona mostra uma alta atividade citotóxica. Como foi reportado em um trabalho cujo estudo foi feito em células de câncer de ovário (SKOV-3), a lausona foi capaz de inibir o crescimento celular em cerca de 80%. Nesse mesmo estudo, o mecanismo de ação foi descrito como apoptose pela indução do aumento da expressão de *p53* (LI; XIN; LIU, 2017). Também foi demonstrado que a lausona é capaz reduzir a viabilidade celular de células de câncer de mama (MCF-7) (BARANI et al., 2018). Em câncer de colo (DLD-1), a lausona apresentou efeito antiproliferativo com à diminuição da atividade de NF- κ B resultando na supressão dos níveis de expressão de ciclina B1 e cdk1 em células de câncer de cólon humano (WANG; TAO; LI, 2017).

Por conta do seu potencial citotóxico, a lausona é uma ótima candidata para síntese de derivados, com o objetivo de obter compostos com maior atividade antitumoral. (OLIVEIRA et al., 2017). Os estudos com derivados sintéticos mostram que alteração desses compostos pode melhorar o seu efeito. É o caso dos derivados do shikonin, no qual o derivado β -Hydroxyisovalerylshikonin em células de câncer gástrico, câncer de pâncreas e leucemia apresentou alto potencial citotóxico, maior do que o composto de origem (CHEN et al., 2002). Além disso, os derivados sintéticos podem apresentar uma melhora da absorção pelo organismo. Por exemplo, derivados

do ácido oleanólico foram capazes não só de melhorar o efeito na redução de tumores, como também de aumentar a absorção gastrointestinal do composto (SHANMUGAM et al., 2014).

Otoni et al. (2020) e Franca et al. (2021) mostraram que derivados glicosídicos de lausona possuem um efeito mais citotóxico em diferentes linhagens tumorais quando comparado a lausona. Derivados de lausona também foram capazes de apresentar alto efeito citotóxico em células de leucemia (CEM/ADR5000), resistentes a doxorrubicina, após 72 horas de tratamento (HAMDOUN et al., 2017).

Os resultados mostrados na literatura sobre como derivados de lausona são mais citotóxicos e a necessidade da busca por novos compostos para tratar o câncer, revelam a importância de estudos nessa área.

3. OBJETIVOS

3.1. OBJETIVO GERAL

Avaliar a atividade citotóxica dos derivados de lausona em linhagens de adenocarcinoma pulmonar (A549), melanoma (B16-F10) e glioma (C6).

3.2. OBJETIVOS ESPECÍFICOS

Avaliar o grau de inibição dos derivados sintéticos de lausona nas linhagens de tumorais.

Analisar as alterações morfológicas nas linhagens tumorais após tratamento com os derivados de lausona.

Investigar a capacidade dos derivados de lausona inibirem a formação de colônias na linhagem A549.

Avaliar a capacidade dos derivados de lausona em inibir a migração celular.

Avaliar o percentual de células apoptóticas e necróticas após tratamento com os derivados lausona na linhagem A549.

4. MATERIAIS E MÉTODOS

4.1. REAGENTES

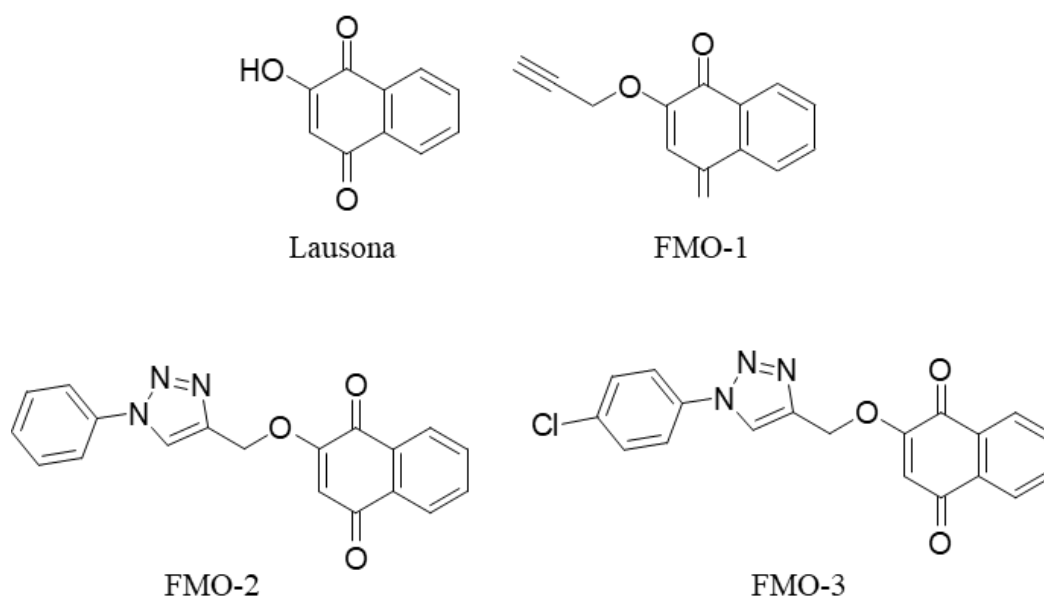
Para a realização dos experimentos foram usados Dulbeccos's Modified Eagle Medium (DMEM), Tripsina, Dimetilsulfóxido (DMSO) e Sulforodamina B (SRB) - Sigma Aldrich (Saint Louis, MO, USA), Soro Fetal de Bovino (SBF) e antibiótico (penicilina 10000 U/mL; estreptomicina 10000 mg/mL) - Gibco (Life Technologies, India) EDTA,

Cloridrato de Doxorrubicina (Rubidox, Bergamo), Ácido tricloroacético e Giemsa - NEON, Ácido acético (Synth), TRIS-base (Inlab Confiança, Brasil), Iodeto de propídeo, AnexinaV e Accutase - Invitrogen (Life Technologies, India).

4.2. OBTENÇÃO DOS DERIVADOS DE LAUSONA

A lausona e seus derivados sintéticos foram obtidos através de uma parceria feita com Prof. Dr. Ricardo José Alves do Laboratório de Química Farmacêutica do Curso de Farmácia da Universidade Federal de Minas Gerais. Os derivados de lausona FMO-1, FMO-2 e FMO-3 (Figura 2) foram selecionados, para este trabalho, devido à similaridade da estrutura química. Assim, foi preparada uma solução estoque de 100 mM em Dimetilsulfóxido dos derivados sintéticos de lausona para ser utilizadas nos experimentos in vitro.

Figura 3 - Estrutura química dos derivados de lausona.



Fonte: Autoria Própria

Tabela 1 – Nomenclatura segundo a União Internacional de Química Pura e Aplicada (IUPAC) dos derivados de lausona

Nomenclatura IUPAC	
FMO-1	2-(Prop-2-in-1-iloxi)naftaleno-1,4-diona
FMO-2	2-[(1-(fenil)-1,2,3-triazol-4-metil)oxi]-1,4-naftoquinona
FMO-3	2-[(1-(4-clorofenil)-1,2,3-triazol-4-metil)oxi]-1,4-naftoquinona

Fonte: Autoria Própria

4.3. CULTIVO DAS LINHAGENS TUMORAIS

A linhagens tumorais de adenocarcinoma pulmonar (A549), melanoma (B16-F10) e glioma (C6) foram mantidas em garrafas de cultivo celular em meio Dulbeccos's Modified Eagle Medium (DMEM) suplementado com 10% de Soro Fetal Bovino (SBF) e 1% de antibiótico (penicilina 10000 U/mL; estreptomicina 10000 mg/mL) e incubadas em estufa à 37°C com atmosfera de 5% de CO₂. Após atingir a confluência necessária para realização dos experimentos, o meio foi retirado e as células desprendidas da garrafa com a utilização de uma solução de Tripsina-EDTA 0,25% por um período de 1 a 15 minutos. Após essa etapa, a solução de Tripsina-EDTA foi inativada com meio de cultura e as células foram centrifugadas, em tubos de 15 mL, com rotação de 1200 rpm por 10 minutos a 4°C. O *pellet* formado foi ressuspensionado em meio de cultura e as células foram contadas em câmara de Neubauer para a realização dos experimentos e o estabelecimento de subculturas.

4.4. AVALIAÇÃO DE CITOTOXICIDADE PELA TÉCNICA DE SULFORODAMINA B (SRB)

A Sulforodamina B é um corante que se liga a resíduos de aminoácidos básicos, de modo que a quantidade de aminoácidos corados é proporcional a quantidade de células viáveis (VICHAI; KIRTIKARA, 2006). Para esse experimento, as células das linhagens A549, B16-F10 e C6 foram semeadas em placas de 96 poços (1x10⁴ células/poço). Após um período de incubação de 24 horas em estufa umidificada à 37°C com atmosfera de 5% de CO₂, para adesão, as células foram tratadas com a lausona e os derivados de lausona (FMO-1, FMO-2 e FMO-3) por 72 horas com concentrações de 25µM a 0,8µM. Doxorrubicina foi utilizado como controle positivo. As células foram fixadas com 100 µL ácido tricloroacético a 30% por 1 hora em geladeira a 4°C. Após esse tempo a placa foi lavada 4 vezes com água e posta para secar. Após o período de secagem da placa, foram adicionados 100 µL da solução de SRB 0,057% (massa/volume) dissolvido em ácido acético 1% por 30 minutos em temperatura ambiente. Em seguida a placa foi lavada 4 vezes com ácido acético 1% para remoção do excesso do corante. Depois de seca, foi adicionado 200 µL de TRIS

Base 10mM pH 10,5 para diluição do SRB por 30 minutos. A leitura foi feita em espectrofotômetro (Biotek - H1 Synergy) com comprimento de onda de 510nm.

O grau de inibição foi calculado a partir da média das absorbâncias observadas utilizando a seguinte fórmula:

$$\% \text{Grau de Inibição} = 100 - \left(\left(\frac{\text{Células tratadas}}{\text{Células não tratadas}} \right) \times 100 \right)$$

Com base no grau inibitório dos derivados, foi calculado a IC₅₀ dos compostos. A IC₅₀ é a concentração capaz de inibir 50% do crescimento celular (ANDRADE et al., 2015). O composto que apresentou a menor IC₅₀ foi o FMO-1, sendo selecionado para a avaliação nos demais ensaios. Para isso foram utilizados valores de IC₅₀ como base para definir as concentrações de duas vezes a IC₅₀, o valor da IC₅₀ e metade da IC₅₀ (1,1, 2,2 e 4,4 µM).

