



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

CRISTIANE ALMEIDA SANTOS OLIVEIRA

AVALIAÇÃO DO POTENCIAL ANTITUMORAL *IN VITRO* DE DERIVADOS
GLICOSÍDICOS DE LAPACHOL

SÃO CRISTOVÃO/SE

2024

CRISTIANE ALMEIDA SANTOS OLIVEIRA

AVALIAÇÃO DO POTENCIAL ANTITUMORAL *IN VITRO* DE DERIVADOS
GLICOSÍDICOS DE LAPACHOL

Dissertação apresentada ao Programa de PósGraduação em Ciências Fisiológica (PROCFIS) da Universidade Federal de Sergipe para defesa de Mestrado.

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

Co-orientador: Prof. Dr Ricardo Scher

SÃO CRISTOVÃO

2024

FICHA CATALOGRÁFICA ELABORADA PELA BIBLIOTECA CENTRAL
UNIVERSIDADE FEDERAL DE SERGIPE

O48a Oliveira, Cristiane Almeida Santos
Avaliação do potencial antitumoral *in vitro* de derivados glicosídicos de lapachol / Cristiane Almeida Santos Oliveira ; orientadora Cristiane Bani Corrêa. – São Cristóvão, SE, 2024.
57 f. : il.

Dissertação (mestrado em Ciências Fisiológicas) –
Universidade Federal de Sergipe, 2024.

1. Pulmões - Câncer. 2. Adenocarcinoma. 3. Naftoquinona. 4. Morte celular. 5. Citotoxicidade mediada por célula. I. Corrêa, Cristiane Bani, orient. II. Título.

CDU 616.24-006-085

UNIVERSIDADE FEDERAL DE SERGIPE
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS FISIOLÓGICAS

CRISTIANE ALMEIDA SANTOS OLIVEIRA

AVALIAÇÃO DO POTENCIAL ANTITUMORAL *IN VITRO* DE
DERIVADOS GLICOSÍDICOS DE LAPACHOL

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-graduação em Ciências Fisiológica (PROCFIS) da Universidade Federal de Sergipe para defesa de Mestrado.

1º Examinador: Profa. Dra. Cristiane Bani Corrêa

2º Examinador: Dra. Audrey Rouse Soares Tavares Silva

3º Examinador: Profa. Dra. Tatiana Rodrigues de Moura

AGRADECIMENTOS

Agradeço primeiramente a Deus por ter me dado saúde, sabedoria e força para superar as dificuldades dessa árdua caminhada. Ele foi essencial em todas as minhas conquistas e superações.

Sou grata ao meu marido Tiago que nunca me recusou amor, apoio e incentivo. Obrigada por tanta paciência e por estar ao meu lado nos inúmeros momentos de ansiedade e estresse. Sem você tudo seria mais difícil.

Aos queridos amigos que fazem parte do Labicel, João, Jileno, Rauan, Monalisa, Bruno, Audrey e Bryane, companheiros de trabalho e parceiros na amizade, sempre estiveram presentes com palavras de encorajamento e força. Obrigada pelos cafés, pela ajuda na bancada e por ouvirem os meus lamentos. Cada um teve sua contribuição para realização dessa conquista. Em especial a Mariana e Will, que não largaram minha mão em nenhum momento, estiveram sempre junto driblando todos os obstáculos do início ao fim. Vocês são anjos na minha vida acadêmica.

Agradeço ao meu coorientador Ricardo Scher por esclarecer inúmeras dúvidas e ser tão gentil e paciente.

Agradeço a minha querida Orientadora Cris, a quem tenho enorme admiração e respeito, pela oportunidade, dedicação e empatia. Você nunca perdeu a confiança no meu trabalho e sabia o que fazer para que eu não viesse a escorregar durante os momentos mais desafiadores. Declaro aqui minha eterna gratidão por compartilhar do seu conhecimento e tempo, bem como da sua amizade, sem medir esforços.

RESUMO

AValiação DO POTENCIAL ANTITUMORAL *IN VITRO* DE DERIVADOS GLICOSÍDICOS DE LAPACHOL. OLIVEIRA, C. A. S. São Cristóvão, 2024.

O câncer de pulmão é o tipo mais letal de câncer no mundo, representando cerca de 18% das mortes causadas pela doença, e lidera a segunda posição de maior incidência no mundo. A quimioterapia é um dos principais tratamentos nos estágios mais avançados do câncer de pulmão, entretanto, os medicamentos utilizados não são eficazes em casos mais graves e apresentam diversos efeitos adversos. O lapachol é um composto natural, encontrado em diversas espécies de plantas, que possui efeito citotóxico em diferentes linhagens tumorais e tem um grande potencial no tratamento da doença. Dessa forma, o lapachol tem sido utilizado como uma excelente fonte para a criação de derivados sintéticos com o objetivo de potencializar o efeito citotóxico do composto. Neste contexto, o objetivo desse trabalho foi avaliar a atividade citotóxica de derivados sintéticos de lapachol em linhagens de células tumorais de carcinoma de pulmão (A549), melanoma (B16F10) e glioma (C6). Seis derivados de lapachol foram testados quanto a sua capacidade inibitória nas linhagens tumorais através do ensaio de Sulforrodamina B. Os compostos 2, 4, 5 e 6 apresentaram um alto grau de inibição em pelo menos duas linhagens testadas. O composto 3 apresentou baixo grau de inibição nas linhagens testadas. O composto 1 apresentou um grau de inibição maior que 90% nas três linhagens estudadas e foi selecionado para avaliação da CI_{50} . O composto 1 apresentou CI_{50} abaixo de 9,2 μM nas três linhagens tumorais, sendo considerado um ótimo efeito antitumoral. A linhagem A549 foi selecionada para os próximos ensaios no tratamento com o composto 1 pela relevância do câncer. O ensaio de hemólise em eritrócitos humanos sugere que o composto 1 não possui toxicidade em células saudáveis, uma vez que não apresentou hemólise em nenhuma das concentrações testadas. No ensaio clonogênico observamos uma redução significativa na capacidade de formação de clones das células A549 em todas as concentrações testadas do composto 1, que sugere a inibição do efeito metastático. O composto 1 também apresentou efeito na migração celular, onde se observou que as maiores concentrações inibiram a migração celular, 48 horas após o tratamento. Além disso, foi feito o ensaio de marcação das células A549 com DAPI e Faloidina FITC e foram observadas alterações morfológicas de morte celular como redução do material citoplasmático e alteração na forma nuclear, que sugere morte por apoptose. A avaliação da morte celular por Anexina V e iodeto de propídeo mostrou um percentual de células positivas para apoptose. Os resultados indicam que o composto 1 pode ter efeito antitumoral, antimetastático e induz alterações morfológicas características de apoptose nas células A549.

Palavras-chave: Adenocarcinoma de pulmão; naftoquinona; morte celular; citotoxicidade.

ABSTRACT

IN VITRO EVALUATION OF THE ANTITUMOR POTENTIAL OF GLYCOSIDIC DERIVATIVES OF LAPACHOL. OLIVEIRA, C. A. S. São Cristóvão, 2024.

Lung cancer is the most lethal type of cancer worldwide, accounting for about 18% of deaths caused by the disease and ranking as the second most common cancer globally. Chemotherapy is a primary treatment in advanced stages of lung cancer; however, the drugs used may not be effective in severe cases and can have various adverse effects. Lapachol is a natural compound found in various plant species, showing cytotoxic effects on different tumor cell lines and holding great potential in treating the disease. Therefore, Lapachol has been used as an excellent source for creating synthetic derivatives to enhance its cytotoxic effects. In this study, we aimed to evaluate the cytotoxic activity of synthetic lapachol derivatives on lung carcinoma (A549), melanoma (B16F10), and glioma (C6) cell lines. Six lapachol derivatives were tested for their inhibitory capacity using the Sulforhodamine B assay. Compounds 2, 4, 5, and 6 showed high inhibition in at least two tested cell lines, while compound 3 showed low inhibition. Compound 1 exhibited over 90% inhibition in all three studied cell lines and was selected for IC₅₀ evaluation. Compound 1 demonstrated IC₅₀ below 9.2 μ M in all three tumor cell lines, indicating excellent antitumor effects. A549 cell line was chosen for further testing with compound 1 due to the relevance of lung cancer. Hemolysis assay on human erythrocytes suggested that compound 1 is non-toxic to healthy cells, as it did not cause hemolysis at any tested concentrations. Clonogenic assay showed a significant reduction in the ability of A549 cells to form clones at all tested concentrations of compound 1, indicating inhibition of metastatic effects. Compound 1 also affected cell migration, with higher concentrations inhibiting cell migration 48 hours post-treatment. Additionally, DAPI and Phalloidin FITC staining revealed morphological changes indicative of cell death, such as reduced cytoplasmic material and altered nuclear shape, suggesting apoptosis. Annexin V and propidium iodide staining indicated a percentage of positive cells for apoptosis. The results suggest that compound 1 may have antitumor and antimetastatic effects, inducing morphological changes characteristic of apoptosis in A549 cells.

Keywords: lung adenocarcinoma; naphthoquinone; cell death; cytotoxicity.

RESUMO PARA COMUNIDADE

AVALIAÇÃO DO POTENCIAL ANTITUMORAL *IN VITRO* DE DERIVADOS GLICOSÍDICOS DE LAPACHOL. OLIVEIRA, C. A. S. São Cristóvão, 2024.

O câncer de pulmão é o tipo mais perigoso de câncer no mundo, sendo responsável por cerca de 18% das mortes causadas por essa doença, e lidera a segunda posição de maior incidência no mundo. A quimioterapia é um dos principais tratamentos nos estágios mais avançados do câncer, embora os medicamentos utilizados não sejam eficazes contra alguns tipos mais graves e apresentem diversos efeitos adversos. O lapachol é um derivado de planta que possui efeito citotóxico em diferentes linhagens tumorais, sendo uma excelente fonte para a criação de derivados sintéticos. Neste contexto, o objetivo desse projeto é avaliar a atividade citotóxica de derivados sintéticos de lapachol em linhagens de células tumorais de carcinoma de pulmão (A549), melanoma (B16F10) e glioma (C6). Seis compostos derivados do lapachol foram testados quanto a sua capacidade inibitória nas linhagens tumorais através do ensaio de Sulforrodamina B. O composto 1 apresentou um grau de inibição maior que 90% nas três linhagens estudadas e foi selecionado para avaliação da CI_{50} . O composto 1 apresentou CI_{50} abaixo de $9,2 \mu\text{M}$ nas três linhagens tumorais, sendo considerado um ótimo efeito antitumoral. A linhagem A549 foi selecionada para os próximos ensaios no tratamento com o composto 1 pela relevância do câncer. Testes em células saudáveis foram feitas pelo ensaio de hemólise, na qual não foi evidenciado toxicidade. No ensaio clonogênico observamos uma redução significativa na capacidade de formação de clones das células de adenocarcinoma de pulmão em todas as concentrações testadas do composto 1. O composto 1 também apresentou efeito na migração celular, onde se observou que as maiores concentrações inibiram a migração celular, 48 horas após o tratamento. Além disso, foi feito o ensaio de marcação das células com DAPI e Faloidina FITC e foram observadas alterações morfológicas de morte celular como redução do material citoplasmático e alteração na forma nuclear. Em conjunto, os resultados mostram que o composto 1 possui um efeito citotóxico em diferentes linhagens tumorais e tem um efeito na linhagem A549 inibindo a formação de clones e a migração celular, como também induz a morte celular.

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

μL	Microlitro
μg	Micrograma
μM	Micromolar
mM	Milimolar
A549	Human Lung Carcinoma Epithelial cell line
ANOVA	Análise de variância
B16-F10	Melanoma cell line
Bax	Proteína pró-apoptótica
C6	Glioma cell line
CAM	Membrana corioalantóide de embrião de galinha
CI_{50}	Concentração inibitória para 50% das células
CPCNP	Câncer de células não pequenas
CPPC	Câncer de células pequenas
DAPI	4',6-Diamidine-2-Phenylindole Dihydrochloride
DMEM	Dulbecco's Modified Eagle Medium
DMSO	Dimetilsulfóxido
DNA	Ácido desoxirribonucleico
DOXO	Doxorrubicina
EDTA	Ácido etilenodiamino tetra-acético
FITC	Isotiocianato de Fluoresceína (Fluorescein isothiocyanate)
GI	Grau de inibição
GI_{50}	Grau de inibição para 50% das células
IDH	Índice de Desenvolvimento Humano
LoVo	câncer de cólon
PBS	Tampão Fosfato Salina (Phosphate buffered saline)
PC-3	Câncer de próstata
PI	Iodeto de Propídio (Propidium Iodide)
SFB	Soro fetal bovino
SRMEL-28	Melanoma
TA	Temperatura ambiente
TNF	Fator de necrose tumoral

U373

Glioblastoma

LISTA DE TABELAS

TABELA 1. LINHAGENS DE CÉLULAS UTILIZADAS NOS EXPERIMENTOS	23
TABELA 2. PORCENTAGEM DO GRAU DE INIBIÇÃO CELULAR NAS LINHAGENS B16-F10, C6 E A549	29
TABELA 3. VALORES DE CI50 DETERMINADOS PARA O COMPOSTO 1, LAPACHOL E DOXORRUBICINA.	30

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

FIGURA 1. CARACTERÍSTICAS DO CÂNCER.....	11
FIGURA 2. 10 TIPOS MAIS COMUNS DE CÂNCER EM HOMENS E MULHERES NO BRASIL.	14
FIGURA 3. ESTRUTURAS QUÍMICAS DO LAPACHOL E SEIS DERIVADOS SINTÉTICOS.	22
FIGURA 4. GRAU DE INIBIÇÃO DAS LINHAGENS DE CÉLULAS A549, B16F10 E C6.	30
FIGURA 5. AVALIAÇÃO DO PERCENTUAL DE HEMÓLISE EM ERITRÓCITOS HUMANO.	32
FIGURA 6. EFEITO INIBITÓRIO DO COMPOSTO 1 NA FORMAÇÃO DE COLÔNIAS DE CÉLULAS A549.	33
FIGURA 7. EFEITO DO COMPOSTO 1 NA MIGRAÇÃO DE CÉLULAS A549.	34
FIGURA 8. EFEITO DO COMPOSTO 1 NA MORFOLOGIA DO CITOESQUELETO E NÚCLEO DA LINHAGEM CELULAR A549.	35
FIGURA 9. PORCENTAGEM DE CÉLULAS A549 EM APOPTOSE E NECROSE APÓS TRATAMENTO COM COMPOSTO 1.	37

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	9
2. REVISÃO DA LITERATURA	10
2.1. BIOLOGIA DO CÂNCER	10
2.2. EPIDEMIOLOGIA DO CÂNCER.....	13
2.3. CÂNCER DE PULMÃO	14
2.4. MORTE CELULAR	15
2.5. TRATAMENTO DO CÂNCER DE PULMÃO	16
2.6. PRODUTOS NATURAIS	18
2.7. LAPACHOL E DERIVADOS DE LAPACHOL	19
3. OBJETIVOS	21
3.1. OBJETIVO GERAL	21
3.2. OBJETIVOS ESPECÍFICOS	21
4. MATERIAIS E MÉTODOS	22
4.1. DERIVADO DE LAPACHOL	22
4.2. LINHAGENS E CULTIVO CELULAR	22
4.3. ENSAIO DE CITOTOXICIDADE POR SULFORODAMINA B	23
4.4. ENSAIO DE HEMÓLISE	24
4.5. ENSAIO DE FORMAÇÃO DE COLÔNIAS	25
4.6. ENSAIO DE MIGRAÇÃO CELULAR.....	25
4.7. ALTERAÇÕES MORFOLÓGICAS	26
4.8. DETECÇÃO DE CÉLULAS APOPTÓTICAS E NECRÓTICAS.....	27
4.9. ANÁLISE ESTATÍSTICA	28
5. RESULTADOS.....	28
5.1. COMPOSTO 1 INIBE O CRESCIMENTO CELULAR EM LINHAGENS TUMORAIS	28
5.2. COMPOSTO 1 NÃO APRESENTA TOXICIDADE EM ERITROCITOS HUMANOS	31
5.3. COMPOSTO 1 INIBE A FORMAÇÃO DE COLÔNIAS EM LINHAGENS DE A549.....	32
5.4. COMPOSTO 1 INIBE A MIGRAÇÃO CELULAR APÓS 48H DE TRATAMENTO.....	33
5.5. O COMPOSTO 1 INDUZ ALTERAÇÕES MORFOLOGICAS EM LINHAGEM A549	34
5.6. COMPOSTO 1 INDUZ APOPTOSE E NECROSE EM CÉLULAS DE A459	36
6. DISCUSSÃO	37
7. CONCLUSÃO.....	42
8. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	42
9. APÊNDICE	51

1. INTRODUÇÃO

O câncer é o termo utilizado para nomear um grupo de mais de 100 diferentes doenças, cuja principal característica é o crescimento desordenado de células (INCA, 2023). A transformação de uma célula normal em uma célula cancerígena é conhecida como carcinogênese, processo que envolve o acúmulo de alterações no material genético da célula. A transformação da célula pode ser desencadeada por vários fatores, como exposição a substâncias cancerígenas, como tabaco, exposição a radiação ultravioleta, predisposição genética e o processo de envelhecimento (TAKESHIMA; USHIJIMA, 2019).

