



UFBA

UNIVERSIDADE FEDERAL DA BAHIA
FACULDADE DE MEDICINA
FUNDAÇÃO OSWALDO CRUZ
INSTITUTO GONÇALO MONIZ



FIOCRUZ

Curso de Pós-Graduação em Patologia Humana

TESE DE DOUTORADO

**ESTUDO DO POTENCIAL ANTITUMORAL DA β -LAPACHONA E SEUS
DERIVADOS 3-iodo EM CÉLULAS DE CARCINOMA ESCAMOCELULAR ORAL**

ROSANE BORGES DIAS

Salvador – Bahia

2018

UNIVERSIDADE FEDERAL DA BAHIA

FACULDADE DE MEDICINA

FUNDAÇÃO OSWALDO CRUZ

INSTITUTO GONÇALO MONIZ

Curso de Pós-Graduação em Patologia

**ESTUDO DO POTENCIAL ANTITUMORAL DA β -LAPACHONA E SEUS
DERIVADOS 3-iodo EM CÉLULAS DE CARCINOMA ESCAMOCELULAR ORAL**

ROSANE BORGES DIAS

Orientadora: Clarissa Araújo Gurgel Rocha

Co-orientador: Daniel Pereira Bezerra

Tese apresentada ao Curso de Pós-Graduação em Patologia Humana, como requisito obrigatório para obtenção do grau de Doutor.

Salvador – Bahia

2018

Ficha Catalográfica elaborada pela Biblioteca do
Instituto Gonçalo Moniz / FIOCRUZ - Salvador - Bahia.

Dias, Rosane Borges
M541e Estudo do potencial antitumoral da β -lapachona e seus derivados 3-iodo em
células de carcinoma escamocelular oral. / Rosane Borges Dias. - 2018.
103 f. : il. ; 30 cm.

Orientador: Prof^a. Dr^a. Clarissa Araújo Gurgel Rocha, Laboratório de
Patologia e Biologia Molecular.

Tese (Doutorado em Patologia) – Universidade Federal da Bahia, Faculdade
de Medicina. Fundação Oswaldo Cruz, Instituto Gonçalo Moniz, 2018.

1. Câncer oral. 2. Quimioterapia. 3. Produtos naturais. I. Título.

CDU 616-006.6:615.28

Título da Tese: " ESTUDO DO POTENCIAL ANTITUMORAL DA β -LAPACHONA E SEUS DERIVADOS 3-IODO EM CÉLULAS DE CARCINOMA ESCAMOLECULAR"

ROSANE BORGES DIAS

FOLHA DE APROVAÇÃO

Salvador, 19 de fevereiro de 2018

COMISSÃO EXAMINADORA



Dr. Ricardo Della Coletta
Professor Associado
UNICAMP



Dr. Ivan Marcelo Gonçalves Agra
Professor
UFBA



Dr. Luiz Antonio Rodrigues de Freitas
Pesquisador
IGM/Fiocruz



Dra. Dalila Luciola Zanette
Pesquisadora
IGM/Fiocruz



Dra. Clarissa Araújo Gurgel Rocha
Pesquisadora
IGM/Fiocruz

Aos meus pais Edite e José Maria,

Por todo apoio, incentivo e amor incondicional.

AGRADECIMENTOS

À DEUS,

Pela vida e por ser tão presente em meus dias, iluminando meu caminho.

À minha mãe Edite,

Por todo amor, apoio, incentivo e conselhos sábios, e principalmente, por ser presente em todos os momentos mesmo com a distância física. Obrigada por ser o meu melhor exemplo e também por compartilhar, com tanto orgulho e alegria, minhas conquistas.

Ao meu pai José Maria,

Pelo amor, carinho, incentivo e por ser meu grande exemplo de força, fé e determinação.

À minha querida orientadora Profa. Dra. Clarissa Gurgel,

Por ter despertado o meu interesse e amor pela vida acadêmica e pesquisa científica, desde o início da minha graduação em Odontologia. Muito obrigada pelo apoio, incentivo, carinho, convivência, aprendizado e oportunidades que contribuíram com o meu crescimento profissional e científico. Tenho uma grande admiração, orgulho e carinho por você.

Ao meu co-orientador Dr. Daniel Pereira Bezerra,

Pelo apoio incondicional, pelas oportunidades científicas e por toda contribuição fundamental desde a idealização deste trabalho. Obrigada também por ter me acolhido no seu grupo de pesquisa.

À Raíza Dias de Freitas e Taís Bacelar,

Pelo apoio incondicional, carinho, amizade e também por todos os momentos compartilhados. Vocês foram essenciais durante esta jornada.

À Caroline Brandi Schlaepfer Sales,

Pela amizade e cumplicidade desde o início da minha trajetória na pós-graduação. Obrigada por todo apoio, incentivo, aprendizados, conselhos e por contribuir para a realização e análise dos experimentos de expressão gênica e análise histopatológica deste trabalho.

Ao querido Prof. Dr. Eduardo Antônio Gonçalves Ramos,

Pelo apoio, carinho, incentivo e colaboração. Obrigada também pela análise histopatológica deste trabalho, que contribui imensamente para o meu aprendizado.

Às meninas do grupo de pesquisa Biopatologia,

Pela parceria, amizade e apoio durante esta jornada.

À Ludmila de Faro Valverde,

Pelo carinho, amizade, apoio, preocupação e cumplicidade desde o início da pós-graduação. Obrigada por contribuir para a realização dos experimentos de expressão gênica e *in vivo* deste trabalho.

Ao meu noivo Paulo Henrique,

Pelo amor, carinho, paciência, apoio, incentivo e pelos momentos alegres e especiais.

Aos meus avós (*in memorian*), Tudinha e Didi,

Por terem sido uma fonte inesgotável de amor, carinho, doçura e sabedoria em minha vida. Vocês são os espíritos protetores que iluminam minha caminhada.

Aos meus irmãos, especialmente Rafael e Wanierbonn,

Pelo carinho, cumplicidade e por acreditarem nos meus sonhos.

Às minhas primas, especialmente, Aleíse e Maria Helena,

Pelo amor, carinho, amizade e cumplicidade durante toda a minha vida.

Ao meu primo Allan Borges,

Pelo carinho, incentivo e auxílios científicos.

Às famílias Borges e Dias,

Pelo incentivo, carinho e por todos os momentos de alegrias.

À minha cachorrinha Malu,

Pelo amor, alegrias e cumplicidade incondicional.

À minha amiga Maria Edna,

Pela sua amizade especial e por ser tão presente. Foi muito importante ter o seu carinho, apoio e conforto em todos os momentos.

Aos meus queridos amigos, especialmente Ana Paula, Cinara, Danilo Araújo, Indira, Louise, Nanashara, Otoniel, Renata Oliveira, Suian e Valdenizia,

Pelo apoio, amizade, risadas e momentos de alegria compartilhados.

À Manuela Vidal e Vanessa Guimarães,

Pelo apoio, carinho e por transmitirem leveza e alegria no dia-a-dia do nosso Biopatologia.

À querida Arlinda,

Pelas orações, amor e carinho de sempre.

Ao Laboratório de Patologia e Biologia Molecular, especialmente Prof. Dr. Mittermayer,

Pela oportunidade em fazer do laboratório e pela imensa contribuição na minha formação acadêmica.

Ao Laboratório de Engenharia Tecidual e Imunofarmacologia (LETI), especialmente Dr. Diogo Moreira, Dra Milena Botelho, Cássio Santana e Tatiana Barbosa,

Por terem me acolhido com tanto carinho e pela imensa contribuição científica nesta jornada.

Ao Grupo de Câncer do LETI,

Pelo carinho, cumplicidade e por compartilharem os ensinamentos de cultura celular.

À Ana Carolina Borges e Letícia Palmeira,

Pelo apoio e por terem sido fundamentais para realização do estudo *in vivo* deste trabalho.

À Lucyvera, Rute Vivas e Cleiton Guimarães,

Pela disponibilidade em me ajudar em todos os momentos.

Ao Prof. Dr. Ricardo Della Coletta,

Pela contribuição científica e doação das células para a realização deste estudo.

Ao Prof. Dr. José Maria Barbosa Filho,

Por contribuir com a realização deste estudo através da disponibilização dos compostos-teste.

Aos professores da minha banca de qualificação,

Pela disponibilidade e contribuições.

Ao Instituto Gonçalo Moniz,

Por contribuir com o meu crescimento científico e oferecer toda a infraestrutura física, científica e tecnológica para a realização deste trabalho.

À Coordenação de Ensino, especialmente Ana Carolina, Noélia e Simone,

Por colaborar com minhas solicitações e dúvidas.

Ao Serviço de Microscopia,

Pela imensa colaboração com as análises microscópicas.

À Plataforma de Citometria de Fluxo, especialmente Liliane e Rafaela,

Por contribuir na realização dos experimentos de citometria de fluxo.

Ao Serviço de Histotecnologia,

Pela imensa colaboração com o preparo e coloração das lâminas utilizadas neste trabalho.

Ao Serviço do Biotério,

Por contribuir na realização do estudo *in vivo*.

Biblioteca do IGM,

Pela contribuição e cuidados na revisão das normas desta tese.

Ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq),

Pela concessão da bolsa de estudos e pelo auxílio financeiro deste trabalho.

“Pode-se viver no mundo uma vida magnífica quando se sabe trabalhar e amar. Trabalhar pelo que se ama e amar aquilo em que se trabalha.”

(Leon Tolstói)

DIAS, Rosane Borges. Estudo do potencial antitumoral da β -lapachona e seus derivados 3-iodo em células de carcinoma escamocelular oral. 103 f. il. Tese (Doutorado em Patologia) – Fundação Oswaldo Cruz, Instituto Gonçalo Moniz, Salvador, 2018.

RESUMO

INTRODUÇÃO: A pesquisa oncológica tem sido amplamente incentivada na busca do conhecimento sobre a patogênese, alvos terapêuticos e pesquisa de novos grupos farmacológicos que possam atuar no controle do câncer. Dentro desta perspectiva, os produtos naturais representam uma fonte tradicional e importante de novos fármacos com atividade antitumoral. **OBJETIVO:** Estudar os efeitos da β -lapachona e seus derivados 3-iodo (3-I- α -lapachona e 3-I- β -lapachona) sobre a proliferação, morte celular, expressão de alguns genes alvos relacionados ao câncer e o potencial antineoplásico *in vivo* em células de carcinoma escamocelular oral (CEO). **MATERIAL E MÉTODOS:** Inicialmente, a citotoxicidade foi avaliada contra diferentes células tumorais e não tumorais através do ensaio do alamar blue. Ensaio em microscópio óptico e citometria de fluxo foram realizados para estudar os efeitos sobre o ciclo celular e o padrão de morte celular, utilizando a linhagem de CEO HSC3, como modelo celular. Os efeitos sobre a expressão de diversos genes de alvos relacionados ao câncer foram avaliados em células HSC3 através de qPCR. Em sequência, a eficácia antitumoral *in vivo* foi avaliada em modelo de xenotransplante utilizando a linhagem HSC3. **RESULTADOS:** A β -lapachona e seus derivados 3-iodo apresentaram atividade citotóxica potentes contra diferentes linhagens tumorais humanas, sendo os derivados 3-iodo mais potente que a β -lapachona para várias células testadas. Os compostos foram capazes de induzir parada do ciclo celular na fase G₂/M, o qual é seguido de fragmentação do DNA internucleosomal, em células HSC3. O tratamento com β -lapachona e seus derivados 3-iodo promoveu um aumento significativo na externalização de fosfatidilserina, ativação de caspases 8 e 9, despolarização mitocondrial, produção de espécies reativas de oxigênio (ERO) e morfologia típica de morte celular por apoptose em células HSC3. A apoptose induzida pelos compostos-teste foi prevenida com o pré-tratamento com um inibidor não seletivo de caspases (Z-VAD-FMK) e um antioxidante (N-acetil-L-Cisteína). Ainda, uma superexpressão de genes relacionados a apoptose foi observada após o tratamento com os compostos-teste. No estudo *in vivo*, a β -lapachona e seus derivados 3-iodo reduziram significativamente o tamanho tumoral. Os animais tratados com os compostos-teste não apresentaram alterações significantes nos parâmetros bioquímicos, hematológicos e histológicos. **CONCLUSÕES:** A β -lapachona e seus derivados 3-iodo apresentam atividade citotóxica promissora, sendo os derivados 3-iodo mais potente que a β -lapachona para várias células testadas, induzem bloqueio do ciclo celular na fase G₂/M e morte celular por apoptose mediada por caspases e ERO em células de CEO. Além disso, a β -lapachona e seus derivados 3-iodo também foram capazes de reduzir o crescimento tumoral *in vivo*, indicando que estes compostos-teste representam novos candidatos a fármacos antitumorais.

Palavras-chave: Câncer oral, Quimioterapia, Produtos naturais.

DIAS, Rosane Borges. Study of the antitumor potential of β -lapachone and its 3-iodine derivatives in oral squamous cell carcinoma cells. 103 f. il. Tese (Doutorado em Patologia) – Fundação Oswaldo Cruz, Instituto Gonçalo Moniz, Salvador, 2018.

ABSTRACT

INTRODUCTION: The oncology research has been widely encouraged in the pursuit of knowledge over the pathogenesis, therapeutic targets and research of new pharmacological groups of drugs that may act on the control of cancer. In addition, natural products represent a traditional and important source in the search for new drugs with antitumor activity. **AIM:** To study the effects of β -lapachone and its 3-iodine derivatives (3-I- α -lapachone and 3-I- β -lapachone) on proliferation, cell death and expression of target genes related to cancer in oral squamous cell carcinoma (OSCC). **MATERIAL AND METHODS:** Initially, cytotoxicity was evaluated against different tumor cells and non-tumor cells by the alamar blue assay. Optical microscope and flow cytometry assays were performed to study the effects on the cell cycle and cell death pattern, using the OSCC cell line, HSC3, as a cellular model. The effects on the expression of various genes related to cancer targets were evaluated in HSC3 cells by qPCR. In sequence, study of antitumor efficacy in vivo was evaluated in xenograft model using the HSC3 cell line. **RESULTS:** β -lapachone and its 3-iodine derivatives showed potent cytotoxic activity against different types of tumor human cells, which 3-iodo derivatives were more potent than β -lapachone for several cells tested. The compounds were able to induce cell cycle arrest in the G₂/M phase, which is followed by fragmentation of the internucleosomal DNA in HSC3 cells. The treatment with β -lapachone and its 3-iodine derivatives promoted a significant increase in phosphatidylserine expression, activation of caspases-8 and -9, mitochondrial depolarization, production of reactive oxygen species (ROS) and typical morphology of apoptotic cell death in HSC3 cells. The apoptosis induced by the compounds was prevented by the pre-treatment with a pan-caspase inhibitor (Z-VAD-FMK) and an antioxidant (N-acetyl-L-Cysteine). In the in vivo study, β -lapachone and its 3-iodine derivatives significantly reduced the tumor size. Animals treated with the compounds didn't show any significant changes in the biochemical, hematological and histological parameters. **CONCLUSIONS:** β -lapachone and its 3-iodine derivatives show promising cytotoxic activity, which 3-iodo derivatives are more potent than β -lapachone for several cells tested, induce cell cycle block in G₂/M phase and cell death by caspases- and ROS-mediated apoptosis in OSCC cells. In addition, β -lapachone and its 3-iodine derivatives were also able to reduce tumor growth in vivo, indicating that these test compounds represent new candidates as antitumor drugs.

Key words: Oral cancer, Quimiotherapy, Natural products.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1.	Estrutura química da β -lapachona e seus derivados, 3-I- α -lapachona e 3-I- β -lapachona	24
Figura 2.	Efeito da β -lapachona e seus derivados 3-iodo no modelo 3D <i>in vitro</i> de esferoides multicelulares de câncer formados a partir de células HSC3	45
Figura 3.	Efeito da β -lapachona e seus derivados 3-iodo sobre a viabilidade de células HSC3, determinado pelo ensaio de exclusão do corante azul de tripam após 12, 24, 48 e 72 horas de tratamento	47
Figura 4.	Histogramas representativos da análise da progressão do ciclo celular após o tratamento com β -lapachona e seus derivados 3-iodo	50
Figura 5.	Fotomicrografias representativas da análise morfológica de células HSC3 através da coloração com May-Grünwald-Giemsa após o tratamento com β -lapachona e seus derivados 3-iodo	52
Figura 6.	Dotplots representativos das características de dispersão da luz em células HSC3 tratadas com β -lapachona e seus derivados 3-iodo	53
Figura 7.	Efeito da β -lapachona e seus derivados 3-iodo sobre a externalização da fosfatidilserina em células HSC3 determinando por citometria de fluxo usando anexinaV-FITC	55
Figura 8.	Dotplots representativos do efeito da β -lapachona e seus derivados 3-iodo sobre a externalização da fosfatidilserina de células HSC3 determinados por citometria de fluxo usando anexinaV-FITC e IP	56
Figura 9.	Efeito da β -lapachona e seus derivados 3-iodo sobre a externalização da fosfatidilserina em células HSC3 determinando por citometria de fluxo usando anexina V-FITC com o pré-tratamento com inibidor Z-VAD(Ome)-FMK	57
Figura 10.	Dotplots representativos dos efeitos do inibidor Z-VAD(Ome)-FMK sobre a externalização da fosfatidilserina de células HSC3 tratadas com β -lapachona e seus derivados 3-iodo, determinados por citometria de fluxo usando anexina V-FITC	58
Figura 11.	Efeito da β -lapachona e seus derivados 3-iodo na atividade das caspases 8 e 9 determinada por ensaio colorimétrico após 72 horas de incubação	59
Figura 12.	Efeito da β -lapachona e seus derivados 3-iodo sobre o potencial transmembrânico de células HSC3 determinado por citometria de fluxo usando rodamina 123	60
Figura 13.	Efeito da β -lapachona e seus derivados 3-iodo sobre os níveis de espécies reativas de oxigênio em células HSC3 após 1 e 3 h determinado por citometria de fluxo	62

Figura 14.	Efeito da β -lapachona e seus derivados 3-iodo sobre os níveis de espécies reativas de oxigênio em células HSC3 determinado por citometria de fluxo com o pré-tratamento com NAC e catalase	63
Figura 15.	Efeito da β -lapachona e seus derivados 3-iodo sobre a externalização da fosfatidilserina em células HSC3 determinando por citometria de fluxo usando anexina V-FITC com o pré-tratamento com o antioxidante NAC, após 72h de tratamento com os compostos-teste	64
Figura 16.	Dotplots representativos dos efeitos do antioxidante N-acetil-L-cisteína (NAC) sobre a externalização da fosfatidilserina de células HSC3 tratadas com β -lapachona e seus derivados 3-iodo, determinados por citometria de fluxo usando anexina V-FITC	65
Figura 17.	Efeito da β -lapachona e seus derivados 3-iodo sobre os níveis óxido nítrico em células HSC3 após 1 h determinado por citometria de fluxo	66
Figura 18.	Efeito da β -lapachona e seus derivados 3-iodo sobre os níveis óxido nítrico em células HSC3 após 1 h determinado por citometria de fluxo	67
Figura 19.	Perfil de expressão de genes associados à apoptose, proliferação, migração e sobrevivência celular em células HSC3 tratadas com a β -lapachona e de seus derivados 3-iodo	71
Figura 20.	Fotomicrografias representativas dos tumores HSC3 tratados com β -lapachona e seus derivados 3-iodo	77
Figura 21.	Fotomicrografias representativas dos órgãos dos animais tratados com β -lapachona e seus derivados 3-iodo.	84
Figura 22.	Resumo dos mecanismos de ação da β -lapachona e seus derivados 3-iodo em células HSC3	91
Figura A1	Genes da placa <i>TaqMan Array Human Molecular Mechanisms of Cancer</i> (Life Technologies®)	101

LISTA DE TABELAS

Tabela 1.	Linhagens tumorais humanas utilizadas no ensaio de citotoxicidade	28
Tabela 2.	Atividade citotóxica da β -lapachona e seus derivados 3-iodo	42
Tabela 3.	Índice de seletividade da β -lapachona e seus derivados 3-iodo	43
Tabela 4.	Atividade citotóxica da β -lapachona e seus derivados 3-iodo no modelo 3D <i>in vitro</i> em células HSC3	44
Tabela 5.	Efeito da β -lapachona e seus derivados 3-iodo sobre o ciclo celular e fragmentação do DNA internucleosomal em células HSC3	49
Tabela 6.	Efeito da β -lapachona e de seus derivados 3-iodo sobre a massa tumoral em camundongos inoculados com células HSC3	72
Tabela 7.	Efeito da β -lapachona e seus derivados sobre os parâmetros histológicos de tumores HSC3	76
Tabela 8.	Efeito da β -lapachona e seus derivados 3-iodo sobre a massa corpórea e a massa úmida dos órgãos de camundongos inoculados com células HSC3	79
Tabela 9.	Efeito da β -lapachona e seus derivados 3-iodo sobre os parâmetros hematológicos de sangue periférico de camundongos inoculados com células HSC3	80
Tabela 10.	Efeito da β -lapachona e seus derivados 3-iodo sobre os parâmetros bioquímicos de sangue periférico de camundongos inoculados com células HSC3	81
Tabela A1. (Apêndice)	Efeito da β -lapachona e seus derivados 3-iodo sobre a expressão de genes alvos relacionados ao câncer em células HSC3	102

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

AKT	<i>Protein kinase B(PKB)</i>
BCL2	Gene <i>Human B-cell lymphoma 2</i>
CCND1	Ciclina D1
CEO	Carcinoma escamocelular oral
CI₅₀	Concentração inibitória de 50%
Cq	<i>Quantification cycle</i>
DAF-FM diacetate	<i>4-amino-5-methylamino-2', 7'-difluo fluorescein diacetate</i>
DCF-DA	diacetato de 2,7-diclorodihidrofluoresceína
DMSO	Dimetilsulfóxido
EP	Erro padrão
ERRO	Espécies reativas de oxigênio
FDA	Food and Drug Administration
FIOCRUZ	Fundação Oswaldo Cruz
FOP – UNICAMP	Faculdade de Odontologia de Piracicaba da Universidade de Campinas
HPV	<i>Human Papiloma vírus</i>
HTS	<i>High Throughput Screening</i>
IARC	<i>International Agency for Research on Cancer</i>
INCA	Instituto Nacional de Câncer
IS	Índice de Seletividade
MAPK	<i>Mitogen-activated protein kinase</i>
NAC	N-acetilcisteína
NIH	<i>National Institute of Health</i>
OMS	Organização Mundial de Saúde
PBMC	<i>Peripheral blood mononuclear cell</i>
IP	Iodeto de propídio
RPMI 1640	Meio de cultura criado pelo <i>Roswell Park Memorial Institute</i>

RQ	Quantificação relativa de RNAm
SCID	<i>Severe combined immunodeficiency</i>
SFB	Soro fetal bovino
TNM	TNM Classificação de tumores malignos
UFBA	Universidade Federal da Bahia
UICC	<i>Union for International Cancer Control</i>
VEGF	<i>Vascular endothelial growth factor</i>
WHO	<i>World Health Organization</i>
WNT	Do inglês, <i>wingless type</i>
Z-VAD-FMK	Inibidor de caspases Z-VAD-FMK (<i>carbobenzoxy-valyl-alanyl-aspartyl-[O-methyl]-fluoromethylketone</i>)