4.5. ANÁLISE DA MOFORLOGIA CELULAR PELA COLORAÇÃO DE GIEMSA

A coloração de Giemsa é uma combinação de eosina e azul de metileno que permite distinguir citoplasma e núcleo das células, sendo possível observar alterações no citoplasma assim como integridade do núcleo (ANDRADE, 2013). As células de A549, B16-F10 e C6 foram semeadas em lâminulas em placas de 24 poços (2x10⁴ células/poço) e incubadas em estufa. Após o período de 24 horas para aderência, as células foram tratadas com o derivado FMO-1 utilizando-se concentrações de 1,1, 2,2 e 4,4 µM para A549 e C6 e 0,75, 1,5 e 3 µM para B16-F10 durante 24h horas. Após o tratamento, as células foram lavadas duas vezes com Tampão fosfato-salino (PBS) e fixadas com Álcool Metílico por 3 minutos. Em seguida as células foram coradas com Giemsa por 1 minuto. As lâminas foram avaliadas em microscópio óptico Olympus e as fotos foram capturadas com aumento de 400x.

4.6. ENSAIO CLONOGÊNICO

O ensaio clonogênico é uma técnica utilizada para avaliar a capacidade de uma única célula formar colônias (FRANKEN et al., 2006). As células A549 foram semeadas em placa de 6 poços (150 células/poço) e incubadas em estufa com atmosfera de 5% CO₂ a 37°C. Após 24 h as células foram tratadas com o composto FMO-1 nas concentrações de 1,1, 2,2 e 4,4 µM por 72h. Dimetilsulfóxido 0,02% e Doxorrubicina 0,2 µM foram usados como controle negativo e controle positivo de

morte. Os tratamentos foram então removidos e substituídos por meio DMEM suplementado, sem os tratamentos. As células foram incubadas em estufa com atmosfera de 5% CO₂ a 37°C. Após 6 dias, as células foram fixadas com metanol + ácido acético (3:1) por 5 min e coradas com cristal violeta 0,5% em água por 30 min. As placas foram fotografadas e as imagens foram analisadas no software ImageJ 1.46.

4.7. ENSAIO DE MIGRAÇÃO

O ensaio consiste na criação de uma ferida e a observação da migração das células para o centro da ferida (LIANG; PARK; GUAN, 2007). As células de A549 foram semeadas em placas de 12 poços (4x10⁵ células/poço) e incubadas em estufa com atmosfera de 5% CO₂ a 37°C por 24h. Após o período de incubação, foi feita uma ferida em linha reta com o auxílio de uma ponteira p200, o sobrenadante foi descartado e os poços foram lavados duas vezes com PBS 1x para a retirada das células soltas. As células foram tratadas com o composto FMO-1 nas concentrações de 1,1, 2,2 e 4,4 µM. Dimetilsulfóxido 0,02% e Cloridrato de Doxorrubicina 0,2 µM foram usados com controle negativo e controle positivo, respectivamente. As imagens do fechamento da ferida foram adquiridas nos períodos de 0h, 24h e 48h de tratamento com o auxílio de um microscópio Olympus. As imagens foram analisadas no software ImageJ versão 1.46.

4.8. ENSAIO ANEXINA V/FITC E IODETO DE PROPÍDIO COMO INDICADORES DE MORTE POR APOPTOSE E NECROSE

A Anexina V/FITC é um composto fluorescente que tem afinidade por um fosfatidilserina que é um componente fosfolipídico expressado na membrana de células em apoptose. O Iodeto de propídeo é um corante de DNA impermeável a membrana plasmática, dessa forma ele só é capaz de se ligar ao DNA de células com integridade da membrana comprometida (VAN ENGELAND et al., 1998). As células de A549 foram semeadas em placas de 12 poços em meio DMEM suplementado com SFB e antibiótico 1% (penicilina 10000 U/mL; estreptomicina 10000 mg/mL) com 2x10⁵ células/poço e incubadas em estufa umidificada à 37°C com atmosfera de 5% de CO₂ por 24 horas. Após esse tempo as células foram tratadas com o derivado sintético de lausona nas concentrações de 1,1, 2,2 e 4,4 µM, por 24 horas. Dimetilsulfóxido 0,02% e Cloridrato de Doxorrubicina 0,2 µM foram usados com controle negativo e controle

positivo de morte por apoptose, respectivamente. Após o tratamento as células foram desprendidas com solução de Accutase e transferidas para tubos eppendorf e centrifugadas a 1500 rpm por 10 min a 4°C. O sobrenadante foi descartado e o pellet foi lavado com PBS e centrifugado novamente a 1500 rpm por 10 min a 4°C. Após a lavagem as células foram ressuspensas em 100 µL de tampão de ligação de Anexina e incubadas com 5 µL Anexina V/FITC por 15 min e 2 µL Iodeto de propídio por 10min, no escuro em temperatura ambiente. Ao final dos 15 min foram adicionados 400 µL do tampão de ligação e as amostras foram analisadas por citometria de fluxo (Attune NxT Acoustic Focusing Cytometer, Thermo Fisher Scientific). Células sem marcação foram consideradas viáveis, as células positivas apenas para Anexina V/FITC foram consideradas células em apoptose, as células com dupla marcação para Anexina V/FITC e Iodeto de propídio foram consideradas células em apoptose tardia e as células positivas apenas para iodeto de propídio foram consideradas células em necrose (SAMARGHANDIAN; SHABESTARI, 2013).

4.9. ANÁLISE ESTATÍSTICA

Todos os resultados foram avaliados pela execução de três experimentos independentes. Para todos os experimentos de citotoxicidade, valores $p < 0,05$ foram considerados significantes estatisticamente. Análises e gráficos assim como as IC₅₀ foram obtidos através da utilização do programa GraphPad Prism 8. O teste de normalidade Shapiro-Wilk foi aplicado para analisar a distribuição dos dados. O teste estatístico foi feito através de ANOVA.

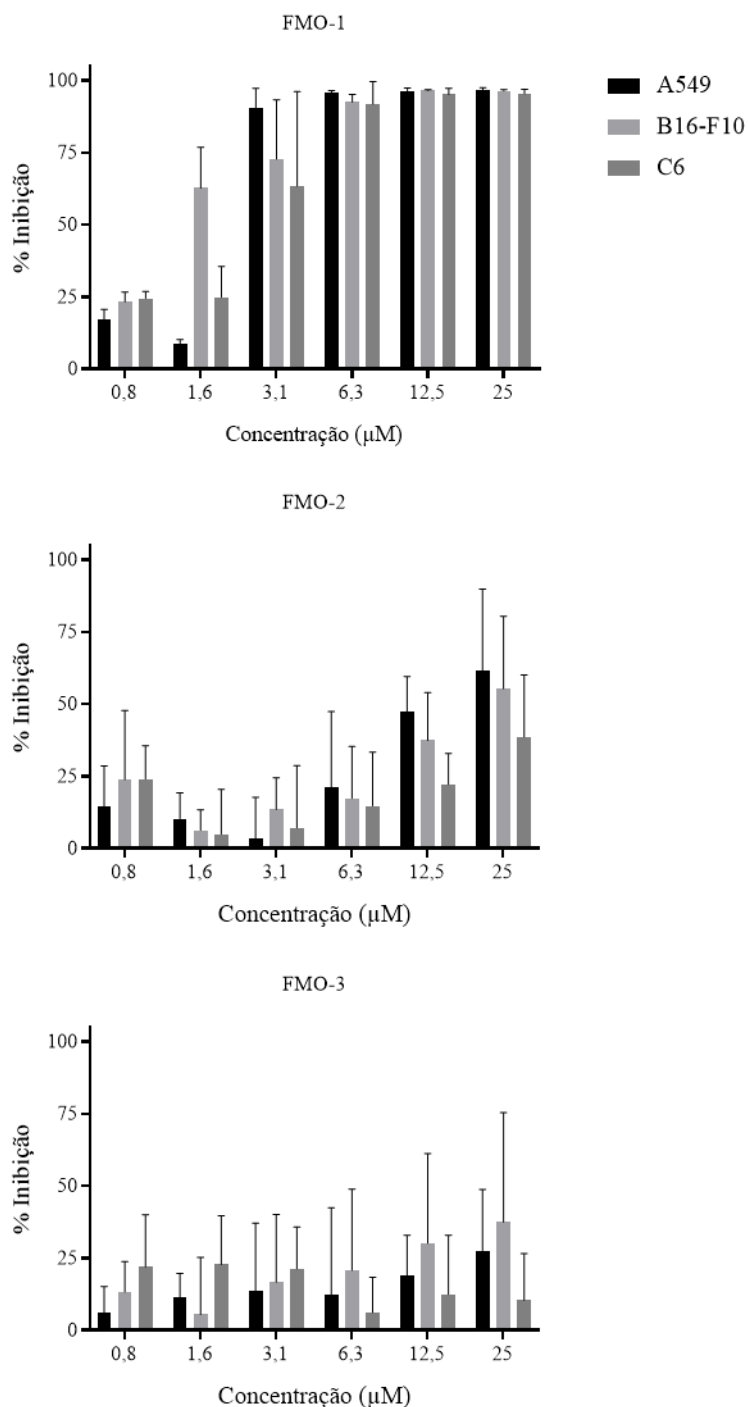
5. RESULTADOS

5.1. DERIVADOS DE LAUSONA MOSTRAM ALTA PORCENTAGEM DE INIBIÇÃO DE CRESCIMENTO

Os derivados de lausona FMO-1, FMO-2 e FMO-3 foram utilizados para avaliar o potencial de inibir o crescimento das linhagens de carcinoma pulmonar (A549), melanoma (B16-F10) e glioma (C6) (Figura 4). Nesse trabalho utilizamos a classificação descrita por Mahmoud et al. (2011) que categoriza a atividade inibitória em: alto grau acima de 75% de inibição, médio grau entre 75% e 50% e baixo grau abaixo de 50%. O FMO-1 apresentou um alto grau de inibição nas linhagens A549, B16-F10 e C6 nas concentrações de 25 a 6,3 µM. O FMO-2 nas concentrações 12,5 a 0,8 µM apresentou um baixo grau de inibição para as três linhagens estudadas e

médio grau de inibição nas linhagens A549 e B16-F10 na concentração de 25 μM . O FMO-3 apresentou um baixo grau inibitório nas linhagens tumorais em todas as concentrações testadas.