O câncer representa um problema de saúde pública em constante crescimento em todo o mundo, sendo a segunda causa de morte mais comum após as doenças cardíacas. Estimativas da *International Agency for Research on Cancer* da Organização Mundial da Saúde indicam que houve cerca de 19,3 milhões de novos casos de câncer e um total de 10 milhões de mortes relacionadas à doença em todo o mundo no ano de 2020 (SUNG *et al.*, 2021). No Brasil, são esperados para o período de 2023 a 2025 a ocorrência de 704 mil casos novos de câncer. O câncer de pele não melanoma é previsto como o mais comum, com 220 mil casos novos (31,3%), seguido pelo câncer de mama, com 74 mil casos (10,5%); câncer de próstata, com 72 mil casos (10,2%); câncer de cólon e reto, com 46 mil casos (6,5%); câncer de pulmão, com 32 mil casos (4,6%); e câncer de estômago, com 21 mil casos novos (3,1%) (INCA, 2023).

Dentre os tipos de câncer, o câncer de pulmão é a principal causa de morte em todo o mundo. O principal fator de risco associado ao surgimento do câncer de pulmão é o tabagismo, que está relacionado de 80% a 90% de todos os casos diagnosticados (FERLAY *et al.*, 2019; SCHABATH; COTE, 2019). No Brasil, o câncer de pulmão tem os maiores índices de mortalidade com 15.987 óbitos em homens e 12.977 óbitos em mulheres registrados em 2021 (INCA, 2023). A doença é geralmente descoberta tardiamente, uma vez que, os sintomas iniciais são inespecíficos (MIRANDA-FILHO *et al.*, 2021). Assim, após o diagnóstico, apenas 50% dos pacientes sobrevivem no primeiro ano e de 10 a 20% após o quinto ano (ZAPPA; MOUSA, 2016).

Diante das elevadas taxas de incidência e prevalência do câncer, bem como da heterogeneidade da doença e da resistência das células tumorais aos tratamentos convencionais, torna-se evidente a importância de buscar novas moléculas bioativas

com potencial atividade antitumoral (SUNG *et al.*, 2019; WILD *et al.*, 2019). Nesse contexto, os produtos naturais desempenham um papel fundamental como fonte de moléculas biologicamente ativas, uma vez que cerca de 40% dos medicamentos aprovados para comercialização têm origem natural. No que se refere ao câncer, 64,9% dos medicamentos antineoplásicos existentes são oriundos de fontes naturais (NEWMAN; CRAGG, 2020).

O lapachol é uma naftoquinona natural que pode ser extraída de diversas espécies de árvores, incluindo *Tabebuia avellanedae*, *Tabebuia impetiginosa* e *Handroanthus impetiginosus*, conhecidas popularmente como ipês. O lapachol é um composto químico que tem despertado interesse na área da saúde devido às suas propriedades medicinais. Já foi demonstrado que o lapachol possui propriedades antitumorais, antileishmaniais, anti-inflamatórias, antimaláricas, antissépticas, bactericidas, entre outras (HUSSAIN *et al.*, 2007).

Os derivados de lapachol são obtidos a partir de modificações estruturais na molécula de lapachol. Essas modificações estruturais nos derivados de lapachol visam melhorar sua atividade antitumoral, seletividade e propriedades farmacocinéticas em relação ao lapachol de origem (EPIFANO *et al.*, 2014; HUSSAIN; GREEN, 2017). Eyong *et al.* (2020) mostraram que derivados indanes de lapachol possuem alta citotoxicidade em linhagens de BE(2)-C, Kelly, SKNSH e, CHLA-90 (neuroblastomas), A549 (adenocarcinoma pulmonar), SKMEL-28 (melanoma) e U373 (glioblastoma). Derivados de lapachol também foram capazes de induzir morte por apoptose por indução de espécies reativas de oxigênio em linhagem de HL-60 (leucemia). Assim, considerando o potencial antitumoral desses derivados, é importante investigar o efeito de novos compostos derivados de lapachol no câncer.

2. REVISÃO DA LITERATURA

2.1. BIOLOGIA DO CÂNCER

O câncer pode ser definido como um grupo de doença causada pelo crescimento desordenado e acelerado de um grupo de células consideradas anormais, formando um nódulo ou tumor (GRAHAM; SOTTORIVA, 2017). Segundo Hanahan (2022), existem características que são necessárias para o estabelecimento

do câncer como: resistência a sinais antiproliferativos; evasão do sistema imune; proliferação ilimitada, invasão tecidual e metástase; angiogênese; instabilidade genética e mutação; resistência a morte celular; reprogramação do metabolismo energético e autossuficiência de sinais de crescimento (Figura 1). As células normais respondem a sinais de crescimento e divisão, equilibrando a taxa de proliferação. Esses sinais são transmitidos através de vias de sinalização celular complexas. No câncer, uma das suas principais características é a proliferação celular descontrolada, perdendo a capacidade de regular seu crescimento (DEBERARDINIS *et al.*, 2008).

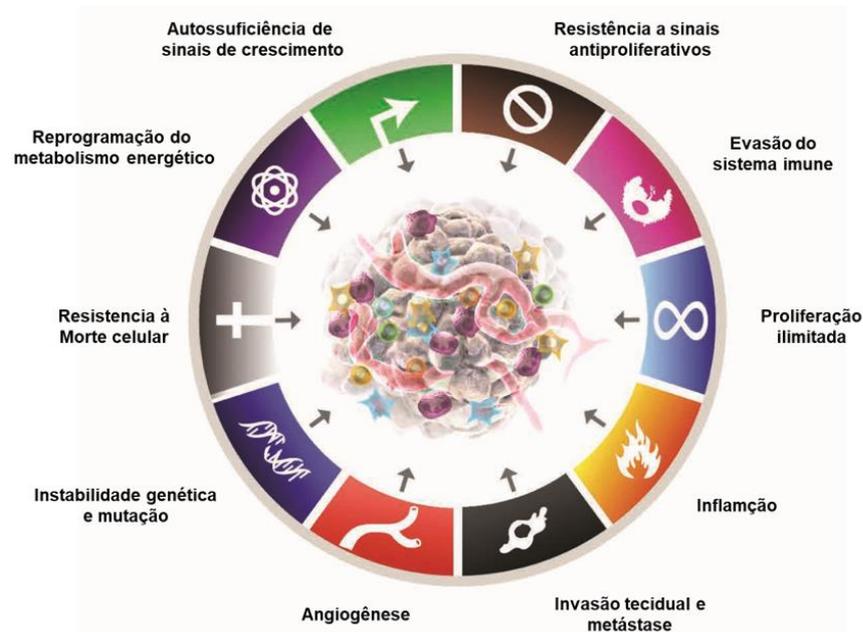


Figura 1. Características do câncer. Adaptado de HANAHAN, 2022

Durante o desenvolvimento do câncer, as células podem adquirir mutações em genes que controlam o ciclo celular. Por exemplo, o gene supressor de tumor TP53, conhecido como "guardião do genoma", é frequentemente inativado em vários tipos diferentes de câncer. O gene TP53 codifica a proteína p53, que atua como um regulador crucial do ciclo celular, interrompendo o ciclo e induzindo a apoptose em resposta a danos no DNA ou outros sinais de estresse (JOYCE; RAYI; KASI, 2018). A mutação da proteína p53 pode levar a um crescimento e divisão celular descontrolados (CHEN; WANG; EL-DEIRY, 2010).

Da mesma forma, mutações no gene RB1, que codifica a proteína retinoblastoma, podem resultar na perda da função do RB1 e na progressão não controlada do ciclo celular (KNUDSEN *et al.*, 2019). Além da desativação dos genes supressores de tumores, as células cancerígenas também podem aumentar a produção de proteínas que promovem a progressão do ciclo celular, como ciclinas ou quinases dependentes de ciclina (CDKs), ou reduzir a produção de proteínas que inibem a progressão do ciclo celular (GOEL *et al.*, 2018).

As alterações genéticas permitem que as células cancerígenas continuem se dividindo e crescendo mesmo na ausência de sinais normais de crescimento ou na presença de sinais inibitórios de crescimento. Além disso, a inativação de genes supressores de tumor e a ativação de genes oncogenes, como o gene RAS, podem levar a uma ativação constante dos sinais de crescimento e à inibição dos sinais de inibição celular, resultando em uma proliferação celular descontrolada (LANFREDINI; THAPA; O'NEILL, 2019).

Um aspecto importante das células tumorais é a resistência à morte celular por apoptose (MOHAMMAD *et al.*, 2015). Uma das estratégias utilizadas pelas células cancerígenas é a inativação de genes envolvidos na via de sinalização da apoptose (IGNEY; KRAMMER, 2002). Além disso, as células cancerígenas podem adquirir mutações que ativam vias de sobrevivência celular, como a via PI3K/AKT/mTOR. Essa via desempenha um papel importante na promoção da sobrevivência e proliferação celular, inibindo a apoptose e estimulando a síntese de proteínas e o crescimento celular (DONG *et al.*, 2021).

Um outro fator de progressão do câncer é a metástase onde a célula tumoral sai do local de origem entra na corrente sanguínea, escapa do sistema imune e se espalha para outras partes do corpo, sendo a principal causa de morte por câncer (FARES *et al.*, 2020). Na migração celular os filamentos de actina localizados no citoplasma são essenciais, pois estão envolvidos na formação e remodelação de protrusões celulares, como lamelipódios e filopódios (YAMAGUCHI; CONDEELIS, 2007).

Os lamelipódios são extensões planas e largas que se formam na frente da célula. Eles consistem em uma rede de filamentos de actina ramificados, mediada pela ativação da Arp2/3, que promove o crescimento da rede de actina e a protrusão do lamelipódio. Essa protrusão impulsiona o deslocamento da célula cancerígena através da matriz extracelular, permitindo a invasão do tecido adjacente

(YAMAGUCHI; CONDEELIS, 2007). Os filopódios, por outro lado, são extensões finas e alongadas que se projetam da célula. Eles são formados pela polimerização linear dos filamentos de actina, ancorados à membrana celular por proteínas como a fascina, responsável pela fase inicial da disseminação das células cancerígenas. Regulada em vários cânceres agressivos e metastáticos de origem epitelial. (OLSON; SAHAI, 2009).

2.2. EPIDEMIOLOGIA DO CÂNCER

De acordo com dados da Agência Internacional de Pesquisa em Câncer e da Organização Mundial da Saúde, aproximadamente 19,3 milhões de novos casos de câncer foram registrados em todo o mundo durante o ano de 2020, resultando em um total de 10 milhões de óbitos relacionados à doença (SUNG *et al.*, 2021). Os tipos de câncer variam entre homens e mulheres, sendo que homens apresentaram uma taxa de incidência 19% maior do que mulheres, especialmente em países com IDH baixo, onde a taxa de incidência chega a ser cinco vezes maior (SUNG *et al.*, 2021). O câncer de pulmão é o mais comum entre os homens, representando 1,4 milhão de casos novos (14,3%), seguido pelos cânceres de próstata com 1,4 milhão (14,1%); cólon e reto com 1 milhão (10,6%); pele não melanoma, com 722 mil (7,2%); e estômago com 719 mil (7,1%) novos casos no mundo (SUNG *et al.*, 2021).

No Brasil, está prevista a ocorrência de 704 mil casos novos de câncer no período de 2023 a 2025. O câncer de pele não melanoma é o mais comum, com 220 mil casos novos (31,3%), seguido pelo câncer de mama, com 74 mil casos (10,5%); câncer de próstata, com 72 mil casos (10,2%); câncer de cólon e reto, com 46 mil casos (6,5%); câncer de pulmão, com 32 mil casos (4,6%); e câncer de estômago, com 21 mil casos novos (3,1%) (INCA, 2023).

Entre os homens, os tipos de câncer mais comuns são pele não melanoma com 102 mil casos novos (29,9%); próstata com 72 mil casos (21,0%); cólon e reto com 22 mil casos (6,4%); pulmão com 18 mil casos (5,3%); estômago com 13 mil casos (3,9%); e cavidade oral com 11 mil casos (3,2%). Já nas mulheres, os cânceres de pele não melanoma com 118 mil casos (32,7%); mama com 74 mil casos (20,3%); cólon e reto com 24 mil casos (6,5%); colo do útero com 17 mil casos (4,7%); pulmão com 15 mil casos (4,0%); e tireoide com 14 mil casos (3,9%) (Figura 2) (INCA, 2023).

Localização Primária	Casos	%			Localização Primária	Casos	%
Próstata	71.730	30,0%	Homens	Mulheres	Mama feminina	73.610	30,1%
Cólon e reto	21.970	9,2%			Cólon e reto	23.660	9,7%
Traqueia, brônquio e pulmão	18.020	7,5%			Colo do útero	17.010	7,0%
Estômago	13.340	5,6%			Traqueia, brônquio e pulmão	14.540	6,0%
Cavidade oral	10.900	4,6%			Glândula tireoide	14.160	5,8%
Esôfago	8.200	3,4%			Estômago	8.140	3,3%
Bexiga	7.870	3,3%			Corpo do útero	7.840	3,2%
Laringe	6.570	2,7%			Ovário	7.310	3,0%
Linfoma não Hodgkin	6.420	2,7%			Pâncreas	5.690	2,3%
Fígado	6.390	2,7%			Linfoma não Hodgkin	5.620	2,3%

Figura 2. 10 tipos mais comuns de câncer em homens e mulheres no Brasil. Fonte: INCA, 2023

Essa projeção reflete o crescimento e envelhecimento populacional, exacerbado por aumento de prevalência dos fatores de risco. É preciso se preparar para o impacto desta doença nos diversos sistemas de saúde, com adoção de medidas de prevenção, diagnóstico precoce e alocação de recurso para tratamento adequado, que ano após ano, assume maior complexidade e custo. É também responsabilidade global equalizar as diferenças que existem no acesso à saúde e nos desfechos desta doença entre as diversas regiões do mundo (MINISTÉRIO DA SAUDE, 2020).

2.3. CÂNCER DE PULMÃO

O câncer de pulmão é uma das formas mais comuns de câncer no Brasil e no mundo. Este câncer foi a principal causa de morte por câncer em 2020, representando cerca de 1 a cada 10 (11,4%) cânceres diagnosticados e 1 a cada 5 (18,0%) óbitos no mundo. Houve cerca de 2,2 milhões de casos novos e 1,8 milhão de óbitos por câncer de pulmão em 2020 (INCA, 2023). Além disso, a sobrevivência dos pacientes com câncer de pulmão após 5 anos do diagnóstico é de apenas 10% a 20% na maioria dos países para aqueles diagnosticados entre 2010 e 2014 (SUNG *et al.*, 2021). No Brasil, estima-se que tenham aproximadamente 32.560 novos casos de câncer de pulmão a cada ano no triênio de 2023 a 2025, resultando em um risco estimado de 15,06 casos por 100 mil habitantes. Apenas no ano de 2020 foram contabilizados 28.618 mil óbitos por câncer de pulmão (INCA, 2023).

O câncer de pulmão é classificado em dois grupos principais: Câncer de Pulmão de Células não Pequenas (CPCNP) e Câncer de Pulmão de Células Pequenas (CPCP). Dentre os CPCNP, o adenocarcinoma pulmonar se destaca por

ser o tipo de câncer de pulmão mais comum, representando 60% dos cânceres de pulmão (FRIEDLAENDER *et al.*, 2019). Este tipo de câncer surge nas células glandulares que revestem os alvéolos e frequentemente ocorre nas áreas periféricas dos pulmões (DING *et al.*, 2008). Assim como outros tipos de câncer de pulmão, o adenocarcinoma é altamente metastático e muitas vezes se espalha para os linfonodos e outras partes do corpo antes de ser diagnosticado, o que pode tornar o tratamento mais desafiador (RIIHIMÄKI *et al.*, 2014).

A principal causa do câncer de pulmão está relacionada com o tabagismo, já que 80% dos casos estão associados com o uso (HERBST; MORGENSZTERN; BOSHOFF, 2018). Embora o tabagismo seja um fator de risco significativo para o desenvolvimento do câncer de pulmão, o adenocarcinoma é observado com frequência em não fumantes (FRIEDLAENDER *et al.*, 2019). Além do tabagismo, a exposição a substâncias químicas ambiental e laboral, poluição do ar e histórico familiar de câncer de pulmão, podem aumentar o risco de desenvolver adenocarcinoma pulmonar (NICHOLS; SAUNDERS; KNOLLMANN, 2012). Os sintomas do adenocarcinoma pulmonar podem incluir tosse persistente, falta de ar, chiado no peito, perda de peso, fadiga e presença de sangue no escarro (POLANSKI *et al.*, 2016).

Os carcinomas pulmonares tendem invadir órgãos como o cérebro, os ossos, o fígado, as glândulas adrenais e os linfonodos extratorácicos (TAMURA *et al.*, 2015). O estágio avançado do câncer de pulmão, frequentemente, apresenta sua forma metastática através de vasos linfáticos e sanguíneos (POPPER, 2016).

2.4. MORTE CELULAR

A morte celular é um processo biológico essencial para o equilíbrio e a manutenção da homeostase em organismos multicelulares (NIRMALA; LOPUS, 2020). Necrose e apoptose são os tipos de morte celular mais estudados e bem caracterizados quanto às alterações morfológicas e sinalização celular (SATO *et al.*, 2020).