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	18
1.1	CÂNCER: ASPECTOS GERAIS	18
1.2	CARCINOMA ESCAMOCELULAR ORAL	20
1.3	β -LAPACHONA E SEUS DERIVADOS 3-iodo	22
2	JUSTIFICATIVA	25
3	HIPÓTESE	25
4	OBJETIVOS	26
4.1	OBJETIVO GERAL	26
4.2	OBJETIVOS ESPECÍFICOS	26
5	MATERIAL E MÉTODOS	27
5.1	OBTENÇÃO DA β -LAPACHONA E SEUS DERIVADOS 3-iodo	27
5.2	CARACTERIZAÇÃO DO ESTUDO	27
5.3	OBTENÇÃO E MANUTENÇÃO DAS CÉLULAS EM CULTURA	27
5.4	OBTENÇÃO DAS CÉLULAS PBMC	29
5.5	ENSAIO DO ALAMAR BLUE PARA AVALIAÇÃO DA CITOTOXICIDADE DA β -LAPACHONA E SEUS DERIVADOS 3-iodo	30
5.6	FORMAÇÃO DE ESFERAS E TRATAMENTO COM OS COMPOSTOS TESTE EM CULTURA 3D	30
5.7	ESTUDOS SOBRE O CICLO CELULAR E PADRÃO DE MORTE CELULAR	31
5.7.1	<i>Determinação do ciclo celular e fragmentação do DNA internucleosomal</i>	31
5.7.2	<i>Análise morfológica</i>	32
5.7.3	<i>Determinação da externalização de fosfatidilserina</i>	32
5.7.4	<i>Ensaio de ativação das caspases 8 e 9</i>	33
5.7.5	<i>Avaliação do potencial transmembrânico mitocondrial</i>	33
5.7.6	<i>Avaliação da atividade citotóxica de β-lapachona e seus derivados 3-iodo em células de fibroblastos embrionário nocauteadas para o gene BAD</i>	33
5.7.7	<i>Ensaio de quantificação dos níveis de espécies reativas de oxigênio intracelular</i>	34
5.7.8	<i>Ensaio de quantificação de óxido nítrico intracelular</i>	34

5.7.9	<i>Ensaio de quantificação de ânions de superóxido intracelular</i>	34
5.7.10	<i>Ensaio de reversão com inibidor de caspases, antioxidante NAC e catalase</i>	35
5.7.11	<i>Ensaio de intercalação de DNA</i>	35
5.8	ANÁLISE DA EXPRESSÃO GÊNICA POR PCR ARRAY	36
5.8.1	<i>Isolamento de RNA total e transcrição reversa</i>	36
5.8.2	<i>PCR Array</i>	37
5.9	ENSAIO DE EFICÁCIA ANTITUMORAL IN VIVO DA β-LAPACHONA E SEUS DERIVADOS 3-iodo	37
5.9.1	<i>Considerações Éticas</i>	37
5.9.2	<i>Desenho experimental</i>	37
5.9.3	<i>Avaliação toxicológica sistêmica</i>	38
5.9.4	<i>Análise histológica</i>	38
5.10	<i>Análise estatística</i>	39
6	RESULTADOS	40
6.1	EFEITOS DA β-LAPACHONA E SEUS DERIVADOS 3-iodo NA ATIVIDADE CITOTÓXICA EM DIFERENTES LINHAGENS DE CÉLULAS TUMORAIS HUMANAS	40
6.2	EFEITO DA β-LAPACHONA E SEUS DERIVADOS 3-iodo SOBRE A FORMAÇÃO DE ESFERAS EM CULTURA EM 3D	44
6.3	EFEITO DA β-LAPACHONA E SEUS DERIVADOS 3-iodo SOBRE O CICLO CELULAR E PADRÃO DE MORTE CELULAR EM CÉLULAS DE CEO	46
6.3.1	<i>Efeito da β-lapachona e seus derivados 3-iodo sobre a viabilidade de células HSC3</i>	46
6.3.2	<i>Efeito da β-lapachona e seus derivados 3-iodo sobre o ciclo celular e fragmentação do DNA internucleosomal em células HSC3</i>	48
6.3.3	<i>Efeito da β-lapachona e seus derivados 3-iodo sobre a morfologia das células HSC3</i>	51
6.3.4	<i>Efeito da β-lapachona e seus derivados 3-iodo sobre a externalização da fosfatidilserina em células HSC3</i>	54
6.3.5	<i>Efeito da β-lapachona e seus derivados 3-iodo na atividade das caspases 8 e 9</i>	59
6.3.6	<i>Efeito da β-lapachona e seus derivados 3-iodo sobre a despolarização</i>	60

	<i>mitochondrial</i>	
6.3.7	<i>Efeito da atividade citotóxica de β-lapachona e seus derivados 3-iodo em células de fibroblastos embrionário nocauteadas para o gene BAD</i>	61
6.3.8	<i>Efeito da β-lapachona e seus derivados 3-iodo na produção de espécies reativas de oxigênio</i>	62
6.3.9	<i>Efeito da β-lapachona e seus derivados 3-iodo na produção de óxido nítrico intracelular</i>	66
6.3.10	<i>Efeito da β-lapachona e seus derivados 3-iodo na produção de ânions de superóxido intracelular</i>	67
6.3.11	<i>Efeito da β-lapachona e seus derivados 3-iodo sobre a intercalação de DNA</i>	68
6.4	EFEITO DA β-LAPACHONA E DE SEUS DERIVADOS 3-iodo SOBRE A EXPRESSÃO DE GENES ALVOS RELACIONADOS AO CÂNCER EM CÉLULAS HSC3	68
6.5	EFICÁCIA ANTITUMORAL DA β-LAPACHONA E DE SEUS DERIVADOS 3-iodo EM MODELO DE XENOTRANSPLANTE UTILIZANDO CÉLULAS HSC3	72
6.5.1	<i>Análise histopatológica dos tumores HSC3 após o tratamento com β-lapachona e seus derivados 3-iodo</i>	73
6.5.2	<i>Efeito da β-lapachona e de seus derivados 3-iodo na toxicidade sistêmica de camundongos inoculados com células HSC3</i>	78
6.5.3	<i>Análise histopatológica dos órgãos dos animais após tratamento com β-lapachona e seus derivados 3-iodo</i>	82
7	DISCUSSÃO	85
8	CONCLUSÕES	92
	REFERÊNCIAS	93
	ANEXOS	101
	APÊNDICES	102

1 INTRODUÇÃO

1.1 CÂNCER: ASPECTOS GERAIS

O câncer é responsável por mais de seis milhões de óbitos por ano, constituindo-se um evidente problema de saúde pública. A previsão é que, em 2030, existam 27 milhões de casos novos da doença e 17 milhões de mortes por câncer (OMS, 2007). No Brasil, as neoplasias malignas despontam como a segunda causa de morte, perdendo apenas para as doenças coronarianas, sendo que 600 mil casos novos de câncer foram previstos no biênio 2018/2019, para cada ano, segundo a última estimativa do Instituto Nacional do Câncer (INCA) (BRASIL, INCA, 2018).

A transformação maligna é mediada por mutações genéticas e alterações epigenéticas em genes supressores de tumor e oncogenes, favorecendo, assim, o desenvolvimento, progressão e metástase. As alterações genéticas e epigenéticas favorecem a aquisição de características fenotípicas durante o desenvolvimento e progressão tumorais como potencial replicativo ilimitado, evasão da apoptose, indução da angiogênese, auto-suficiência em sinais de crescimento, insensibilidade aos sinais antiproliferativos, invasão tecidual, metástase, instabilidade genômica, ambiente inflamatório favorável ao crescimento tumoral, desregulação do metabolismo energético celular e escape do sistema imune (HANAHAN, WEINBERG 2000; HANAHAN, WEINBERG 2011).

Ao longo das últimas décadas, os questionamentos científicos mais frequentes estão relacionados às recidivas dos tumores e a cura quando há metástases. Neste contexto, uma resistência primária ou adquirida a agentes quimioterápicos e biológicos tem sido responsável pela falha de muitos dos agentes utilizados no tratamento oncológico (DAWOOD et al., 2014). Isso pode ser explicado pela presença da heterogeneidade intratumoral e a complexidade molecular de muitos tipos de câncer, de modo que, embora algumas das células tumorais sofram morte com a exposição à quimioterapia, outras células sobrevivem e contribuem para recorrência e progressão do tumor (HANAHAN, WEINBERG 2011). Os fatores que contribuem para a heterogeneidade intratumoral e, finalmente, a resistência adquirida a agentes quimioterápicos e biológicos incluem mutações genéticas, interações com o microambiente e a presença de células-tronco tumorais (HANAHAN, WEINBERG 2011).

Diante do conhecimento sobre a participação do microambiente tumoral e das células-tronco tumorais no desenvolvimento e progressão tumoral, a investigação de vias de sinalização embrionárias, como a WNT e Hedgehog, e de outras vias envolvidas durante a carcinogênese, como MAPK e PI3K/Akt, tem se destacado como um dos campos mais intrigantes nos estudos da patogênese de neoplasias malignas, principalmente para o desenvolvimento de novos alvos terapêuticos (TAKEBE et al., 2011; TAKEBE et al., 2015; SAEZ-RODRIGUEZ, MACNAMARA, COOK; 2015).

O tratamento oncológico é um campo altamente dinâmico e o desenvolvimento de novas estratégias terapêuticas proporcionou avanços significativos na área da oncologia. Com os grandes avanços tecnológicos e científicos, o tratamento do câncer é baseado, principalmente, na abordagem convencional, multidisciplinar e envolve uma combinação de modalidades terapêuticas que variam dependendo do diagnóstico de cada paciente (MITRA et al., 2015). Dentro desta perspectiva, sabe-se que, os produtos naturais são uma fonte produtiva de novas moléculas e fármacos com potencial anticâncer, principalmente aqueles derivados de plantas medicinais, os quais são amplamente estudados pelos grupos de pesquisa em oncologia, e consistem em uma alternativa cada vez mais real e viável de tratamento para diversos tipos de câncer (KIM et al., 2010).

Segundo o Instituto Nacional de Câncer dos Estados Unidos, mais de dois terços dos fármacos utilizados no tratamento do câncer aprovados pelo FDA entre o período de 1940 e 2006, são produtos naturais ou foram desenvolvidos com base no conhecimento adquirido a partir de produtos naturais (EFFERTH et al., 2010). Este dado justifica o esforço contínuo de cientistas em busca de um maior conhecimento acerca do assunto, o que poderá corroborar para futuras descobertas de tratamentos mais inovadores e efetivos para o tratamento do câncer. Essa fonte tem grande importância nos estudos de desenvolvimento de novos fármacos, principalmente no Brasil, país que possui uma rica biodiversidade de fontes naturais associado a uma alta prevalência e variedade da doença (VIEIRA et al., 2010).

Dentre as classes farmacológicas dos produtos naturais que representam uma fonte importante na pesquisa de novos fármacos com atividade antitumoral, destacam-se as quinonas, as quais têm recebido uma atenção importante da indústria farmacêutica, pela diversidade de ações biológicas, incluindo citotoxicidade para células cancerosas (SUNASSEE et al., 2013). As quinonas, juntamente com os seus derivados, tem mostrado resultados interessantes na literatura, sendo considerados

como potentes agentes quimioterápicos inclusive para células cancerosas resistentes aos fármacos clássicos, como é o caso da β -lapachona, bem como seus derivados (OUGH et al., 2005; SEONE et al., 2013; KUNG et al., 2014; JEON et al., 2015; WU et al., 2016; YANG et al., 2017).

1.2 CARCINOMA ESCAMOCELULAR ORAL

O câncer de cabeça e pescoço é a sexta neoplasia maligna mais comum no mundo, sendo considerado um problema de saúde pública mundial. Estimativas da agência internacional para pesquisa em câncer (IARC) apontaram que ocorreriam, no mundo, cerca de 320 mil casos novos e 157 mil óbitos, para o ano de 2015, por câncer de boca e lábio, sendo que 80% desses em países em desenvolvimento (FERLAY et al., 2015).

Neste contexto, a última estimativa para o Brasil, publicada pelo INCA referente ao biênio 2018/2019, estimou-se 15.700 casos novos de câncer da cavidade oral, sendo 11.200 em homens e 3.500 em mulheres. Esses valores correspondem a um risco estimado de 10,86 casos novos a cada 100 mil homens, ocupando a quinta posição; e de 3,28 para cada 100 mil mulheres, sendo o 12º mais frequente entre todos os tipos de cânceres. Na região Nordeste, sem considerar os tumores de pele não melanoma, o câncer de boca é o quinto mais frequente em homens. Adicionalmente, a Bahia é o estado responsável pelo maior número de casos da região Nordeste, ocupando o sexto lugar na incidência de todo o país (BRASIL, INCA, 2018). O carcinoma escamocelular oral (CEO) é o tipo histológico mais frequente dos tumores malignos da cavidade oral, correspondendo a 95% dos casos diagnosticados (BHARGAVA, SAIGAL, CHALISHAZAR, 2010; JEMAL, BRAY, FERLAY, 2011; RODRIGUES et al., 2014). O tabaco e o álcool são os principais fatores de risco associados ao CEO (HUNTER, PARKINSON, HARRISON, 2005; JOHNSON, FRANCESCHI, FERLAY, 2005; CHI, DAY, NEVILLE, 2015).

Clinicamente, este tumor pode se apresentar como uma placa leucoplásica e/ou eritematosa, um nódulo ou ainda como uma úlcera, podendo ou não estar associada a dor, disfagia, odinofagia, dificuldades da fala, sangramentos, perda de peso ou odor bucal (JOHNSON, FRANCESCHI, FERLAY, 2005; MARKOPOULOS et al., 2012). Geralmente, a maioria dos pacientes possui uma apresentação de sinais e sintomas de doença localmente avançada no momento do diagnóstico, podendo evoluir com áreas de necrose focal e invasão de estruturas adjacentes como ossos, músculos e pele

(JOHNSON, FRANCESCHI, FERLAY, 2005). Em relação à localização anatômica, língua, assoalho bucal e palato duro são os sítios anatômicos mais acometidos por esta neoplasia (LAMBERT et al., 2011, CHI, DAY, NEVILLE, 2015).

Histologicamente, o CEO apresenta características típicas de uma neoplasia de células escamosas como a formação de queratina, podendo formar aglomerados denominados de pérolas córneas, e crescimento invasivo, que se caracteriza pelo rompimento da membrana basal e invasão de tecidos adjacentes. A gradação histológica do CEO é dada de acordo com o grau de diferenciação e o tumor é classificado em bem, moderadamente e pouco diferenciado, sendo que quanto menor é a diferenciação, maior é o pleomorfismo celular e a quantidade de eventos atípicos (OMS, 2005). Ainda, a gradação histológica atribuída ao tumor está associada com o prognóstico do paciente, sendo que quanto menor o grau de diferenciação celular, pior o prognóstico para o paciente (JOHNSON, FRANCESCHI, FERLAY, 2005; MÉNDEZ et al., 2002).

Adicionalmente à gradação histológica, é necessário também estadiar clinicamente o tumor a fim de descrever a extensão anatômica da lesão (SOBIN, WITTEKIND, 2009), bem como avaliar a ocorrência de metástase e comprometimento de estruturas adjacentes (CLATOT et al., 2014). Nesse contexto, o sistema de estadiamento clínico utilizado é o preconizado pela União Internacional contra o Câncer (UICC), denominado sistema TNM de classificação dos tumores malignos. Este sistema baseia-se em três componentes: T, extensão do tumor primário; N, a presença ou ausência de metástases para linfonodos regionais; e M, para presença ou ausência de metástase à distância. Estes parâmetros recebem gradações, geralmente de T0 a T4, N0 a N3 e M0 a M1. Seguindo o TNM, os tumores são agrupados em estádios clínicos que podem variar de I ao IV. Nos estádios I e II, os tumores são, respectivamente, T1 e T2, não apresentam metástase em linfonodos regionais (N0) e nem à distância (M0). Os tumores T3 ou aqueles T1 e T2 com 1 linfonodo regional invadido (N1) são considerados estágio III. Lesões classificadas como T4, ou aquelas que apresentam 2 linfonodos regionais invadidos (N2) e todos os tumores que apresentam metástase à distância (M1), são considerados estágio IV (SOBIN, WITTEKIND, 2009).

O principal tratamento para o CEO primário é a ressecção cirúrgica, a qual deve sempre incluir toda lesão tumoral e margem de tecido livre de tumor em todas as dimensões (mínimo de 1 cm de margem) (BRASIL, INCA, 2014). Este tratamento cirúrgico pode ser associado à radioterapia em estágios mais avançados da doença, e também a quimioterapia para controle de metástase locoregional ou à distância, ou

ainda, em casos recorrentes. Apesar dos grandes avanços terapêuticos, o diagnóstico do CEO ainda não é precoce e seu tratamento acaba sendo associado a uma diminuição da qualidade de vida por proporcionar dificuldades na fala, distúrbios na deglutição e mastigação, deformidades estéticas e problemas psicológicos. Ainda existe grande dificuldade de prever a história natural de lesões individuais, embora o prognóstico seja estabelecido a partir do tamanho do tumor, correlação com sítios anatómicos nobres, gradação histológica e envolvimento de linfonodos (MÉNDEZ et al., 2002; CLATOT et al., 2014).

1.3 β -LAPACHONA E SEUS DERIVADOS 3-iodo

A β -lapachona é uma naftoquinona natural, originalmente obtida a partir da casca do ipê roxo (*Tabebuia avellanedae* Lor, Bignoniaceae), encontrada na América do Sul. Esse composto possui uma atividade biológica promissora, com uma diversidade de funções terapêuticas como antimicrobiana, anti-inflamatória, antimalárica e antitumoral (SCHUERCH, WEHRLI, 1978; SITÔNIO et al., 2013).

Devido suas propriedades antitumorais, a β -lapachona tem sido alvo de vários estudos para avaliar o seu potencial terapêutico em células tumorais humanas. Com isso, a atividade antitumoral e os mecanismos de ação da β -lapachona tem sido amplamente estudada em diversos tipos de tumores, como adenocarcinoma de mama (WUERZBERGER et al., 1998; SEONE et al., 2013; YANG et al., 2017), câncer de pulmão (KUNG et al., 2014; JEON et al., 2015a; WU et al., 2016), câncer de esôfago (SUNASSEE et al., 2013), câncer de próstata (BRETON et al., 2015; BEG et al., 2017), hepatocarcinoma (WOO et al., 2006; PARK et al., 2015), câncer de cólon retal (CHOI et al., 2003b; KEE et al., 2017a), melanoma (BANG et al., 2016; KEE et al., 2017b) e carcinoma escamocelular oral (JEON et al., 2015b).

Inicialmente, foi demonstrado que a β -lapachona tem a capacidade de induzir morte celular por apoptose através da ativação da enzima topoisomerase I em células de glioblastoma (WELLER et al., 1997). Em seguida, resultados de outros estudos *in vitro* demonstraram que a apoptose estava associada ao estresse oxidativo promovido pelo composto, com consequente fosforilação da proteína p53, ativação dos inibidores de quinases dependentes de ciclinas, da proteína pró-apoptótica Bax e caspase 3 em células de carcinoma de cólon (CHOI et al., 2003b) e hepatocarcinoma (WOO et al., 2006), além disso, a inativação da telomerase foi observada em células de leucemia após tratamento com a β -lapachona (MOON et al., 2010).

Adicionalmente, em estudo *in vitro*, Jeon e colaboradores (2015) demonstraram que o tratamento com a β -lapachona reduziu a proliferação celular em câncer de pequenas células de pulmão (JEON et al., 2015a) e carcinoma escamocelular oral (JEON et al., 2015b) por promover parada do ciclo celular seguida de apoptose através da redução das proteínas Sp1, essenciais para sobrevivência, invasão, metástase e angiogênese das células tumorais. Ainda, os autores demonstraram que a apoptose era ativada através da redução da expressão das proteínas Bcl-xL e PARP e aumento de Bax e caspase 3.

Por outro lado, Park e colaboradores (2015) demonstraram que a β -lapachona induz necroptose em células de hepatocarcinoma através da hiperativação da via RIP1-PARP1-AIF mediada pelo acúmulo intracelular de espécies reativas de oxigênio. Além disso, a indução da morte celular por β -lapachona foi relacionada com um aumento da atividade da enzima de detoxificação quinona oxido-redutase (NQO1). Corroborando com este achado, Yang e colaboradores (2017) observaram que o tratamento com β -lapachona interferiu no desenvolvimento tumoral através da inibição da transição epitélio-mesênquima em células de câncer de mama positivas para NQO1, ratificando a participação desta molécula para efetividade deste fármaco.

Estudos em modelos de xenotransplantes com células de adenocarcinoma de mama (SEONE et al., 2013; YANG et al., 2017) e carcinoma escamocelular de pulmão (WU et al., 2016), demonstraram que a β -lapachona apresenta efeito antitumoral *in vivo* por reduzir significativamente o volume tumoral. Em adição, o tratamento *in vivo* com a β -lapachona promoveu uma redução da angiogênese tumoral e diminuição da imunomarcagem de AKT e CD31 em células de carcinoma escamocelular de pulmão (WU et al., 2016). Além disso, observou-se uma redução da imunomarcagem de proteínas relacionadas à transição epitélio-mesênquima, vimentina e Snail, em células de adenocarcinoma de mama após o tratamento com este fármaco (YANG et al., 2017).

A β -lapachona tem apresentado também efeitos antitumorais promissores quando combinado com outros fármacos quimioterápicos, potencializando seus efeitos. Recentemente, a β -lapachona foi combinada ao quimioterápico APO866, inibidor da biossíntese de nicotinamida adenina dinucleotídeo (NAD), para o tratamento de células de câncer de próstata. Essa combinação promoveu autofagia, dependente de Beclin-1, das células tumorais e ativação de PARP-1 através de aumento da produção de espécies reativas de oxigênio e perda do potencial transmembrânico da mitocôndria (BRETON et al., 2015).

Os derivados 3-iodo da β -lapachona, 3-I- α -lapachona e 3-I- β -lapachona (Figura 1), foram sintetizados pelo grupo de pesquisa da Universidade Federal da Paraíba e apresentaram propriedades anti-inflamatórias e antimicrobianas, contudo, não existe nenhum estudo na literatura científica que demonstre a atividade antitumoral desses derivados. Estes compostos estão patenteados por pesquisadores das Universidades Federais da Paraíba e Pernambuco, Universidade Estadual de Feira de Santana e também pelo Instituto Gonçalo Moniz, IGM, Fiocruz, Bahia.

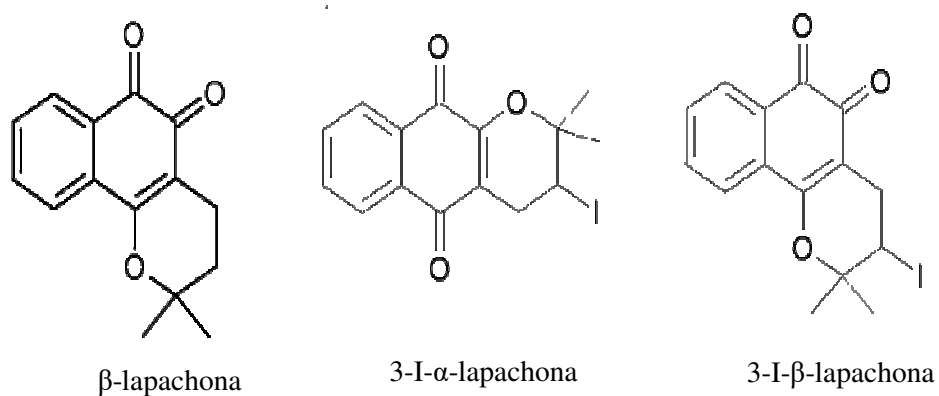


Figura 1. Estrutura química da β -lapachona e seus derivados, 3-I- α -lapachona e 3-I- β -lapachona.