Figura 4 - Porcentagem do Grau de Inibição dos Derivados Sintéticos de Lausona.



Resultados obtidos após tratamento de 72h com os derivados sintéticos nas linhagens de A549, B16-F10 e C6. O gráfico representa a média e desvio padrão de três experimentos independentes. **Fonte:** Autoria Própria

Os resultados do grau de inibição da Figura 4 foram utilizados para calcular a concentração máxima inibitória de 50% do crescimento celular (IC_{50}) que estão apresentados na Tabela 2. O FMO-1 foi o mais citotóxico comparado com os compostos FMO-2 e FMO-3 e a lausona, apresentando valores de IC_{50} abaixo de 2,2 μM nas três linhagens tumorais. Já o composto FMO-2 apresentou IC_{50} acima de 14 μM nas linhagens testadas e o composto FMO-3 não foi possível determinar os valores de IC_{50} . A lausona não apresentou valores de IC_{50} maiores que 26 μM para as linhagens A549 e C6. A doxorrubicina, composto utilizado como controle positivo, apresentou uma IC_{50} abaixo de 0,6 μM nas linhagens de A549 e B16-F10. Considerando que o FMO-1 apresentou a menor IC_{50} entre os compostos testados, ele foi selecionado para a avaliação da sua atividade nos demais experimentos. Para os demais ensaios, foram utilizadas as concentrações de metade da IC_{50} , o valor da IC_{50} e o dobro da IC_{50} .

Tabela 2 - Resultados da IC_{50} calculados com base no ensaio de SRB.

Composto	IC_{50} (μM)		
	A549	B16-F10	C6
FMO-1	2,2 (1,6 – 2,9)	1,5 (1,1 – 2)	2,2 (1,6 – 2,8)
FMO-2	14,9 (9,8 – 30,6)	14,2 (9,8 – 24,1)	43,4 (23 - >100)
FMO-3	ND	ND	ND
LAUSONA	53 (32,2 – 123,7)	ND	22,6 (10,2 – 41)
DOX	0,2 (0,07 – 0,6)	0,6 (0,2 – 1,1)	ND

Dados na tabela mostram a concentração máxima inibitória de 50% do crescimento celular (IC_{50}) e o intervalo de confiança. ND – não determinada. **Fonte:** Autoria Própria

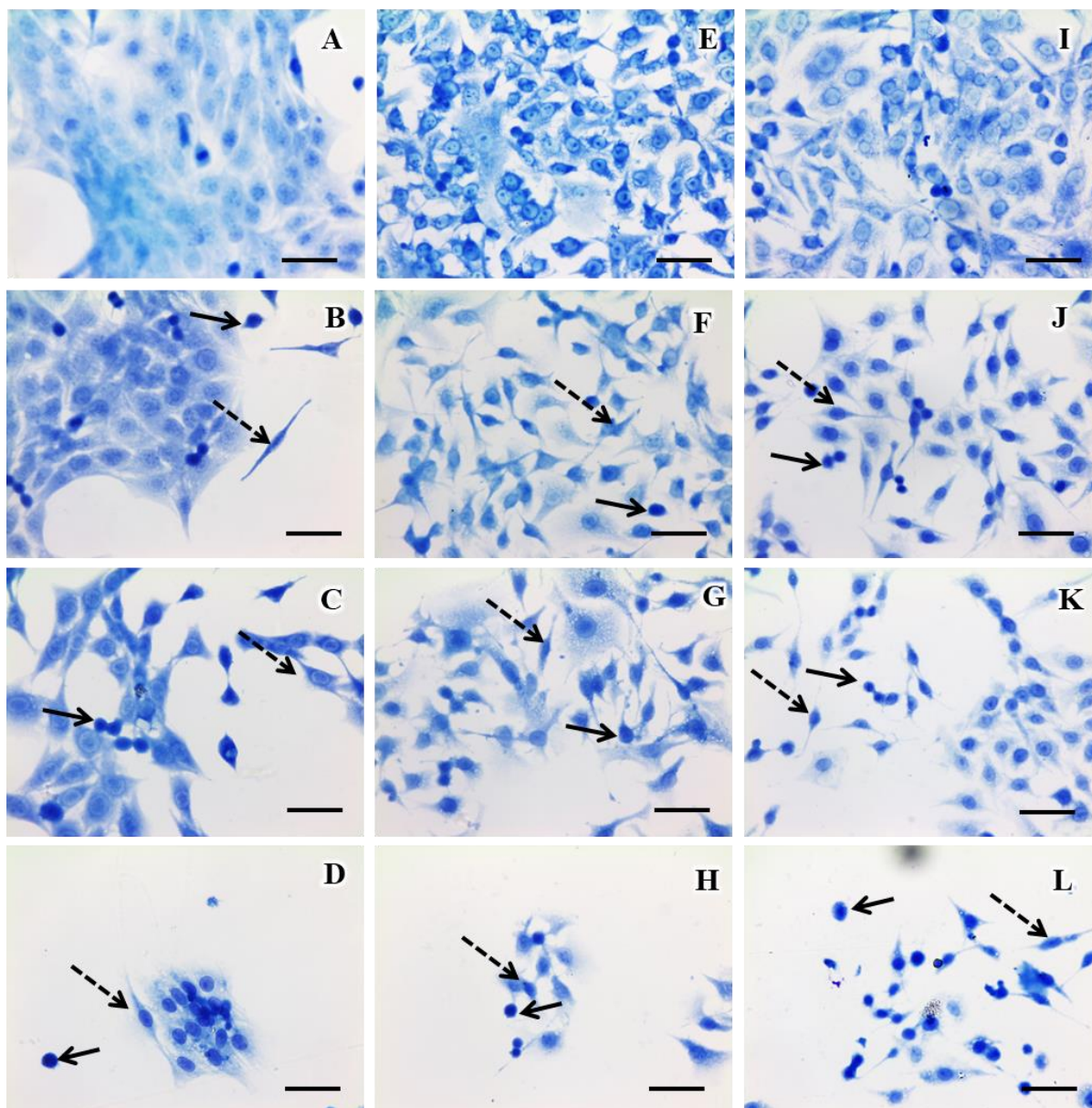
5.2. FMO-1 INDUZ ALTERAÇÕES MORFOLÓGICAS SEMELHANTES À APOPTOSE

Para a análise das alterações morfológicas, o composto FMO-1 foi utilizado em concentrações referentes a 1,1, 2,2 e 4,4 μM para A549 e C6, 0,75, 1,5 e 3 μM para B16-F10 (Figura 5).

Após o tratamento por 24h com o FMO-1 nas concentrações de 1,1 e 0,75 μM , foi possível observar alterações morfológicas como redução do volume citoplasmático e surgimento de células apoptóticas nas linhagens B16-F10 e C6 (Figura 5F e 5J). Nas concentrações de 2,2 e 1,1 μM para as linhagens de A549 e C6 e 1,5 e 3 μM para a linhagem de B16-F10 foi possível observar redução do citoplasma e células apoptóticas para as linhagens de A549, B16-F10 e C6 (Figura 5C-L). Os resultados

observados no ensaio de citotoxicidade e análise morfológica evidenciam que o composto FMO-1 possui um alto efeito citotóxico na linhagem A549.

Figura 5 - Aspectos morfológicos das linhagens tumorais após o tratamento de 24 horas com o composto FMO-1.

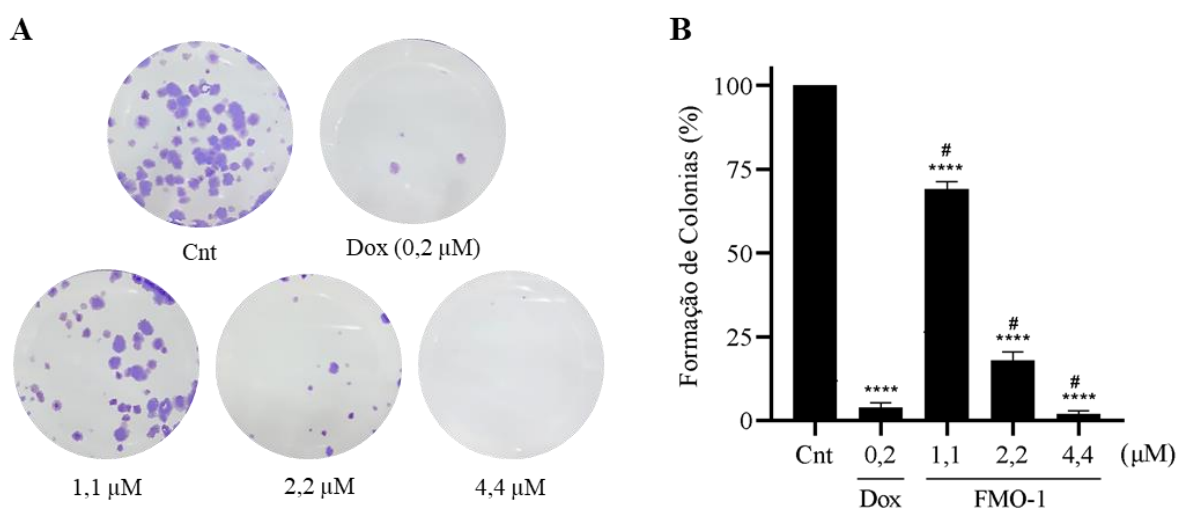


A – A549 sem tratamento. **B-D** – A549 tratadas com FMO-1 nas concentrações de 1,1, 2,2 e 4,4 μM , respectivamente. **E** – B16-F10 sem tratamento. **F-H** – B16-F10 tratadas com FMO-1 nas concentrações de 0,75, 1,5 e 3 μM respectivamente. **I** – C6 sem tratamento. **J-L** – C6 tratadas com FMO-1 nas concentrações de 1,1, 2,2 e 4,4 μM respectivamente. A seta sólida indica a posição das células apoptóticas e as setas pontilhadas indicam a posição das células com citoplasma reduzido. Barra 50 μm . Representação de dois experimentos independentes. **Fonte:** Autoria Própria

5.3. FMO-1 INIBE A PROLIFERAÇÃO CELULAR REDUZINDO A FORMAÇÃO DE COLÔNIAS

A capacidade do FMO-1 em inibir a formação de colônias foi avaliada através do ensaio clonogênico. Nesse ensaio, as células A549 foram tratadas com o composto FMO-1 nas concentrações de 1,1 μM , 2,2 μM e 4,4 μM por 72h. Após o tratamento, o composto FMO-1 foi capaz de inibir a formação de colônias de forma concentração dependente. O FMO-1 na concentração de 1,1 μM foi capaz de inibir a formação de colônias em 31,1%, na concentração de 2,2 μM o composto foi capaz de inibir 82,1% enquanto na concentração de 4,4 μM o composto foi capaz de inibir 98,1% comparado com o controle negativo ($p < 0,0001$). A doxorrubicina inibiu 96,1% da formação de colônias, semelhante a maior concentração do composto FMO-1 (Figura 6).