A necrose é um tipo de morte celular não programada e desordenada que ocorre em resposta a danos extremos ou estresse físico, químico ou biológico no ambiente celular (D'ARCY, 2019). Na necrose ocorre um rompimento da membrana celular que resulta no extravazamento do conteúdo do citoplasma para o ambiente ao

redor desencadeando uma resposta inflamatória, uma vez que as substâncias liberadas, como enzimas e componentes celulares, são reconhecidas pelo sistema imunológico como sinais de lesão (GOLSTEIN; KROEMER, 2007).

Na apoptose, a morte celular ocorre de forma ordenada e controlada, sem causar inflamação ou danos ao ambiente ao redor (NIRMALA; LOPUS, 2020). Existem duas principais vias envolvidas na apoptose: a via intrínseca e a via extrínseca. Na via intrínseca, a ativação ocorre dentro da célula em resposta a estímulos internos, como danos no DNA ou estresse celular. Essa via é dependente da regulação de proteínas pró-apoptóticas e antiapoptóticas da família Bcl-2, localizadas na membrana mitocondrial (SEGAWA; NAGATA, 2015). Estímulos ativam proteínas pró-apoptóticas como Bax e Bak, que permeabilizam a membrana mitocondrial, liberando citocromo c e outras moléculas pró-apoptóticas no citoplasma. Isso inicia uma cascata ativadora de caspases 3, 7, 8 e 9, enzimas que degradam proteínas celulares de forma controlada, culminando na fragmentação do DNA e formação de corpos apoptóticos (RIEDL; SHI, 2004).

Na via extrínseca, a ativação ocorre por estímulos externos, geralmente pela interação de ligantes a receptores específicos na superfície celular. Ligantes como o Fator de Necrose Tumoral (TNF) e o FasLigante (FasL) se ligam a receptores correspondentes (TNFR e Fas/CD95, respectivamente) na célula (SEGAWA; NAGATA, 2015). Isso recruta proteínas adaptadoras que ativam caspases iniciadoras, como a caspase-8. As caspases iniciadoras ativam caspases executoras, levando à execução da apoptose e subsequente fragmentação do DNA (HOFMANN, 2020).

2.5. TRATAMENTO DO CÂNCER DE PULMÃO

Atualmente, existem alguns tipos de tratamento mais conhecidos e utilizados para o câncer como a cirurgia, a radioterapia, a quimioterapia, a hormonioterapia, a imunoterapia, a terapia-alvo e o transplante de medula óssea (NCI, 2022). Os tratamentos para o câncer são realizados com o objetivo de controlar a doença de forma a assegurar ganhos de sobrevida e de qualidade de vida, sendo que, conforme a medicina avança, surgem novas terapias (NEWMAN; CRAGG, 2018).

A cirurgia é o procedimento utilizado para retirada da massa tumoral que se desenvolve no organismo e pode ser indicada para tumores que não tenham sofrido metástase (MINISTÉRIO DA SAUDE, 2020). O câncer em sua fase inicial pode ser

controlado ou curado com o tratamento cirúrgico, ressaltando que a abordagem múltipla do tratamento, associando diversas modalidades terapêuticas geram melhores resultados em termos de cura, sobrevida e qualidade de vida (INCA, 2023).

A radioterapia é realizada através do uso de radiação ionizante que danifica o material genético das células tornando-as incapazes de se multiplicar, podendo ser realizado de forma única ou em associação com a quimioterapia (SAWANDA; DIAS; ZAGO, 2006). A radiação elimina ou diminui o tamanho do tumor, reduz hemorragias, dores e outros sintomas, contribuindo para melhoria da qualidade de vida (INCA, 2023).

A quimioterapia envolve o uso de medicamentos, chamados quimioterápicos ou agentes citotóxicos, para combater e controlar as células cancerosas. Estes medicamentos funcionam atingindo células que estão se dividindo ativamente (NYGREN, 2001). Na quimioterapia, devido à inespecificidade dos medicamentos usados, uma alta porcentagem de células saudáveis são destruídas junto com as células cancerosas causando efeitos adversos, como transtornos hormonais, queda de cabelo, náusea e vômitos (FERREIRA; FRANCO, 2017).

No contexto do câncer de pulmão, o tratamento varia de acordo com o estágio da doença e a avaliação individual do paciente. Nos estágios iniciais, a cirurgia é uma opção recomendada e quando combinada com a quimioterapia, pode aumentar significativamente as perspectivas de sobrevivência do paciente (COLLINS *et al.*, 2007). Nos estágios mais avançados ou na presença de metástase, a quimioterapia é o tratamento mais utilizado. Entre os quimioterápicos comumente empregados estão a doxorrubicina, gencitabina, vinorelbina e irinotecano. Recentemente, o uso de imunoterápicos se tornou mais comum, e tem sido utilizado de forma intensiva no tratamento do câncer de pulmão, apresentando resultados efetivos nos estágios mais avançados (LIU *et al.*, 2023; RECK *et al.*, 2013). Apesar da efetividade dos tratamentos, o tempo de sobrevida do paciente após o diagnóstico ainda é baixo, o que reforça a busca de compostos que possam tratar de forma ainda mais efetiva os câncer (CHANG, 2011; LIU *et al.*, 2023).

2.6. PRODUTOS NATURAIS

Os produtos naturais são produzidos por organismos vivos, como plantas, insetos, animais, organismos aquáticos e micróbios. Eles apresentam propriedades farmacológicas ou biológicas para uma variedade de condições patológicas como o câncer, tendo um papel importante no desenvolvimento de novas drogas (AGARWAL *et al.*, 2020). Mais de 60% dos compostos anticâncer usados hoje em dia no tratamento de pacientes são obtidos de derivados de plantas ou podem ser produtos químicos semissintéticos (NEWMAN; CRAGG, 2020). São exemplos as drogas antitumorais derivadas de produtos naturais, doxorrubicina, taxanos, vimblastina, vincristina e análogos da podofilotoxina. (DEMAIN; VAISHNAV, 2011; NAEEM *et al.*, 2022; NEWMAN; CRAGG, 2016).

Compostos proveniente de fontes naturais podem servir como protótipo para o desenvolvimento de uma nova geração de compostos com melhores propriedades farmacocinéticas, tais como, aumento da eficácia, estabilidade e diminuição dos efeitos colaterais (OTTONI *et al.*, 2020). A biodiversidade vegetal representa uma das mais importantes fontes de compostos biologicamente ativos, e os bioconstituintes de plantas podem ser utilizados na clínica médica para o tratamento de diversas doenças. Os compostos ativos podem ainda ser isolados e utilizados como precursores no desenvolvimento de novas drogas sintéticas e semissintéticas (NAEEM *et al.*, 2022).

Para o tratamento do câncer podemos destacar vários compostos baseados na estrutura aromática de origem da quinona como as naftoquinonas, antraquinonas, benzoquinonas e fenantraquinonas (SILVA; FERREIRA; SOUZA, 2003). As quinonas são um grupo de produtos naturais que possui atividade biológica em doenças tais como câncer de pulmão, asma e inflamação alérgica (SOUZA; LOPES; ANDRADE, 2016).

As naftoquinonas são utilizadas como agentes quimioterápicos eficazes no tratamento do câncer sendo encontradas em plantas ou sintetizadas em laboratório (SOUZA; LOPES; ANDRADE, 2016). Sua estrutura química é caracterizada por dois anéis naftalenos ligados por um grupo carbonila e demonstram propriedades anticancerígenas significativas, sendo alvo de extensa pesquisa (PEREYRA *et al.*, 2019). A doxorrubicina é uma naftoquinona que pertence à classe das antraciclina, amplamente utilizada no tratamento do câncer. Esse fármaco é um dos medicamentos com eficácia comprovada para diversos tipos de câncer, incluindo

leucemia, linfoma, câncer de mama, câncer de pulmão e sarcoma (SCHABATH; COTE, 2019). A doxorubicina age inibindo a replicação do DNA nas células cancerígenas, impedindo sua proliferação descontrolada e induzindo a morte celular (CARVALHO *et al.*, 2009).

Outra naftoquinona relevante é a mitomicina C, utilizada principalmente no tratamento de cânceres gastrointestinais como o câncer de cólon e o câncer de estômago. A mitomicina C exerce sua atividade anticancerígena por meio da formação de ligações cruzadas no DNA das células, o que leva à inibição de sua divisão celular e, conseqüentemente, à redução do crescimento do tumor (SHARAF *et al.*, 2018).

Embora as naftoquinonas sejam eficazes no combate o câncer, é importante destacar que essas substâncias também podem ter efeitos adversos significativos. Em doses elevadas ou tratamentos prolongados a toxicidade cardíaca é um dos principais efeitos adversos. Por esse motivo, é essencial a busca de novos compostos com atividade antitumoral (CARVALHO *et al.*, 2009; PEREYRA *et al.*, 2019).

2.7. LAPACHOL E DERIVADOS DE LAPACHOL

O lapachol é uma naftoquinona natural que pode ser extraída de diversas espécies de árvores, incluindo *Tabebuia avellanedae*, *Tabebuia impetiginosa* e *Handroanthus impetiginosus*, conhecidas popularmente como ipês. É um composto químico que tem despertado interesse na área da saúde devido às suas propriedades medicinais (HUSSAIN; GREEN, 2017).

O lapachol demonstrou diversas atividades biológicas e propriedades terapêuticas potenciais. Entre elas, destacam-se as propriedades antitumorais, anti-inflamatórias, antimicrobianas e antioxidantes (HUSSAIN *et al.*, 2007). Estudos *in vitro* sugerem que o lapachol possui efeitos inibitórios sobre o crescimento de células cancerígenas e pode induzir a apoptose, como foi demonstrado em células de glioma (C6) no qual o composto foi capaz de inibir topoisomerasas I e II (XU *et al.*, 2016). O lapachol tem a capacidade de inibir a metástase em linhagem de HeLa utilizando o modelo tumoral CAM (BALASSIANO *et al.*, 2005). Além disso, o lapachol é capaz de inibir o crescimento celular em linhagens de U373 e Hs683 (glioblastoma), A549 (adenocarcinoma pulmonar), PC-3 (câncer de próstata), SKMEL-28 (melanoma) e LoVo (câncer de cólon) (FIORITO *et al.*, 2014).

Os derivados de lapachol têm despertado interesse no campo do tratamento do câncer devido as suas potenciais propriedades terapêuticas. Esses compostos são obtidos a partir de modificações estruturais na molécula de lapachol, que é uma naftoquinona natural encontrada em diversas espécies de árvores. Essas modificações estruturais nos derivados de lapachol visam melhorar sua atividade antitumoral, seletividade e propriedades farmacocinéticas em relação ao lapachol original (HUSSAIN; GREEN, 2017). Por meio de síntese química ou processos de biotransformação, é possível obter derivados com características específicas, como maior potência e menor toxicidade (JANOWSKA; PANETH; WUJEC, 2020).

Os estudos com derivados de lapachol no tratamento do câncer têm demonstrado resultados promissores pois podem interferir na proliferação celular, induzindo parada do ciclo celular e inibindo a replicação do DNA, como foi demonstrado por derivados amina de lapachol em linhagens de tumor de Ehrlich e K562 (leucemia) (ESTEVES-SOUZA *et al.*, 2007). Outro aspecto relevante é a seletividade dos derivados de lapachol para células cancerígenas. Estudos têm demonstrado que esses compostos apresentam maior toxicidade seletiva para células tumorais em comparação com células normais, o que é um aspecto importante para minimizar os efeitos colaterais no tratamento do câncer (HUSSAIN *et al.*, 2007).

Os valores de CI_{50} para derivados glicosilados de lapachol, LA4A (5,7 μM) e LA4C (5,3 μM) foram menores do que os observados para o lapachol (25 μM). Tanto LA4A quanto LA4C induziram características típicas de apoptose, incluindo a exposição de fosfatidilserina na superfície celular, a condensação da cromatina, a fragmentação do DNA e a diminuição do potencial transmembranar mitocondrial ($\Delta\Psi\text{m}$) antes da lise celular (MARQUES *et al.*, 2020).

Otoni *et al.* (2020) e Franca *et al.* (2021) mostraram que derivados glicosídicos de lausona, derivado análogo do lapachol, possuem um efeito mais citotóxico em diferentes linhagens tumorais quando comparado a lausona. Derivados de lausona como O-propargil lawsona, apresentaram alto efeito citotóxico e induziram apoptose em células A549 (DOS SANTOS *et al.*, 2023).

3. OBJETIVOS

3.1. OBJETIVO GERAL

Avaliar a atividade citotóxica de derivados de lapachol, em linhagens de células de melanoma (B16-F10), glioma (C6) e adenocarcinoma de pulmão (A549).

3.2. OBJETIVOS ESPECÍFICOS

1 - Avaliar o grau de inibição celular dos derivados de lapachol nas linhagens tumorais;

2 - Determinar a Concentração Inibitória para 50% das células (CI_{50}) do derivado de lapachol nas linhagens tumorais;

3 - Avaliar o efeito do derivado de lapachol na inibição da formação de colônias e migração das células tumorais;

4 - Avaliar as alterações morfológicas sofridas pelas células tumorais após tratamento com o derivado de lapachol;

6 - Analisar a morte celular em células tumorais após tratamento com derivado de lapachol.

4. MATERIAIS E MÉTODOS

4.1. DERIVADO DE LAPACHOL

O lapachol e os derivados de lapachol foram obtidos em parceria com Prof. Dr. Ricardo José Alves do Laboratório de Química Farmacêutica do Curso de Farmácia da Universidade Federal de Minas Gerais. Seis derivados sintéticos de lapachol (Figura 3) foram selecionados, para este trabalho. Os compostos foram preparados numa solução estoque de 100 mM em dimetilsulfóxido para serem utilizados nos experimentos *in vitro*.

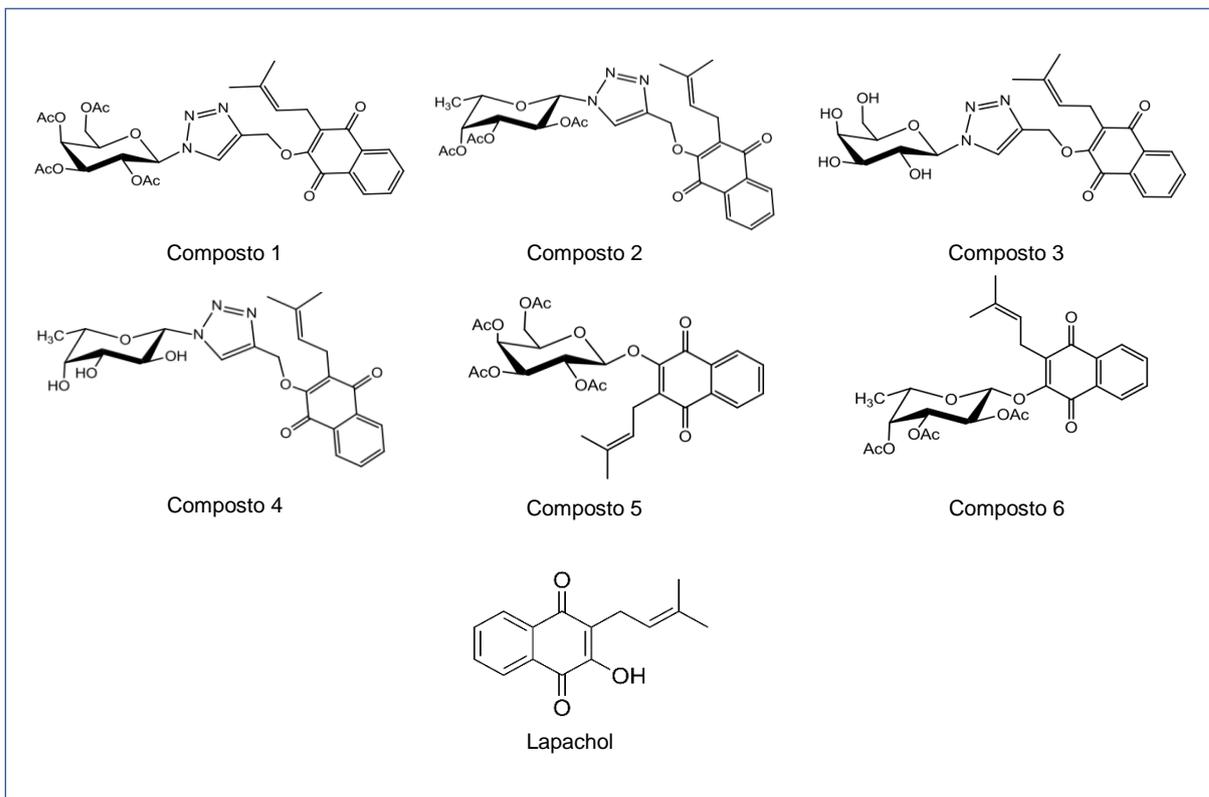


Figura 3. Estruturas químicas do lapachol e seis derivados sintéticos. Fonte: autoria própria

4.2. LINHAGENS E CULTIVO CELULAR

A citotoxicidade dos compostos foi realizada nas linhagens B16-F10 (melanoma), C6 (glioma) e A549 (adenocarcinoma de pulmão) (Tabela1). Todas as células foram obtidas do banco de células do Rio de Janeiro e mantidas no Laboratório

de Biologia e Imunologia do Câncer e Leishmania do Departamento de Morfologia da Universidade Federal de Sergipe (UFS). As linhagens foram mantidas em garrafas de cultivo com meio Dulbeccos's Modified Eagle Medium completo (DMEM) (suplementado com 10% de Soro Fetal Bovino 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. Ao obter confluência de 80%, as células foram dissociadas da garrafa por meio do tratamento com solução Tripsina-EDTA (Tripsina 0,25%; EDTA 0,53 Mm) por tempo de 2 a 5 min à 37°C. Em seguida, a solução de Tripsina-EDTA foi inativada por adição de meio completo (3:1). O meio contendo as células foi transferido para tubo Falcon® de 15 mL e centrifugado a 259xg por 10 min à 4°C. O pellet de células formado após centrifugação foi ressuscitado em meio completo e uma alíquota de 10 µL foi transferida para câmara de Neubauer para ajuste da concentração de células para subcultivo e experimentos posteriores.