2 JUSTIFICATIVA

A pesquisa oncológica tem sido amplamente incentivada na busca do conhecimento sobre a patogênese, alvos terapêuticos e pesquisa de novos grupos farmacológicos que possam atuar no controle do câncer. Adicionalmente, os produtos naturais representam uma fonte importante na pesquisa de novos fármacos com atividade antitumoral. Dentre as classes farmacológicas, as quinonas tem recebido atenção da indústria farmacêutica pela diversidade de ações biológicas, incluindo citotoxicidade para células neoplásicas (SUNASSE et al., 2013; SEONE et al., 2013; KUNG et al., 2014; JEON et al., 2015b; WU et al., 2016; YANG et al., 2017). Dentro do grupo das quinonas, o β -lapachol e a β -lapachona, bem como seus derivados, tem apresentados uma atividade antitumoral promissora (FIORITO et al. 2014). Entretanto, na literatura científica, não existem trabalhos que demonstrem os efeitos antitumorais dos derivados 3-iodo. Diante disso, este estudo visa avaliar os efeitos da β -lapachona e seus derivados 3-iodo (3-I- α -lapachona e 3-I- β -lapachona) em células de CEO, com a finalidade de contribuir para os estudos de novas terapias, para este tumor.

3 HIPÓTESE

A β -lapachona e seus derivados 3-iodo apresentam atividade citotóxica promissora, sendo os derivados 3-iodo mais potentes que a β -lapachona, exercem efeitos inibitórios na proliferação, promovem morte celular e apresentam eficácia antitumoral *in vivo* em células de carcinoma escamocelular oral.

4 OBJETIVOS

4.1 OBJETIVO GERAL

Estudar os efeitos da β -lapachona e seus derivados 3-iodo (3-I- α -lapachona e 3-I- β -lapachona) sobre a proliferação, morte celular e expressão de genes alvos relacionados ao câncer em células de CEO.

4.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Avaliar os efeitos da β -lapachona e seus derivados 3-iodo sobre a viabilidade celular de diferentes células tumorais e não tumorais;
- Estudar os efeitos da β -lapachona e seus derivados 3-iodo sobre a viabilidade, ciclo celular e mecanismos relacionados com o padrão de morte em células de CEO;
- Avaliar os efeitos da β -lapachona e seus derivados 3-iodo sobre a morfologia das células de CEO;
- Analisar os efeitos da β -lapachona e seus derivados 3-iodo sobre a expressão gênica de genes alvos relacionados à proliferação, ciclo celular, morte celular e invasão em células de CEO;
- Avaliar a eficácia antitumoral *in vivo* da β -lapachona e seus derivados 3-iodo em modelo de xenotransplante utilizando células de CEO.

5 MATERIAL E MÉTODOS

5.1 OBTENÇÃO DA β -LAPACHONA E SEUS DERIVADOS 3-iodo

A β -lapachona e seus derivados 3-iodo foram obtidos pelo Prof. Dr. José Barbosa Filho da Universidade Federal da Paraíba. A β -lapachona foi isolada da casca de *Tabebuia avellanedae* e seus derivados 3-iodo, 3-I- α -lapachona e 3-I- β -lapachona foram obtidos a partir do lapachol por iodo-ciclização induzida por base na presença do eletrófilo iodo à molécula de lapachol (BARBOSA-FILHO et al., 2006; ANTUNES et al., 2006).

5.2 CARACTERIZAÇÃO DO ESTUDO

Trata-se de um estudo *in vitro* e *in vivo*, experimental e analítico.

5.3 OBTENÇÃO E MANUTENÇÃO DAS CÉLULAS EM CULTURA

As linhagens de CEO (HSC3, SCC4, SCC9, SCC15 e SCC25) foram utilizadas para a realização deste estudo. Para uma análise comparativa, uma linhagem celular de queratinócitos normais, humana e imortalizada, mas não transformada, denominada HaCaT (BOUKAMP et al., 1988) e uma linhagem de fibroblastos humanos normais, denominada MRC5 (JACOBS et al., 1970), foram utilizadas. Além das linhagens tumorais de CEO, células tumorais de outros tipos histológicos também foram utilizadas para avaliar o potencial citotóxico dos compostos-teste (Tabela 1).

As linhagens celulares foram cultivadas em garrafas para cultura de células (75 cm³, volume de 250 mL), em meio RPMI 1640 (Gibco[®]), suplementados com 10% de soro fetal bovino (SFB, Gibco[®]) e 50 μ g/mL de gentamicina (Novafarma, Anápolis, GO, BRA). As células foram mantidas em incubadoras com atmosfera de 5% de CO₂ a 37°C e o crescimento celular foi acompanhado diariamente com a utilização do microscópio invertido. A manutenção das células com tripsinização foi realizada sempre que o crescimento celular atingiu a confluência necessária, ou seja, preencheu 70 a 80% do volume total da garrafa de cultura. As linhagens deste estudo foram testadas mensalmente para contaminação com micoplasma através do corante Hoechst (Sigma-Aldrich, St Louis, MO, EUA).

Tabela 1. Linhagens tumorais humanas utilizadas no ensaio de citotoxicidade

Linhagem tumoral	Tipo histológico	Fonte
HSC3	Carcinoma escamocelular oral	Banco de Recursos para Pesquisa em Ciências da Saúde do Japão
SCC4, SCC9, SCC15 e SCC25	Carcinoma escamocelular oral	Instituto de Câncer Sidney Farber, Divisão de Crescimento e Regulação Celular e Departamento de Fisiologia, Faculdade de Medicina de Harvard
HepG2	Carcinoma hepatocelular	Instituto de Anatomia e Biologia Wistar, Filadélfia, Pensilvânia
HL-60	Leucemia promielocítica aguda	Hospital Pediátrico de Mercy – EUA
K562	Leucemia mielogênica crônica	Laboratórios de Citogenética e Fisiopatologia Esplênica, Centro de Pesquisa e Hospital da Univesidade de Tennessee
AGP01	Adenocarcinoma gástrico peritoneal	Universidade Federal do Pará – Brasil
ACP02	Adenocarcinoma gástrico	Universidade Federal do Pará – Brasil
ACP03	Adenocarcinoma gástrico	Universidade Federal do Pará – Brasil
HT-29	Adenocarcinoma de cólon	Instituto Sloan Kettering – EUA
HCT-116	Carcinoma de cólon	Departamento de Bioquímica da Universidade do Alabama – EUA

5.4 OBTENÇÃO DE CÉLULAS PBMC

As células mononucleares (linfócitos e monócitos) humanas de sangue periférico – PBMC (do inglês *peripheral blood mononuclear cell*) foram obtidas a partir de sangue periférico de voluntários saudáveis, não fumantes, com idade variando entre 25 – 35 anos, que não haviam utilizado qualquer tipo de droga ou medicamento durante, pelo menos, 15 dias antes da coleta. O comitê de ética em pesquisa da Fundação Oswaldo Cruz (Salvador, Bahia, Brasil) aprovou o protocolo experimental (n° 031019/2013). Todos os participantes assinaram o termo de consentimento livre e esclarecido para participação do estudo. A coleta do sangue foi realizada em frasco heparinizado por profissionais capacitados no Laboratório de Engenharia Tecidual e Imunofarmacologia (IGM, Fiocruz, Bahia), utilizando seringas esterilizadas e descartáveis com volume de 5 mL.

As células do PBMC foram isoladas por protocolo padrão, utilizando um gradiente de densidade com uso de Ficoll (Ficoll-Paque Plus, GE Helthcare Bio-Sciences AB, Suécia). Após a separação, as células foram lavadas duas vezes com solução salina, ressuspensas ($0,3 \times 10^6$ células/ mL) em meio RPMI 1640 (Gibco®) suplementado com 20% de SFB, 2 mM de glutamina e 50 µg/mL de gentamicina. Para induzir a divisão celular de linfócitos T, 10 µg/mL de concanavalina A (ConA, Sigma Chemical Co. St. Louis, MO, EUA) foi utilizada como agente mitógeno.

5.5 ENSAIO DO ALAMAR BLUE PARA AVALIAÇÃO DA CITOTOXICIDADE DA β -LAPACHONA E SEUS DERIVADOS 3-iodo

Para avaliar a citotoxicidade da β -lapachona e seus derivados 3-iodo sobre a proliferação de células tumorais e não tumorais (HaCaT, MRC5 e PBMC), o ensaio do alamar blue foi realizado após 72 horas de exposição aos compostos. O alamar blue é um ensaio colorimétrico e fluorimétrico que avalia a viabilidade celular através da capacidade de redução da resazurina em resofurina por células metabolicamente viáveis. Neste ensaio, todas as células listadas na tabela 1 foram utilizadas. As células tumorais foram distribuídas em placas de 96 cavidades numa densidade de 7×10^4 células/mL, para células aderidas, e 3×10^5 células/mL, para células em suspensão, em um volume de 100 μ L. As substâncias testes (0,19 a 25 μ g/mL) dissolvidas em DMSO foram adicionadas em cada poço e incubadas por 72 horas. A doxorubicina (Laboratory IMA S.A.I.C., Buenos Aires, Argentina) foi utilizada como controle positivo com concentrações variando de 0,03 a 5 μ g/mL. As células tratadas com o veículo (DMSO 0,5%) usado para diluir as substâncias testes foram utilizadas como controle negativo. Antes do final do período de incubação (4 h para linhagens celulares e 24 h para PBMC), 20 μ L da solução estoque (0,312 mg/mL) de alamar blue (resazurina, Sigma-Aldrich) foram adicionados a cada poço. As absorbâncias foram mensuradas nos comprimentos de onda de 570 nm (reduzido) e 595 nm (oxidado) utilizando leitora de placas Spectra Max 190.

Com o objetivo de estudar o efeito da β -lapachona e seus derivados 3-iodo sobre o ciclo celular e padrão de morte celular em células de CEO, uma série de novos experimentos foram realizados utilizando a linhagem HSC3. Essa linhagem foi escolhida por estar entre as linhagens com maior sensibilidade ao tratamento com a β -lapachona e seus derivados 3-iodo, conforme Tabela 2 dos resultados.

5.6 FORMAÇÃO DE ESFERAS E TRATAMENTO COM OS COMPOSTOS-TESTE EM CULTURA 3D

As células HSC3 foram cultivadas em esferoides 3D multicelulares. Resumidamente, foram inseridos 100 μ l de uma suspensão de células ($0,5 \times 10^6$ células/mL) em uma placa de 96 poços com uma superfície repelente de células (Greiner Bio-One, Kremsmünster, Áustria). As células foram cultivadas em meio RPMI 1640 (Gibco[®]) suplementado com 10% de soro fetal bovino (SFB, Gibco[®]), 2 mM de glutamina, 3% de matrigel (BD Biosciences, San Jose, CA, EUA) e 50 μ g/mL de

gentamicina (Novafarma, Anápolis, GO, BRA) e mantidas a 37 ° C com 5% de CO₂. Os esferoides com estruturas estáveis e diâmetros se formaram após três dias. Em seguida, os compostos-teste (0,003 a 25 µg/mL) foram dissolvidos em DMSO e incubados por 72h. O controle negativo recebeu o veículo que foi usado para diluir os compostos testados. No final do experimento, as alterações morfológicas foram examinadas no microscópio de inversão (Leica DMI8, Wetzlar, Germany) e fotografadas utilizando o software Leica Application Suite X (XLAS X, Leica Microsystems, Wetzlar, Germany). A viabilidade celular foi determinada pelo ensaio do alamar blue conforme descrito acima.

5.7 ESTUDOS SOBRE O CICLO CELULAR E PADRÃO DE MORTE CELULAR

Os experimentos seguintes foram realizados para estudar o efeito da β-lapachona e seus derivados 3-iodo sobre o ciclo celular e o padrão de morte celular em células de HSC3. Em todos os experimentos, 2 mL de uma suspensão de células (0,7 x 10⁵ cells/mL) foram inseridos em placas de 24 ou 6 poços e incubados por *overnight* para permitir a adesão das células na placa. Para a maioria dos ensaios, as células foram tratadas por 12, 24, 48 e 72 horas com a β-lapachona (1 µM), 3-I-α-lapachona (4,5 e 9 µM) e 3-I-β-lapachona (1 e 2 µM). As concentrações utilizadas foram baseadas nos valores de CI₅₀ obtidos para cada composto nessa linhagem celular. O controle negativo foi tratado com o veículo (DMSO 0,2%) usado para diluir as substâncias teste e a doxorrubicina (0,5 µM) foi usada como controle positivo. Os experimentos foram realizados em duplicatas e repetidos pelo menos três vezes. O monitoramento da viabilidade celular foi determinado pelo método de exclusão de azul de tripam, onde uma alíquota de 90 µL foi recolhida após o período de incubação, corada com 10 µL o azul de tripam e contadas utilizando a câmara de Neubauer.

5.7.1 Determinação do ciclo celular e fragmentação do DNA internucleosomal

A determinação do conteúdo de DNA nuclear da célula, que reflete as fases do ciclo celular, foi avaliada por citometria de fluxo, utilizando o IP (iodeto de propídio) como agente fluorógeno. Decorridos os períodos de tratamento com os compostos, o sobrenadante foi coletado, os poços foram lavados com solução salina, as células foram tripsinizadas e centrifugadas (295 xG/ 5 minutos) juntamente com o sobrenadante. As células foram diluídas com a solução de permeabilização (200 µL) contendo 0,1 % de triton X-100, 0,1% de citrato de sódio e 2 µg/mL de IP e 100 µg/mL de RNase em água

destilada, na ausência de luz e a temperatura ambiente. Após 30 minutos, as células foram adquiridas e analisadas em citômetro de fluxo BD LSRFortessa através do software BD FACSDiva versão 6.2 (Becton Dickinson Biosciences, San José, CA, EUA). As proporções de DNA internucleosomal fragmentado e as fases do ciclo celular foram obtidas utilizando o software Flowjo, versão 10 (Flowjo LCC, Ashland, OR, EUA). Os *debritos* celulares foram omitidos das análises e 10.000 eventos foram analisados por amostra.

5.7.2 Análise morfológica

Para a realização da análise morfológica, as células foram incubadas sobre lamínulas de vidro adicionadas aos poços da placa de cultura. Após o período de tratamento, as células foram centrifugadas (295 xG/ 5 minutos) e o meio de cultura foi descartado. A fixação das células foi realizada com metanol por 1 minuto, as lamínulas foram coradas com May-Grunwald-Giemsa, e então, com o auxílio de microscópio de inversão (Leica DMi8, Wetzlar, Germany), as alterações morfológicas foram avaliadas e fotografadas utilizando o software Leica Application Suite X (XLAS X, Leica Microsystems, Wetzlar, Germany).

Em adição, a morfologia das células HSC3 após o tratamento com os compostos-teste também foi avaliada por citometria de fluxo através dos parâmetros FSC (*Forward Light Scatter*) e SSC (*Side Scatter*) relacionados com volume e granulosidade da célula, respectivamente.

5.7.3 Determinação da externalização de fosfatidilserina

Após o tratamento com β -lapachona e seus derivados 3-iodo, as células foram marcadas com anexina V-FITC e IP para determinar a viabilidade celular (viável, apoptose inicial, apoptose tardia e necrose), de acordo com o protocolo do fabricante (BD Biosciences, Franklin Lakes, New Jersey, EUA). As células foram tripsinizadas, lavadas duas vezes com solução salina e em seguida, ressuspensas numa solução de 100 μ L do tampão de ligação, 5 μ L de IP e 5 μ L de anexina V-FITC. Após 15 minutos de incubação em isopor com gelo, na ausência de luminosidade, 400 μ L de tampão de ligação foram adicionados a cada amostra. As células foram adquiridas e analisadas no citômetro de fluxo BD LSRFortessa através do software BD FACSDiva versão 6.2 (Becton Dickinson Biosciences, San José, CA, EUA). A proporção de células em apoptose foi determinada pela porcentagem de anexina quantificada utilizando o

programa FlowJo, versão 10 (Flowjo LCC, Ashland, OR, EUA). Os *debritos* celulares foram omitidos das análises e 10.000 eventos foram analisados por amostra.

5.7.4 *Ensaio de ativação das caspases 8 e 9*

A atividade das caspases 8 e 9 foi avaliada através de kit colorimétrico, de acordo com as recomendações do fabricante (BioVision Incorporated). O método é baseado na detecção espectrofotométrica do cromóforo p-nitroanilida (pNA) após clivagem dos substratos X-pNA, onde X representa a seqüência de aminoácidos reconhecidos por caspases específicas. Inicialmente, as células HSC3 tratadas por 72 h com o β -lapachona e seus derivados 3-iodo foram centrifugadas e lisadas em gelo. A quantidade de proteína no lisado foi determinada utilizando-se o ensaio para dosagem de proteína pelo método já descrito por Bradford (BRADFORD, 1976). A densidade óptica das amostras foi medida a 405 nm em espectrofotômetro.

5.7.5 *Avaliação do potencial transmembrânico mitocondrial*

As células HSC3 foram plaqueadas na densidade de $0,7 \times 10^5$ células/mL e tratadas por 24 e 48 horas com a β -lapachona (1 μ M), α -I-lapachona (4,5 e 9 μ M) e β -I-lapachona (1 e 2 μ M). Após esse período, as células foram tripsinizadas e ressuspensas em 1 mL de meio fresco e as células foram diluídas com a solução de rodamina 123 (1 μ g/mL, Sigma-Aldrich Co, St. Louis, MO, EUA) na ausência de luz e a 37 °C por 15 minutos. Após o período de incubação as células foram centrifugadas e o precipitado foi ressuspensado em salina e reincubado por 30 minutos. As células foram adquiridas e analisadas no citômetro de fluxo BD LSRFortessa através do software BD FACSDiva versão 6.2 (Becton Dickinson Biosciences, San José, CA, EUA). Os *debritos* celulares foram omitidos das análises e 10.000 eventos foram analisados por amostra.

5.7.6 *Avaliação da atividade citotóxica de β -lapachona e seus derivados 3-iodo em células de fibroblastos embrionário nocauteadas para o gene BAD*

A atividade citotóxica da β -lapachona e seus derivados 3-iodo em células de fibroblastos embrionários imortalizados de murinos, não mutado, (WT SV40 MEF) e fibroblastos embrionários imortalizados de murinos com o gene BAD nocauteado (BAD KO SV40 MEF) também foi avaliada pelo ensaio de azul de alamar após 72 horas de incubação, conforme descrito no item 5.5.

5.7.7 Ensaio de quantificação dos níveis de espécies reativas de oxigênio intracelular

As células HSC3 foram tratadas por 1 h e 3 h com β -lapachona e seus derivados 3-iodo. Após esse período, as células foram tripsinizadas e ressuspensas em 1 mL de meio fresco e 2 μ L de diacetato de 2,7-diclorodihidrofluoresceína (DCF-DA), que é convertido num produto fluorescente na presença de espécies reativas de oxigênio intracelular. Após 30 minutos de incubação a 37° C, na ausência de luminosidade, as células foram centrifugadas (295 xG/5 minutos) e ressuspensas em salina. As células foram adquiridas e analisadas no citômetro de fluxo BD LSRFortessa através do software BD FACSDiva versão 6.2 (Becton Dickinson Biosciences, San José, CA, EUA). Os *debritos* celulares foram omitidos das análises e 10.000 eventos foram analisados por amostra.

5.7.8 Ensaio de quantificação de óxido nítrico intracelular

As células HSC3 foram tratadas por uma hora com β -lapachona e seus derivados 3-iodo. Após 1h de tratamento, as células foram tripsinizadas e ressuspensas em 2 mL de meio fresco e 1,2 μ L de 4-amino-5-methylamino-2', 7'-difluorofluorescein diacetate (DAF-FM diacetate), que é convertido num produto fluorescente na presença de óxido nítrico. Após 30 minutos de incubação a 37° C, na ausência de luminosidade, as células foram centrifugadas (295 xG/ 5 minutos) e ressuspensas em salina. As células foram adquiridas e analisadas no citômetro de fluxo BD LSRFortessa através do software BD FACSDiva versão 6.2 (Becton Dickinson Biosciences, San José, CA, EUA). Os *debritos* celulares foram omitidos das análises e 10.000 eventos foram analisados por amostra.

5.7.9 Ensaio de quantificação de ânions de superóxido intracelular

A hidroetidina (Sigma-Aldrich Co., Saint Louis, MO, EUA) foi utilizada para detectar níveis de superóxido celular após 1 h de tratamento com β -lapachona e seus derivados 3-iodo. As células foram marcadas com 10 μ M de hidroetidina durante 30 min. As células foram adquiridas e analisadas no citômetro de fluxo BD LSRFortessa através do software BD FACSDiva versão 6.2 (Becton Dickinson Biosciences, San José, CA, EUA). Os *debritos* celulares foram omitidos das análises e 10.000 eventos foram analisados por amostra.

5.7.10 *Ensaio de reversão com inibidor de caspases, antioxidante NAC e catalase*

Os inibidores farmacológicos podem ser utilizados no intuito de confirmar possíveis mecanismos de citotoxicidade induzido por compostos-teste. O inibidor de caspases, Z-VAD-FMK, foi utilizado para confirmar o efeito da β -lapachona e seus derivados 3-iodo sobre a indução de apoptose. Ainda, o reagente N-acetilcisteína (NAC), um potente antioxidante, foi utilizado para verificar a possibilidade de reversão do dano oxidativo causado pelos compostos-teste. Desse modo, se o padrão de morte celular é revertido por algum desses inibidores é sugestivo que o efeito promovido pelo tratamento tem alguma relação com as vias inibidas. Para avaliação da reversão com Z-VAD-FMK e 5 mM NAC, os inibidores foram adicionados 2 e 1 h antes do tratamento por 72 h com os compostos-teste, respectivamente, sendo adotada a metodologia para marcação de anexina V/IP, descrita no item 5.7.3.

Adicionalmente, a quantificação das espécies reativas de oxigênio intracelular foi avaliada após o pré-tratamento com o antioxidante 5 mM de NAC e 2000 UI de catalase para confirmar os efeitos da β -lapachona e seus derivados 3-iodo sobre a produção de espécies reativas de oxigênio após 1h de tratamento com estes compostos-teste. A produção de espécies reativas de oxigênio foi determinada através da metodologia descrita anteriormente no item 5.7.7.

As concentrações utilizadas para estes ensaios foram 1, 9 e 2 μ M para β -lapachona, 3-I- α -lapachona e 3-I- β -lapachona, respectivamente.