Figura 6 - Redução da formação de colônias de A549 pelo composto FMO-1.

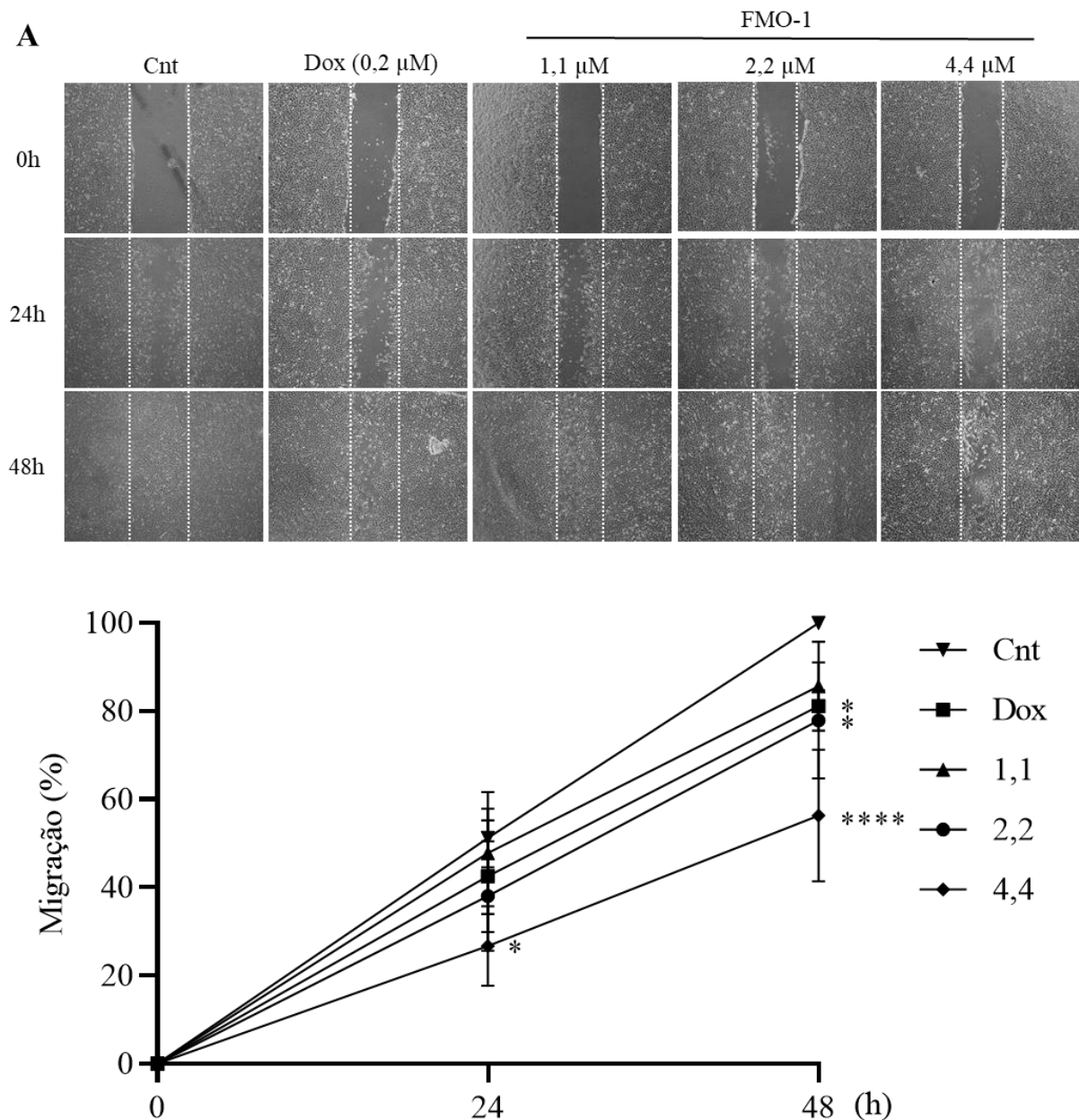


A – Representação de um experimento mostrando a formação de colônias. **B** – Porcentagem da formação de colônias. Cnt = controle negativo e Dox = doxorrubicina. Os dados foram submetidos a One-Way ANOVA seguida de pós-teste de Dunnett. (****) $p < 0,0001$ tratamentos comparados com o controle negativo e (#) $p < 0,001$ para comparações entre os tratamentos. **Fonte:** Autoria Própria

5.4. FMO-1 REDUZ A MIGRAÇÃO CELULAR APÓS O TRATAMENTO

O ensaio foi realizado para avaliar a capacidade do composto em inibir a migração celular. Após a realização da ferida foi possível observar que o composto FMO-1 inibiu a migração celular significativamente em todas as concentrações testadas. A concentração de 4,4 μM foi a que mostrou a maior capacidade inibitória, com apenas 18% de migração em 24h e 56% em 48h. Ao final do experimento a porcentagem de migração foi de 99% para o controle negativo, enquanto que o positivo, doxorrubicina, a porcentagem foi de 78% em 48h (Figura 7).

Figura 7 - Efeito inibitório na migração de células A549 após tratamento com FMO-1



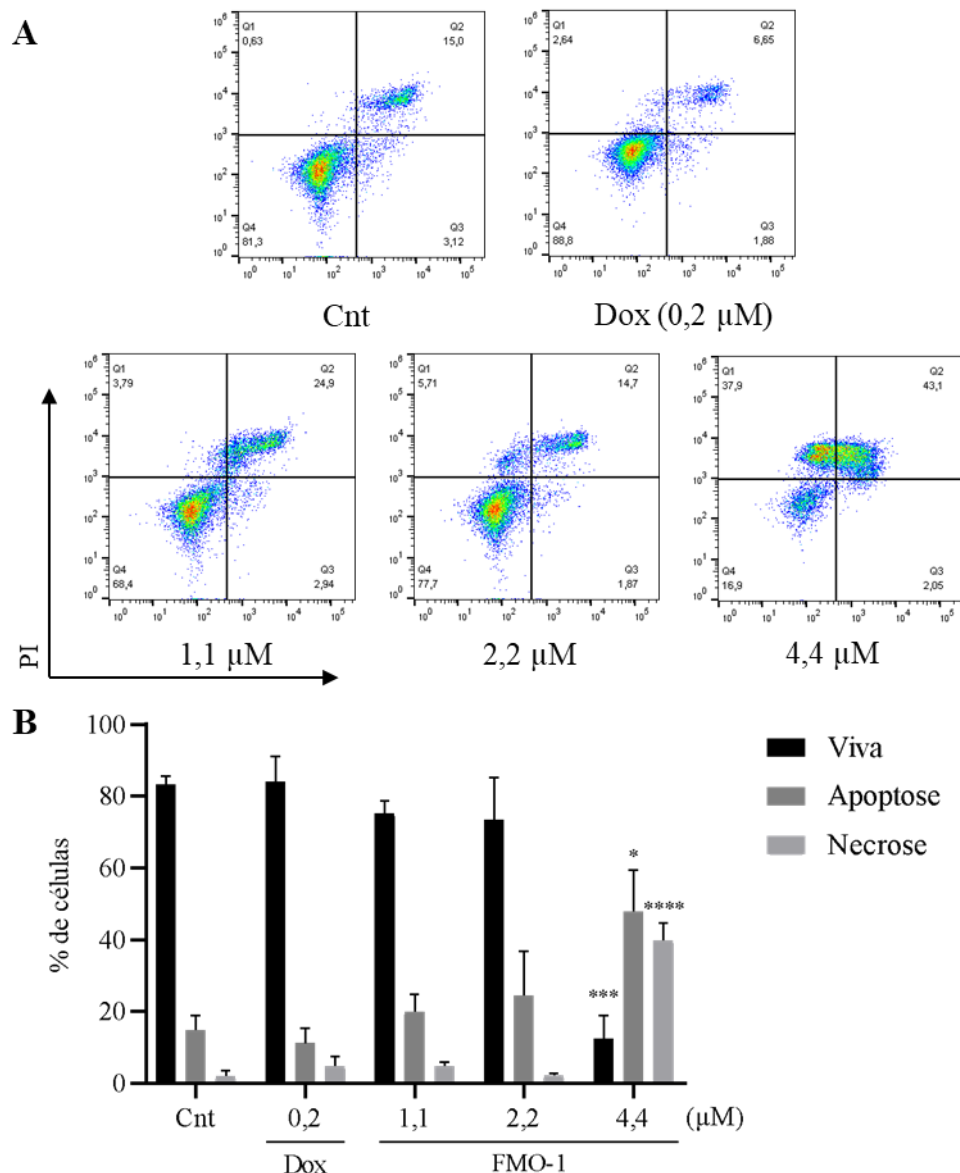
A – Representação de um experimento de migração após tratamento com FMO-1 por 0h, 24h e 48h. **B** – Percentual de migração. Os dados mostram média e desvio padrão de três experimentos independentes. Cnt = controle negativo e Dox = doxorrubicina. Os dados foram submetidos a Two-Way ANOVA seguida do pós-teste de Dunnett para a comparação entre os tratamentos. (****) $P < 0,001$ e (*) $P < 0,01$. **Fonte:** Autoria Própria

5.5. FMO-1 INDUZ APOPTOSE E NECROSE EM CÉLULAS DE A549 APÓS O TRATAMENTO

Para analisar o possível tipo de morte induzida pelo composto FMO-1, foi realizado o ensaio de Anexina V FITC/Iodeto de propídio. Após o tratamento por 24h

foi possível observar na concentração de 4,4 μM uma redução significativa na porcentagem de células vivas (12,4%), assim como o aumento de células em apoptose (47,8%) e necrose (39,7%) em relação ao controle negativo. As concentrações de 1,1 μM e 2,2 μM não foram capazes de induzir alterações significativas na porcentagem de células vivas, em apoptose ou necrose. Também não foi possível observar alterações na concentração de 0,2 μM da doxorubicina (Figura 8).