Linhagem	Descrição	Origem
A549	Carcinoma de pulmão	Humano
B16F10	Melanoma	Camundongo
C6	Glioma	Rato

Tabela 1. Linhagens de células utilizadas nos experimentos. Fonte: autoria própria

4.3. ENSAIO DE CITOTOXICIDADE POR SULFORODAMINA B

As células das linhagens B16-F10, C6 e A549, foram semeadas em placas de 96 poços contendo meio completo com densidade igual a 1×10^4 células em 0,2 mL por poço. As células foram incubadas em estufa com atmosfera de 5% de CO₂ à 37°C por 24 h para aderência. Para a análise do grau de inibição foi realizado screening farmacológico em 6 derivados sintéticos do lapachol e sua molécula de origem. As células foram tratadas com os derivados de lapachol em na concentração de 25 µM por 72h. Dimetilsulfóxido 0,1% e Cloridrato de Doxorubicina 5 µg/mL foram usados como controle negativo e controle positivo de morte, respectivamente. Ao completar o tempo, o meio contendo os tratamentos, controle negativo e controle positivo de morte foram descartados e as células foram fixadas com ácido tricloroacético (30%) por uma

hora à 4°C. A placa foi lavada por 4 vezes com água destilada e deixada no ambiente para secar. Um volume final de 100 µL da solução de Sulforodamina B (SRB) 0,057% (p/v) dissolvida em ácido acético (1%) foi adicionado aos poços por 30 min em temperatura ambiente (TA). A placa foi lavada por 4 vezes com ácido acético para remoção do excesso de corante. TRIS base (10 mM; pH 10,5) foi usado para diluição do SRB por 30 min e então a placa foi lida em leitor de microplaca (Synergy H1, Biotek, VT, EUA) por espectrofotometria com comprimento de onda de 510 nm.

O SRB é um corante aniônico utilizado para avaliação da viabilidade celular com base na medição do teor de proteínas que se ligam a este eletrostaticamente (VICHAI; KIRTIKARA, 2006). Os valores de absorbância foram convertidos a porcentagem de inibição do crescimento celular a partir da fórmula:

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

A partir das porcentagens do grau de inibição, obtidas pelo screening farmacológico foi determinado valores da CI_{50} , utilizando concentrações de 0,78 a 25 µM do composto selecionado por 72h, através de regressão não-linear da curva sigmoidal log (inibidor) vs. resposta pelo programa GraphPad Prism 7 (GraphPad Software, USA). A CI_{50} é a capacidade máxima que o composto possui em inibir o crescimento celular em 50%. A linhagem A549 foi escolhida para os experimentos posteriores, pois o câncer de pulmão apresenta uma alta taxa de mortalidade e incidência no mundo.

4.4. ENSAIO DE HEMÓLISE

A atividade hemolítica do composto 1 foi testada usando eritrócitos humanos de voluntários saudáveis. Os eritrócitos foram distribuídos em placas de 96 poços (2% por poço em 0,2 ml de solução salina tamponada a 1X) e expostos a concentrações do composto 1 de 34,5, 69, 138 e 276 µM. Triton X 100 (0,1%) e DMSO (0,1%) foram utilizados como controles de hemólise positiva e negativa, respectivamente. Os eritrócitos foram mantidos sob agitação a uma temperatura de 37 °C por 1 hora. Após esse período, a placa foi centrifugada a 405 x g por 5 minutos e 0,15 mL do sobrenadante foi transferido e lido em um espectrofotômetro (Biotek - H1 Synergy)

com uma absorbância de 540 nm. Todos os valores foram convertidos para percentual de hemólise através da fórmula (KANG et al., 2009):

$$\% \text{ Hemólise} = [(T - CN) / (CP - CN)] \times 100$$

Onde:

T = teste

CN = controle negativo

CP = controle positivo

4.5. ENSAIO DE FORMAÇÃO DE COLÔNIAS

Células da linhagem A549 foram semeadas em placa de 6 poços, 3×10^2 células por poço em 2 mL de meio completo. A placa foi deixada em estufa com atmosfera de 5% CO₂ a 37°C por 24h para aderência celular. Após esse tempo as células foram expostas as concentrações correspondentes a 4,6, 9,2 e 18,4 µM do composto 1 por 72h, em estufa sob as mesmas condições descritas anteriormente. DMSO 0,1% e Cloridrato de Doxorrubicina 1,4 µM, foram usados como controle negativo e controle positivo, respectivamente. Após o tempo de tratamento os meios foram desprezados e o meio DMEM completo foi adicionado aos poços e deixados em estufa com atmosfera de 5% CO₂ a 37°C por 5 dias. Esse ensaio consiste em avaliar a viabilidade proliferativa e a capacidade de formação de colônias por uma única célula após um período de incubação (FRANKEN *et al.*, 2006). Após 10 dias, as células foram fixadas com metanol + ácido acético (3:1) por 5min, e coradas com cristal violeta 0,5% em água por 30min. Após a coloração os poços contendo células foram lavadas com água. Ao final do experimento, foram capturas imagens de cada poço com o auxílio de uma câmera e o número de colônias formadas foram determinadas com auxílio do software ImageJ®.

4.6. ENSAIO DE MIGRAÇÃO CELULAR

O efeito do composto 1 sobre a migração de células A549 foi avaliado pelo método de migração. Para a realização deste ensaio, as células foram semeadas numa densidade de 3×10^5 células por poço em placa de 12 poços e após 24h, um

risco foi feito na porção central de cada poço, removendo as células desta região com o auxílio de uma ponteira p200. Os poços foram lavados com solução fosfato-salino (PBS) 1X para remover as células que se soltaram. Neste ensaio o meio de cultura DMEM foi suplementado com soro reduzido a 2% para reduzir a proliferação a fim de avaliar somente a migração celular (GRADA *et al.*, 2017). Em seguida, as células foram expostas a concentrações correspondentes a 2,3, 4,6 e 9,2 μM do composto 1 e incubadas por 48h. DMSO 0,1% e Cloridrato de Doxorrubicina 1,4 μM foram usados, respectivamente, como controles negativo e controle positivo. Durante o período de incubação, a área do risco foi analisada com auxílio de microscópio óptico invertido (Olympus, IX81) em aumento de 40X a fim de observar o fechamento do risco. Fotos foram capturadas nos tempos 0, 24 e 48h de tratamento. A área de fechamento foi medida com auxílio do software ImageJ®, e a porcentagem de fechamento foi calculada comparando os dados dos tempos 24h e 48h com o tempo zero, utilizando a fórmula previamente descrita (YARROW *et al.*, 2004).

$$\% \text{Porcentagem de fechamento} = \frac{(A_{t=0h} - A_{t=h})}{A_{t=h}} \times 100$$

Onde:

$A_{t=0h}$ - área da ferida medida imediatamente após realizar o arranhão (tempo zero).

$A_{t=h}$ - área da ferida medida 24 ou 48 horas após o arranhão ser realizado.

4.7. ALTERAÇÕES MORFOLÓGICAS

As células da linhagem tumoral A549 foram semeadas em placas de 24 poços numa densidade de 2×10^4 células por poço em 1 mL de meio completo. As células foram deixadas em estufa com atmosfera de 5% de CO_2 à 37°C por 24 h para aderência. Ao completar esse tempo, as células foram expostas ao composto 1, nas concentrações de 4,6, 9,2 e 18,4 μM por 24h. DMSO 0,1% e Cloridrato de Doxorrubicina 1,4 μM foram usados como controles negativo e positivo respectivamente. O meio contendo os tratamentos e os controles negativo e positivo foram descartados e as células foram lavadas com solução PBS (1x) por três vezes e fixadas com formol 4% por 15min. Após fixação foi realizada a lavagem dos poços com PBS. A permeabilização celular foi realizada com solução Triton™ X-100 a 0,2% em PBS por 15 min. Em seguida, foi realizada a lavagem dos poços com PBS. O

citoesqueleto das células foi corado com Faloidina conjugada ao fluorocromo FITC (25 µg/mL) por 30 min no escuro, e em seguida os poços foram lavados com PBS. O núcleo celular foi contra corado com DAPI (1 µg/mL) por 10 min, no escuro e adicionado PBS aos poços. As leituras foram realizadas utilizando microscópio de fluorescência (Zeiss, USA) onde foram avaliadas alterações nos componentes citoesqueleto e ácido desoxirribonucleico (DNA), como condensação da cromatina e fragmentação de DNA, características que podem sugerir o mecanismo de morte celular por apoptose.

4.8. DETECÇÃO DE CÉLULAS APOPTÓTICAS E NECRÓTICAS

Para o ensaio de detecção de células apoptóticas e necróticas foram utilizados os marcadores Anexina V e Iodeto de Propídeo (PI). As células de A549 foram semeadas em placas de 12 poços em meio DMEM completo com densidade igual a 2×10^5 células por poço em 1 mL e incubadas em estufa com atmosfera de 5% de CO₂ a 37°C, por 24h. Após esse tempo as células foram tratadas com o composto 1 nas concentrações correspondentes a 4,6, 9,2 e 18,4 µM por 24 h em estufa sob mesmas condições descritas anteriormente. Dimetilsulfóxido 0,1% e Cloridrato de Doxorrubicina 2,8 µM foram usados com controle negativo e controle positivo, respectivamente. Após o tempo de tratamento as células lavadas com PBS 1x por duas vezes e dissociadas com solução de Tripsina/EDTA (Tripsina 0,25%; EDTA 0,53 Mm) pelo tempo de 3 a 5 min à 37°C. Após inativação da solução de tripsina com meio DMEM completo (3:1), as células foram transferidas para microtubos do tipo Eppendorf e centrifugadas a 259 x g por 10 min a 4°C. O sobrenadante foi descartado e o pellet ressuspendido em solução de lavagem (PBS 1x). Após nova centrifugação sob mesmas condições, as células foram ressuspendidas em 100 µl de tampão de ligação de Anexina 1X e coradas com Anexina V/FITC por 15min e PI, por 10 min no escuro a temperatura ambiente, segundo recomendação do fabricante. Ao final dos 15 min foram adicionados 300 µl do tampão de ligação e as amostras foram analisadas em citômetro de fluxo (BD FACSCanto™ II).

A Anexina V/FITC se liga as células apoptóticas por meio da interação com a fosfatidilserina externalizada na membrana das células em processo de morte por apoptose. O PI é um indicador de células necróticas, por se ligar ao DNA de células com integridade da membrana alterada. Os resultados foram analisados de acordo

com o perfil de marcação da Anexina V/FITC e PI às células. Células sem marcação foram consideradas viáveis, células Anexina V/FITC positivo e PI negativo, foram consideradas em estágio inicial de apoptose, e células Anexina V/FITC e PI positivos, foram consideradas em estágio tardio de apoptose, enquanto que as células PI positivas e Anexina V/FITC negativas foram consideradas células necróticas (GALHARDAS, 2014).

4.9. ANÁLISE ESTATÍSTICA

Os ensaios de citotoxicidade foram realizados em quadruplicata de pelo menos três experimentos independentes, e representados como médias e intervalos de confiança de 95%. Para análises de comparação entre grupo foi utilizado ANOVA seguida de pós teste de Dunnett com resultados considerados significativos com $p < 0,05$. Análises e gráficos foram obtidos através da utilização do programa GraphPad Prism 7.

5. RESULTADOS

5.1. COMPOSTO 1 INIBE O CRESCIMENTO CELULAR EM LINHAGENS TUMORAIS

Inicialmente, foi realizado um screening farmacológico, utilizando o ensaio SRB, no qual foram testados o lapachol, seis derivados sintéticos de lapachol, e a doxorubicina na concentração de 25 μM (Tabela 2). O ensaio de SRB consiste da coloração de aminoácidos básicos para quantificar, pela absorbância, quantidade de células viáveis após o tratamento (VICHAI; KIRTIKARA, 2006). Para avaliar o grau de inibição dos compostos, foi empregada neste estudo a classificação proposta por Mahmoud *et al.* (2011), que categoriza o grau de inibição em três níveis: alto grau, inibição acima de 75%; médio grau, inibição entre 75% e 50%; e baixo grau, inibição abaixo de 50%.

Compostos (25 μ M)	Linhagens de células		
	B16-F10	C 6	A549
1	93,9 \pm 5,0	96,2 \pm 0,5	92,8 \pm 1,8
2	90,8 \pm 2,9	93,4 \pm 2,7	47,7 \pm 9,9
3	21,0 \pm 9,5	55,5 \pm 9,4	15,9 \pm 8,0
4	94,0 \pm 2,6	87,5 \pm 9,3	74,0 \pm 13,9
5	93,9 \pm 4,2	91,9 \pm 1,6	78,1 \pm 10,8
6	94,7 \pm 1,6	89,4 \pm 4,3	80,8 \pm 13,0
Lapachol	72,4 \pm 10,6	85,0 \pm 1,7	69,0 \pm 5,5
Doxorrubicina	95,2 \pm 1,2	87,7 \pm 0,9	77,1 \pm 3,1

Tabela 2. Porcentagem do grau de inibição celular nas linhagens B16-F10, C6 e A549. Valores de média \pm desvio padrão de pelo menos três experimentos independentes após tratamentos com derivados sintéticos de lapachol por 72 horas. Doxorrubicina foi usado como controle positivo.

Dentre os compostos testados, o composto 3 foi o único que apresentou um baixo grau de inibição nas três linhagens testadas, com grau de inibição abaixo de 55%. Os compostos 1, 5 e 6 apresentaram alto grau de inibição em todas as linhagens. Já os compostos 2 e 4 apresentaram alto grau de inibição nas linhagens B16-F10 e C6, mas baixo e médio grau de inibição na linhagem A549 respectivamente. A doxorrubicina apresentou alto grau de inibição nas três linhagens com inibições acima de 75%. O composto 1 apresentou grau de inibição acima de 90% nas linhagens B16-F10, C6 e A549, e, portanto, foi selecionado para a avaliação da CI_{50} e os demais experimentos. Para o cálculo da CI_{50} do composto 1, foram testadas concentrações de 25 μ M a 0,78 μ M nas linhagens de B16-F10, C6 e A549 (Figura 4). Foi possível observar que o composto 1 possui um alto potencial inibitório, mantendo um alto grau de inibição nas concentrações de 25 μ M e 12,5 μ M nas três linhagens tumorais. O mesmo foi observado para o lapachol que apresentou um alto grau de inibição. Os resultados de grau de inibição da Figura 4 foram utilizados para calcular a CI_{50} dos compostos que estão dispostos na Tabela 3.

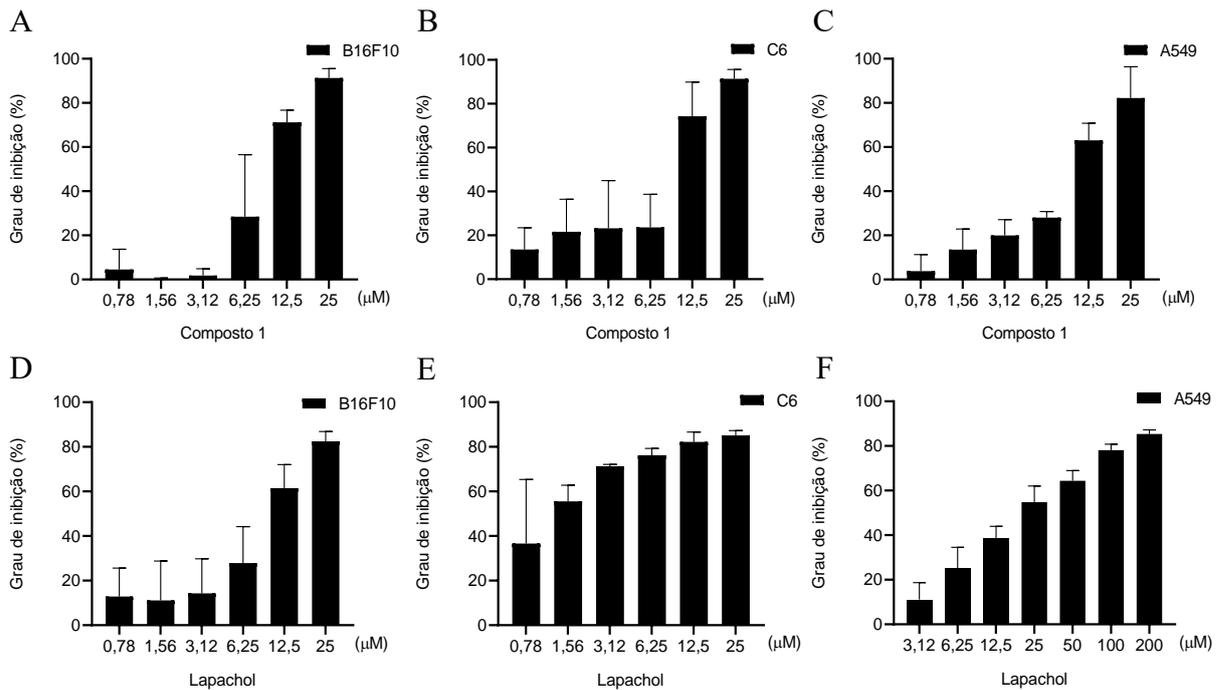


Figura 4. Grau de inibição das linhagens de células A549, B16F10 e C6. Resultados obtidos após tratamento de 72h com o composto 1 (A, B e C) e lapachol (D, E e F) nas linhagens de A549, B16-F10 e C6. O gráfico representa a média e desvio padrão de três experimentos independentes.