5.7.11 *Ensaio de intercalação de DNA*

A intercalação do DNA foi avaliada examinando a capacidade dos compostos-teste para deslocar o brometo de etídio do DNA do timo de bezerro (ctDNA, Sigma-Aldrich Co., Saint Louis, MO, EUA). Os ensaios foram conduzidos em seis réplicas (100 μ L) em placas de 96 poços e continham 15 μ g/mL de ctDNA, 1,5 μ M de brometo de etídio e 5, 10 e 20 μ M dos compostos-teste em solução salina (100 μ L). O controle negativo recebeu o veículo que foi usado para diluir os compostos testados. A doxorubicina (0,5 μ M) foi utilizada como controle positivo. A fluorescência foi medida utilizando comprimentos de onda de excitação e emissão de 320 nm e 600 nm, respectivamente, utilizando o Leitor de Microplacas Spectra Max 190 (Molecular Devices, Sunnyvale, CA, EUA).

5.8 ANÁLISE DA EXPRESSÃO GÊNICA POR PCR ARRAY

O efeito da β -lapachona e de seus derivados 3-iodo sobre a expressão gênica de genes alvos relacionados à proliferação, ciclo celular, morte celular e invasão em células de CEO foi avaliado por qPCR. Em todos os experimentos, 5 mL de uma solução de células HSC3 ($0,7 \times 10^5$ cells/mL) foram inseridos em garrafas para cultura celular de 25 cm² incubadas por *overnight* para permitir a adesão das células na placa. As células foram tratadas por 12 horas como a β -lapachona (1 μ M), 3-I- α -lapachona (4,5 μ M) e 3-I- β -lapachona (1 μ M). O controle negativo foi tratado com o veículo (DMSO 0,2%) usado para diluir as substâncias teste. A doxorrubicina (1 μ M) foi usada como controle positivo. Os experimentos foram realizados em duplicatas e repetidos pelo menos três vezes. Um *pool* de cDNA obtido de três experimentos independentes realizados em duplicata foi utilizado para a análise.

5.8.1 Isolamento de RNA total e transcrição reversa

Todos os experimentos foram realizados em condições DNase/RNase free. Para o procedimento de extração de RNA, foram utilizadas microcolunas de sílica-Rneasy Plus Mini Kit (QIAGEN). Após determinar o total de 5×10^6 células, o meio de cultura foi aspirado e as células lavadas três vezes com PBS gelado. Em seguida, as células foram novamente lavadas com PBS/Tripsina 1%, a fim de que fossem separadas. Após adição de meio de cultura contendo soro fetal bovino para inativação da tripsina, as células foram transferidas para um microtubo e centrifugadas a 295 xG, durante 5 minutos. O sobrenadante foi aspirado e, em seguida, 600 μ L do tampão de lise RLT foi transferido para o *pellet* e a amostra foi misturada durante 1 min, com auxílio do vórtex. Para homogeneização o lisado foi passado 10 vezes, através de uma agulha de 0.9mm, acoplada a uma seringa. Em seguida, o lisado foi transferido para a microcoluna contendo Dnase, a fim de eliminar o DNA genômico. Em seguida, foi adicionado 600 μ L de etanol 70% e o mesmo misturado gentilmente a amostra, com auxílio de pipeta. Após a passagem por nova microcoluna de sílica, lavagens com tampões do kit (RW1 e RPE), o RNA foi eluído com 30 μ L de água Rnase/Dnase Free pH 7.4 e armazenado em temperatura de -80°C.

A quantidade e pureza do RNA extraído de cada amostra foi analisada em aparelho de fluorimetria (QuBit™, Life Technologies, USA) e a integridade das amostras testada em condições denaturantes, em gel de agarose 1%, contendo Syber

Safe (0,5mg/mL) e formaldeído 37%. A transcrição reversa foi realizada com a enzima transcriptase Superscript VILO™ (Invitrogen Corporation, USA) e as amostras de cDNA armazenadas em temperatura de -20°C.

5.8.2 PCR Array

Para as reações de PCR quantitativo em tempo real foram utilizados *TaqMan Gene Expression Assays™* (Life Technologies) inventoriados para *TaqMan Array Human Molecular Mechanisms of Cancer 96 plate* (Life Technologies® - Anexo, Figura A1). As reações foram conduzidas no aparelho ABI ViiA7 (Applied Biosystems™). O programa de amplificação consistiu de um ciclo inicial de 50°C por 2 minutos e 95°C por 10 minutos, seguido de 40 ciclos de 95°C por 15 segundos e 60°C por 1 minuto. Todos os experimentos foram realizados em condições DNase/RNase free.

5.9 ENSAIO DE EFICÁCIA ANTITUMORAL *IN VIVO* DA β -LAPACHONA E SEUS DERIVADOS 3-iodo

5.9.1 Considerações Éticas

Este trabalho foi aprovado pela comissão de ética no uso de animais do Instituto Gonçalo Moniz (CEUA, IGM, FIOCRUZ, Bahia), obtendo parecer número 006/2015.

5.9.2 Delineamento do estudo

A eficácia antitumoral *in vivo* foi avaliada em modelo de xenotransplante e heterotópico utilizando camundongos imunodeficientes da linhagem CB17 SCID inoculados com células HSC3 (20×10^6 células/500 μ L/animal), implantadas subcutaneamente na axila esquerda dos camundongos. Os compostos foram dissolvidos em DMSO e diluídos em água destilada (obedecendo a proporção 5% de DMSO) e o tratamento foi realizado por via intraperitoneal, uma vez por dia, durante 27 dias consecutivos. Os camundongos foram divididos em sete grupos de 16 animais (10 fêmeas e 6 machos) como se segue: Grupo 1 (grupo controle negativo) - os animais tratados com o veículo DMSO a 5%; Grupo 2 (grupo controle positivo) - os animais tratados com doxorubicina (0,1 mg/kg); Grupo 3 - os animais tratados com β -lapachona (20 mg/kg); Grupo 4 - os animais tratados com 3-I- α -lapachona (20 mg/kg); Grupo 5 - os animais tratados com 3-I- α -lapachona (40 mg/kg); Grupo 6 - os animais tratados com

3-I- β -lapachona (20 mg/kg) e Grupo 7 - os animais tratados com 3-I- β -lapachona (40 mg/Kg). Os tratamentos foram iniciados 72 horas após a inoculação. No final do tratamento, amostras de sangue periférico dos camundongos foram coletadas a partir do plexo retro-orbital para análise bioquímica e hematológica após anestesia, como descrito abaixo. Em seguida, os animais foram eutanasiados por deslocamento cervical. Os tumores foram excisados e pesados, além do fígado, pulmão, coração e rins dos camundongos. Os efeitos dos compostos foram expressos como a percentagem de inibição de controle.

5.9.3 Avaliação toxicológica sistêmica

Os camundongos foram pesados no início e no fim do experimento. Além disso, os animais foram observados quanto a sinais de alterações ao longo do estudo. Fígados, rins, coração e pulmões foram removidos, pesados e observados para detectar quaisquer sinais de lesões graves ou alterações de cor e hemorragia.

Análises hematológicas foram realizadas por microscopia óptica. Parâmetros hematológicos, incluindo contagem total de eritrócitos e de leucócitos, bem como uma contagem diferencial de leucócitos, tais como neutrófilos, linfócitos, monócitos, eosinófilos e basófilos, foram realizadas.

As análises bioquímicas de amostras de soro foram realizadas utilizando o rotor Vet-16 (Hemagen Diagnostics Inc., Columbia, MD, EUA). TGO, TGP, amilase, ureia nitrogenada, glicose, fósforo, cálcio, ácido úrico, creatina quinase, proteínas totais e globulina foram analisados.

5.9.4 Análise histológica

Após fixação em formol a 10%, os tumores e órgãos foram examinados, macroscopicamente, para avaliar o tamanho, cor, presença de hemorragia e metástases macroscópicas. Posteriormente ao processamento histológico, cortes de 4 μ m de espessura foram obtidos dos blocos de parafina e submetidos à coloração pela hematoxilina/eosina, conforme a rotina do Serviço de Histotecnologia do IGM. As análises histológicas foram realizadas através de microscopia de luz, nos aumentos finais de 4x, 100x, 200x e 400x (quando necessário), por um patologista experiente. Após análise histológica, os parâmetros histológicos foram categorizados em negativo (0), discreto (+1), moderado (+2) e intenso (+3).

As características e alterações histológicas dos tumores HSC3 foram analisadas através da coloração HE. Em adição, as colorações especiais *Picrosirius Red* e orceína foram utilizadas para avaliar a matriz extracelular composta por colágeno e fibras elásticas, respectivamente. Para análise da gradação histológica dos tumores, foram considerados os parâmetros definidos pela Classificação da Organização Mundial de Saúde (OMS, 2017), deste tumor.

Os fígados dos camundongos foram analisados histologicamente por HE e pela coloração ácido periódico-Schiff (PAS) para uma melhor avaliação do glicogênio nas células hepáticas e também para confirmar a presença de degeneração hidrópica neste órgão. Os rins foram analisados por HE e pelas colorações especiais PAS e *Picrosirius Red* para uma melhor avaliação da presença de degeneração hialina e fibrose nestes órgãos, respectivamente. As alterações dos corações e pulmões foram analisadas por HE.

5.10 ANÁLISE ESTATÍSTICA

Os resultados obtidos foram compilados em um banco de dados organizado em planilhas do programa operacional Microsoft Excel e a análise estatística foi realizada utilizando o programa GraphPad Prism versão 6.03 (*GraphPad Software, Inc., San Diego, USA*). Os dados foram analisados segundo a distribuição na curva normal de Gauss. Os valores de CI_{50} foram obtidos através de regressão não linear, a partir de três experimentos independentes realizados em duplicata. O índice de seletividade (IS) foi calculado com a seguinte fórmula: $IS = CI_{50} (\text{células não tumorais}) / CI_{50} (\text{células tumorais})$. A diferença entre os grupos dos ensaios *in vitro* e *in vivo* foi avaliada pelo teste ANOVA (análise de variância) seguida do teste de Student-Newman-Keuls ($p < 0,05$). A análise estatística deste estudo considerou como nível de significância o valor de “p” correspondente a alfa (α) menor ou igual a 5%.

Em relação à análise do PCR Array, após as corridas de amplificação e dissociação, os valores de quantificação relativa (QR) foram obtidos com o auxílio do programa *Gene Expression Suite™* (Applied Biosystems, USA) em comparação com o calibrador (células tratadas com o controle negativo DMSO 0,2%, QR = 1,0), de acordo com o método comparativo de C_q ($\Delta\Delta C_q$) (LIVAK; SCHMITTGEN, 2001). Com isso, os genes considerados superexpressos apresentaram valores de $QR \geq 2$ e subexpressos com valores de $QR \leq 0,5$.

6 RESULTADOS

6.1 EFEITOS DA β -LAPACHONA E SEUS DERIVADOS 3-iodo NA ATIVIDADE CITOTÓXICA EM DIFERENTES LINHAGENS DE CÉLULAS TUMORAIS HUMANAS

A β -lapachona apresentou citotoxicidade com valores de CI_{50} que variaram de 0,06 a 48,9 μ M para as linhagens SCC15 e APC02, respectivamente. A 3-I- α -lapachona apresentou valores de CI_{50} que variaram de 2,2 a 11,8 μ M para as linhagens K562 e HepG2, respectivamente. A 3-I- β -lapachona apresentou valores de CI_{50} que variaram de 0,02 a 2,5 μ M para as linhagens HL60 e SCC9, respectivamente.

Os novos derivados 3-iodo apresentaram uma atividade citotóxica mais potente para algumas linhagens tumorais por apresentarem valores de CI_{50} menores do que a β -lapachona. A 3-I- α -lapachona apresentou valores de CI_{50} 2 vezes menor para as células SCC4 quando comparada a β -lapachona, 2,4 vezes menor para AGP01, 4,3 vezes menor para ACP02, 3,2 vezes menor para ACP03, 3,8 vezes menor para HT-29, por apresentar valores de CI_{50} menores, respectivamente, quando comparados com a β -lapachona. A 3-I- β -lapachona apresentou valores de CI_{50} 9 vezes menor para células SCC4 quando comparada a β -lapachona, 2,5 vezes menor para células HepG2, 29 vezes menor para AGP01, 35 vezes menor para ACP02, 22 vezes menor para ACP03, 27 vezes menor para HT-29 e 14 vezes menor para HCT-116.

Para as células não tumorais, a β -lapachona apresentou citotoxicidade com valores de CI_{50} que variaram de 0,4 a 82,7 μ M para as células HaCaT e PBMC, respectivamente. A 3-I- α -lapachona apresentou valores de CI_{50} que variaram de 4,3 a 14,8 μ M para as células MRC5 e PBMC, respectivamente. A 3-I- β -lapachona apresentou valores de CI_{50} que variaram de 1,2 a 33,8 μ M para as células MRC5 e PBMC, respectivamente.

A doxorrubicina, utilizada como controle positivo, também apresentou atividade citotóxica, com valores de CI_{50} que variaram de 0,01 a 6,8 μ M para as linhagens HL60/HepG2 e APC02, respectivamente. Para as células não tumorais, a doxorrubicina apresentou valores de CI_{50} que variaram de 0,1 a 5,2 μ M para as células HaCaT e PBMC, respectivamente. A tabela 2 apresenta os valores de CI_{50} encontrados para as células tumorais e não tumorais.

Em relação ao índice de seletividade (IS), os resultados foram bem diferentes para as células não tumorais HaCaT, MRC5 e PBMC conforme demonstrado na Tabela

3. Os valores de IS são considerados significativos quando apresentam valores de $IS \geq 2,0$ (SUFFNESS; PEZZUTO, 1990). De forma geral, a β -lapachona e seus derivados 3-iodo apresentaram uma maior seletividade quando os valores de CI_{50} das células tumorais foram comparados aos valores das células mononucleares. A β -lapachona, 3-I- α -lapachona, 3-I- β -lapachona apresentaram IS de 82,7 μ M, 3,3 μ M e 33,8 μ M, respectivamente, em células HSC3.

Tabela 2. Atividade citotóxica da β -lapachona e seus derivados 3-iodo

Células	CI ₅₀ em μ M			
	DOX	β -lapachona	3-I- α -lapachona	3-I- β -lapachona
Células tumorais				
HSC 3	0,3 0,05 – 0,66	1,0 0,70 – 1,52	4,5 3,13 – 6,19	1,0 0,70 – 1,40
SCC 4	0,07 0,05- 0,09	16,2 10,70 – 25,06	7,5 6,31 – 9,11	1,8 1,40 – 2,1
SCC 9	0,8 0,14 – 1,26	0,2 0,03 – 0,56	8,4 5,42 – 13,15	2,5 1,17 – 5,61
SCC 15	1,5 0,42 – 1,57	0,06 0,03 – 1,29	4,3 3,11 – 6,07	0,8 0,47 – 1,64
SCC 25	1,4 0,61 – 2,92	2,8 2,05 – 3,74	8,1 6,50 – 10,04	2,5 2,10 – 3,04
HepG2	0,01 0,01 – 0,04	1,0 0,50 – 1,95	11,8 9,44 – 14,65	0,4 0,23 – 0,93
HL60	0,01 0,01 – 0,03	0,1 0,03 – 0,60	4,0 3,22 – 5,07	0,02 0,02 – 0,12
K562	0,05 0,04 – 0,09	1,3 0,36 – 2,22	2,2 0,77 – 5,47	0,7 0,23 – 1,64
AGP 01	1,9 0,45 – 2,34	20,3 14,77 – 27,98	8,4 6,82 – 10,40	0,7 0,23 – 1,64
ACP 02	6,8 0,56 – 24,31	48,9 34,17 – 70,13	11,3 9,70 – 13,15	1,4 1,17 – 1,64
ACP 03	2,3 0,51 – 3,20	15,5 10,76 – 22,28	4,8 3,57 – 6,40	0,7 0,47 – 1,17
HT-29	0,3 0,26 – 0,44	25,0 18,14 – 34,60	6,6 5,34 – 7,90	1,1 0,93 – 1,40
HCT-116	0,2 0,12 – 0,42	5,6 4,67 – 6,75	3,0 2,52 – 3,67	0,4 0,23 – 0,47
Células não tumorais				
HaCaT	0,1 0,01 – 0,30	0,4 0,10 – 1,95	8,0 4,44 – 14,46	1,8 0,93 – 3,55
MRC5	0,8 0,48 – 1,25	37,7 19,67 – 72,18	4,3 4,26 – 5,72	1,2 0,77 – 1,87
PBMC	5,2 1,39 – 5,67	82,7 53,7 – 90,8	14,8 5,02 – 18,62	33,8 12,54 – 38,70

Dados apresentados como valores de CI₅₀ em μ M e intervalo de confiança de 95% obtidos por regressão não linear de três experimentos independentes realizados em duplicata, pelo ensaio de alamar blue, após 72 horas de incubação.

Tabela 3. Índice de seletividade da β -lapachona e seus derivados 3-iodo

Células tumorais	Células não tumorais											
	HaCaT				MRC5				PBMC			
	DOX	β -lap	3-I- α -lap	3-I- β -lap	DOX	β -lap	3-I- α -lap	3-I- β -lap	DOX	β -lap	3-I- α -lap	3-I- β -lap
HSC 3	0,3	0,4	1,8	1,8	2,7	37,7	0,9	1,2	17,3	82,7	3,3	33,8
SCC 4	1,4	0,02	1,1	1,0	11,42	2,3	0,6	0,7	74,3	5,1	2,0	18,8
SCC 9	0,1	2,0	1,0	0,7	1,0	188,5	0,5	0,5	6,5	413,5	1,8	13,5
SCC 15	0,06	6,7	1,9	2,3	0,5	628,3	1,0	1,5	3,5	1.378,3	3,4	42,3
SCC25	0,07	0,1	1,0	0,7	0,6	13,4	0,5	0,5	3,7	29,5	1,8	13,5
HepG2	10,0	0,4	0,7	4,5	80	37,7	0,4	3,0	520,0	82,7	1,3	84,5
HL60	10,0	4,0	2,0	90,0	80	377	1,1	60,0	520,0	827,0	3,7	1.690,0
K562	2,0	0,3	3,6	2,6	16	29,0	1,9	1,7	104,0	63,6	6,7	48,3
AGP 01	0,05	0,02	1,0	2,6	0,4	1,8	0,5	1,7	2,7	4,1	1,8	48,3
ACP 02	0,01	0,01	0,8	1,3	0,1	0,8	0,4	0,8	0,7	1,7	1,3	24,1
ACP 03	0,04	0,03	1,6	2,6	0,3	2,4	0,9	1,7	2,3	5,3	3,1	48,3
HT-29	0,3	0,02	1,2	1,6	2,7	1,6	0,6	1,9	17,3	3,3	2,2	30,7
HCT-116	0,5	0,07	2,7	4,5	4,0	6,8	1,4	3,0	26,0	14,8	4,9	84,5

Os dados apresentados são o índice de seletividade (IS) calculado com a seguinte fórmula: $IS = CI_{50} [\text{células não tumorais}] / CI_{50} [\text{células tumorais}]$. A doxorrubicina (DOX) foi utilizada como controle positivo.

6.2 EFEITO DA β -LAPACHONA E SEUS DERIVADOS 3-iodo SOBRE A FORMAÇÃO DE ESFERAS EM CULTURA EM 3D

O efeito citotóxico da β -lapachona e seus derivados 3-iodo também foi realizado em um modelo tridimensional (3D) *in vitro* de esferoides multicelulares de câncer formados a partir de células HSC3. As alterações morfológicas dos esferoides tratados com β -lapachona e seus derivados 3-iodo indicam permeabilidade ao fármaco na cultura 3D (Figura 2). O valor CI_{50} da β -lapachona foi de 9,8 μ M após 72 h de incubação. A 3-I- α -lapachona apresentou uma CI_{50} de 8,1 μ M e 3-I- β -lapachona de 2,3 μ M. Por outro lado, a doxorrubicina apresentou valor de CI_{50} de 43,5 μ M. A tabela 4 apresenta os resultados encontrados da CI_{50} da β -lapachona e seus derivados 3-iodo no modelo 3D *in vitro* em células HSC3.

Tabela 4. Atividade citotóxica da β -lapachona e seus derivados 3-iodo no modelo 3D *in vitro* em células HSC3

Esferoides	CI_{50} em μ M			
	Doxorrubicina	β -lapachona	3-I- α -lapachona	3-I- β -lapachona
HSC3	43,5	9,8	8,1	2,3
	22,4 – 84,6	5,6 – 16,9	4,9 – 13,3	1,5 – 3,6

Dados apresentados como valores de CI_{50} em μ M e intervalo de confiança de 95% obtidos por regressão não linear de três experimentos independentes realizados em duplicata, pelo ensaio de alamar blue, após 72 horas de incubação.

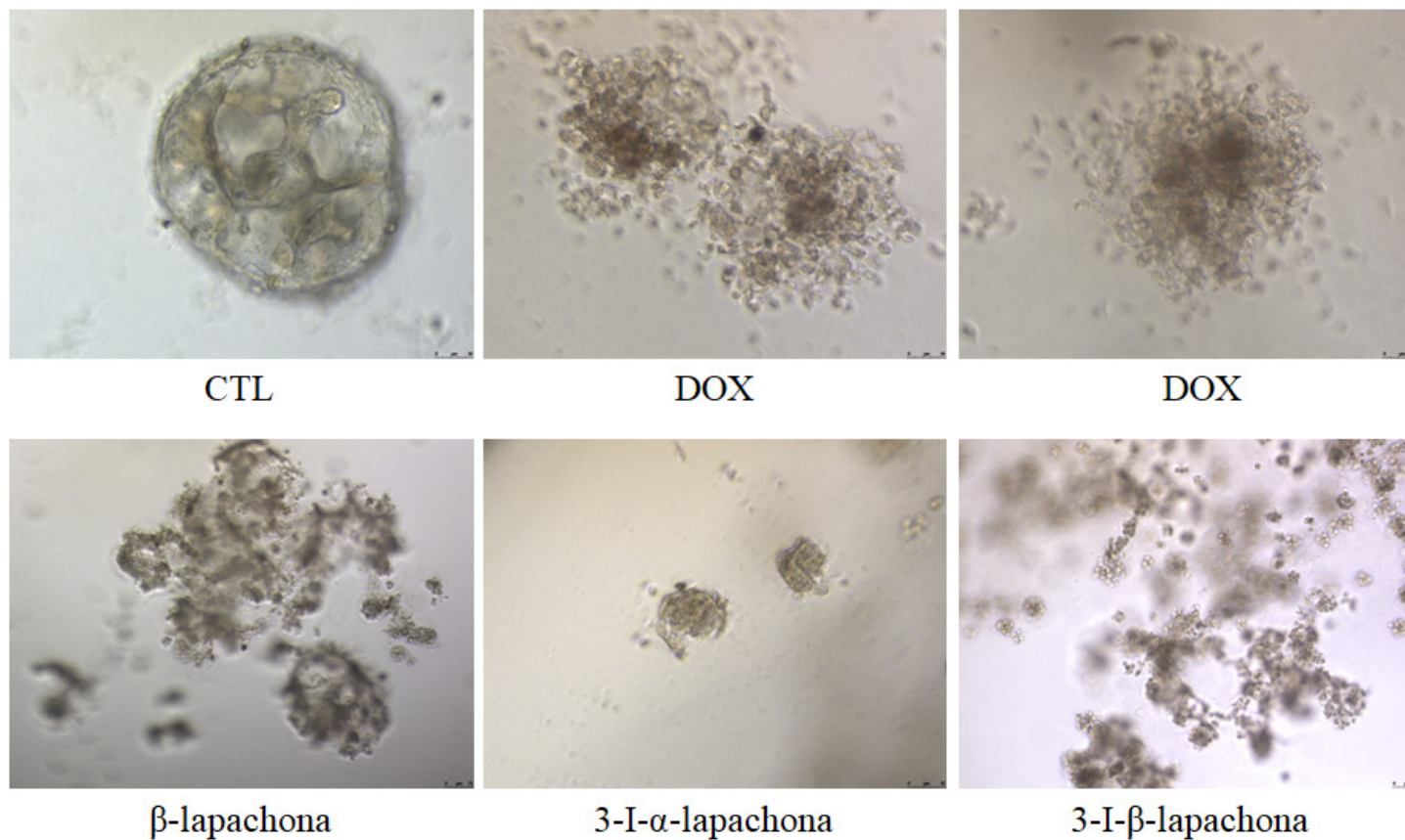


Figura 2. Efeito da β -lapachona e seus derivados 3-iodo no modelo 3D *in vitro* de esferoides multicelulares de câncer formados a partir de células HSC3. As células foram examinadas com o auxílio de microscópio de inversão (Leica DMi8, Wetzlar, Germany), as alterações morfológicas foram avaliadas e fotografadas (bar = 100 μ m) utilizando o software *Leica Application Suite X* (XLAS X, Leica Microsystems, Wetzlar, Germany).