Figura 8 - Porcentagem de células de A549 em apoptose e necrose após tratamento com FMO-1.



A – Representação da análise por citometria de fluxo. Nos quadrantes temos: células viáveis (Anexina V-/PI-), apoptose inicial (Anexina V+/PI-), apoptose tardia (Anexina V+/PI+) e necrose (Anexina V-/PI+). **B** – Porcentagem de células viáveis, em apoptose e necrose após tratamento com composto FMO-1. Cnt = controle negativo e Dox = doxorubicina. Os dados foram submetidos a One-Way ANOVA seguida de pós-teste de Dunnett para comparar tratamentos com o controle negativo. (****) $p < 0,0001$, (***) $p < 0,0002$ e (*) $p < 0,01$.

6. DISCUSSÃO

A lausona é uma quinona pertencente a classe das naftoquinonas que é encontrada na espécie *Lawsonia inermis*, popularmente conhecida como henna e apresenta grande atividade biológica (DANANJAYA et al., 2017; RAHMOUN et al., 2012; RASOULIYAN et al., 2021). Dessa forma, a lausona tem sido fonte de inspiração para a produção de derivados a fim de melhorar o seu potencial antitumoral (OLIVEIRA et al., 2017). Nesse trabalho foram avaliados os derivados de lausona FMO-1, FMO-2 e FMO-3 quanto a sua atividade citotóxica em linhagens de adenocarcinoma pulmonar (A549), melanoma (B16-F10) e glioma (C6).

Os resultados do SRB mostram que os três compostos foram capazes de inibir o crescimento celular nas linhagens testadas. Dentre eles o FMO-1 possui o maior potencial inibitório em comparação com o FMO-2 e FMO-3, mostrando valores de IC_{50} abaixo de 2,2 μM nas três linhagens tumorais. Os compostos FMO-1 e FMO-2 apresentaram uma IC_{50} menor que a da lausona, dentre eles o FMO-1 se destaca por ter um potencial inibitório pelo menos 10 vezes maior que o da lausona. Compostos considerados potentes no tratamento do câncer devem apresentar uma IC_{50} abaixo de 10 μM após 72h de tratamento (KUETE et al., 2014).

A capacidade de um composto ser citotóxico em tipos de câncer com características histológicas distintas, o torna promissor no tratamento das neoplasias (CARVALHO et al., 2009). Como o FMO-1 foi capaz de inibir o crescimento celular de três tipos de câncer histologicamente diferentes, sugere-se que ele possui um grande potencial antitumoral. Semelhante aos nossos resultados, Franca et al. (2021) mostrou que derivados glicosídicos de lausona, possuem alto efeito inibitório nas linhagens A549, B16-F10 e C6 com IC_{50} menor que a da lausona. Ottoni et al. (2020) também demonstrou que derivados glicosídicos tem alto efeito inibitório em diferentes linhagens de câncer de mama (SKBR-3, MDA-MB-231 e MCF-7). Em comparação ao trabalho de Franca com derivados glicosídicos, o FMO-1 apresentou uma IC_{50} menor nas linhagens A549, B16-F10 e C6, evidenciando o potencial inibitório desse composto.

Outros derivados de quinonas, por exemplo derivados heterocíclicos possuem potencial inibitório com valores de IC_{50} abaixo de 10 μM em células de câncer de pulmão (A549), câncer de ovário (SKOV-3), melanoma (SK-MEL-2), câncer de cérebro

(XF498), colón (HCT15), estômago (SNU-638), fibrosarcoma (HT1080) e leucemia mieloide (HL60) (KIM et al., 2008). Com base nos nossos resultados e os dados encontrados na literatura, derivados sintéticos tem maior efeito inibitório em relação ao seu composto de origem. O FMO-1 apresentou o maior efeito inibitório entre os compostos testados, sendo assim foi selecionado para a avaliação no demais ensaios de citotoxicidade.

A A549 é uma linhagem de câncer de pulmão de células não pequenas que representa cerca de 80% dos tipos de câncer de pulmão (SUNG et al., 2021). O câncer de pulmão é um dos mais incidentes e apresenta o maior índice de mortalidade no Brasil e no mundo, assim a descoberta de compostos capazes de tratar esse tipo de câncer é de grande importância (INCA, 2019a). Por isso, nesse trabalho foi utilizada a linhagem A549 para estudo da atividade antiproliferativa e de morte celular.

Células tumorais possuem altas taxas de proliferação devido ao acúmulo de mutações que favorecem a divisão celular e diminuem a morte. Uma única célula mutada pode se dividir inúmeras vezes formando tumores, sendo esse um dos aspectos importantes para o estabelecimento do câncer (FRANK; NOWAK, 2004). O ensaio clonogênico permite avaliar a capacidade de uma célula em resistir ao tratamento exposto e se dividir formando colônias (GUZMÁN et al., 2014). Nesse estudo, foi possível observar que o composto FMO-1 inibiu significativamente a formação de colônias na linhagem A549 em todas as concentrações testadas. O efeito inibitório de clones tumorais pelo FMO-1 corrobora com os resultados de citotoxicidade por SRB no qual o composto apresentou um alto potencial inibitório na A549.

Estudos com o composto 1,4-naftoquinona, demonstrou que essa naftoquinona foi capaz de inibir a formação de colônias de melanoma (B16-F10) (KUMAR et al., 2009). Sadhukhan et al. (2016) testaram ao todo vinte e dois compostos derivados da lausona em linhagens de células de glioblastoma multiforme humano (CCF-4). Eles observaram que um dos compostos foi capaz de inibir a formação de colônias comparadas com o controle negativo. A β -lapachona uma naftoquinona semelhante a lausona, é capaz de inibir a formação de colônias em linhagem A549 pela capacidade de produzir espécies reativas de oxigênio (CHOI et al., 2007). Assim, compostos derivados de lausona possuem alta capacidade de inibir a formação de colônias de células tumorais.

O adenocarcinoma pulmonar é um câncer com alta taxa de mortalidade e altamente metastático, no qual, a migração celular desempenha um papel importante na progressão do tumor (HUNG et al., 2014; ZABALLA; EIDEMÜLLER, 2016). Dessa forma, compostos com a capacidade de impedir a proliferação são de grande relevância para o tratamento desse câncer (HITTELMAN, 1999). Como observado no ensaio de migração, o composto FMO-1 possui uma alta capacidade em inibir a migração de células da linhagem A549 principalmente na maior concentração testada. Esses resultados corroboram com os dados mostrados anteriormente, tornando evidente a capacidade antiproliferativa do composto. Resultados da literatura mostram que derivados de lausona, semelhantes aos estudados nesse trabalho, também demonstram a capacidade de inibir a migração celular. Franca et al. (2021) mostrou que após 24h os derivados glicosídicos de lausona foram capazes de inibir 80% da migração celular em comparação ao controle negativo na linhagem de melanoma (B16-F10). Oliveira et al. (2017) observaram que compostos rutênicos complexados com a lausona também foram capazes de inibir a migração celular. Após 48h esses compostos inibiram cerca de 70% da migração celular na linhagem de adenocarcinoma pulmonar (A549).

A apoptose é um tipo de morte celular que apresenta alterações morfológicas semelhantes tanto na via de ativação intrínseca quanto na extrínseca (HACKER, 2000). As alterações morfológicas podem ser a perda do aspecto de fibroblasto ou arredondamento da célula, redução do volume citoplasmático, geralmente acompanhada da condensação e fragmentação do núcleo (DOONAN; COTTER, 2008). Nos resultados obtidos pela coloração de Giemsa, o composto FMO-1 induziu alterações morfológicas características da apoptose na linhagem A549, como redução do citoplasma e células com aspecto redondo, indicando que o composto pode induzir apoptose.

A ativação das vias de caspases na apoptose, induz a exposição de fosfolípidios de membranas como a fosfatidiserina (FIANDALO; KYPRIANOU, 2012). A fosfatidiserina encontra-se na parte interna da bicamada lipídica e após a indução da apoptose, ela é externalizada na membrana plasmática onde servirá como um sinal de fagocitose para células como macrófagos (MARIÑO; KROEMER, 2013; VAN DEN EIJNDE et al., 1998). Os resultados encontrados no ensaio de Anexina V/PI mostraram que na concentração de 4,4 μ M, o composto FMO-1 induz morte celular por apoptose. Esse resultado corrobora com as análises morfológicas observadas

pela coloração de Giemsa, no qual foi visto alterações como redução do citoplasma e células apoptóticas.