Compostos	Linhagem Celular		
	B16F10	C6	A549
1	9,0 (7,6-10,8)	7,6 (5,4-10,4)	9,2 (7,6-11,2)
Lapachol	9,8 (7,4-12,9)	1,3 (0,66-1,9)	22,8 (19,5-26,6)
Doxorrubicina	0,6 (0,2-1,1)	1,3 (0,2-3)	1,4 (1,16-2,3)

Tabela 3. Valores de CI_{50} determinados para o composto 1, lapachol e doxorrubicina. Valores expressos em média e intervalo de confiança de 95% de pelo menos três experimentos independentes após tratamento com composto 1, lapachol (molécula de origem) e doxorrubicina (controle positivo).

O composto 1 apresentou uma CI_{50} de 9,2 μM para A549, 9 μM para B16-F10 e 7,6 μM para C6, já o lapachol mostrou uma CI_{50} de 22,8 μM para A549, 9,8 μM para B16-F10 e 1,3 μM para C6. Em comparação com o lapachol, o composto 1 aparenta ter uma seletividade maior para as linhagens de A549 e B16-F10, uma vez que apresentou uma menor CI_{50} nessas linhagens, mostrando-se um composto com potencial para inibir células de adenocarcinoma de pulmão e melanoma. Na linhagem de A549 o composto 1 apresentou uma IC_{50} 2,5 vezes menor que o lapachol e na linhagem de C6 uma CI_{50} 5 vezes menor que o composto de origem.

O composto 1 apresentou alta atividade citotóxica nas três linhagens estudadas, contudo a linhagem A549 foi selecionada para avaliação em outras alterações biológicas que envolvem o câncer. Essa escolha se justifica, pois o câncer de pulmão apresenta o maior índice de mortalidade no Brasil e no mundo.

5.2. COMPOSTO 1 NÃO APRESENTA TOXICIDADE EM ERITROCITOS HUMANOS

A avaliação do efeito tóxico do composto 1 foi realizada através da realização do ensaio hemolítico em eritrócitos humanos (Figura 5). Para esse ensaio é avaliada a atividade hemolítica, onde é possível verificar alterações na estabilidade mecânica da membrana dos eritrócitos provocado por drogas. Os eritrócitos fornecem um modelo de estudo para os efeitos protetores e tóxicos de substâncias com condições correlatas com estresse oxidativo (PITA et al., 2012). Para avaliar a toxicidade do composto em células saudáveis, o ensaio usa a quantificação de hemoglobina, pela absorvância, liberada após o tratamento (SHARMA; SHARMA, 2001). Nesse ensaio foi utilizada uma concentração de até 30x a CI_{50} para averiguar a toxicidade do composto em concentrações elevadas. O composto 1 não apresentou efeito hemolítico em nenhuma das concentrações testadas (34,5, 69, 138 e 276 μ M), e não apresentou diferenças em relação ao controle negativo de hemólise. O controle positivo de hemólise, apresentou alta atividade hemolítica.

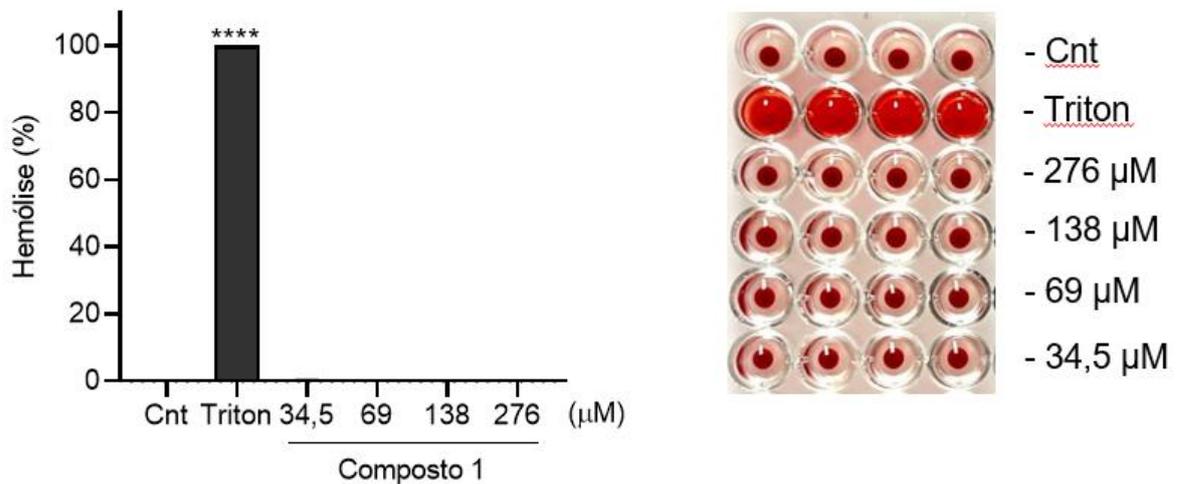


Figura 5. Avaliação do percentual de hemólise em eritrócitos humano. Ensaio de hemólise em eritrócitos humanos tratados com concentrações de 34, 69, 138 e 276 μM do composto 1. Os dados representam a média \pm DP de três experimentos independentes realizados em quadruplicata. Fotografias de poços em um experimento representativo. Triton X 100 (0,1%) foi utilizado como controle positivo, Cnt= controle negativo. A análise entre grupos foi realizada com ANOVA, seguida de pós-teste de Dunnet. $p < 0,0001$ ****comparado ao controle.

5.3. COMPOSTO 1 INIBE A FORMAÇÃO DE COLÔNIAS EM LINHAGENS DE A549

O ensaio clonogênico foi utilizado para investigar a capacidade de inibição do efeito do composto 1 na formação de clones e colônias por uma única célula da linhagem A549, após período de 72 horas de tratamento (Figura 6).

Por meio da contagem das colônias com o auxílio do software ImageJ, observou-se uma diminuição no número de colônias após o tratamento com diferentes concentrações de composto 1. A concentração mais elevada do composto 1 (18,4 μM), inibiu a formação de colônias pelas células A549, enquanto a concentração de 9,2 e 4,6 μM reduziram a formação de colônias em 95% e 79%, respectivamente. A análise dos resultados revelou uma redução significativa na capacidade de formação de colônias pelas células tumorais, em resposta ao tratamento com o composto 1.

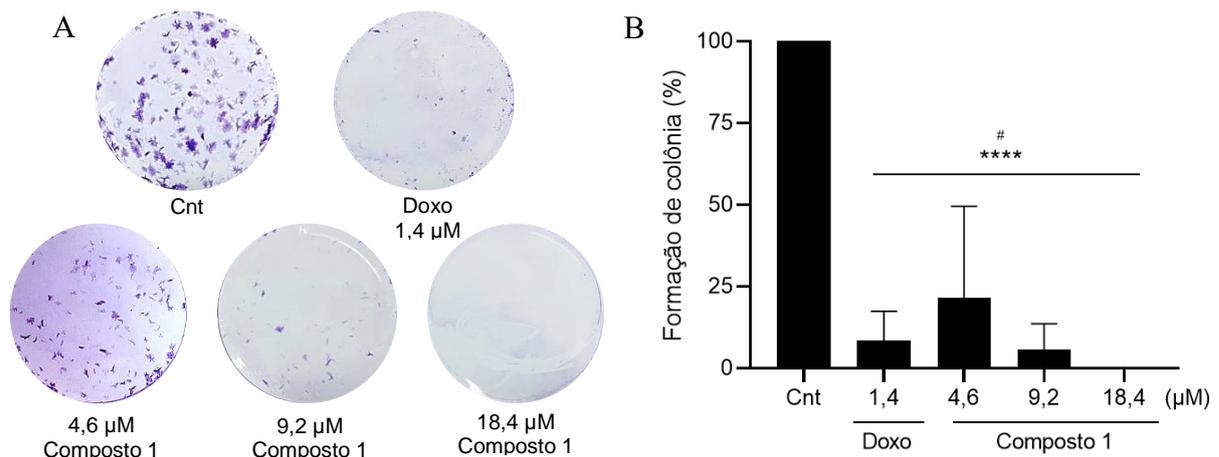


Figura 6. Efeito inibitório do composto 1 na formação de colônias de células A549. **A** - Colônias formadas após 72 horas de tratamento e 10 dias de crescimento celular. **B** - Porcentagem da formação de colônias. Cnt = controle negativo e Doxo = doxorubicina. Os dados foram submetidos a One-Way ANOVA seguida de pós-teste de Dunnett. (****) $p < 0,0001$ tratamentos comparados com o controle negativo e (#) $p < 0,001$ para comparações entre os tratamentos.

5.4. COMPOSTO 1 INIBE A MIGRAÇÃO CELULAR APÓS 48H DE TRATAMENTO

O ensaio foi conduzido com o objetivo de avaliar a capacidade do composto 1 em inibir a migração celular (Figura 7). Após a indução de uma ferida, o efeito inibitório do composto foi observado nos tempos 0h, 24h e 48h, nas concentrações de 2,3, 4,6 e 9,2 μM . As concentrações de 4,6 e 9,2 μM demonstraram resultados similares na migração celular, resultando em uma taxa de migração de 32% e 35% após 24 horas e 53% e 56% após 48 horas, respectivamente. Após 48h o controle negativo exibiu uma porcentagem de migração de 87%, enquanto o controle positivo, doxorubicina, apresentou uma taxa de migração de 61%. O efeito inibitório é observado de forma clara nas diferentes concentrações testadas, com a concentração de 4,6 μM apresentando o maior efeito na migração celular, quando comparada ao controle negativo.

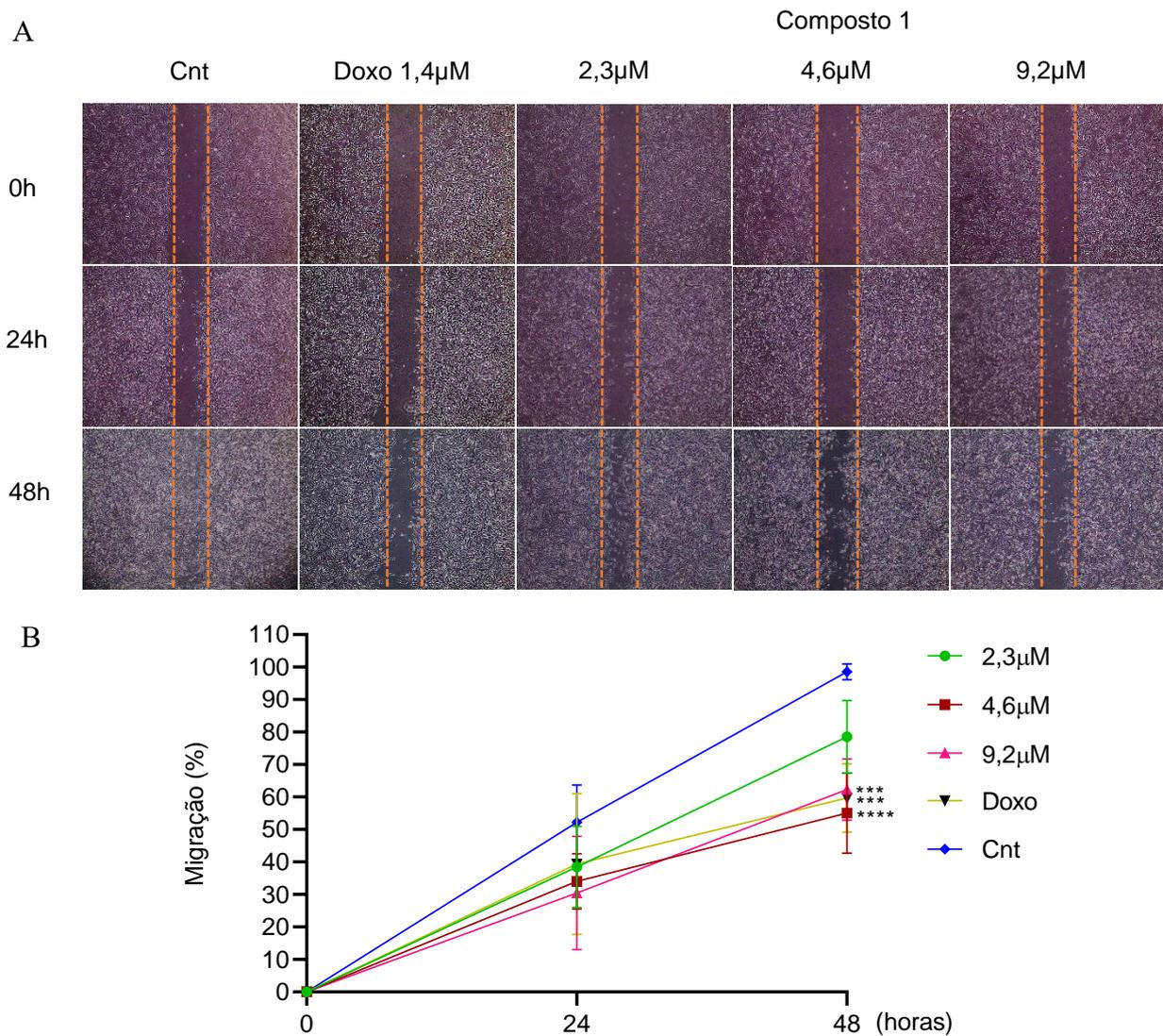


Figura 7. Efeito do composto 1 na migração de células A549. **A** – Representação de um experimento de migração após tratamento com composto 1 por 0h, 24h e 48h. **B** – Percentual de migração. Os dados mostram média e desvio padrão de três experimentos independentes. Cnt = controle negativo e Doxo = doxorubicina. Os dados foram submetidos a Two-Way ANOVA seguida do pós-teste de Dunnett para a comparação entre os tratamentos. (****) $P < 0,001$ e (*) $P < 0,01$.

5.5. O COMPOSTO 1 INDUZ ALTERAÇÕES MORFOLÓGICAS EM LINHAGEM A549

Para a avaliação das alterações morfológicas, foi utilizada a coloração de DAPI e Faloidina/FITC, para corar o núcleo celular e citoesqueleto, respectivamente. Os resultados revelaram que o tratamento com o composto 1 induziu alterações morfológicas característica de morte celular na linhagem A549 (Figura 8). É possível observar que em todas as concentrações testadas do composto 1 (18,4, 9,2 e 4,6 μ M) as células A549 perderam volume citoplasmático, houve alteração na forma nuclear e redução do número de células quando comparado ao controle. Essas alterações

morfológicas também são visíveis para doxorrubicina que foi utilizada como controle positivo.