6.3 EFEITO DA β -LAPACHONA E SEUS DERIVADOS 3-iodo SOBRE O CICLO CELULAR E PADRÃO DE MORTE CELULAR EM CÉLULAS DE CEO

Para estudar o efeito da β -lapachona e seus derivados 3-iodo sobre o ciclo celular e padrão de morte celular em células de CEO, uma série de novos experimentos foram realizados utilizando a linhagem HSC3. Nesses experimentos adicionais, o efeito dos compostos sobre a viabilidade celular foi confirmado através do ensaio de exclusão de azul de tripam, enquanto o conteúdo do DNA nuclear, que reflete as fases do ciclo celular, a análise morfológica, a externalização da fosfatidilserina, despolarização mitocondrial e aumento da produção de espécies reativas de oxigênio foram determinados por citometria de fluxo. Adicionalmente, outros ensaios foram realizados para avaliar os efeitos da β -lapachona e seus derivados 3-iodo sobre as alterações morfológicas também através da coloração por May-Grünwald-Giemsa, ativação das caspases através de ensaio colorimétrico e intercalação de DNA utilizando o brometo de etídio como agente intercalante.

6.3.1 *Efeito da β -lapachona e seus derivados 3-iodo sobre a viabilidade de células HSC3*

A confirmação dos efeitos citotóxicos da β -lapachona e seus derivados 3-iodo sobre viabilidade celular foi realizada utilizando o ensaio de exclusão por azul de tripam em células HSC3 (Figura 3). Os resultados demonstraram que o tratamento com todos os compostos reduziu significativamente o número de células HSC3 viáveis quando comparado com o controle negativo (DMSO 0,2%) após 12, 24, 48 e 72 horas de exposição. A doxorrubicina, utilizada como controle positivo, também reduziu o número de células viáveis a partir de 12 horas de tratamento. Em relação ao número de células não viáveis, não houve diferenças significativas entre os grupos.

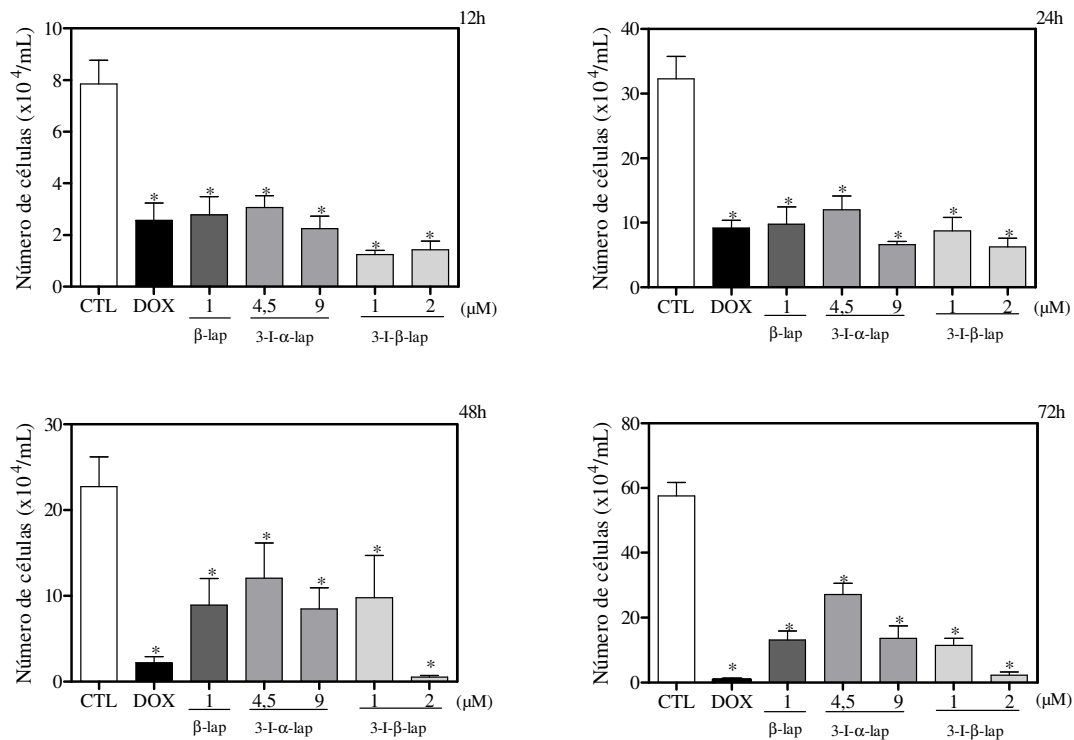


Figura 3. Efeito da β -lapachona e seus derivados 3-iodo sobre a viabilidade de células HSC3, determinado pelo ensaio de exclusão do corante azul de tripam após 12, 24, 48 e 72 horas de tratamento. O controle negativo foi tratado com o veículo (DMSO 0,2%) utilizado para solubilizar e diluir as substâncias teste. A doxorubicina (DOX, 0,5 μ M) foi utilizada como controle positivo. Os valores respondem à média \pm E.P.M. de três experimentos independentes realizados em duplicata. * $p < 0,05$ quando comparado com o grupo controle negativo por ANOVA (análise de variância) seguido por Student Newman-Keuls.

6.3.2 Efeito da β -lapachona e seus derivados 3-iodo sobre o ciclo celular e fragmentação do DNA internucleosomal em células HSC3

A fragmentação do DNA internucleosomal foi analisada por citometria de fluxo, com o intuito de diferenciar as fases do ciclo celular. As células em sub-G₁ foram consideradas como células com fragmentação do DNA internucleosomal. Após 24 horas de incubação, um aumento significativo de células HSC3 na fase G₂/M foi observado (40,62% para o tratamento com β -lapachona e 41,47% para o tratamento com 3-I- α -lapachona 9 μ M em comparação com 20,01% do controle negativo). A 3-I- β -lapachona 1 μ M também aumentou o número de células G₂/M, mas o valor não foi estatisticamente significativo. Essa parada do ciclo celular na fase G₂/M foi seguida de aumento significativo de fragmentação do DNA internucleosomal, como pode ser observado após 48 e 72 horas de incubação com 3-I- β -lapachona. O tratamento com β -lapachona e 3-I- α -lapachona também aumentou a fragmentação do DNA internucleosomal, mas o valor não foi estatisticamente significativo.

A doxorrubicina, utilizada como controle positivo, induziu parada do ciclo celular na fase G₂/M com 24 horas de incubação. A partir de 48 horas de incubação, a parada do ciclo celular foi seguida do aumento da fragmentação do DNA internucleosomal, como observado pelo aumento significativo do número de células em sub-G₁.

A tabela 5 apresenta os resultados da análise das fases do ciclo celular e a Figura 4 mostra os histogramas representativos do ciclo celular após o tratamento com β -lapachona e seus derivados 3-iodo.

Tabela 5. Efeito da β -lapachona e seus derivados 3-iodo sobre o ciclo celular e fragmentação do DNA internucleosomal em células HSC3

Tratamento	Concentração (μ M)	Distribuição do conteúdo de DNA (%)			
		Sub-G ₁	G ₀ /G ₁	S	G ₂ /M
12h de tratamento					
DMSO 0,2%	-	2,81 \pm 1,15	51,51 \pm 3,71	11,49 \pm 2,42	25,69 \pm 1,01
Doxorrubicina	0,5	8,06 \pm 3,05	48,10 \pm 9,19	9,72 \pm 1,71	42,30 \pm 7,21
β -lapachona	1	5,68 \pm 1,56	32,00 \pm 3,97*	21,88 \pm 3,91*	37,51 \pm 6,23
3-I- α -lapachona	4,5	8,39 \pm 3,02	36,25 \pm 2,57	24,81 \pm 3,31*	27,76 \pm 2,79
	9	8,10 \pm 2,28	36,77 \pm 1,10	25,76 \pm 1,24*	30,21 \pm 6,35
3-I- β -lapachona	1	7,68 \pm 4,35	33,89 \pm 3,77*	18,07 \pm 1,12	34,52 \pm 4,53
	2	14,93 \pm 4,76	33,10 \pm 1,81*	16,55 \pm 3,34	29,19 \pm 5,24
24h de tratamento					
DMSO 0,2%	-	5,20 \pm 0,78	55,01 \pm 3,33	16,45 \pm 1,62	20,01 \pm 1,88
Doxorrubicina	0,5	18,92 \pm 1,89	31,76 \pm 2,93*	10,90 \pm 1,51	37,16 \pm 4,15*
β -lapachona	1	4,62 \pm 1,0	32,97 \pm 6,20*	17,26 \pm 3,01	40,62 \pm 5,66*
3-I- α -lapachona	4,5	8,28 \pm 2,31	41,97 \pm 4,54	15,99 \pm 1,25	32,19 \pm 3,75
	9	8,74 \pm 1,39	33,15 \pm 6,27*	16,60 \pm 3,81	41,47 \pm 3,86*
3-I- β -lapachona	1	9,16 \pm 2,93	41,85 \pm 2,50	14,15 \pm 2,82	33,49 \pm 3,69
	2	27,10 \pm 9,83*	38,17 \pm 6,51	13,32 \pm 2,95	21,15 \pm 2,04
48h de tratamento					
DMSO 0,2%	-	10,60 \pm 1,75	56,13 \pm 5,20	14,26 \pm 2,33	13,72 \pm 1,40
Doxorrubicina	0,5	65,74 \pm 3,29*	14,39 \pm 2,49*	5,69 \pm 1,71*	8,83 \pm 1,08
β -lapachona	1	25,59 \pm 4,48	38,08 \pm 4,14*	12,24 \pm 3,06	23,74 \pm 4,05
3-I- α -lapachona	4,5	15,95 \pm 1,37	49,81 \pm 2,62	10,28 \pm 1,58	18,87 \pm 2,53
	9	18,80 \pm 1,46	47,58 \pm 2,99	9,69 \pm 1,43	23,22 \pm 3,79
3-I- β -lapachona	1	32,34 \pm 10,07*	38,92 \pm 5,55*	7,97 \pm 1,60	20,58 \pm 4,46
	2	80,83 \pm 5,51*	11,56 \pm 4,31*	2,93 \pm 1*	4,69 \pm 1,46
72h de tratamento					
DMSO 0,2%	-	17,35 \pm 1,68	62,40 \pm 6,04	7,58 \pm 0,89	10,35 \pm 2,58
Doxorrubicina	0,5	69,52 \pm 10,12*	12,89 \pm 4,33*	4,87 \pm 1,63	13,81 \pm 4,87
β -lapachona	1	22,41 \pm 1,47	39,29 \pm 5,13*	10,38 \pm 2,18	29,09 \pm 2,52*
3-I- α -lapachona	4,5	26,04 \pm 4,13	44,61 \pm 5,18*	8,11 \pm 2,14	20,30 \pm 8,02
	9	27,32 \pm 3,14	40,32 \pm 3,95*	10,26 \pm 1,95	19,00 \pm 2,76
3-I- β -lapachona	1	34,68 \pm 3,21	39,14 \pm 4,26*	11,01 \pm 1,88	13,57 \pm 1,55
	2	80,85 \pm 6,27*	12,67 \pm 4,64*	1,98 \pm 0,53	4,31 \pm 1,44

A tabela apresenta os valores correspondentes a média \pm E.P.M de três experimentos independentes realizados em duplicata. O controle negativo foi tratado com o veículo (DMSO 0,2%) utilizado para solubilizar e diluir as substâncias. A doxorrubicina foi usada como controle positivo. Os detritos celulares foram omitidos das análises e 10.000 eventos foram analisados por amostra. * $p < 0,05$ quando comparado ao grupo controle negativo por ANOVA (análise de variância) seguido por Student Newman-Keuls.

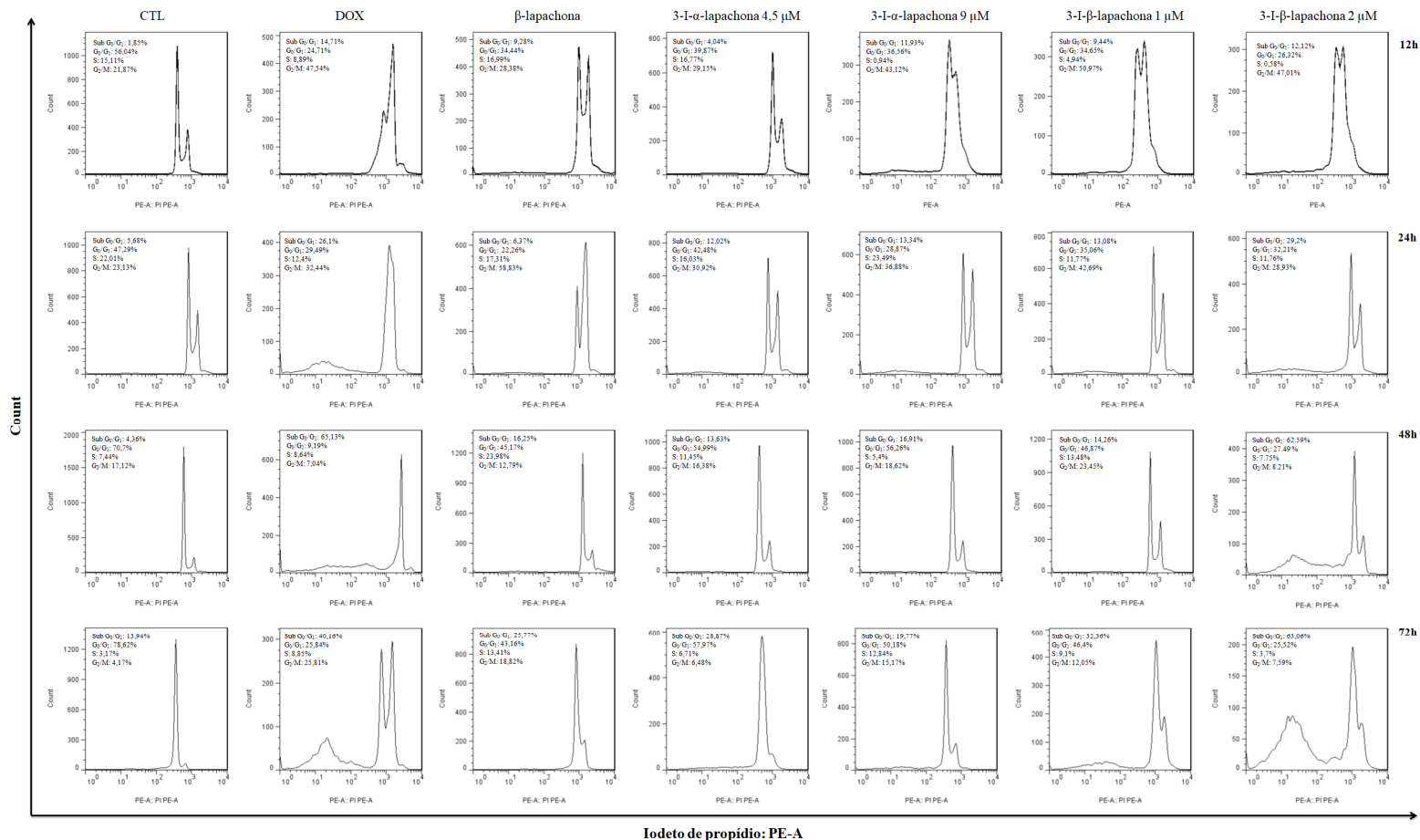


Figura 4. Histogramas representativos da análise da progressão do ciclo celular após o tratamento com β -lapachona e seus derivados 3-iodo. As células foram tratadas por 12, 24, 48 e 72 h. Em seguida, as células foram marcadas com iodeto de propídio (2 μ g/mL) e o conteúdo de DNA foi analisado por citometria de fluxo. A distribuição e porcentagem de células em Sub- G_1 , G_0/G_1 , S e G_2/M estão indicadas. O controle negativo foi tratado com o veículo (DMSO 0,2%) utilizado para solubilizar e diluir as substâncias. A doxorubicina (DOX, 0,5 μ M) foi utilizada como controle positivo. Os dados são representativos de três experimentos independentes realizados em duplicata. Os detritos celulares foram omitidos das análises e 10.000 eventos foram analisados por amostra.

6.3.3 Efeito da β -lapachona e seus derivados 3-iodo sobre a morfologia das células HSC3

Na análise morfológica de células HSC3 tratadas com β -lapachona e seus derivados 3-iodo através da coloração May-Grünwald-Giemsa (Figura 5), observamos uma redução no volume celular, redução da proporção núcleo/citoplasma, aumento da fragmentação nuclear e condensação da cromatina, picnose e cariorrexe. Ainda, podemos observar uma perda de adesão celular e formação de corpos apoptóticos, essas alterações foram bem evidentes nas células tratadas com 3-I- β -lapachona e doxorubicina a partir de 24h de tratamento.

Em adição, a análise morfológica também foi avaliada por citometria de fluxo. O tratamento de células HSC3 com β -lapachona e seus derivados 3-iodo causou encolhimento celular, observado pelo decréscimo da dispersão luminosa para frente (FSC) e condensação nuclear, como observado por um aumento na dispersão lateral (SSC) (Figura 6). A doxorubicina, utilizada como controle positivo, também causou alterações condizentes com mecanismos apoptóticos de morte. Conforme demonstrado, os efeitos na morfologia foram concentração e tempo dependente.

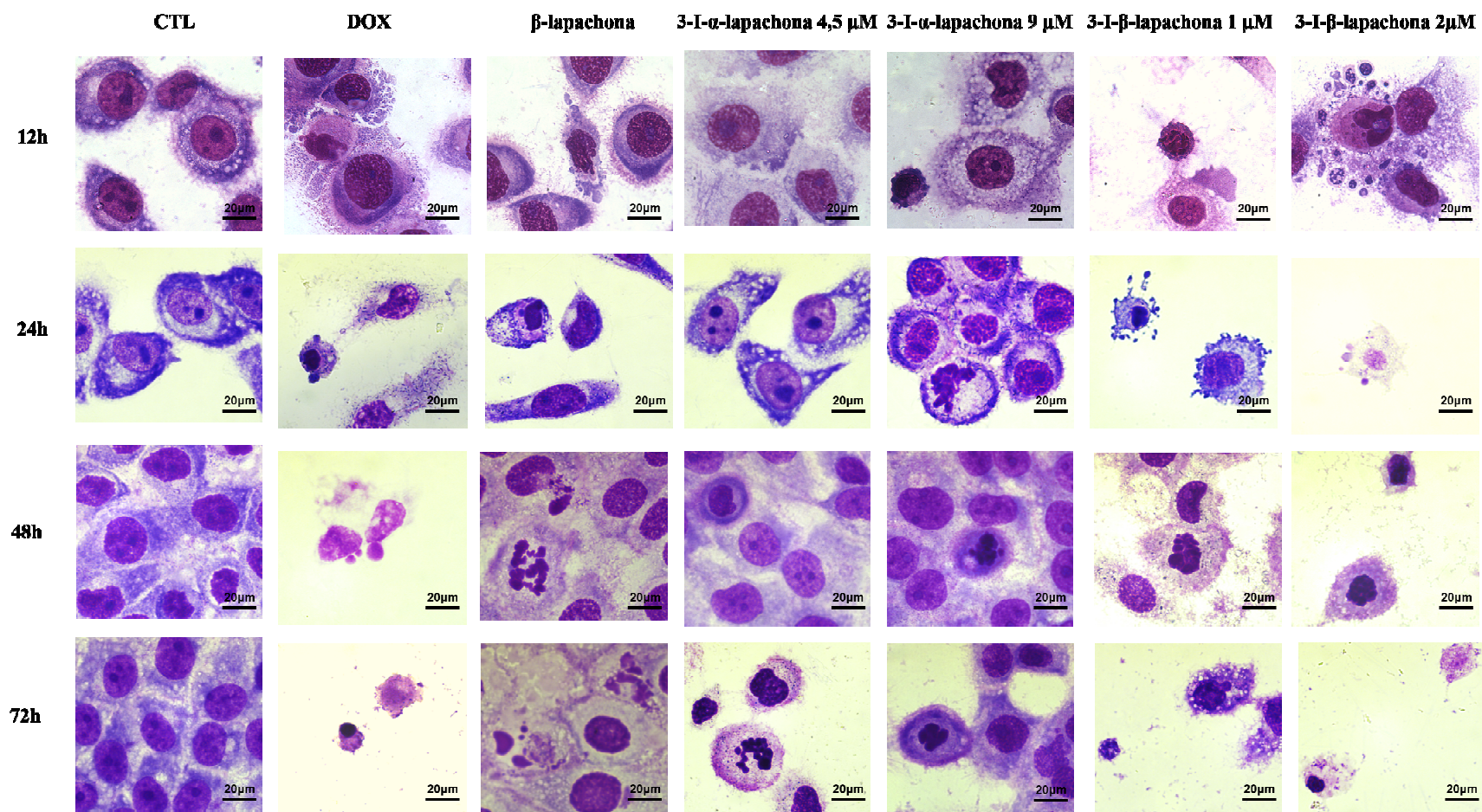


Figura 5. Fotomicrografias representativas da análise morfológica de células HSC3 através da coloração com May-Grünwald-Giemsa, após o tratamento com β -lapachona e seus derivados 3-iodo. As células foram tratadas com os compostos-teste por 12, 24, 48 e 72 h. A doxorubicina (DOX, 0,5 μ M) foi utilizada como controle positivo. O controle negativo foi tratado com o veículo (DMSO 0,2%) utilizado para solubilizar e diluir as substâncias. As imagens são representativas de três experimentos independentes realizados em duplicata e analisadas em microscópio óptico.