A lausona e diversas outras quinonas induzem morte por apoptose em uma variedade de células tumorais. Um dos mecanismos de apoptose descritos para naftoquinonas é a inativação de topoisomerases I e II, como demonstrado no modelo *in vitro* e *in vivo* de glioma (C6), no qual o lapachol foi capaz de induzir apoptose após o tratamento (XU et al., 2016). Complexos de rutênio contendo lausona induzem apoptose em células de câncer de próstata (DU-145), câncer de mama (MCF-7) e câncer de pulmão (A549) com parada do ciclo celular na fase G1 (OLIVEIRA et al., 2017). Franca et al. (2021) demonstrou que o derivado glicosídico de lausona foi capaz de induzir apoptose em células de melanoma (B16-F10), entretanto o mecanismo de ação ainda não foi descrito. No adenocarcinoma pulmonar (A549) as quinonas tem como principal mecanismo de ação descrito para apoptose a produção de ROS, por conta do seu potencial redox (WATANABE; FORMAN, 2003; WU; KASSIE; MERSCH-SUNDERMANN, 2005).

Naftoquinonas no geral tem potencial de induzir a produção de espécies reativas de oxigênio (ROS) por participarem do ciclo redox. Essas são reduzidas em semiquinonas ou hidroquinonas, dessa forma, ocorre a reação com oxigênio celular resultando no ânion radical superóxido que induz o estresse oxidativo (SOUZA; LOPES; ANDRADE, 2016). O estresse oxidativo é uma das vias de indução de apoptose associadas com naftoquinonas (SADHUKHAN et al., 2016). Esse mecanismo pode estar associado com o efeito citotóxico do composto FMO-1 na linhagem A549, entretanto se faz necessário a realização de ensaios para demonstrá-lo.

7. CONCLUSÃO

Em suma, o composto FMO-1 foi o que apresentou a melhor atividade inibitória frente as linhagens testadas. Os resultados obtidos sugerem que o composto foi capaz de inibir o crescimento celular, assim como induziu alterações morfológicas nas linhagens A549, B16F10 e C6. O FMO-1 também inibiu a formação de clones na linhagem A549 e o sugere-se que o mecanismo de morte seja a apoptose. Assim, o composto FMO-1 possui grande potencial no tratamento do câncer de pulmão.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- AHMED, H. H. et al. Phytochemical analysis and anti-cancer investigation of Boswellia Serrata bioactive constituents in vitro. **Asian Pacific Journal of Cancer Prevention**, v. 16, n. 16, p. 7179–7188, 2015.
- AKBARI, E. et al. Co-Loading of Cisplatin and Methotrexate in Nanoparticle-Based PCL-PEG System Enhances Lung Cancer Chemotherapy Effects. **Journal of Cluster Science**, v. 9, 2021.
- ANDRADE, J. K. F. **Avaliação da atividade anticâncer da nitrofurantoina e de seus novos derivados**. [s.l.] Universidade Federal de Pernambuco, 2013.
- ANDRADE, L. N. et al. Evaluation of the cytotoxicity of structurally correlated p-menthane derivatives. **Molecules**, v. 20, n. 7, p. 13264–13280, 2015.
- ASCHE, C. Antitumour Quinones. **Mini-Reviews in Medicinal Chemistry**, v. 5, n. 5, p. 449–467, 2005.
- BARANI, M. et al. Lawsone-loaded Niosome and its antitumor activity in MCF-7 breast Cancer cell line: a Nano-herbal treatment for Cancer. **DARU, Journal of Pharmaceutical Sciences**, v. 26, n. 1, p. 11–17, 2018.
- BARTIS, D. et al. Down-Regulation of Canonical and Up-Regulation of Non-Canonical Wnt Signalling in the Carcinogenic Process of Squamous Cell Lung Carcinoma. **PLoS ONE**, v. 8, n. 3, 2013.
- BERTRAM, J. S. The molecular biology of cancer. **Molecular Aspects of Medicine**, v. 21, p. 167–223, 2001.
- CARSON, DENNIS A.; RIBEIRO, JOAO M. Apoptosis and disease. **The Lancet**, v. 341, p. 1251–1254, 1993.
- CARVALHO, C. et al. Doxorubicin: The Good, the Bad and the Ugly Effect. **Current Medicinal Chemistry**, v. 16, n. 25, p. 3267–3285, 2009.
- CATALDO, J. K.; BRODSKY, J. L. Lung cancer stigma, anxiety, depression and symptom severity. **Oncology (Switzerland)**, v. 85, n. 1, p. 33–40, 2013.
- CHANG, A. Chemotherapy, chemoresistance and the changing treatment landscape for NSCLC. **Lung Cancer**, v. 71, n. 1, p. 3–10, 2011.
- CHEN, F.; WANG, W.; EL-DEIRY, W. S. Current strategies to target p53 in cancer.

Biochemical Pharmacology, v. 80, n. 5, p. 724–730, 2010.

CHEN, X. et al. Cellular pharmacology studies of shikonin derivatives. **Phytotherapy Research**, v. 16, n. 3, p. 199–209, 2002.

CHOI, E. K. et al. Upregulation of NAD(P)H:quinone oxidoreductase by radiation potentiates the effect of bio-reductive β -lapachone on cancer cells. **Neoplasia**, v. 9, n. 8, p. 634–642, 2007.

COLLINS, L. G. et al. Lung cancer: Diagnosis and management. **American Family Physician**, v. 75, n. 1, p. 56–63, 2007.

CRESPO, P.; LEÓN, J. Ras proteins in the control of the cell cycle and cell differentiation. **Cellular and Molecular Life Sciences**, v. 57, n. 11, p. 1613–1636, 2000.

DANANJAYA, S. H. S. et al. In vitro and in vivo antifungal efficacy of plant based lawsone against *Fusarium oxysporum* species complex. **Microbiological Research**, v. 201, n. August 2016, p. 21–29, 2017.

DE GRANDIS, R. A. et al. Novel lawsone-containing ruthenium(II) complexes: Synthesis, characterization and anticancer activity on 2D and 3D spheroid models of prostate cancer cells. **Bioorganic Chemistry**, v. 85, n. li, p. 455–468, 2019.

DE MELO, J. G. et al. Medicinal plants used as antitumor agents in Brazil: An ethnobotanical approach. **Evidence-based Complementary and Alternative Medicine**, v. 2011, 2011.

DEMAIN, A. L.; VAISHNAV, P. Natural products for cancer chemotherapy. **Microbial Biotechnology**, v. 4, n. 6, p. 687–699, 2011.

DIMOPOULOU, I. et al. Pulmonary toxicity from novel antineoplastic agents. **Annals of Oncology**, v. 17, n. 3, p. 372–379, 2006.

DING, L. et al. Somatic mutations affect key pathways in lung adenocarcinoma. **Nature**, v. 455, n. 7216, p. 1069–1075, 2008.

DOONAN, F.; COTTER, T. G. Morphological assessment of apoptosis. **Methods**, v. 44, n. 3, p. 200–204, 2008.

DUTRA, R. C. et al. Medicinal plants in Brazil: Pharmacological studies, drug

discovery, challenges and perspectives. **Pharmacological Research**, v. 112, p. 4–29, 2016.

EFFERTH, T. et al. Collateral sensitivity of natural products in drug-resistant cancer cells. **Biotechnology Advances**, p. #pagerange#, 2019.

ELMORE, S. Apoptosis: A Review of Programmed Cell Death. **Toxicologic Pathology**, v. 35, n. 4, p. 495–516, 2007.

EVAN, G. I.; VOUSDEN, K. H. Proliferation, cell cycle and apoptosis in cancer. **Nature**, v. 411, n. 6835, p. 342–348, 2001.

FEDERICO, C. et al. Localized Delivery of Cisplatin to Cervical Cancer Improves Its Therapeutic Efficacy and Minimizes Its Side Effect Profile. **International Journal of Radiation Oncology Biology Physics**, v. 109, n. 5, p. 1483–1494, 2021.

FIANDALO, M. V.; KYPRIANOU, N. CASPASE CONTROL: PROTAGONISTS OF CANCER CELL APOPTOSIS. **Exp Oncol.**, v. 34, n. 3, p. 165–175, 2012.

FILHO, V. W.; GATTAS, G. J. F. Biomarcadores moleculares em câncer: implicações para a pesquisa epidemiológica e a saúde pública. **Cad. Saúde Pública**, v. 17, n. 3, p. 467–480, 2001.

FITSIOU, E. et al. Phytochemical profile and evaluation of the biological activities of essential oils derived from the greek aromatic plant species *Ocimum basilicum*, *Mentha spicata*, *Pimpinella anisum* and *Fortunella margarita*. **Molecules**, v. 21, n. 8, p. 1–15, 2016.

FITSIOU, E. et al. Chemical composition and evaluation of the biological properties of the essential oil of the dietary phytochemical *Lippia citriodora*. **Molecules**, v. 23, n. 123, 2018.

FRANK, S. A.; NOWAK, M. A. Problems of somatic mutation and cancer. **BioEssays**, v. 26, n. 3, p. 291–299, 2004.

FRANKEN, N. A. P. et al. Clonogenic assay of cells in vitro. **Nature Protocols**, v. 1, n. 5, p. 2315–2319, 2006.

FRIEDLAENDER, A. et al. Next generation sequencing and genetic alterations in squamous cell lung carcinoma: Where are we today? **Frontiers in Oncology**, v. 9, n.

MAR, p. 1–6, 2019.

FULDA, S.; DEBATIN, K. M. Extrinsic versus intrinsic apoptosis pathways in anticancer chemotherapy. **Oncogene**, v. 25, n. 34, p. 4798–4811, 2006.

GOEL, S. et al. CDK4/6 inhibition in cancer: beyond cell cycle arrest. **Trends in Cell Biology**, v. 28, n. 11, p. 911–925, 2018.

GREEN, D. R.; LLAMBI, F. Cell death signaling. **Cold Spring Harbor Perspectives in Biology**, v. 7, n. 12, 2015.

GUESMI, F. et al. Antiinflammatory and anticancer effects of terpenes from oily fractions of *Teucrium alopecurus*, blocker of I κ B α kinase, through downregulation of NF- κ B activation, potentiation of apoptosis and suppression of NF- κ B-regulated gene expression. **Biomedicine and Pharmacotherapy**, v. 95, p. 1876–1885, 2017.

GUZMÁN, C. et al. ColonyArea: An ImageJ plugin to automatically quantify colony formation in clonogenic assays. **PLoS ONE**, v. 9, n. 3, p. 14–17, 2014.