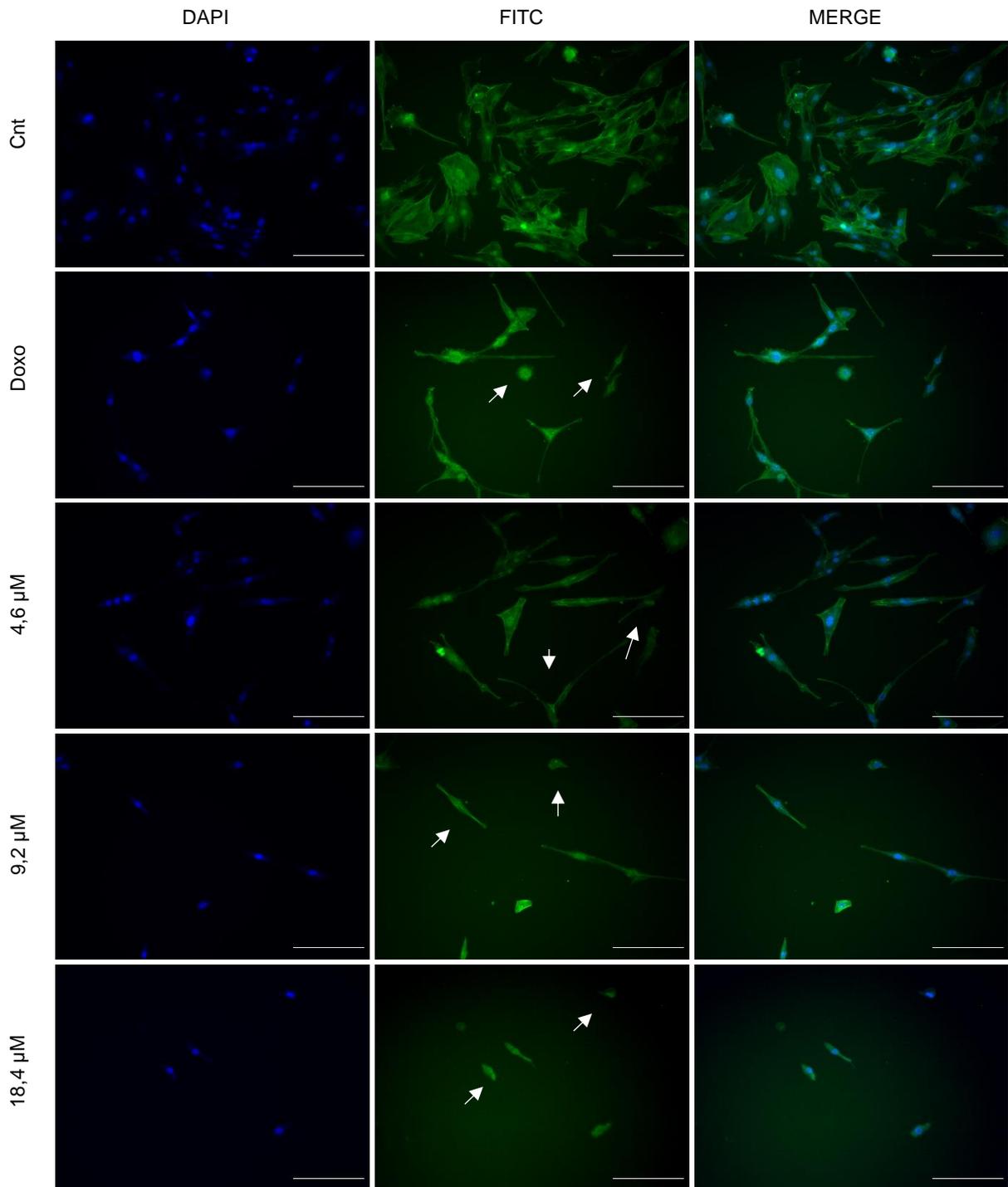
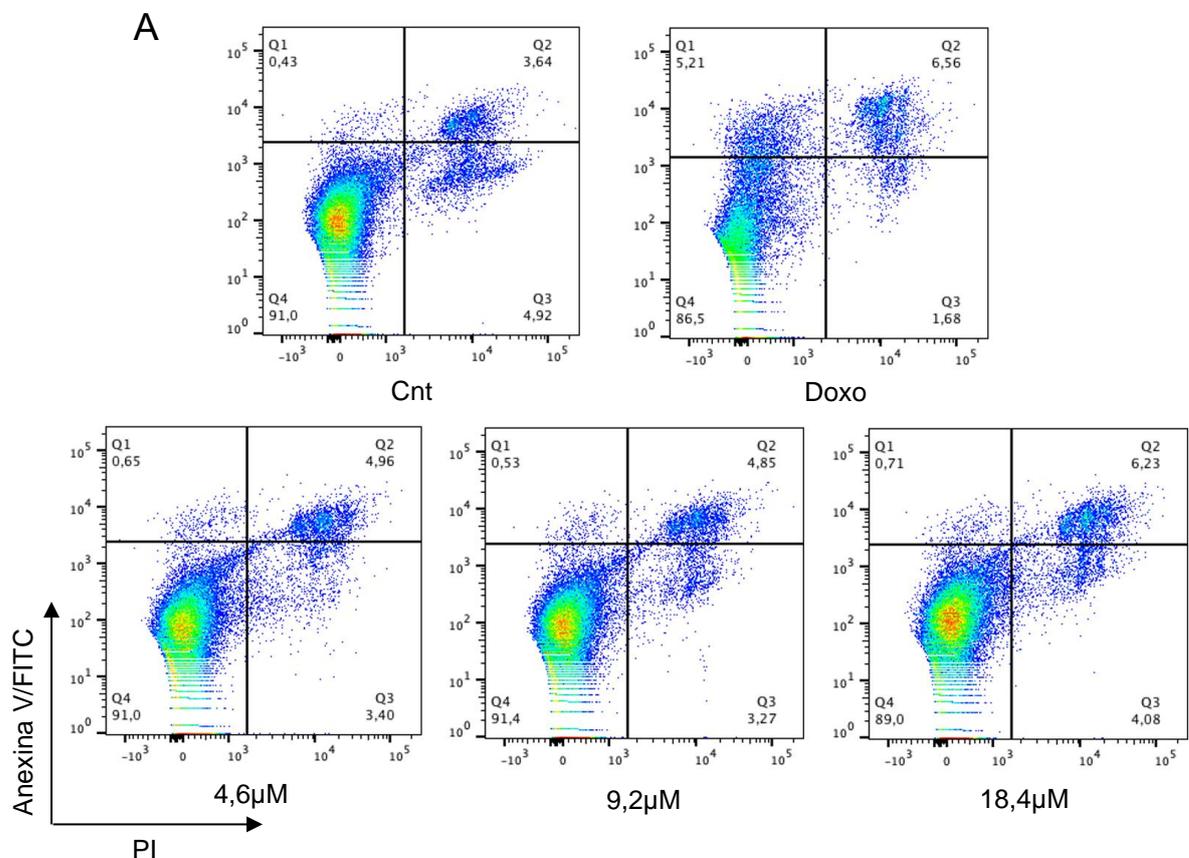


Figura 8. Efeito do composto 1 na morfologia do citoesqueleto e núcleo da linhagem celular A549. Alterações morfológicas observadas na coloração DAPI e Faloidina/FITC em célula A549 após tratamento com composto 1, nas concentrações de 4,6, 9,2 e 18,4 µM por 24 horas. Doxorrubicina (Doxo) a 1,4 µM foi usada como controle positivo e células não tratadas como controle negativo (Cnt). Setas representam alterações no citoesqueleto das células e alterações na morfologia nuclear. Ampliação de 200x. Barra: 20µm.

5.6. COMPOSTO 1 INDUZ APOPTOSE E NECROSE EM CÉLULAS DE A459

Para investigar o tipo de morte celular provocado pelo composto 1, foi realizado o ensaio Anexina V FITC/Iodeto de propídeo (Figura 9), A anexina se liga a fosfatidilserina externalizada na membrana de células em apoptose. O PI se liga ao DNA da célula com integridade da membrana alterada. Neste ensaio, as células de A549 foram tratadas com o composto 1 por 24h nas concentrações de 4,6, 9,2 e 18,4 μM . Como mostra a figura representativa dos experimentos de citometria de fluxo (Figura 9 A) houve um aumento da apoptose nas células A549 (Anexina⁺; Anexina⁺/PI⁺) tratadas com o composto 1 na concentração de 18,4 μM , quando comparado ao controle. Além desta, o fenômeno de necrose (PI⁺) apesar de em menor proporção, aumentou nos tratamentos com a molécula teste. O controle positivo, doxorubicina, também foi capaz de induzir apoptose ou necrose (Figura 9 B).



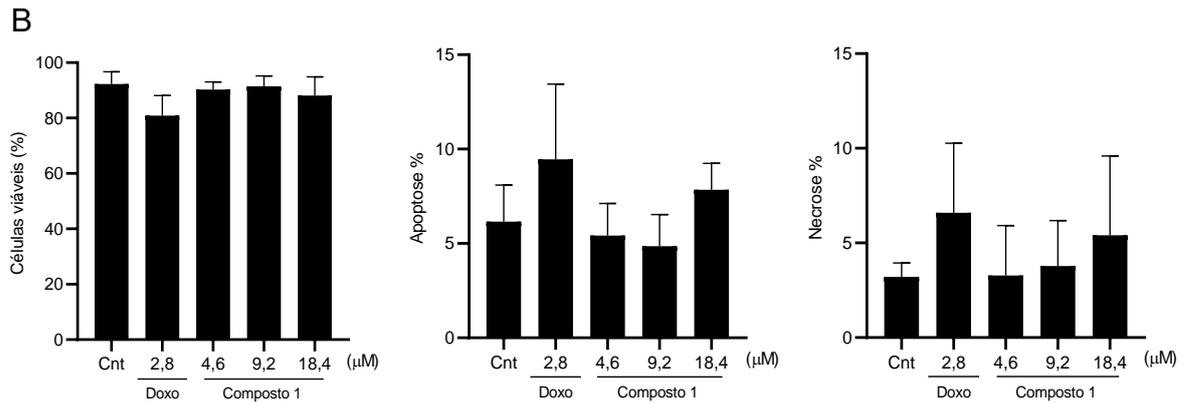


Figura 9. Porcentagem de células A549 em apoptose e necrose após tratamento com composto 1. **A**– Representação da análise por citometria de fluxo. Nos quadrantes temos: células viáveis (Anexina V-/PI-), apoptose inicial (Anexina V+/PI-), apoptose tardia (Anexina V+/PI+) e necrose (Anexina V-/PI+). **B** – Porcentagem de células viáveis, em apoptose e necrose após tratamento com composto 1. Cnt = controle negativo e Doxo = doxorubicina. Os dados foram submetidos a One-Way ANOVA seguida de pós-teste de Dunnett para comparar tratamentos com o controle negativo.

6. DISCUSSÃO

O câncer de pulmão representa um sério desafio de saúde pública, ocupando a primeira posição em termos de mortalidade e o segundo lugar em incidência em nível global (SUNG *et al.*, 2021). Uma das principais características do câncer é a sua alta taxa proliferativa, devido a inativação de genes pro-apoptóticos e a hiperativação de genes que estimulam o crescimento celular (MATTHEWS; BERTOLI; DE BRUIN, 2021).

O lapachol é um composto que apresenta alta capacidade inibitória em diversas linhagens de câncer e é uma excelente fonte para a síntese de novos compostos (FIORITO *et al.*, 2014). Nesse estudo foram investigados seis novos derivados glicosídicos de lapachol quanto ao potencial de inibição celular. Entre os seis compostos, o composto 1 apresentou uma inibição maior que 90% (GI>90%) nas linhagens de melanona (B16F10), glioma (C6) e adenocarcinoma de pulmão (A549).

Otoni *et al.* (2020) avaliaram derivados glicosídicos da lausona, análogos do lapachol, com características químicas semelhantes aos avaliados nesta pesquisa, em linhagens celulares de adenocarcinoma de mama (SKBR-3, MDA-MB-231 e MCF-7), que apresentaram alta citotoxicidade. Uma importante característica química dos derivados de lausona é que elas são quinonas e essas estruturas causam danos a célula, pois tem a capacidade de liberar elétrons e conseqüentemente formar radicais livres, como ânion superóxido e peróxido de hidrogênio (DE FRANCA *et al.*, 2021).

De acordo com a literatura derivados de lapachol possuem uma alta citotóxicidade em linhagens tumorais. O derivado hidroxilapachol foi capaz de inibir o crescimento das linhagens de câncer de ovário (A2780), câncer de mama (HBL100), câncer de colo do útero (HeLa), câncer de pulmão de células não pequenas (SW1573), câncer de mama (T-47D) e câncer de cólon (WiDr), esse efeito inibitório foi associado a presença do grupo 5-hidroxil no anel aromático que foi capaz de aumentar a toxicidade dos derivados (BONIFAZI *et al.*, 2010). Esteves (2007), mostrou que derivados de amina lapachol inibiram o crescimento da linhagem de carcinoma de Ehrlich e leucemia (K562). Esses dados evidenciam o potencial dos derivados de lapachol em inibir o crescimento de células tumorais.

As modificações na estrutura de compostos derivados de produtos naturais podem conferir melhores perfis de absorção, hidrossolubilidade, lipossolubilidade e reatividade, tornando-as mais citotóxicas às células tumorais, como também, torná-las mais seletivas, menos tóxicas e mais potentes (OTTONI, 2014). Nossos resultados mostraram que o tratamento com o composto 1 apresentou uma CI_{50} duas vezes menor que o lapachol na linhagem de adenocarcinoma de pulmão, mostrando que a inserção do grupamento glicosídico na estrutura do lapachol, bem como, do anel triazólico gerou um composto mais citotóxico que o composto original. Semelhantes aos nossos resultados, o estudo de Marques (2020), demonstrou valores de IC_{50} para derivados glicosídicos de lapachol quatro vezes menor que o lapachol em uma linhagem de leucemia (HL60).

Os compostos 1, 2 e 5, utilizados no nosso trabalho, mostraram uma alta atividade citotóxica nas células tumorais quando comparado ao lapachol. Essa atividade citotóxica pode ser resultado da eterificação do grupo hidroxila do lapachol para formação desses compostos. A baixa atividade do composto 3 pode ser explicada pelo seu alto caráter polar, uma vez que esse composto possui frações de açúcar desacetiladas em suas estruturas. Isso prejudicaria a permeação da membrana celular.

Segundo Kuete *et al.* (2014), para que um composto seja considerado um poderoso agente quimioterápico, seus valores de CI_{50} devem ser inferiores a $10 \mu M$ após 72h de tratamento. De acordo com nossos resultados, o composto 1 pode ser considerado um bom agente antitumoral, uma vez que os valores de CI_{50} encontrados para as três linhagens utilizadas foram menores que $9,2 \mu M$. Uma vez que as três linhagens foram sensíveis ao tratamento com o composto 1, a linhagem de

adenocarcinoma de pulmão (A549) foi escolhida para dar continuidade à investigação antitumoral do composto derivado de Lapachol. O adenocarcinoma de pulmão possui uma alta taxa de incidência e mortalidade, além da sua alta capacidade de formar metástases.

Um dos principais problemas no tratamento do câncer é a toxicidade aos quimioterápicos (LIVSHITS; RAO; SMITH, 2014). Dentre as toxicidades frequentemente relacionadas à quimioterapia, incluem-se a supressão da medula óssea, a cardiopatia, a alopecia, a imunossupressão, as náuseas e os vômitos, a mucosite, além de impactos sociais e emocionais, como depressão, estresse, vergonha e isolamento social (GOMES, COELHO e MOURA, 2018). Uma complicação frequente no tratamento do câncer é a hemólise, a qual alguns compostos, tais como, cisplatina e carboplatina, interagem com a membrana dos eritrócitos e conseqüentemente induz ao rompimento da membrana, causando anemia hemolítica (JESWANI *et al.*, 2015).

Segundo Kapare *et al.* (2019) um composto deve apresentar uma porcentagem de hemólise menor que 3% para que seja considerado seguro. Em nosso estudo, foi avaliado a toxicidade em eritrócitos humanos do composto 1, o qual não apresentou toxicidade, mesmo na concentração mais elevada testada de 276µM. Os resultados de hemólise em conjunto com os resultados antitumorais mostram que o composto 1 possui citotoxicidade em células tumorais e não possui efeito tóxico em células saudáveis.

Uma única célula cancerígena possui a capacidade de se dividir inúmeras vezes e formar um tumor (MICHOR; IWASA; NOWAK, 2004). O ensaio clonogênico possibilita a avaliação da capacidade de uma célula em resistir ao tratamento ao qual foi submetida e se multiplicar, formando colônias (GUZMÁN *et al.*, 2014). No nosso trabalho investigamos a capacidade do composto 1 em reduzir a formação de colônias e foi possível observar uma alta capacidade de inibição dos clones nas concentrações utilizadas. No estudo conduzido por Chipoline *et al.* (2020), foi observado que os derivados de 1,4-naftoquinona tiveram a capacidade de diminuir a formação de colônias de carcinoma oral de células escamosas (SSC-9), sem afetar a viabilidade das células não tumorais de fibroblastos.

Corroborando com nossos resultados, Zu *et al.* (2019), mostraram que o lapachol inibiu a formação de colônias em células de câncer de esôfago (KYSE450 e KYSE510). Derivados glicosídicos de lapachol foram capazes de inibir a formação de

colônias em linhagens de MCF-7 (câncer de mama), MDA-MB-231 (câncer de mama) e HCT-116 (câncer colorretal) (OTTONI *et al.*, 2021). Complexos rutênicos de lapachol também foram capazes de inibir a formação de colônias em células de DU-145 (adenocarcinoma de próstata) (DE GRANDIS *et al.*, 2021).

No adenocarcinoma pulmonar, um câncer altamente metastático e com alta taxa de mortalidade, a migração celular desempenha um papel crucial na progressão do tumor (HUNG *et al.*, 2014; ZABALLA; EIDEMÜLLER, 2016). A metástase é a principal causa de morte em pacientes com câncer, visto que ela é observada em estágios mais avançados da doença (RIIHIMÄKI *et al.*, 2014). No câncer de pulmão, pacientes com metástase apresentam uma taxa de sobrevivência de apenas 10% após 5 anos do diagnóstico (SUNG *et al.*, 2021).

No ensaio de migração realizado nesse trabalho, o composto 1 demonstrou uma notável capacidade de inibir mais de 60% a migração das células A549 após 48h de tratamento. Oliveira *et al.* (2021), observaram que compostos rutênicos complexados com lapachol também foram capazes de inibir a migração celular na linhagem de câncer de mama (MDA-MB-231). Derivado glicosídico de lausona, composto análogo ao lapachol, foi capaz de inibir a migração celular em 24 horas em linhagens de melanoma (B16-F10) (DE FRANCA *et al.*, 2021).