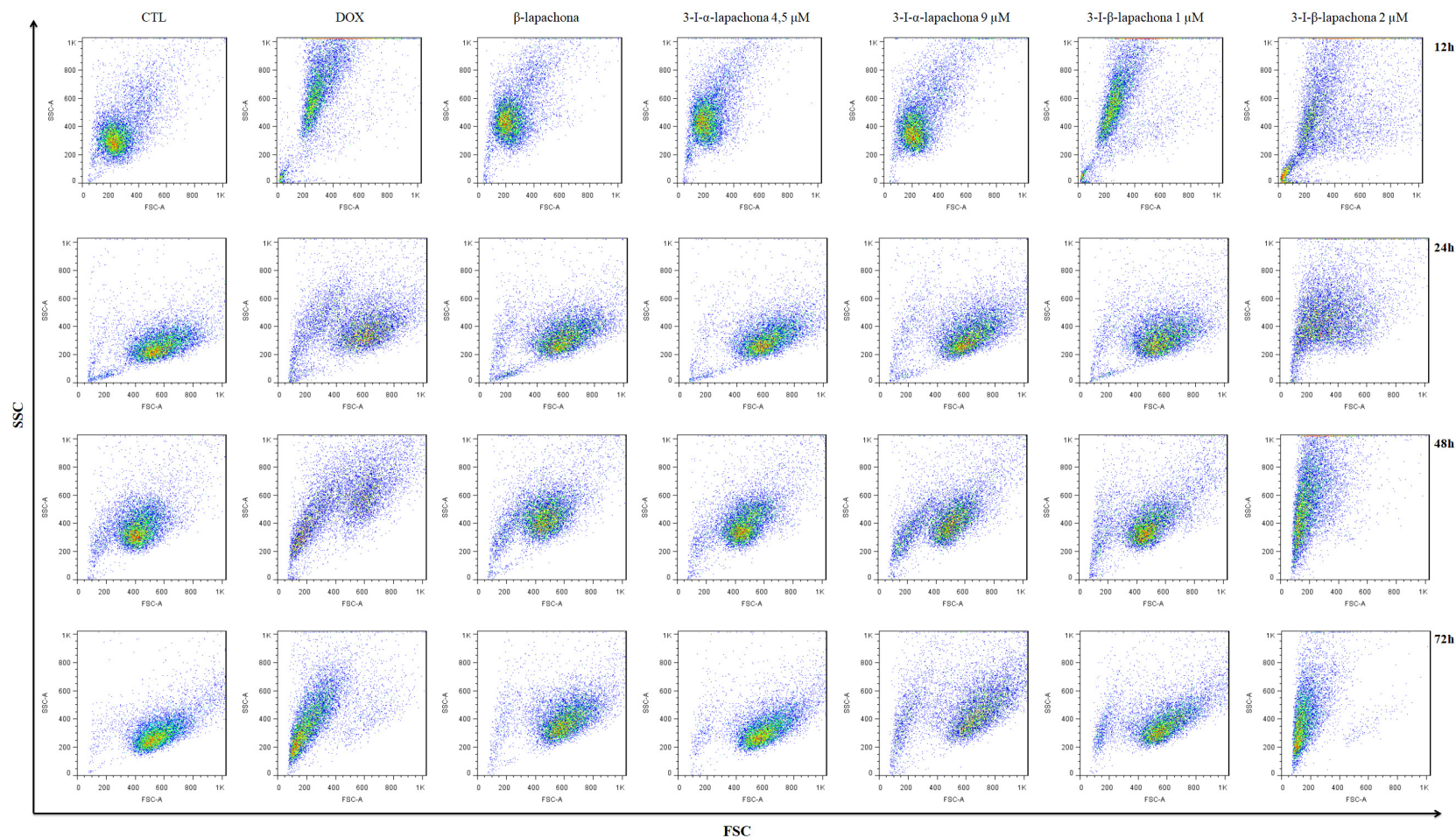


Figura 6. Dotplots representivos das características de dispersão da luz em células HSC3 tratadas com β -lapachona e seus derivados 3-iodo. FSC (*Forward scatter* – desvio de luz para frente) e SSC (*Side scatter* – desvio de luz para o lado), determinados por citometria, foram utilizados como parâmetros de tamanho relativo e granuloseza ou complexidade interna da célula, respectivamente, após o período de tratamento de 12, 24, 48 e 72 h. O controle negativo foi tratado com o veículo (DMSO 0,2%) utilizado para solubilizar e diluir as substâncias. A doxorubicina (DOX, 0,5 μ M) foi utilizada como controle positivo. Os dados são representativos de três experimentos independentes realizados em duplicata. Os detritos celulares foram omitidos das análises e 10.000 eventos foram analisados por amostra.

6.3.4 Efeito da β -lapachona e seus derivados 3-iodo sobre a externalização da fosfatidilserina em células HSC3

A avaliação do perfil de morte celular foi verificada a partir da externalização da fosfatidilserina (Figuras 7 e 8) e permeabilidade da membrana citoplasmática utilizando anexina V-FITC e IP. Os resultados obtidos demonstram uma exposição significativa de fosfatidilserina em células HSC3 tratadas com 3-I- β -lapachona (2 μ M), em todos os tempos avaliados, quando comparada com o grupo controle negativo (DMSO 0,2%). Por outro lado, a β -lapachona e 3-I- α -lapachona demonstraram uma exposição significativa de fosfatidilserina após 72 horas de incubação. Adicionalmente, um aumento da permeabilidade da membrana citoplasmática foi observada em células HSC3 tratadas com 3-I- β -lapachona (2 μ M) a partir de 48 horas de incubação, indicando um processo tardio de morte por apoptose. Em adição, o pré-tratamento com um inibidor de caspases, Z-VAD(OMe)-FMK impediu o aumento de apoptose induzida pelos compostos-teste nas concentrações testadas, após 72h de tratamento (Figuras 9 e 10).

A doxorrubicina (0,5 μ M), utilizada como controle positivo, também induziu aumento na externalização da fosfatidilserina de modo significativo em todos os tempos de tratamento, quando comparada ao grupo controle negativo (DMSO 0,2%). Um aumento da marcação apenas para IP também foi observado, indicando um dano membranar sem exposição externa da fosfatidilserina.

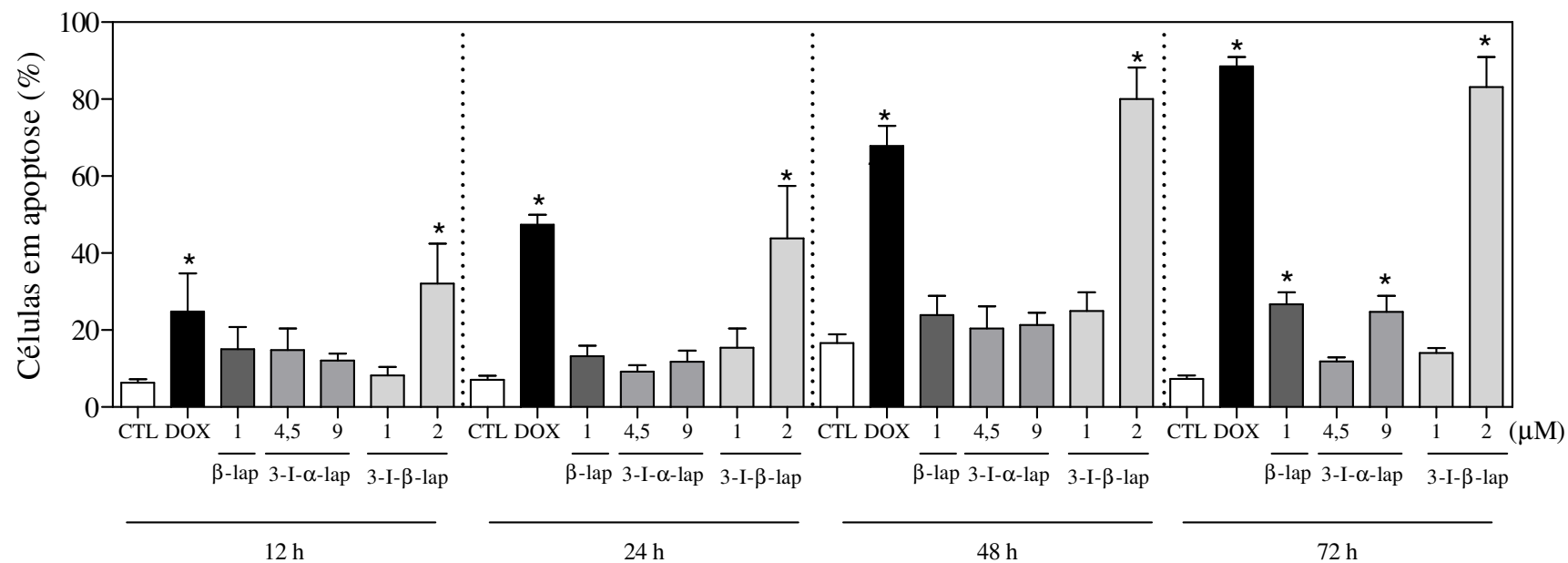


Figura 7. Efeito da β -lapachona e seus derivados 3-iodo sobre a externalização da fosfatidilserina em células HSC3 determinado por citometria de fluxo usando anexina V-FITC. O controle negativo foi tratado com o veículo (DMSO 0,2%) utilizado para solubilizar e diluir as substâncias teste. A doxorrubicina (DOX, 0,5 μ M) foi usada como controle positivo. Os valores respondem à média \pm E.P.M. de três experimentos independentes realizados em duplicata. Os detritos celulares foram omitidos das análises e 10.000 eventos foram analisados por amostra. * $p < 0,05$ quando comparado ao grupo controle negativo por ANOVA (análise de variância) seguido por Student Newman-Keuls.

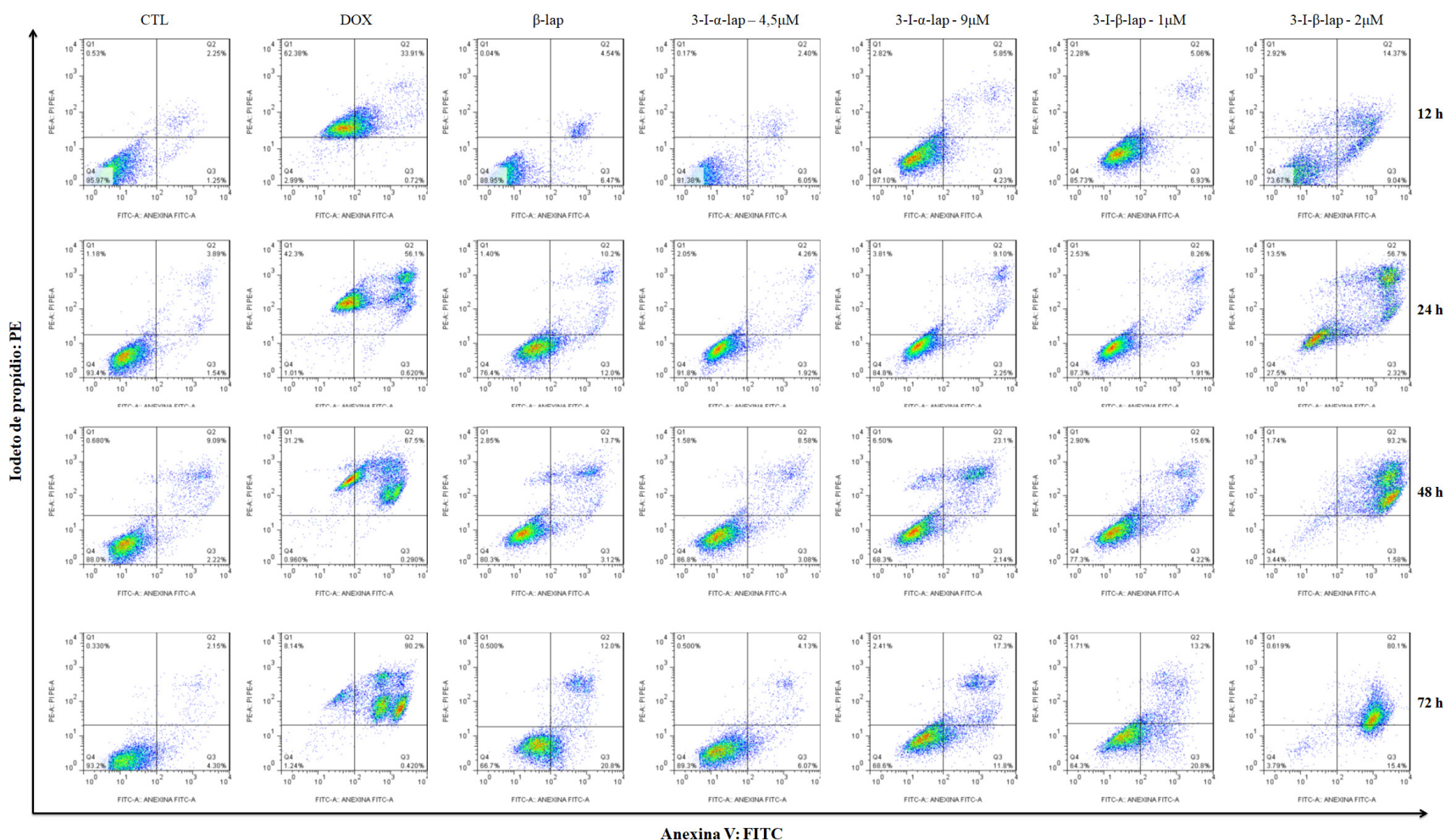


Figura 8. Dotplots representivos do efeito da β -lapachona e seus derivados 3-iodo sobre a externalização da fosfatidilserina de células HSC3, determinados por citometria de fluxo usando anexina V-FITC. O controle negativo foi tratado com o veículo (DMSO 0,2%) utilizado para solubilizar e diluir as substâncias testes. A doxorrubicina (0,5 μ M) foi usada como controle positivo. Os dados são representativos de três experimentos independentes realizados em duplicata. Os detritos celulares foram omitidos das análises e 10.000 eventos foram analisados por amostra.

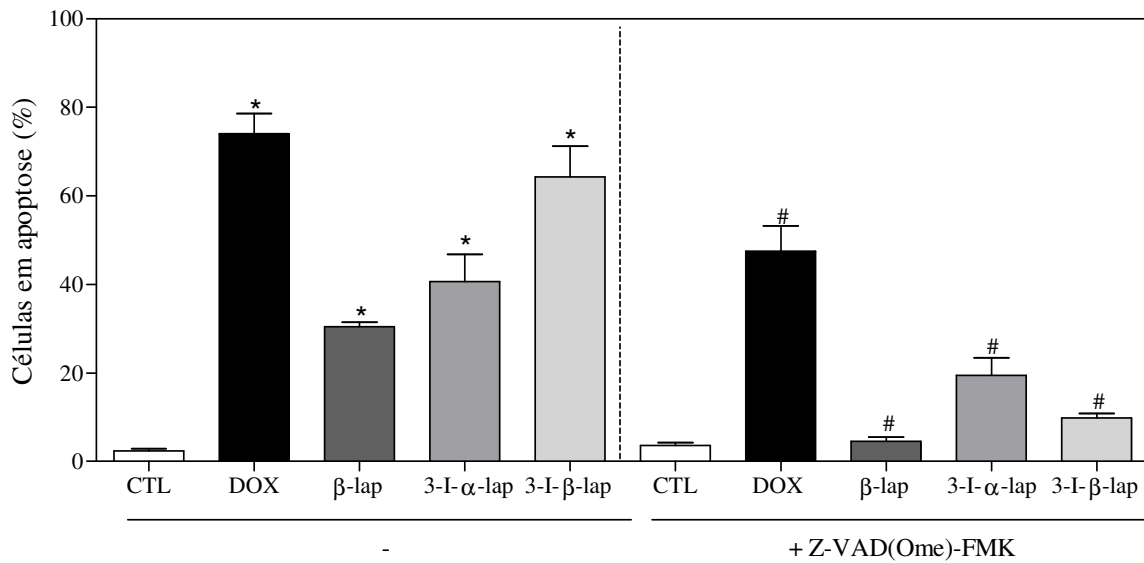


Figura 9. Efeito da β -lapachona e seus derivados 3-iodo sobre a externalização da fosfatidilserina em células HSC3 determinado por citometria de fluxo usando anexina V-FITC com o pré-tratamento com inibidor Z-VAD(Ome)-FMK após 72h de tratamento com os compostos-teste. As concentrações utilizadas para este ensaio foram 1, 9 e 2 μ M para β -lapachona, 3-I- α -lapachona e 3-I- β -lapachona, respectivamente. O controle negativo foi tratado com o veículo (DMSO 0,2%) utilizado para solubilizar e diluir as substâncias teste. A doxorrubicina (DOX, 0,5 μ M) foi usada como controle positivo. Os valores respondem à média \pm E.P.M. de três experimentos independentes realizados em duplicata. Os detritos celulares foram omitidos das análises e 10.000 eventos foram analisados por amostra. * $p < 0,05$ quando comparado ao grupo controle negativo por ANOVA (análise de variância) seguido por Student Newman-Keuls. # $p < 0,05$ em comparação com o respectivo tratamento sem inibidor de caspases por ANOVA seguido do teste de Student Newman-Keuls.

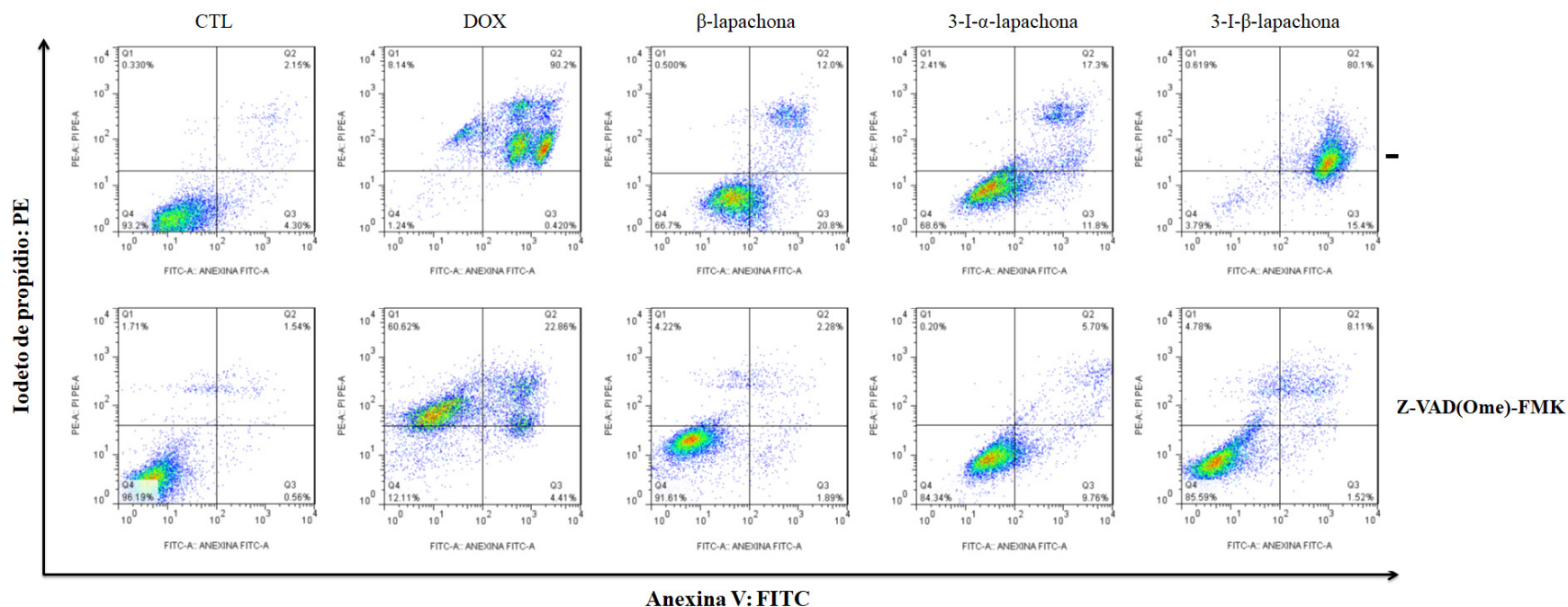


Figura 10. Dotplots representativos dos efeitos do inibidor Z-VAD(Ome)-FMK sobre a externalização da fosfatidilserina de células HSC3 tratadas com β -lapachona e seus derivados 3-iodo, determinados por citometria de fluxo usando anexina V-FITC. As concentrações utilizadas para este ensaio foram 1, 9 e 2 μ M para β -lapachona, 3-I- α -lapachona e 3-I- β -lapachona, respectivamente. O controle negativo foi tratado com o veículo (DMSO 0,2%) utilizado para solubilizar e diluir as substâncias testes. A doxorrubicina (DOX, 0,5 μ M) foi usada como controle positivo. Os dados são representativos de três experimentos independentes realizados em duplicata. Os detritos celulares foram omitidos das análises e 10.000 eventos foram analisados por amostra.

6.3.5 Efeito da β -lapachona e seus derivados 3-iodo na atividade das caspases 8 e 9

A figura 11 apresenta o efeito da β -lapachona e seus derivados 3-iodo na atividade das caspases 8 e 9, os resultados demonstraram um aumento significativo na ativação das caspases 8 e 9 em células HSC3 tratadas com β -lapachona e seus derivados 3-iodo nas concentrações testadas em comparação com o controle negativo. Ainda, observamos uma ativação significativa das caspases 8 e 9 após o tratamento com o controle positivo, doxorubicina.

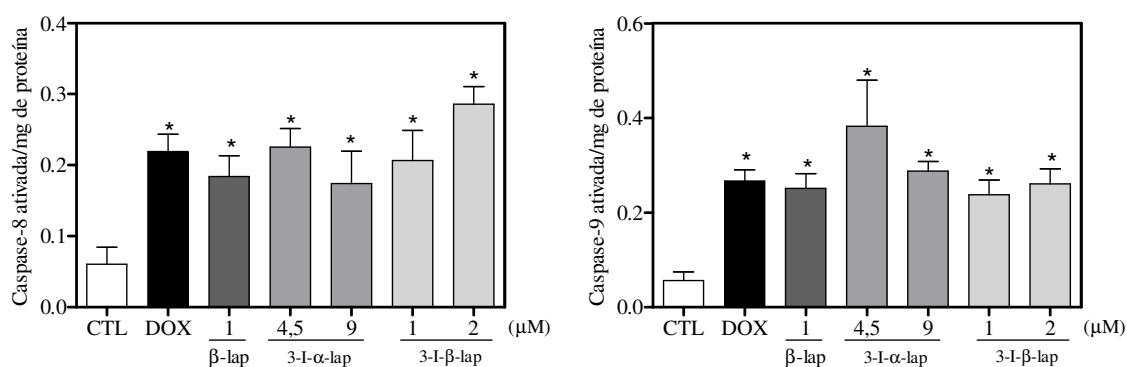


Figura 11. Efeito da β -lapachona e seus derivados 3-iodo na atividade das caspases 8 e 9 determinada por ensaio colorimétrico após 72 horas de incubação. O controle negativo (CTL) foi tratado com o veículo (0,2% de DMSO) usado para diluir o composto testado. A doxorubicina (DOX, 0,5 μ M) foi utilizada como controle positivo. Os dados são apresentados como a média \pm E.P.M. de três experiências independentes realizadas em duplicata. * $p < 0,05$ em comparação com o controle negativo por ANOVA seguido pelo teste de Student Newman-Keuls.