HACKER, G. The morphology of apoptosis. *Cell Tissue Res.* **Cell Tissue Res**, v. 301, p. 5–17, 2000.

HAMDOUN, S. et al. Lawsone derivatives target the Wnt/ β -catenin signaling pathway in multidrug-resistant acute lymphoblastic leukemia cells. **Biochemical Pharmacology**, v. 146, p. 63–73, 2017.

HARVEY, A. L.; EDRADA-EBEL, R.; QUINN, R. J. The re-emergence of natural products for drug discovery in the genomics era. **Nature Reviews Drug Discovery**, v. 14, n. 2, p. 111–129, 2015.

HEIDEMANN, F. et al. Selectins mediate small cell lung cancer systemic metastasis. **PLoS ONE**, v. 9, n. 4, p. 1–11, 2014.

HERBST, R. S.; MORGENSZTERN, D.; BOSHOFF, C. The biology and management of non-small cell lung cancer. **Nature**, v. 553, n. 7689, p. 446–454, 2018.

HILL, B. T. Etiology of Cancer. In: **Clinical Ophthalmic Oncology**. [s.l: s.n.]. p. 11–17.

HITTELMAN, W. N. Clones and subclones in the lung cancer field. **Journal of the**

National Cancer Institute, v. 91, n. 21, p. 1796, 1999.

HOFMANN, K. The evolutionary origins of programmed cell death signaling. **Cold Spring Harbor Perspectives in Biology**, v. 12, n. 9, p. 1–16, 2020.

HORTOBDGYI, G. N. Anthracyclines in the Treatment of Early Breast Cancer. **Drugs**, v. 45, n. 2, p. 1–3, 1997.

HUNG, J. Y. et al. Colony-stimulating factor 1 potentiates lung cancer bone metastasis. **Laboratory Investigation**, v. 94, n. 4, p. 371–381, 2014.

HUSSAIN, H.; GREEN, I. R. Lapachol and lapachone analogs: a journey of two decades of patent research(1997-2016). **Expert Opinion on Therapeutic Patents**, v. 27, n. 10, p. 1111–1121, 2017.

INCA. **O que é câncer?** Disponível em: <<https://www.inca.gov.br/o-que-e-cancer>>. Acesso em: 13 ago. 2019a.

INCA. **Cirurgia**. Disponível em: <<https://www.inca.gov.br/tratamento/cirurgia>>. Acesso em: 13 ago. 2019b.

INCA. **Estimativa/2020 - Incidência de Câncer no Brasil**. Rio de Janeiro: [s.n.].

INCA. **Cartilha - Radioterapia**. Disponível em: <<https://www.inca.gov.br/tratamento/radioterapia>>. Acesso em: 13 ago. 2019b.

JORDÃO, A. K. et al. Lawsone in organic synthesis. **RSC Advances**, v. 5, n. 83, p. 67909–67943, 2015.

JOYCE, C.; RAYI, A.; KASI, A. Tumor-suppressor genes. **Europe PMC**, 2018.

KATZUNG, B. G. **Basic & Clinical Pharmacology**. 14. ed. [s.l: s.n.].

KIM, J. S. et al. Synthesis of 1-/2-substituted-[1,2,3]triazolo[4,5-g]phthalazine-4,9-diones and evaluation of their cytotoxicity and topoisomerase II inhibition. **Bioorganic and Medicinal Chemistry**, v. 16, n. 8, p. 4545–4550, 2008.

KRISHNAMURTHI, K. Screening of Natural Products for Anticancer and Antidiabetic Properties. **Health Administrator**, v. 20, p. 69–75, 2007.

KUETE, V. et al. Cytotoxicity of four Aframomum species (A. arundinaceum, A. alboviolaceum, A. kayserianum and A. polyanthum) towards multi-factorial drug

resistant cancer cell lines. **BMC Complementary and Alternative Medicine**, v. 14, n. 1, p. 1–7, 2014.

KUMAR, M. R. S. et al. Cytotoxic, genotoxic and oxidative stress induced by 1,4-naphthoquinone in B16F1 melanoma tumor cells. **Toxicology in Vitro**, v. 23, n. 2, p. 242–250, 2009.

LAI, M. et al. Acid ceramidase controls apoptosis and increases autophagy in human melanoma cells treated with doxorubicin. **Scientific Reports**, v. 11, n. 1, p. 1–14, 2021.

LANFREDINI, S.; THAPA, A.; O'NEILL, E. RAS in pancreatic cancer. **Biochemical Society Transactions**, v. 47, n. 4, p. 961–972, 2019.

LEE, H. W. et al. Alpha-smooth muscle actin (ACTA2) is required for metastatic potential of human lung adenocarcinoma. **Clinical Cancer Research**, v. 19, n. 21, p. 5879–5889, 2013.

LI, P.; XIN, H.; LIU, W. Lawsone inhibits cell growth and improves the efficacy of cisplatin in skov-3 ovarian cancer cell lines. **Afr J Tradit Complement Altern Med.**, v. 5, n. 14, p. 8–17, 2017.

LI, X. Y.; WANG, X. The role of human cervical cancer oncogene in cancer progression. **International Journal of Clinical and Experimental Medicine**, v. 8, n. 6, p. 8363–8368, 2015.

LIANG, C. C.; PARK, A. Y.; GUAN, J. L. In vitro scratch assay: A convenient and inexpensive method for analysis of cell migration in vitro. **Nature Protocols**, v. 2, n. 2, p. 329–333, 2007.

LÓPEZ, L. I. L. et al. Naphthoquinones: Biological Properties and Synthesis of Lawsone and Derivatives — a Structured Review. **Vitae**, v. 21, n. 3, p. 248–258, 2014.

LU, J.-J. et al. Quinones Derived from Plant Secondary Metabolites as Anti-cancer Agents. **Anti-Cancer Agents in Medicinal Chemistry**, v. 13, n. 3, p. 456–463, 2013.

MACALUSO, M. et al. Ras family genes: An interesting link between cell cycle and cancer. **Journal of Cellular Physiology**, v. 192, n. 2, p. 125–130, 2002.

- MANOSROI, J.; DHUMTANOM, P.; MANOSROI, A. Anti-proliferative activity of essential oil extracted from Thai medicinal plants on KB and P388 cell lines. **Cancer Letters**, v. 235, n. 1, p. 114–120, 2006.
- MARIN, J. et al. Importance and Limitations of Chemotherapy Among the Available Treatments for Gastrointestinal Tumours. **Anti-Cancer Agents in Medicinal Chemistry**, v. 9, n. 2, p. 162–184, 2009.
- MARIÑO, G.; KROEMER, G. Mechanisms of apoptotic phosphatidylserine exposure. **Cell Research**, v. 23, n. 11, p. 1247–1248, 2013.
- MARKMAN, M. Toxicities of the platinum antineoplastic agents. **Expert Opinion on Drug Safety**, v. 2, n. 6, p. 597–607, 2003.
- MATTHEWS, H. K.; BERTOLI, C.; DE BRUIN, R. A. M. Cell cycle control in cancer. **Nature Reviews Molecular Cell Biology**, v. 0123456789, 2021.
- MAZZONI, C.; FALCONE, C. Caspase-dependent apoptosis in yeast. **Biochimica et Biophysica Acta - Molecular Cell Research**, v. 1783, n. 7, p. 1320–1327, 2008.
- MEIER, P.; FINCH, A.; EVAN, G. Apoptosis in development. **Nature**, v. 407, n. 6805, p. 796–801, 2000.
- MEREDITH, A. M.; DASS, C. R. Increasing role of the cancer chemotherapeutic doxorubicin in cellular metabolism. **Journal of Pharmacy and Pharmacology**, v. 68, n. 6, p. 729–741, 2016.
- MIRANDA, S. E. M. et al. Enhanced antitumor efficacy of lapachol-loaded nanoemulsion in breast cancer tumor model. **Biomedicine and Pharmacotherapy**, v. 133, n. October 2020, 2021.
- MOLINA, J. R. et al. Non-small cell lung cancer: Epidemiology, risk factors, treatment, and survivorship. **Mayo Clinic Proceedings**, v. 83, n. 5, p. 584–594, 2008.
- MONGA, A. K.; KUMAR, S. A phytopharmacological review on N. Jatamansi. **Pharma Research**, v. 9, n. 2, p. 21–32, 2013.
- MULLER, P. A. J.; VOUSDEN, K. H. P53 mutations in cancer. **Nature Cell Biology**, v. 15, n. 1, p. 2–8, 2013.

NEWMAN, D. J.; CRAGG, G. M. Natural products as sources of new drugs over the 30 years from 1981 to 2010. **Journal of Natural Products**, v. 75, n. 3, p. 311–335, 2012.

NEWMAN, D. J.; CRAGG, G. M. Natural Products as Sources of New Drugs over the Nearly Four Decades from 01/1981 to 09/2019. **Journal of Natural Products**, v. 83, n. 3, p. 770–803, 2020.

NICHOLS, L.; SAUNDERS, R.; KNOLLMANN, F. D. Causes of death of patients with lung cancer. **Archives of Pathology and Laboratory Medicine**, v. 136, n. 12, p. 1552–1557, 2012.

NIRMALA, J. G.; LOPUS, M. Cell death mechanisms in eukaryotes. **Cell Biol Toxicol**, v. 36, p. 145–146, 2020.

NYGREN, P. What is cancer chemotherapy? **Acta Oncologica**, v. 40, n. 2–3, p. 166–174, 2001.

O'SHAUGHNESSY, J. A. Pegylated liposomal doxorubicin in the treatment of breast cancer. **Clinical Breast Cancer**, v. 4, n. 5, p. 318–328, 2003.

OLIVEIRA, K. M. et al. Selective Ru(II)/lawsone complexes inhibiting tumor cell growth by apoptosis. **Journal of Inorganic Biochemistry**, v. 176, p. 66–76, 2017.

OTTERSON, G. A. et al. Phase I/II study of inhaled doxorubicin combined with platinum-based therapy for advanced non-small cell lung cancer. **Clinical Cancer Research**, v. 16, n. 8, p. 2466–2473, 2010.