Estudos demonstram por meio de diferentes análises que derivados naftoquinônicos apresentam atividade citotóxica em células tumorais por induzir apoptose (NARIYA *et al.*, 2020; SINGH; ANAND; KUMAR, 2014). Alterações na disposição dos filamentos de actina, interfere nas estruturas responsáveis por diversas funções na célula, tais como, morfologia e migração (NASCIMENTO *et al.*, 2019). O encolhimento celular e alterações morfológicas são eventos característicos de apoptose (ZHANG *et al.*, 2018). Em nosso trabalho ao corar o núcleo e os filamentos de actina, as células apresentaram características de apoptose após tratamento com as três concentrações do composto 1 e a doxorrubicina, utilizada como controle positivo. As células A549 perderam volume citoplasmático, houve alteração na forma nuclear e redução do número de células quando comparado ao controle, além de perda das características fibroblastóides.

A fragmentação do material genético é característica da morte celular programada, uma vez que os estímulos apoptóticos provocam a ativação da cascata de caspases que cliva e ativa a fragmentação do DNA, permitindo a quebra das moléculas de DNA em pedaços com 180 pares de bases (DE FRANCA *et al.*, 2021).

Dos Santos *et al.* (2023) mostrou que o derivado de lausona O-propargyl lausona induz apoptose e alterações na morfologia como perda da forma fibroblastóide em células de A549.

A ativação das vias de caspases durante o processo de apoptose resulta na exposição de fosfolípídios de membrana, como a fosfatidilserina (FIANDALO; KYPRIANOU, 2012). Uma vez que a célula é induzida a apoptose por um composto, a fosfatidilserina é externalizada e serve como um sinalizador de fagocitose para células fagocitárias (ELISABETE; MOREIRA; BARCINSKI, 2004). Neste trabalho, a avaliação da morte celular por Anexina V e iodeto de propídeo mostrou um percentual de células positivas para apoptose.

Os resultados deste estudo demonstram que os derivados de lapachol representam uma fonte relevante de moléculas potencialmente citotóxicas em células tumorais, considerando que todos os derivados avaliados apresentaram atividade citotóxica. No entanto, o composto 1 apresentou atividade citotóxica mais expressiva, sendo efetivo e eficaz sobre as linhagens de melanoma, glioma e adenocarcinoma de pulmão. Adicionalmente, observamos um efeito do composto 1 em inibir a formação de clones e a migração celular no adenocarcinoma de pulmão, sendo de grande relevância para esse tipo de câncer por ser altamente metastático. Assim, é de grande importância novos estudos com esse derivado para o câncer de pulmão.

O composto 1 é um derivado glicosídico de lapachol e assim como nos trabalhos com lausona a inserção do grupo glicosídico parece potencializar o efeito tóxico do composto quando comparado ao composto original (DE FRANCA *et al.*, 2021; OTTONI *et al.*, 2020). Embora os resultados com o composto 1 tenham sido promissores neste estudo, é necessário realizar uma investigação mais aprofundada dos mecanismos de ação desse composto em modelo de câncer *in vivo*, assim como investigar a importância da glicosilação do composto.

7. CONCLUSÃO

Os resultados demonstram a importância do estudo de seleção de novos fármacos, sobretudo derivados de lapachol, uma vez que eles apresentam um alto efeito citotóxico. Nesse estudo foram utilizados seis derivados sintéticos de lapachol que apresentaram citotoxicidade nas linhagens de melanoma, glioma e adenocarcinoma de pulmão. Dentre eles, o composto 1 apresentou a maior efeito citotóxico nas linhagens testadas. É possível observar que o composto 1 foi capaz de inibir o crescimento celular, reduzir a formação de colônias e migração, e além disso foi capaz de alterar a morfologia de células de adenocarcinoma pulmonar. Ademais, o composto não apresentou toxicidade em células saudáveis o que sugere que ele não possui toxicidade em células saudáveis. Esses dados reunidos mostram uma importante atividade anticancer do composto 1, possibilitando a continuidade de novos estudos antitumorais *in vitro e in vivo*,

8. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

AGARWAL, G.; BLANCO CARCACHE, P. J.; MEKURIA ADDO, E.; DOUGLAS KINGHORN, A. Current Status and Contemporary Approaches to the Discovery of Antitumor Agents from Higher Plants. **Biotechnol Adv.**, 2020.

BALASSIANO, I. T.; PAULO, S. A. de; SILVA, N. H.; CABRAL, M. C.; CARVALHO, M. da G. da C. Demonstration of the lapachol as a potential drug for reducing cancer metastasis. **ONCOLOGY REPORTS**, v. 13, p. 329–333, 2005.

BONIFAZI, E. L.; RÍOS-LUCI, C.; LEÓN, L. G.; BURTON, G.; PADRÓN, J. M.; MISICO, R. I. Antiproliferative activity of synthetic naphthoquinones related to lapachol. First synthesis of 5-hydroxylapachol. **Bioorganic and Medicinal Chemistry**, v. 18, n. 7, p. 2621–2630, 2010. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.bmc.2010.02.032>

CARVALHO, C.; SANTOS, R.; CARDOSO, S.; CORREIA, S.; OLIVEIRA, P.; SANTOS, M.; MOREIRA, P. Doxorubicin: The Good, the Bad and the Ugly Effect. **Current Medicinal Chemistry**, v. 16, n. 25, p. 3267–3285, 2009. Disponível em: <https://doi.org/10.2174/092986709788803312>

CHANG, A. Chemotherapy, chemoresistance and the changing treatment landscape for NSCLC. **Lung Cancer**, v. 71, n. 1, p. 3–10, 2011. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.lungcan.2010.08.022>

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. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.bcp.2010.04.031>

CHIPOLINE, I. C. *et al.* Molecular mechanism of action of new 1,4-naphthoquinones tethered to 1,2,3-1H-triazoles with cytotoxic and selective effect against oral squamous cell carcinoma. **Bioorganic Chemistry**, v. 101, 2020. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.bioorg.2020.103984>

COLLINS, L. G.; HAINES, C.; PERKEL, R.; ENCK, R. E. Lung cancer: Diagnosis and management. **American Family Physician**, v. 75, n. 1, p. 56–63, 2007.

D'ARCY, M. S. **Cell death: a review of the major forms of apoptosis, necrosis and autophagy**. [S. l.]: Wiley-Blackwell Publishing Ltd, 2019. Disponível em: <https://doi.org/10.1002/cbin.11137>

DE FRANCA, M. N. F.; ISIDÓRIO, R. G.; BONIFACIO, J. H. O.; DOS SANTOS, E. W. P.; SANTOS, J. F.; OTTONI, F. M.; DE LUCCA JUNIOR, W.; SCHER, R.; ALVES, R. J.; CORRÊA, C. B. Anti-proliferative and pro-apoptotic activity of glycosidic derivatives of lawsone in melanoma cancer cell. **BMC Cancer**, v. 21, n. 1, p. 1–13, 2021. Disponível em: <https://doi.org/10.1186/s12885-021-08404-4>

DE GRANDIS, R. A.; OLIVEIRA, K. M.; GUEDES, A. P. M.; DOS SANTOS, P. W. S.; AISSA, A. F.; BATISTA, A. A.; PAVAN, F. R. A Novel Ruthenium(II) Complex With Lapachol Induces G2/M Phase Arrest Through Aurora-B Kinase Down-Regulation and ROS-Mediated Apoptosis in Human Prostate Adenocarcinoma Cells. **Frontiers in Oncology**, v. 11, 2021. Disponível em: <https://doi.org/10.3389/fonc.2021.682968>

DEBERARDINIS, R. J.; LUM, J. J.; HATZIVASSILIOU, G.; THOMPSON, C. B. **The Biology of Cancer: Metabolic Reprogramming Fuels Cell Growth and Proliferation**. [S. l.: s. n.] Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.cmet.2007.10.002>

DEMAIN, A. L.; VAISHNAV, P. Natural products for cancer chemotherapy. **Microbial Biotechnology**, v. 4, n. 6, p. 687–699, 2011. Disponível em: <https://doi.org/10.1111/j.1751-7915.2010.00221.x>

DING, L. *et al.* Somatic mutations affect key pathways in lung adenocarcinoma. **Nature**, v. 455, n. 7216, p. 1069–1075, 2008. Disponível em: <https://doi.org/10.1038/nature07423>

DONG, C.; WU, J.; CHEN, Y.; NIE, J.; CHEN, C. **Activation of PI3K/AKT/mTOR Pathway Causes Drug Resistance in Breast Cancer**. [S. l.]: Frontiers Media S.A., 2021. Disponível em: <https://doi.org/10.3389/fphar.2021.628690>

DOS SANTOS, E. W. P.; DE SOUSA, R. C.; DE FRANCA, M. N. F.; SANTOS, J. F.; OTTONI, F. M.; ISIDÓRIO, R. G.; DE LUCCA JUNIOR, W.; ALVES, R. J.; SCHER, R.; CORRÊA, C. B. Inhibitory effect of O-propargyllawsone in A549 lung adenocarcinoma cells. **BMC Complementary Medicine and Therapies**, v. 23, n. 1, 2023. Disponível em: <https://doi.org/10.1186/s12906-023-04156-9>

ELISABETE, M.; MOREIRA, C.; BARCINSKI, M. A. Apoptotic cell and phagocyte interplay: recognition and consequences in different cell systems. v. 76, n. 1, p. 93–115, 2004. Disponível em: www.scielo.br/aabc

EPIFANO, F.; GENOVESE, S.; FIORITO, S.; MATHIEU, V.; KISS, R. **Lapachol and its congeners as anticancer agents: A review.** [S. l.: s. n.] Disponível em: <https://doi.org/10.1007/s11101-013-9289-1>

ESTEVEZ-SOUZA, A.; FIGUEIREDO, D. V.; ESTEVES, A.; CÂMARA, C. A.; VARGAS, M. D.; PINTO, A. C.; ECHEVARRIA, A. Cytotoxic and DNA-topoisomerase effects of lapachol amine derivatives and interactions with DNA. **Braz J Med Biol Res**, v. 40, n. 10, p. 1399–1402, 2007. Disponível em: www.bjournal.com.br

EYONG, K. O.; KETSEMEN, H. L.; ZHAO, Z.; DU, L.; INGELS, A.; MATHIEU, V.; KORNIENKO, A.; HULL, K. G.; FOLEFOG, G. N.; BASKARAN, S.; ROMO, D. Antiproliferative activity of naphthoquinones and indane carboxylic acids from lapachol against a panel of human cancer cell lines. **Medicinal Chemistry Research**, v. 29, n. 6, p. 1058–1066, 2020. Disponível em: <https://doi.org/10.1007/s00044-020-02545-0>

FARES, J.; FARES, M. Y.; KHACHFE, H. H.; SALHAB, H. A.; FARES, Y. Molecular principles of metastasis: a hallmark of cancer revisited. **Signal Transduction and Targeted Therapy**, v. 5, n. 1, 2020. Disponível em: <https://doi.org/10.1038/s41392-020-0134-x>

FERLAY, J.; COLOMBET, M.; SOERJOMATARAM, I.; MATHERS, C.; PARKIN, D. M.; PIÑEROS, M.; ZNAOR, A.; BRAY, F. Estimating the global cancer incidence and mortality in 2018: GLOBOCAN sources and methods. **International Journal of Cancer**, v. 144, n. 8, p. 1941–1953, 2019. Disponível em: <https://doi.org/10.1002/ijc.31937>

FERREIRA, R. G. R.; FRANCO, L. F. de R. EFEITOS COLATERAIS DECORRENTES DO TRATAMENTO QUIMIOTERÁPICO NO CÂNCER DE MAMA: revisão bibliográfica. **Revista da Universidade Vale do Rio Verde**, v. 15, n. 2, p. 633–638, 2017.

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

FIORITO, S.; EPIFANO, F.; BRUYÈRE, C.; MATHIEU, V.; KISS, R.; GENOVESE, S. Growth inhibitory activity for cancer cell lines of lapachol and its natural and semi-synthetic derivatives. **Bioorganic and Medicinal Chemistry Letters**, v. 24, n. 2, p. 454–457, 2014. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.bmcl.2013.12.049>

FRANKEN, N. A. P.; RODERMOND, H. M.; STAP, J.; HAVEMAN, J.; VAN BREE, C. Clonogenic assay of cells in vitro. **Nature Protocols**, v. 1, n. 5, p. 2315–2319, 2006. Disponível em: <https://doi.org/10.1038/nprot.2006.339>

FRIEDLAENDER, A.; BANNA, G.; MALAPELLE, U.; PISAPIA, P.; ADDEO, A. 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. Disponível em: <https://doi.org/10.3389/fonc.2019.00166>

GOEL, S.; DECRISTO, M. J.; MCALLISTER, S. S.; ZHAO, J. J. CDK4/6 inhibition in cancer: beyond cell cycle arrest. **Trends in Cell Biology**, v. 28, n. 11, p. 911–925, 2018.

GOLSTEIN, P.; KROEMER, G. **Cell death by necrosis: towards a molecular definition**. [S. l.: s. n.] Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.tibs.2006.11.001>

GRADA, A.; OTERO-VINAS, M.; PRIETO-CASTRILLO, F.; OBAGI, Z.; FALANGA, V. **Research Techniques Made Simple: Analysis of Collective Cell Migration Using the Wound Healing Assay**. [S. l.]: Elsevier B.V., 2017. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.jid.2016.11.020>

GRAHAM, T. A.; SOTTORIVA, A. **Measuring cancer evolution from the genome**. [S. l.]: John Wiley and Sons Ltd, 2017. Disponível em: <https://doi.org/10.1002/path.4821>

GUZMÁN, C.; BAGGA, M.; KAUR, A.; WESTERMARCK, J.; ABANKWA, D. ColonyArea: An ImageJ plugin to automatically quantify colony formation in clonogenic assays. **PLoS ONE**, v. 9, n. 3, p. 14–17, 2014. Disponível em: <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0092444>

HANAHAN, D. **Hallmarks of Cancer: New Dimensions**. [S. l.]: American Association for Cancer Research Inc., 2022. Disponível em: <https://doi.org/10.1158/2159-8290.CD-21-1059>

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. Disponível em: <https://doi.org/10.1038/nature25183>

HOFMANN, K. The evolutionary origins of programmed cell death signaling. **Cold Spring Harbor Perspectives in Biology**, v. 12, n. 9, p. 1–16, 2020. Disponível em: <https://doi.org/10.1101/cshperspect.a036442>

HUNG, J. Y.; HORN, D.; WOODRUFF, K.; PRIHODA, T.; LESAUX, C.; PETERS, J.; TIO, F.; ABOUD-WERNER, S. L. Colony-stimulating factor 1 potentiates lung cancer bone metastasis. **Laboratory Investigation**, v. 94, n. 4, p. 371–381, 2014. Disponível em: <https://doi.org/10.1038/labinvest.2014.1>

HUSSAIN, H.; GREEN, I. R. **Lapachol and lapachone analogs: a journey of two decades of patent research(1997-2016)**. [S. l.]: Taylor and Francis Ltd, 2017. Disponível em: <https://doi.org/10.1080/13543776.2017.1339792>

HUSSAIN, H.; KROHN, K.; AHMAD, V. U.; ABBAS MIANA, G.; GREEN, I. R. Lapachol: an overview. **ARKIVOC**, v. 2, p. 145–171, 2007.