6.3.6 Efeito da β -lapachona e seus derivados 3-iodo sobre a despolarização mitocondrial

A Figura 12 apresenta os resultados da determinação do potencial transmembrânico mitocondrial em células da linhagem HSC3 tratadas com β -lapachona e seus derivados 3-iodo. Os resultados demonstraram um aumento significativo da despolarização da membrana mitocondrial através da redução da marcação de rodamina 123 após 48 horas de tratamento com os compostos-teste. A doxorrubicina, usada como controle positivo, também reduziu significativamente o potencial transmembrânico mitocondrial.

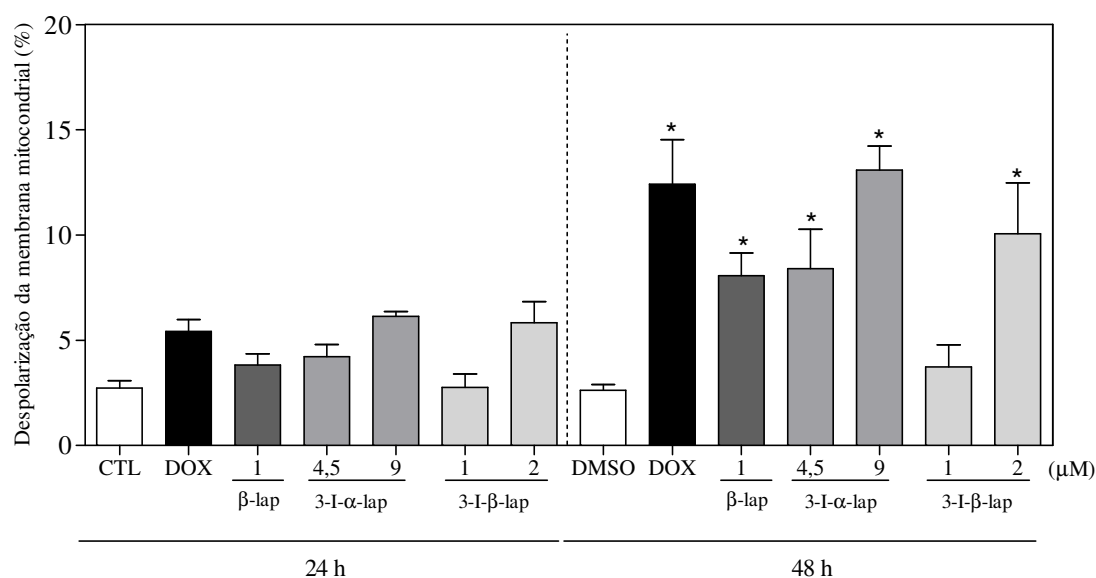


Figura 12. Efeito da β -lapachona e seus derivados 3-iodo sobre o potencial transmembrânico de células HSC3 determinado por citometria de fluxo usando rodamina 123. O controle negativo foi tratado com o veículo (DMSO 0,2%) utilizado para solubilizar e diluir as substâncias teste. A doxorrubicina (DOX, 0,5 μ M) foi usada como controle positivo. Dez mil eventos foram analisados em cada experimento e os detritos celulares foram excluídos das análises. Os valores respondem à média \pm E.P.M. de três experimentos independentes realizados em duplicata. * $p < 0,05$ quando comparado com o controle negativo por ANOVA (análise de variância) seguido por Student Newman-Keuls.

6.3.7 Efeito da atividade citotóxica da β -lapachona e seus derivados 3-iodo em células de fibroblastos embrionário nocauteadas para o gene *BAD*

A atividade citotóxica da β -lapachona e seus derivados 3-iodo foi avaliada em células de fibroblastos embrionários imortalizados de murinos, não mutado, (WT SV40 MEF) e fibroblastos embrionários imortalizados de murinos com o gene *BAD* nocauteado (BAD KO SV40 MEF). Os valores de CI_{50} para β -lapachona foram de 0,72 μ M para célula WT SV40 MEF e 0,50 μ M para BAD KO SV40 MEF. A 3-I- α -lapachona apresentou valores de CI_{50} de 5,14 e 3,50 μ M, em células WT SV40 MEF e BAD KO SV40 MEF, respectivamente. Os valores de CI_{50} para 3-I- β -lapachona foram de 3,97 μ M para célula WT SV40 MEF e 1,70 μ M para BAD KO SV40 MEF. O controle positivo, doxorubicina, apresentou valores de CI_{50} de 0,04 e 0,41 μ M, em células WT SV40 MEF e BAD KO SV40 MEF, respectivamente.

6.3.8 Efeito da β -lapachona e seus derivados 3-iodo na produção de espécies reativas de oxigênio

A Figura 13 apresenta os resultados da produção de espécies reativas de oxigênio (ERO) após 1 e 3 horas de tratamento com β -lapachona e seus derivados 3-iodo em células HSC3 através da marcação de diacetato de 2,7-diclorodihidrofluoresceína (DCF-DA). Os resultados demonstraram um aumento significativo dos níveis de espécies reativas de oxigênio após 1h de incubação nas células HSC3 tratadas com β -lapachona e 3-I- α -lapachona (9 μ M). Por outro lado, o composto 3-I- β -lapachona (2 μ M) aumentou significativamente os níveis de espécies reativas de oxigênio após 1 e 3h de incubação. A doxorrubicina e o peróxido de hidrogênio, usados como controles positivos, também apresentaram um aumento significativo nos níveis de espécies reativas de oxigênio após 1 e 3 horas de incubação em células HSC3.

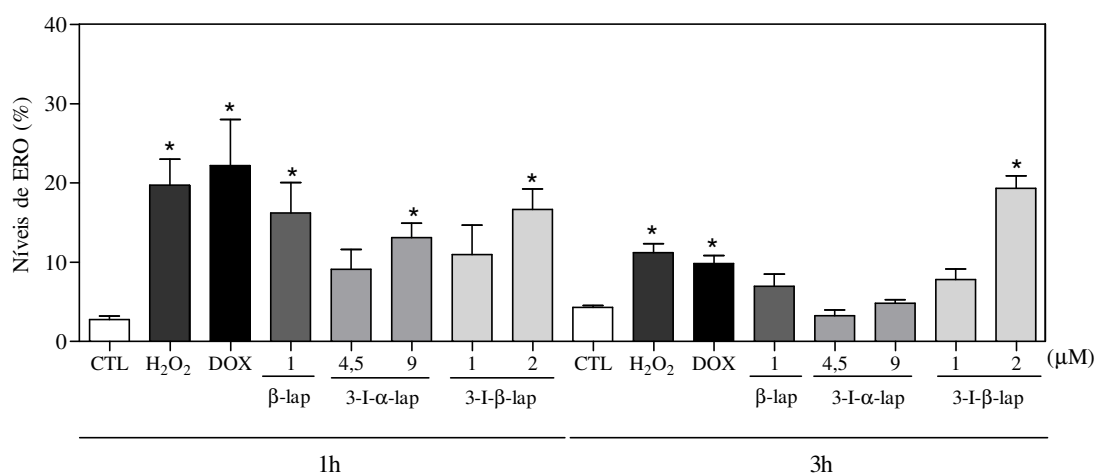


Figura 13. Efeito da β -lapachona e seus derivados 3-iodo sobre os níveis de espécies reativas de oxigênio (ERO) em células HSC3 após 1 e 3 h determinado por citometria de fluxo. O controle negativo foi tratado com o veículo (DMSO 0,2%) utilizado para solubilizar e diluir as substâncias teste. O peróxido de hidrogênio (H₂O₂, 200 μ M) e a doxorrubicina (DOX, 0,5 μ M) foram utilizados como controles positivo. Dez mil eventos foram analisados em cada experimento e os detritos celulares foram excluídos das análises. Os valores respondem à média \pm E.P.M. de três experimentos independentes realizados em duplicata. * $p < 0,05$ quando comparado com o controle negativo por ANOVA (análise de variância) seguido por Student Newman-Keuls.

Em adição, o pré-tratamento com o antioxidante N-acetil-L-cisteína (NAC) impediu o aumento dos níveis de ERO intracelular induzido pela β -lapachona e seus derivados de 3-iodo (Figura 14A). Além disso, o pré-tratamento com catalase, que induz a decomposição de peróxido de hidrogênio, também impediu o aumento dos níveis de ERO intracelular induzido pelos compostos, indicando que há uma produção de peróxido de hidrogênio pelos compostos-teste (Figura 14B).

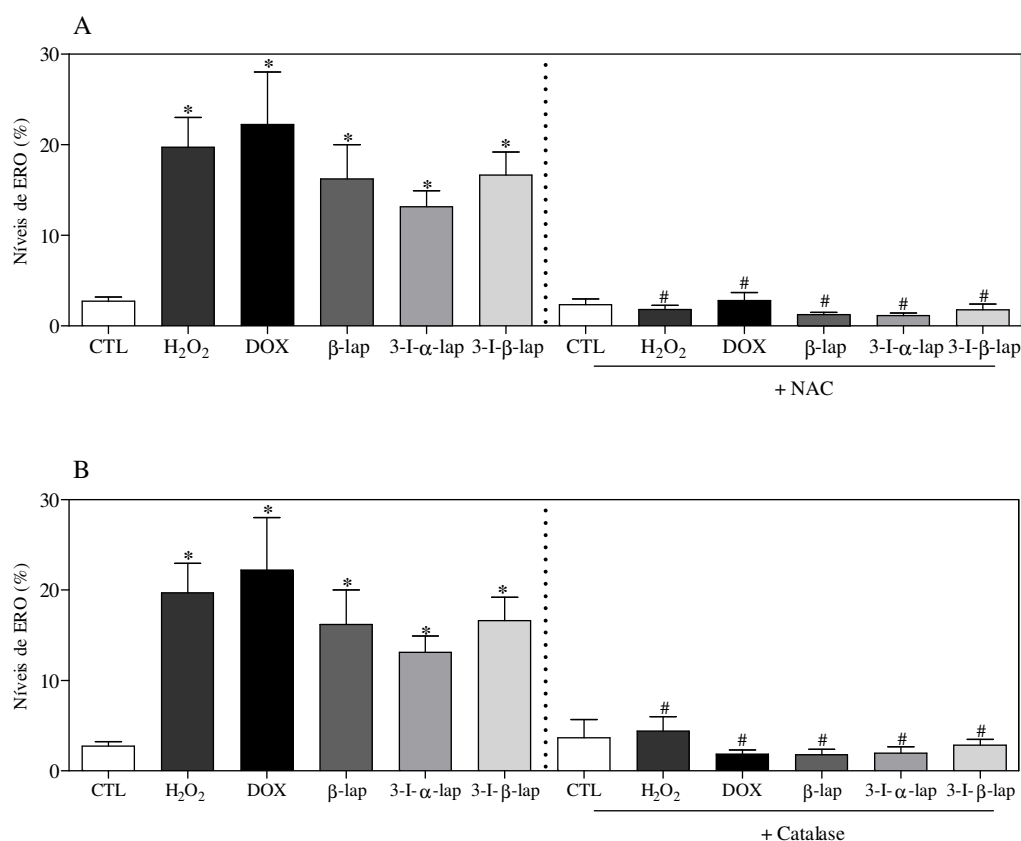


Figura 14. Efeito da β -lapachona e seus derivados 3-iodo sobre os níveis de espécies reativas de oxigênio em células HCS3 determinado por citometria de fluxo com o pré-tratamento com NAC (A) e catalase (B). O controle negativo foi tratado com o veículo (DMSO 0,2%) utilizado para solubilizar e diluir as substâncias teste. O peróxido de hidrogênio (H₂O₂, 200 μ M) e a doxorubicina (DOX, 0,5 μ M) foram utilizados como controles positivo. Dez mil eventos foram analisados em cada experimento e os detritos celulares foram excluídos das análises. Os valores respondem à média \pm E.P.M. de três experimentos independentes realizados em duplicata. * $p < 0,05$ quando comparado com o controle negativo por ANOVA (análise de variância) seguido por Student Newman-Keuls. # $p < 0,05$ em comparação com o respectivo tratamento sem NAC ou catalase por ANOVA seguido do teste de Student Newman-Keuls.

O pré-tratamento com NAC também impediu o aumento de apoptose induzida pelos compostos-teste nas concentrações testadas, após 72h de tratamento (Figuras 15 e 16).

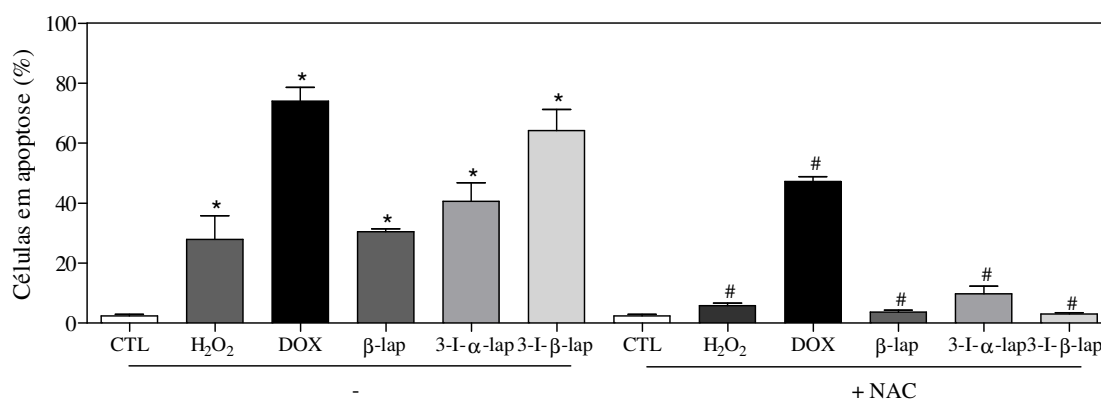


Figura 15. Efeito da β -lapachona e seus derivados 3-iodo sobre a externalização da fosfatidilserina em células HSC3 determinando por citometria de fluxo usando anexina V-FITC com o pré-tratamento com o antioxidante NAC, após 72h de tratamento com os compostos-teste. As concentrações utilizadas para este ensaio foram 1, 9 e 2 μ M para β -lapachona, 3-I- α -lapachona e 3-I- β -lapachona, respectivamente. O controle negativo foi tratado com o veículo (DMSO 0,2%) utilizado para solubilizar e diluir as substâncias teste. A doxorubicina (DOX, 0,5 μ M) foi usada como controle positivo. Os valores respondem à média \pm E.P.M. de três experimentos independentes realizados em duplicata. Os detritos celulares foram omitidos das análises e 10.000 eventos foram analisados por amostra. * $p < 0,05$ quando comparado ao grupo controle negativo por ANOVA (análise de variância) seguido por Student Newman-Keuls. # $p < 0,05$ em comparação com o respectivo tratamento sem NAC por ANOVA seguido do teste de Student Newman-Keuls.

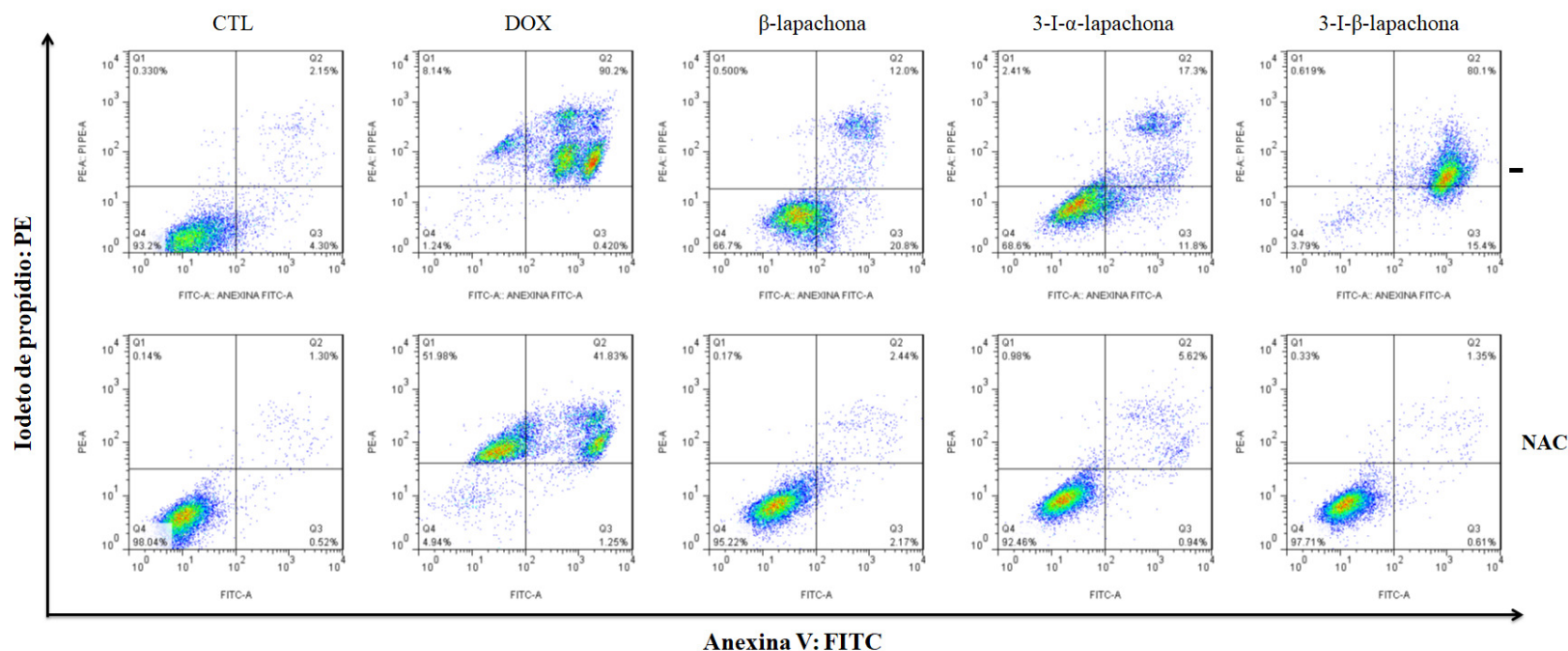


Figura 16. Dotplots representativos dos efeitos do antioxidante N-acetil-L-cisteína (NAC) sobre a externalização da fosfatidilserina de células HSC3 tratadas com β -lapachona e seus derivados 3-iodo, determinados por citometria de fluxo usando anexina V-FITC. As concentrações utilizadas para este ensaio foram 1, 9 e 2 μ M para β -lapachona, 3-I- α -lapachona e 3-I- β -lapachona, respectivamente. O controle negativo foi tratado com o veículo (DMSO 0,2%) utilizado para solubilizar e diluir as substâncias testes. A doxorrubicina (0,5 μ M) foi usada como controle positivo. Os dados são representativos de três experimentos independentes realizados em duplicata. Os detritos celulares foram omitidos das análises e 10.000 eventos foram analisados por amostra.

6.3.9 Efeito da β -lapachona e seus derivados 3-iodo na produção de óxido nítrico intracelular

A figura 17 apresenta os resultados da produção de óxido nítrico (NO) após 1 h de tratamento com β -lapachona e seus derivados 3-iodo em células HSC3. Os resultados demonstraram um aumento significativo dos níveis de óxido nítrico após 1h apenas para as células tratadas com 3-I- α -lapachona (9 μ M).

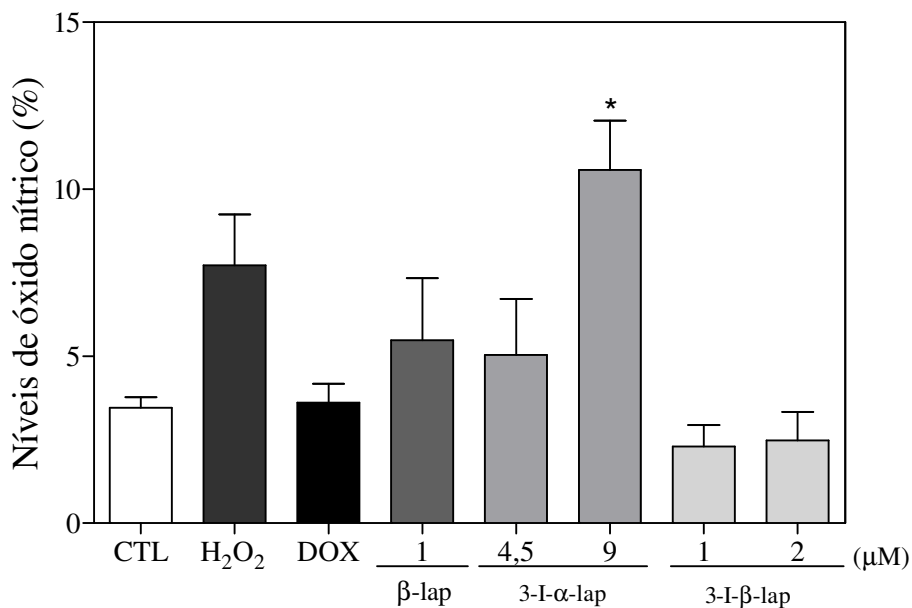


Figura 17. Efeito da β -lapachona e seus derivados 3-iodo sobre os níveis de óxido nítrico em células HSC3 após 1 h determinado por citometria de fluxo. O controle negativo foi tratado com o veículo (DMSO 0,2%) utilizado para solubilizar e diluir as substâncias teste. O peróxido de hidrogênio (H₂O₂, 200 μ M) e a doxorubicina (DOX, 0,5 μ M) foram utilizados como controles positivos. Dez mil eventos foram analisados em cada experimento e os detritos celulares foram excluídos das análises. Os valores respondem à média \pm E.P.M. de três experimentos independentes realizados em duplicata. * $p < 0,05$ quando comparado com o controle negativo por ANOVA (análise de variância) seguido por Student Newman-Keuls.

6.3.10 Efeito da β -lapachona e seus derivados 3-iodo na produção de ânions de superóxido intracelular

A Figura 18 apresenta os resultados da produção de ânions de superóxido intracelular após 1h de tratamento com β -lapachona e seus derivados 3-iodo e os resultados demonstraram que nenhum composto-teste induz aumento de superóxido intracelular nas concentrações testadas. Por outro lado, a doxorrubicina e o peróxido de hidrogênio, usados como controles positivos, apresentaram um aumento significativo nos níveis de superóxido após 1h de incubação em células HSC3.