OTTONI, F. M. et al. Synthesis and cytotoxicity evaluation of glycosidic derivatives of lawsone against breast cancer cell lines. **Bioorganic and Medicinal Chemistry Letters**, v. 30, n. 2, p. 126817, 2020.

PARDO, J. et al. Large cell carcinoma of the lung. **Applied Immunohistochemistry & Molecular Morphology**, v. 17, n. 5, p. 383–392, 2009.

PARKIN, D. M.; BOYD, L.; WALKER, L. C. The fraction of cancer attributable to lifestyle and environmental factors in the UK in 2010. **British Journal of Cancer**, v. 105, n. S2, p. S77–S81, 2011.

PFISTER, C. et al. Randomized Phase III Trial of Dose-dense Methotrexate,

Vinblastine, Doxorubicin, and Cisplatin, or Gemcitabine and Cisplatin as Perioperative Chemotherapy for Patients with Muscle-invasive Bladder Cancer. Analysis of the GETUG/AFU V05 VESPER Trial Seconda. **European Urology**, v. 79, n. 2, p. 214–221, 2021.

POPPER, H. H. Progression and metastasis of lung cancer. **Cancer and Metastasis Reviews**, v. 35, n. 1, p. 75–91, 2016.

PUN, N. T.; JEONG, C. H. Statin as a potential chemotherapeutic agent: Current updates as a monotherapy, combination therapy, and treatment for anti-cancer drug resistance. **Pharmaceuticals**, v. 14, n. 5, 2021.

RAHMOUN, N. M. et al. Antibacterial and antifungal activity of lawsone and novel naphthoquinone derivatives. **Medecine et Maladies Infectieuses**, v. 42, n. 6, p. 270–275, 2012.

RASOULIYAN, F. et al. Preparation, physicochemical characterization, and anti-proliferative properties of Lawsone-loaded solid lipid nanoparticles. **Chemistry and Physics of Lipids**, v. 239, n. July, p. 105123, 2021.

REBECCA, W. O. et al. Combined chemotherapy and radiotherapy (without surgery) compared with radiotherapy alone in localized carcinoma of the esophagus. **Cochrane Database of Systematic Reviews**, n. 1, 2003.

RECK, M. et al. Management of non-small-cell lung cancer: Recent developments. **The Lancet**, v. 382, n. 9893, p. 709–719, 2013.

RIEDL, S. J.; SHI, Y. Molecular mechanisms of caspase regulation during apoptosis. **Nature Reviews Molecular Cell Biology**, v. 5, n. 11, p. 897–907, 2004.

RIVOIRE, W. A. et al. Biologia molecular do câncer cervical. **Revista Brasileira de Saude Materno Infantil**, v. 6, n. 4, p. 447–451, 2006.

RUDIN, C. M. et al. Small-cell lung cancer. **Nature Reviews Disease Primers**, v. 7, n. 1, 2021.

SADHUKHAN, P. et al. Selective pro-apoptotic activity of novel 3,3'-(aryl/alkyl-methylene)bis(2-hydroxynaphthalene-1,4-dione) derivatives on human cancer cells via the induction reactive oxygen species. **PLoS ONE**, v. 11, n. 7, p. 1–22, 2016.

- SAMARGHANDIAN, S.; SHABESTARI, M. M. DNA fragmentation and apoptosis induced by safranal in human prostate cancer cell line. **Indian Journal of Urology**, v. 29, n. 3, p. 177–183, 2013.
- SATO, A. et al. Intracellular microRNA expression patterns influence cell death fates for both necrosis and apoptosis. **FEBS Open Bio**, v. 10, n. 11, p. 2417–2426, 2020.
- SEGAWA, K.; NAGATA, S. An Apoptotic “Eat Me” Signal: Phosphatidylserine Exposure. **Trends in Cell Biology**, v. 25, n. 11, p. 639–650, 2015.
- SHANMUGAM, M. K. et al. Oleanolic acid and its synthetic derivatives for the prevention and therapy of cancer: Preclinical and clinical evidence. **Cancer Letters**, v. 346, n. 2, p. 206–216, 2014.
- SIEGEL, R. L.; MILLER, K. D.; JEMAL, A. Cancer statistics, 2019: {Cancer} {Statistics}, 2019. **CA: A Cancer Journal for Clinicians**, v. 69, n. 1, p. 7–34, 2019.
- SILVA, A. E.; SERAKIDES, R.; CASSALI, G. D. Carcinogênese hormonal e neoplasias hormônio-dependentes. **Ciência Rural**, v. 34, n. 2, p. 625–633, 2004.
- SILVA, M. N.; FERREIRA, V. F.; SOUZA, C. B. V. DE. Um panorama atual da química e da farmacologia de naftoquinonas, com ênfase na β -lapachona e derivados. **Quim. Nova**, v. 26, n. 3, p. 407–416, 2003.
- SOUZA, E. T.; LOPES, W. A.; ANDRADE, J. B. DE. Fontes, formação, reatividade e determinação de quinonas na atmosfera. **Química Nova**, v. 39, n. 4, p. 486–495, 2016.
- STUPP, R. et al. Effects of radiotherapy with concomitant and adjuvant temozolomide versus radiotherapy alone on survival in glioblastoma in a randomised phase III study: 5-year analysis of the EORTC-NCIC trial. **Lancet Oncology**, v. 10, n. 5, p. 459–466, 2009.
- SUN, M. Y. et al. Cisplatin-Resistant Gastric Cancer Cells Promote the Chemoresistance of Cisplatin-Sensitive Cells via the Exosomal RPS3-Mediated PI3K-Akt-Cofilin-1 Signaling Axis. **Frontiers in Cell and Developmental Biology**, v. 9, n. February, p. 1–15, 2021.
- SUNG, H. et al. Global patterns in excess body weight and the associated cancer burden. **CA: A Cancer Journal for Clinicians**, v. 69, p. 88–112, 2019.

- 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.
- VALENZUELA, M. M. A.; NEIDIGH, J. W.; WALL, N. R. Antimetabolite Treatment for Pancreatic Cancer. **Chemotherapy: Open Access**, v. 03, n. 03, 2014.
- VAN DEN EIJNDE, S. M. et al. Cell surface exposure of phosphatidylserine during apoptosis is phylogenetically conserved. **Apoptosis**, v. 3, n. 1, p. 9–16, 1998.
- VAN ENGELAND, M. et al. Annexin V-affinity assay: A review on an apoptosis detection system based on phosphatidylserine exposure. **Cytometry**, v. 31, n. 1, p. 1–9, 1998.
- VERMA, R. Anti-Cancer Activities of 1,4-Naphthoquinones: A QSAR Study. **Anti-Cancer Agents in Medicinal Chemistry**, v. 6, n. 5, p. 489–499, 2006.
- VICHAJ, V.; KIRTIKARA, K. Sulforhodamine B colorimetric assay for cytotoxicity screening. **Nature Protocols**, v. 1, n. 3, p. 1112–1116, 2006.
- WANG, S. BIN; TAO, Z.; LI, P. Lawsone suppresses azoxymethane mediated colon cancer in rats and reduces proliferation of DLD-1 cells via NF- κ B pathway. **Biomedicine and Pharmacotherapy**, v. 89, p. 152–161, 2017.
- WANG, H. et al. Cisplatin prevents breast cancer metastasis through blocking early EMT and retards cancer growth together with paclitaxel. **Theranostics**, v. 11, n. 5, p. 2442–2459, 2021.
- WATANABE, N.; FORMAN, H. J. Autoxidation of extracellular hydroquinones is a causative event for the cytotoxicity of menadione and DMNQ in A549-S cells. **Archives of Biochemistry and Biophysics**, v. 411, n. 1, p. 145–157, 2003.
- WILD, C. P. et al. Cancer Prevention Europe. **Molecular Oncology**, v. 13, n. 3, p. 528–534, 2019.
- WILLIAMS, G. H.; STOEBER, K. The Cell Cycle and Cancer. **Journal Of Pathology**, n. 226, p. 352–364, 2012.
- WISTUBA, I. I.; GAZDAR, A. F. Lung cancer preneoplasia. **Annual Review of Pathology**, v. 1, p. 331–348, 2006.

- WU, X. J.; KASSIE, F.; MERSCH-SUNDERMANN, V. The role of reactive oxygen species (ROS) production on diallyl disulfide (DADS) induced apoptosis and cell cycle arrest in human A549 lung carcinoma cells. **Mutation Research - Fundamental and Molecular Mechanisms of Mutagenesis**, v. 579, n. 1–2, p. 115–124, 2005.
- XU, H. et al. Inhibitory effects of lapachol on rat C6 glioma in vitro and in vivo by targeting DNA topoisomerase i and topoisomerase II. **Journal of Experimental and Clinical Cancer Research**, v. 35, n. 1, p. 1–10, 2016.
- YU, J. et al. Induction of programmed necrosis: A novel anti-cancer strategy for natural compounds. **Pharmacology and Therapeutics**, v. 214, p. 107593, 2020.
- ZABALLA, I.; EIDEMÜLLER, M. Mechanistic study on lung cancer mortality after radon exposure in the Wismut cohort supports important role of clonal expansion in lung carcinogenesis. **Radiation and Environmental Biophysics**, v. 55, n. 3, p. 299–315, 2016.
- ZAPPA, C.; MOUSA, S. A. Non-small cell lung cancer: Current treatment and future advances. **Translational Lung Cancer Research**, v. 5, n. 3, p. 288–300, 2016.
- ZEBER, J. E. et al. Cancer rates, medical comorbidities, and treatment modalities in the oldest patients. **Critical Reviews in Oncology/Hematology**, v. 67, n. 3, p. 237–242, 2008.
- ZHAO, S. et al. Human ALKBH6 Is Required for Maintenance of Genomic Stability and Promoting Cell Survival During Exposure of Alkylating Agents in Pancreatic Cancer. **Frontiers in Genetics**, v. 12, n. April, p. 1–10, 2021.
- ZHONG, Z. et al. Anti-cancer effects of Rhizoma Curcumae against doxorubicin-resistant breast cancer cells. **Chinese Medicine**, v. 13, n. 44, 2018.