IGNEY, F. H.; KRAMMER, P. H. **Death and anti-death: Tumour resistance to apoptosis**. [S. l.]: European Association for Cardio-Thoracic Surgery, 2002. Disponível em: <https://doi.org/10.1038/nrc776>

INCA. **Estimativa 2023 : incidência de câncer no Brasil / Instituto Nacional de Câncer.** [S. l.: s. n.]. Disponível em: <https://doi.org/https://www.inca.gov.br/publicacoes/livros/estimativa-2023-incidencia-de-cancer-no-brasil>

JANOWSKA, S.; PANETH, A.; WUJEC, M. **Cytotoxic properties of 1,3,4-Thiadiazole derivatives—A review.** [S. l.]: MDPI AG, 2020. Disponível em: <https://doi.org/10.3390/molecules25184309>

JESWANI, G.; ALEXANDER, A.; SARAF, S.; SARAF, S.; QURESHI, A.; AJAZUDDIN. **Recent approaches for reducing hemolytic activity of chemotherapeutic agents.** [S. l.]: Elsevier B.V., 2015. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.jconrel.2015.06.001>

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

KAPARE, H.; LOHIDASAN, S.; SINNATHAMBI, A.; MAHADIK, K. Standardization, anti-carcinogenic potential and biosafety of Indian propolis. **Journal of Ayurveda and Integrative Medicine**, v. 10, n. 2, p. 81–87, 2019. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.jaim.2017.06.003>

KNUDSEN, E. S.; PRUITT, S. C.; HERSHBERGER, P. A.; WITKIEWICZ, A. K.; GOODRICH, D. W. **Cell Cycle and Beyond: Exploiting New RB1 Controlled Mechanisms for Cancer Therapy.** [S. l.]: Cell Press, 2019. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.trecan.2019.03.005>

KUETE, V.; ANGO, P. Y.; YEBOAH, S. O.; MBAVENG, A. T.; MAPITSE, R.; KAPCHE, G. D. W. F.; NGADJUI, B. T.; EFFERTH, T. Cytotoxicity of four Aframomum species (*A. arundinaceum*, *A. albobviolaceum*, *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. Disponível em: <https://doi.org/10.1186/1472-6882-14-340>

LANFREDINI, S.; THAPA, A.; O'NEILL, E. RAS in pancreatic cancer. **Biochemical Society Transactions**, v. 47, n. 4, p. 961–972, 2019. Disponível em: <https://doi.org/10.1042/BST20170521>

LIU, S. Y. M.; ZHENG, M. M.; PAN, Y.; LIU, S. Y.; LI, Y.; WU, Y. L. **Emerging evidence and treatment paradigm of non-small cell lung cancer.** [S. l.]: BioMed Central Ltd, 2023. Disponível em: <https://doi.org/10.1186/s13045-023-01436-2>

LIVSHITS, Z.; RAO, R. B.; SMITH, S. W. **An approach to chemotherapy-associated toxicity.** [S. l.]: W.B. Saunders, 2014. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.emc.2013.09.002>

MAHMOUD, T. S.; MARQUES, M. R.; DO Ó PESSOA, C.; LOTUFO, L. V. C.; MAGALHÃES, H. I. F.; DE MORAES, M. O.; DE LIMA, D. P.; TININIS, A. G.; DE OLIVEIRA, J. E. In vitro cytotoxic activity of brazilian middle west plant extracts. **Brazilian Journal of Pharmacognosy**, v. 21, n. 3, p. 456–464, 2011. Disponível em: <https://doi.org/10.1590/S0102-695X2011005000061>

- MARQUES, L. B. *et al.* Lapachol acetylglycosylation enhances its cytotoxic and proapoptotic activities in HL60 cells. **Toxicology in Vitro**, v. 65, 2020. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.tiv.2020.104772>
- MATTHEWS, H. K.; BERTOLI, C.; DE BRUIN, R. A. M. Cell cycle control in cancer. **Nature Reviews Molecular Cell Biology**, v. 0123456789, 2021. Disponível em: <https://doi.org/10.1038/s41580-021-00404-3>
- MICHOR, F.; IWASA, Y.; NOWAK, M. A. **Dynamics of cancer progression**. [S. l.]: Nature Publishing Group, 2004. Disponível em: <https://doi.org/10.1038/nrc1295>
- MINISTÉRIO DA SAUDE. **ABC do Câncer - Abordagens básicas para o controle do**. 6. ed. [S. l.: s. n.]. E-book. Disponível em: www.inca.gov.br
- MIRANDA-FILHO, A.; CHARVAT, H.; BRAY, F.; MIGOWSKI, A.; CHEUNG, L. C.; VACCARELLA, S.; JOHANSSON, M.; CARVALHO, A. L.; ROBBINS, H. A. A modeling analysis to compare eligibility strategies for lung cancer screening in Brazil. **eClinicalMedicine**, v. 42, 2021. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.eclinm.2021.101176>
- MOHAMMAD, R. M. *et al.* **Broad targeting of resistance to apoptosis in cancer**. [S. l.]: Academic Press, 2015. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.semcancer.2015.03.001>
- NAEEM, A.; HU, P.; YANG, M.; ZHANG, J.; LIU, Y.; ZHU, W.; ZHENG, Q. **Natural Products as Anticancer Agents: Current Status and Future Perspectives**. [S. l.]: MDPI, 2022. Disponível em: <https://doi.org/10.3390/molecules27238367>
- NARIYA, P.; SHUKLA, F.; VYAS, H.; DEVKAR, R.; THAKORE, S. Synthesis and characterization of Mannich bases of lawsone and their anticancer activity. **Synthetic Communications**, v. 50, n. 11, p. 1724–1735, 2020. Disponível em: <https://doi.org/10.1080/00397911.2020.1755440>
- NCI - NATIONAL CANCER INSTITUTE. **Cancer Treatment: Types of Cancer Treatment: NCI**, [20--]. Disponível em: <https://www.cancer.gov/about-cancer/treatment/types>. Acesso em: 25 outubro. 2023
- NEWMAN, D. J.; CRAGG, G. M. Natural Products as Sources of New Drugs from 1981 to 2014. **Journal of Natural Products**, v. 79, n. 3, p. 629–661, 2016. Disponível em: <https://doi.org/10.1021/acs.jnatprod.5b01055>
- 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. Disponível em: <https://doi.org/10.1021/acs.jnatprod.9b01285>
- 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. Disponível em: <https://doi.org/10.5858/arpa.2011-0521-OA>
- NIRMALA, J. G.; LOPUS, M. Cell death mechanisms in eukaryotes. **Cell Biol Toxicol**, v. 36, p. 145–146, 2020. Disponível em: <https://doi.org/10.1051/jbio/2020002>

NYGREN, P. What is cancer chemotherapy? **Acta Oncologica**, v. 40, n. 2–3, p. 166–174, 2001. Disponível em: <https://doi.org/10.1080/02841860151116204>

OLIVEIRA, K. M.; HONORATO, J.; DEMIDOFF, F. C.; SCHULTZ, M. S.; NETTO, C. D.; COMINETTI, M. R.; CORREA, R. S.; BATISTA, A. A. Lapachol in the Design of a New Ruthenium(II)-Diphosphine Complex as a Promising Anticancer Metallodrug. **Journal of Inorganic Biochemistry**, v. 214, 2021. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.jinorgbio.2020.111289>

OLSON, M. F.; SAHAI, E. **The actin cytoskeleton in cancer cell motility**. [S. l.: s. n.] Disponível em: <https://doi.org/10.1007/s10585-008-9174-2>

OTTONI, F. M. **Síntese de glicosídeos do lapachol: protótipos potenciais de fármacos antineoplásicos**. 2014. Dissertação (Mestrado) - Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte - MG, 2014.

OTTONI, F. M.; GOMES, E. R.; PÁDUA, R. M.; OLIVEIRA, M. C.; SILVA, I. T.; ALVES, R. J. 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. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.bmcl.2019.126817>

OTTONI, F. M.; MARQUES, L. B.; RIBEIRO, J. M.; FRANCO, L. L.; S FILHO, J. D.; MAIA DE PÁDUA, R.; SOUZA-FAGUNDES, E. M.; ALVES, R. J. Synthesis of Lapachol-Based Glycosides and Glycosyl Triazoles with Antiproliferative Activity Against Several Cancer Cell Lines. **Research Article [Preprint]**, 2021. Disponível em: <https://doi.org/10.21203/rs.3.rs-916974/v1>

PEREYRA, C. E.; DANTAS, R. F.; FERREIRA, S. B.; GOMES, L. P.; SILVA, F. P. **The diverse mechanisms and anticancer potential of naphthoquinones**. [S. l.]: BioMed Central Ltd., 2019. Disponível em: <https://doi.org/10.1186/s12935-019-0925-8>

POLANSKI, J.; JANKOWSKA-POLANSKA, B.; ROSINCZUK, J.; CHABOWSKI, M.; SZYMANSKA-CHABOWSKA, A. Quality of life of patients with lung cancer. **OncoTargets and Therapy**, v. 9, p. 1023–1028, 2016. Disponível em: <https://doi.org/10.2147/OTT.S100685>

POPPER, H. H. Progression and metastasis of lung cancer. **Cancer and Metastasis Reviews**, v. 35, n. 1, p. 75–91, 2016. Disponível em: <https://doi.org/10.1007/s10555-016-9618-0>

RECK, M.; HEIGENER, D. F.; MOK, T.; SORIA, J. C.; RABE, K. F. Management of non-small-cell lung cancer: Recent developments. **The Lancet**, v. 382, n. 9893, p. 709–719, 2013. Disponível em: [https://doi.org/10.1016/S0140-6736\(13\)61502-0](https://doi.org/10.1016/S0140-6736(13)61502-0)

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. Disponível em: <https://doi.org/10.1038/nrm1496>

RIIHIMÄKI, M.; HEMMINKI, A.; FALLAH, M.; THOMSEN, H.; SUNDQUIST, K.; SUNDQUIST, J.; HEMMINKI, K. Metastatic sites and survival in lung cancer. **Lung**

Cancer, v. 86, n. 1, p. 78–84, 2014. Disponível em:
<https://doi.org/10.1016/j.lungcan.2014.07.020>

SATO, A.; YAMAMOTO, A.; SHIMOTSUMA, A.; OGINO, Y.; FUNAYAMA, N.; TAKAHASHI, Y.; HIRAMOTO, A.; WATAYA, Y.; KIM, H. S. Intracellular microRNA expression patterns influence cell death fates for both necrosis and apoptosis. **FEBS Open Bio**, v. 10, n. 11, p. 2417–2426, 2020. Disponível em:
<https://doi.org/10.1002/2211-5463.12995>

SAWANDA, N. O.; DIAS, A. M.; ZAGO, M. M. F. O efeito da radioterapia sobre a qualidade de vida dos pacientes com câncer de cabeça e pescoço. **Revista Brasileira de Cancerologia**, v. 52, n. 4, p. 323–329, 2006.

SCHABATH, M. B.; COTE, M. L. Cancer progress and priorities: Lung cancer. **Cancer Epidemiology Biomarkers and Prevention**, v. 28, n. 10, p. 1563–1579, 2019. Disponível em: <https://doi.org/10.1158/1055-9965.EPI-19-0221>

SEGAWA, K.; NAGATA, S. An Apoptotic “Eat Me” Signal: Phosphatidylserine Exposure. **Trends in Cell Biology**, v. 25, n. 11, p. 639–650, 2015. Disponível em:
<https://doi.org/10.1016/j.tcb.2015.08.003>

SHARAF, E. O.; FOUUDA, A.-M.; YOUSSEF, A. R.; HAMILTON, P.; MAXWELL, P.; WILLIAMSON, K. E. Reduction of mitomycin C resistance in human bladder cancer T24 cells by knocking-down ras oncogene. **Cancer Drug Resistance**, v. 1, n. 1, p. 59–71, 2018. Disponível em: <https://doi.org/10.20517/cdr.2017.01>

SHARMA, P.; SHARMA, J. D. **In vitro hemolysis of human erythrocytes-by plant extracts with antiplasmodial activity** *Journal of Ethnopharmacology*. [S. l.: s. n.]. Disponível em: www.elsevier.com/locate/jethpharm.

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.

SINGH, P.; ANAND, A.; KUMAR, V. **Recent developments in biological activities of chalcones: A mini review**. [S. l.]: Elsevier Masson SAS, 2014. Disponível em:
<https://doi.org/10.1016/j.ejmech.2014.08.033>

SOUZA, E. T.; LOPES, Wilson. A.; ANDRADE, J. B. de. Fontes, formação, reatividade e determinação de quinonas na atmosfera. **Química Nova**, v. 39, n. 4, p. 486–495, 2016. Disponível em: <https://doi.org/10.5935/0100-4042.20160034>

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. Disponível em: <https://doi.org/10.3322/caac.21499>

SUNG, H.; FERLAY, J.; SIEGEL, R. L.; LAVERSANNE, M.; SOERJOMATARAM, I.; JEMAL, A.; BRAY, F. 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. Disponível em:
<https://doi.org/10.3322/caac.21660>

TAKESHIMA, H.; USHIJIMA, T. **Accumulation of genetic and epigenetic alterations in normal cells and cancer risk.** [S. l.]: Nature Publishing Group, 2019. Disponível em: <https://doi.org/10.1038/s41698-019-0079-0>

VICHAJ, V.; KIRTIKARA, K. Sulforhodamine B colorimetric assay for cytotoxicity screening. **Nature Protocols**, v. 1, n. 3, p. 1112–1116, 2006. Disponível em: <https://doi.org/10.1038/nprot.2006.179>

WILD, C. P. *et al.* Cancer Prevention Europe. **Molecular Oncology**, v. 13, n. 3, p. 528–534, 2019. Disponível em: <https://doi.org/10.1002/1878-0261.12455>

XU, H.; CHEN, Q.; WANG, H.; XU, P.; YUAN, R.; LI, X.; BAI, L.; XUE, M. 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. Disponível em: <https://doi.org/10.1186/s13046-016-0455-3>

YAMAGUCHI, H.; CONDEELIS, J. **Regulation of the actin cytoskeleton in cancer cell migration and invasion.** [S. l.: s. n.] Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.bbamcr.2006.07.001>

YARROW, J. C.; PERLMAN, Z. E.; WESTWOOD, N. J.; MITCHISON, T. J. A high-throughput cell migration assay using scratch wound healing, a comparison of image-based readout methods. **BMC Biotechnology**, v. 4, 2004. Disponível em: <https://doi.org/10.1186/1472-6750-4-21>

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. Disponível em: <https://doi.org/10.1007/s00411-016-0659-0>

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. Disponível em: <https://doi.org/10.21037/tlcr.2016.06.07>

ZU, X.; XIE, X.; ZHANG, Y.; LIU, K.; BODE, A. M.; DONG, Z.; KIM, D. J. Lapachol is a novel ribosomal protein S6 kinase 2 inhibitor that suppresses growth and induces intrinsic apoptosis in esophageal squamous cell carcinoma cells. **Phytotherapy Research**, v. 33, n. 9, p. 2337–2346, 2019. Disponível em: <https://doi.org/10.1002/ptr.6415>

9. Apêndice



Título do trabalho:

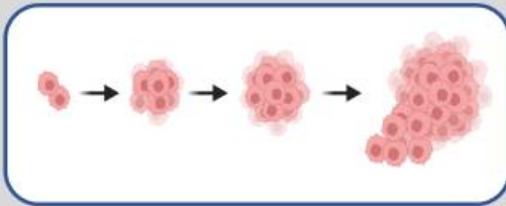
**AVALIAÇÃO DO POTENCIAL ANTITUMORAL
IN VITRO DE DERIVADOS GLICOSÍDICOS
DE LAPACHOL.**

Discente: Cristiane Almeida Santos Oliveira

Orientadora: Profa. Dra. Cristiane Bani Corrêa

Coorientador: Prof. Dr. Ricardo Scher.

→ Introdução



O câncer é o termo utilizado para nomear um grupo de mais de 100 diferentes doenças, cuja principal característica é o crescimento desordenado de células.

Os tratamentos para o câncer da atualidade atinge as células tumorais como também as células saudáveis, causando muitos efeitos colaterais.





Mais de 64% dos medicamentos anticâncer da atualidade são provenientes de produtos naturais

O Lapachol, extraída do Ipê Roxo, é uma importante precursora na síntese de novos compostos para tratamento de doenças, entre elas o câncer.

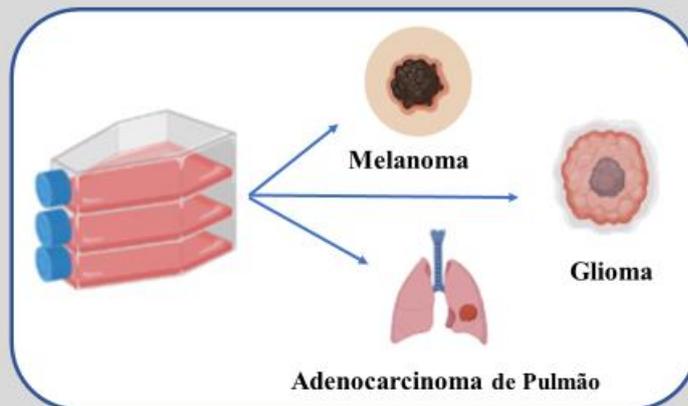


Nesse estudo foram avaliados 6 compostos derivados do lapachol.

Objetivo Geral

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

➔ Os 6 compostos foram avaliados em 3 linhagens tumorais de alta incidência, prevalência e mortalidade.

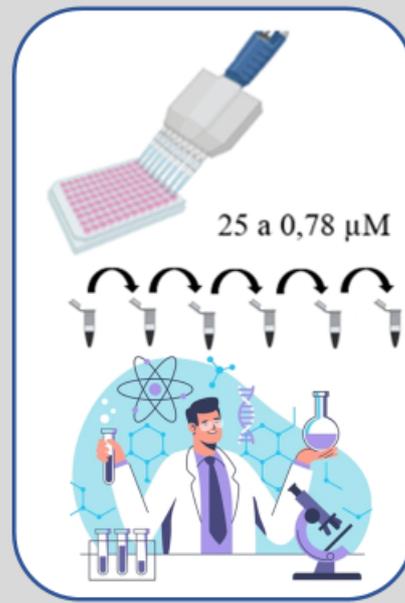


→ Metodologia x Resultados

→ Após screening farmacológico nas linhagens tumorais um dos compostos foi selecionado para experimentos posteriores em células de adenocarcinoma de pulmão.

→ O composto inibiu a formação de clones e colônias e reduziu a migração de células, como também induziram alterações características de apoptose. .

→ Ademais, o composto não apresentou toxicidade em células saudáveis.





PROCFIS
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS FISIOLÓGICAS



Os resultados indicam que o composto pode ter efeito, antiproliferativo, antimetastático e induz alterações morfológicas características de apoptose nas células de adenocarcinoma de pulmão.

<http://www.posgraduacao.ufs.br/procfis>