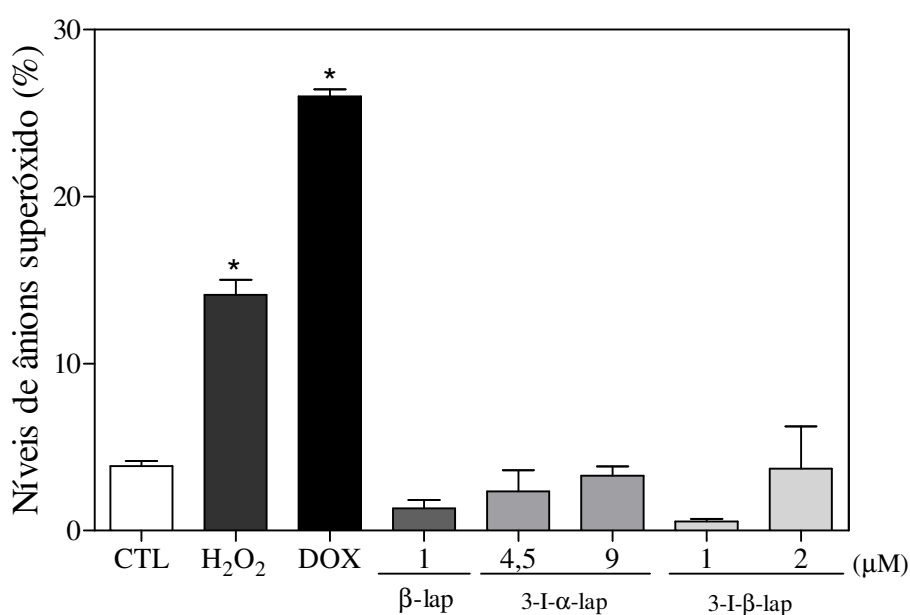


Figura 18. Efeito da β -lapachona e seus derivados 3-iodo sobre os níveis de óxido nítrico em células HSC3 após 1 h determinado por citometria de fluxo. O controle negativo foi tratado com o veículo (DMSO 0,2%) utilizado para solubilizar e diluir as substâncias teste. O peróxido de hidrogênio (H₂O₂, 200 μ M) e a doxorrubicina (DOX, 0,5 μ M) foram utilizados como controles positivos. A hidroetidina foi utilizada para detectar níveis de superóxido celular. Dez mil eventos foram analisados em cada experimento e os detritos celulares foram excluídos das análises. Os valores respondem à média \pm E.P.M. de três experimentos independentes realizados em duplicata. * $p < 0,05$ quando comparado com o controle negativo por ANOVA (análise de variância) seguido por Student Newman-Keuls.

6.3.11 Efeito da β -lapachona e seus derivados 3-iodo sobre a intercalação de DNA

A β -lapachona e seus derivados 3-iodo não conseguiram induzir a intercalação de DNA porque não diminuíram a fluorescência do brometo de etídio do DNA do timo do bezerro (ctDNA). Por outro lado, a doxorubicina, um intercalador de DNA conhecido, reduziu significativamente a fluorescência neste ensaio.

6.4 EFEITO DA β -LAPACHONA E DE SEUS DERIVADOS 3-iodo SOBRE A EXPRESSÃO DE GENES ALVOS RELACIONADOS AO CÂNCER EM CÉLULAS HSC3

O efeito da β -lapachona e de seus derivados 3-iodo sobre a expressão de 92 genes alvos relacionados ao câncer em células HSC3 foi analisado por qPCR Array usando uma placa de 96 poços *TaqMan*[®] *Array Human Molecular Mechanisms of Cancer* (ID 4418806, Applied BiosystemsTM). Os genes avaliados no PCR Array estão relacionados com apoptose, proliferação, sobrevivência, migração, além de alguns componentes de vias de sinalização que estão alterados em células neoplásicas. Os resultados podem ser observados na Figura 19 e Tabela A1 (Apêndice).

Em relação aos genes relacionados a apoptose, o receptor da cadeia extrínseca apoptótica (FAS) apresentou uma superexpressão de RNAm após tratamento com doxorubicina (QR= 34,22) e 3-I- β -lapachona (QR= 4,18). Por outro lado, as células tratadas com β -lapachona (QR= 0,76) e 3-I- α -lapachona (QR= 0,92) apresentaram menores níveis de FAS transcrito em relação ao controle. No entanto, todas as células tratadas não apresentaram expressão de transcritos do ligante FASLG. Quanto às proteases que iniciam a cascata apoptótica, uma superexpressão de CASP8 RNAm foi detectada após tratamento com doxorubicina (QR= 40,15), embora transcritos de CASP9 não tenham sido observados. Por sua vez, as células tratadas com a 3-I- β -lapachona apresentaram superexpressão de transcritos de ambas as caspases, CASP 8 (QR= 4,94) e CASP9 (QR= 104,90). No entanto, os níveis de transcritos da CASP8 foram inferiores ao grupo controle em células tratadas com β -lapachona (QR= 0,89) e 3-I- α -lapachona (QR= 0,71). Por último, CASP9 RNAm apresentou níveis similares ao controle após tratamento com β -lapachona (QR= 1,59), enquanto que no tratamento com 3-I- α -lapachona não foi detectado expressão deste transcrito.

O gene anti-apoptótico BCL2 estava superexpresso após tratamento com doxorubicina (QR= 372,27) e 3-I- β -lapachona (QR=14) e, por outro lado, apresentou

níveis de transcritos similares ao controle após tratamento com 3-I- α -lapachona (QR= 1,51) e não foi detectado em células tratadas com β -lapachona. Porém, o gene pró-apotótico BAX apresentou níveis bastante elevados de RNAm após tratamento com doxorrubicina (QR= 1.346,13), β -lapachona (QR= 3,24) e 3-I- β -lapachona (QR= 37,86). No entanto, este gene se apresentou subexpresso em relação ao controle no tratamento com 3-I- α -lapachona (QR= 0,76).

Apesar do receptor do gene de sobrevivência celular, o IGF1R, estar superexpresso em células tratadas com doxorrubicina (QR= 1.398,54), β -lapachona (QR= 3,51) e 3-I- β -lapachona (QR= 22,07), nenhum transcrito do gene IGF1 foi detectado nas células após tratamento para qualquer droga aplicada. O tratamento com doxorrubicina e 3-I- β -lapachona provocaram uma superexpressão do sinal de sobrevivência AKT1 (Doxorrubicina: QR= 570,92; 3-I- β -lapachona: QR= 42,87), AKT2 (Doxorrubicina: QR= 211,03; 3-I- β -lapachona: QR= 17,12) e PI3K (Doxorrubicina: QR= 210,21; 3-I- β -lapachona: QR= 22,10). Porém, o tratamento com 3-I- α -lapachona provocou uma redução do sinal de sobrevivência celular em comparação a células não tratadas, ocorrendo menores níveis de transcrito de AKT2 (QR= 0,65) e PI3K (QR= 0,82), embora níveis similares de AKT1 RNAm (QR= 1,28). O tratamento com a β -lapachona teve resultados divergentes, sendo observado uma superexpressão de AKT1 (QR= 3,58), níveis de transcritos de PIK3 inferiores às células não tratadas (QR= 0,68) e de AKT2 RNAm apresentou níveis similares ao controle negativo (QR= 1,53).

Quanto à expressão gênica das ciclinas (CCNDs), após tratamento com doxorrubicina e 3-I- β -lapachona observou-se uma superexpressão de transcritos das ciclinas, CCND1 (doxorrubicina: QR= 1.645,54; 3-I- β -lapachona: QR= 41,35), CCND2 (doxorrubicina: QR= 658,45; 3-I- β -lapachona: QR= 25,81) e CCND3 (doxorrubicina: QR= 1.382,27; 3-I- β -lapachona: QR= 42,06). Em células tratadas com β -lapachona, foi observado superexpressão de transcritos de CCND1 (QR= 4,31) e CCND3 (QR=11,63), porém os níveis de transcritos CCND2 (QR= 2,58) foram similares ao controle. O tratamento com o 3-I- α -lapachona provocou uma subexpressão de CCND2 RNAm (QR= 0,63), enquanto níveis de transcritos similares ao grupo controle foi observado para CCND1 (QR= 1,44) e CCND3 (QR=1,52).

O tratamento com doxorrubicina e 3-I- β -lapachona aumentou os níveis de transcritos dos genes CDK2 (doxorrubicina: QR= 1.825,92; 3-I- β -lapachona: QR= 32,33) e CDK4 (Doxorrubicina: QR= 383,88; 3-I- β -lapachona: QR= 22,37), em relação

ao controle. O tratamento com β -lapachona também provou superexpressão de CDK2 RNAm (QR= 5,02), mas os níveis de transcritos da CDK4 (QR= 2,61) foram similares as células não tratadas. As células tratadas com o 3-I- α -lapachona apresentaram superexpressão de CDK2 RNAm (QR= 0,62), no entanto o nível de CDK4 transcritos (QR= 1,01) foi similar ao controle.

Uma superexpressão de transcritos de TGF- β 1 foi detectada após tratamento com doxorubicina (QR= 1.930,18), β -lapachona (QR= 4,79) e 3-I- β -lapachona (QR= 52,17), no entanto, o tratamento com o 3-I- α -lapachona apresentou níveis de expressão semelhante ao grupo controle (QR= 1,15). Uma superexpressão dos receptores do TGF- β também foi observada em células tratadas com doxorubicina (TGFBR1: QR= 358,73; TGFBR2: QR= 330,90) e 3-I- β -lapachona (TGFBR1: QR= 27,11; TGFBR2: QR= 55,38). Uma subexpressão do receptor TGFBR2 foi observada após o tratamento com β -lapachona (QR= 0,09) e 3-I- α -lapachona (QR= 0,75), porém o receptor TGFBR1 apresentou níveis de transcritos similares ao controle para ambos os tratamentos citados.

As células tratadas com doxorubicina e 3-I- β -lapachona apresentaram superexpressão do VEGFA RNAm (doxorubicina: QR= 605,91; 3-I- β -lapachona: QR= 50,52), um importante fator de crescimento que estimula a formação de novos vasos sanguíneos. Porém, o tratamento com β -lapachona (QR= 1,70) e 3-I- α -lapachona (QR= 2,76) quando comparado às células não tratadas, não teve efeito quanto a expressão do gene VEGFA.

Em células tratadas com doxorubicina e 3-I- β -lapachona foi observado uma superexpressão do gene NF- κ B1 (doxorubicina: QR= 536,34; 3-I- β -lapachona: QR= 11,69) e NF- κ B2 (Doxorubicina: QR= 1.563,61; 3-I- β -lapachona: QR= 65,77). O tratamento com β -lapachona também ocasionou superexpressão do NF- κ B1 RNAm (QR= 3), porém o nível do transcrito NF- κ B2 foi similar ao controle. Após o tratamento com 3-I- α -lapachona uma subexpressão do gene NF- κ B1 (QR= 0,74) foi detectada, enquanto que nível similar ao de células não tratadas foi observado para o NF- κ B2 RNAm (QR= 1,93).

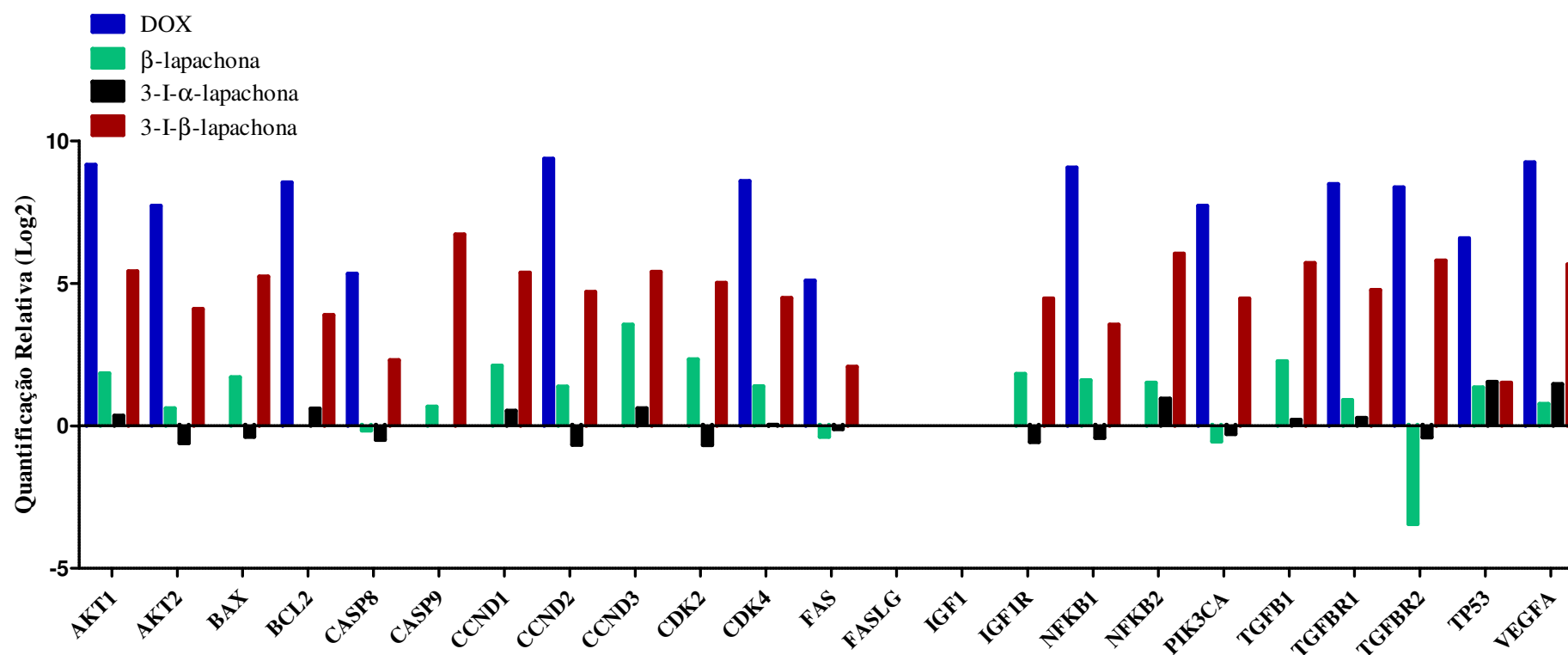


Figura 19. Perfil de expressão de genes associados à apoptose, proliferação, migração e sobrevivência celular em células HSC3 tratadas com a β -lapachona e de seus derivados 3-iodo. Os valores representam a quantificação relativa (\log_2) dos grupos tratados em comparação com o controle negativo (DMSO 0,2%). Os valores abaixo de zero representam subexpressão quando comparados com o controle negativo.

6.5 EFICÁCIA ANTITUMORAL DA β -LAPACHONA E DE SEUS DERIVADOS 3-IODO EM MODELO DE XENOTRANSPLANTE UTILIZANDO CÉLULAS HSC3

Os camundongos da linhagem CB17 SCID foram inoculados com células HSC3 e o tratamento foi iniciado 72 horas após a inoculação, com duração de 27 dias. A tabela 6 apresenta o peso dos tumores e o percentual de inibição observado após o tratamento com a β -lapachona e de seus derivados 3-iodo. Observamos uma redução significativa dos tumores dos animais tratados com doxorrubicina (controle positivo), β -lapachona, 3-I- α -lapachona (40mg/kg) e 3-I- β -lapachona (40mg/kg) quando comparados com o grupo controle negativo (DMSO 5%).

Tabela 6. Efeito da β -lapachona e de seus derivados 3-iodo sobre a massa tumoral em camundongos inoculados com células HSC3

Tratamento	Dose (mg/Kg)	Sobrevida	Tumor (g)	Inibição tumoral (%)
DMSO 5%	-	21/26	0,56 \pm 0,07	-
Doxorrubicina	0,1	12/16	0,36 \pm 0,03*	43,41
β -lapachona	20	13/15	0,38 \pm 0,03*	47,11
3-I- α -lapachona	20	15/15	0,53 \pm 0,05	9,09
	40	14/15	0,28 \pm 0,05*	50,58
3-I- β -lapachona	20	12/16	0,49 \pm 0,05	18,15
	40	13/15	0,28 \pm 0,05*	50,48

Os valores do tamanho tumoral correspondem a média \pm E.P.M. O controle negativo foi tratado com o veículo (DMSO 5%) utilizado para solubilizar e diluir as substâncias testes. A doxorrubicina foi usada como controle positivo. * $p < 0,05$ quando comparado ao grupo controle negativo por ANOVA (análise de variância) seguido por Student Newman-Keuls.

6.5.1 *Análise histopatológica dos tumores HSC3 após o tratamento com β -lapachona e seus derivados 3-iodo*

Nas análises histológicas, observou-se em todos os grupos um tumor de padrão sólido com bordas infiltrativas e intensa celularidade. As células neoplásicas apresentaram núcleos grandes, centrais, muitas vezes vesiculosos, com vários nucléolos e citoplasma proeminente, que se arranjam formando ilhas ou cordões de células escamosas proliferantes ou não. A tabela 7 apresenta as frequências absolutas e relativas dos parâmetros histopatológicos relacionados à matriz extracelular intratumoral, estroma colagênico extra-tumoral e presença de êmbolos tumorais. As fotomicrografias representativas dos tumores HSC3 podem ser observadas na Figura 20.

Grupo controle negativo (DMSO)

Os tumores do grupo controle negativo apresentaram um grau variável de diferenciação celular, sendo que 12 (75%) tumores foram classificados como pouco diferenciado e 4 (25%) como moderadamente diferenciado. Em relação à necrose tecidual, 2 tumores (12,5%) foram negativos, 10 (62,5%) apresentaram necrose discreta e 4 (25%) apresentaram necrose moderada. A vascularização intratumoral foi discreta em 15 tumores (93,75%) e apenas um tumor (6,25%) apresentou uma vascularização intratumoral moderada. Uma inflamação predominantemente aguda foi observada em 10 tumores (62,5%), variando de discreta a moderada. Em relação à invasão tecidual, observou-se que 14 tumores (94,5%) apresentaram invasão muscular, 10 (62,5%) invasão de tecido adiposo e apenas um tumor (6,25%) apresentou invasão perineural.

Grupo controle positivo (Doxorrubicina)

Neste grupo, 7 tumores (70%) foram classificados como pouco diferenciado e 3 (30%) como moderadamente diferenciado. Em relação à necrose tecidual, apenas um tumor (10%) foi negativo, 2 (20%) apresentaram necrose discreta e 7 (70%) apresentaram necrose moderada. A vascularização intratumoral foi discreta em todos os casos deste grupo e a inflamação foi observada em 5 tumores, sendo 3 tumores (30%) com inflamação aguda moderada e 2 tumores (20%) com inflamação crônica discreta. Ainda, observou-se que 6 tumores (60%) apresentaram invasão muscular e 3 (30%) invasão de tecido adiposo.

Grupo tratado com β -lapachona

Os tumores tratados com β -lapachona apresentaram um grau variável de diferenciação celular, sendo 9 (69,22%) tumores classificados como pouco diferenciado, 3 (23,08%) como moderadamente diferenciado e um tumor (7,7%) como bem diferenciado. Em relação à necrose tecidual, 5 tumores (38,46%) apresentaram necrose discreta, 6 (46,15%) apresentaram necrose moderada e 2 tumores (15,38%) foram classificados como necrose intensa. A vascularização intratumoral foi discreta em todos os tumores deste grupo (n=13; 100%) 15 tumores (93,75%). Em relação à inflamação, observou-se inflamação aguda discreta em 7 tumores (53,9%), crônica moderada apenas em um tumor (7,7%) e mista discreta em 2 tumores (15,38%). Ainda, observou-se que 11 tumores (84,62%) apresentaram invasão muscular e 10 (69,22%) apresentaram invasão de tecido adiposo.

Grupo tratado com 3-I- α -lapachona (20 mg/kg)

Neste grupo, 8 tumores (53,33%) foram classificados como pouco diferenciado e 7 (46,67%) como moderadamente diferenciado. Em relação à necrose tecidual, 7 tumores (46,67%) apresentaram necrose discreta, 7 (46,67%) apresentaram necrose moderada e um tumor (6,67%) apresentou necrose intensa. A vascularização intratumoral foi discreta em todos os tumores (n=15; 100%) e células inflamatórias não foram observadas neste grupo. Em relação à invasão tecidual, observou-se que 14 tumores (93,33%) apresentaram invasão muscular, 7 (46,67%) invasão de tecido adiposo e apenas um tumor (6,67%) apresentou invasão perineural.

Grupo tratado com 3-I- α -lapachona (40 mg/kg)

Todos os tumores do grupo tratado com 3-I- α -lapachona (40 mg/kg) foram classificados como pouco diferenciado. Em relação à necrose tecidual, 5 tumores (83,33%) apresentaram necrose discreta e um tumor (16,67%) apresentou necrose moderada. A vascularização intratumoral foi discreta em todos os tumores e a presença de inflamação aguda discreta foi observada em 4 tumores (66,7%) deste grupo. Em relação à invasão tecidual, observou-se que 4 tumores (66,67%) apresentaram invasão muscular, 5 (83,33%) invasão de tecido adiposo, um tumor (16,67%) apresentou invasão perineural e 2 tumores (33,33%) apresentaram invasão de tecido ósseo.

Grupo tratado com 3-I- β -lapachona (20 mg/kg)

Os tumores tratados com 3-I- β -lapachona (20 mg/kg) apresentaram um grau variável de diferenciação celular, sendo 8 tumores (57,14%) classificados como pouco diferenciado, 5 (35,71%) como moderadamente diferenciado e um tumor (7,14%) como bem diferenciado. Em relação à necrose tecidual, um tumor (7,14%) foi negativo, 9 tumores (64,29%) apresentaram necrose discreta e 4 (28,57%) apresentaram necrose moderada. A vascularização intratumoral foi discreta em todos os tumores (n=14; 100%) e uma inflamação mista discreta foi observada em 3 tumores (21,5%).

Em relação à invasão tecidual, observou-se que 13 tumores (92,86%) apresentaram invasão muscular, 5 (35,71%) invasão de tecido adiposo e 2 tumores (14,28%) apresentaram invasão perineural.

Grupo tratado com 3-I- β -lapachona (40 mg/kg)

Neste grupo, 3 tumores (60%) foram classificados como pouco diferenciado e 2 (40%) como moderadamente diferenciado. Em relação à necrose tecidual, um tumor (20%) foi negativo, 2 tumores (40%) apresentaram necrose discreta e 2 (40%) apresentaram necrose moderada. Os tumores deste grupo foram negativos para vascularização intratumoral e células inflamatórias não foram observadas neste grupo. Em relação à invasão tecidual, observou-se que 4 tumores (80%) apresentaram invasão muscular e 2 (40%) apresentaram invasão de tecido adiposo.

Tabela 7. Efeito da β -lapachona e seus derivados sobre os parâmetros histológicos de tumores HSC3

Parâmetros	CTL	DOX	β -Lapachona	3-I- α -lapachona		3-I- β -lapachona	
				20 mg/kg	40 mg/kg	20 mg/kg	40 mg/kg
Matriz conjuntiva extracelular colagênica intratumoral							
Negativa	2 (12,5)	3 (30)	2 (15,38)	4 (26,67)	0	6 (42,86)	0
Discreta	7 (43,75)	6 (60)	6 (46,15)	7 (46,67)	0	7 (50)	5 (100)
Moderada	7 (43,75)	1 (10)	3 (23,08)	2 (13,33)	6 (100)	1 (7,14)	0
Intensa	0	0	2 (15,38)	1 (6,67)	0	0	0
Não classificável	0	0	0	1 (6,67)	0	0	0
Êmbolos tumorais							
Negativa	14 (87,5)	7 (70)	7 (53,84)	15 (100)	6 (100)	13 (92,86)	5 (100)
Discreta	2 (12,5)	0	5 (38,46)	0	0	1 (7,14)	0
Moderada	0	3 (30)	1 (7,7)	0	0	0	0
Intensa	0	0	0	0	0	0	0
Estroma colagênico extra-tumoral							
Negativa	1 (6,25)	0	0	0	0	0	0
Discreta	7 (43,75)	1 (10)	5 (38,46)	7 (46,67)	0	6 (42,86)	0
Moderada	0	1 (10)	3 (23,08)	2 (13,33)	0	1 (7,14)	0
Intensa	0	0	0	0	0	0	0
Não classificável	8 (50)	8 (80)	5 (38,46)	6 (40)	6 (100)	7 (50)	5 (100)

N.C. Não classificável por conta da ausência ou escassez de material histológico para análise.

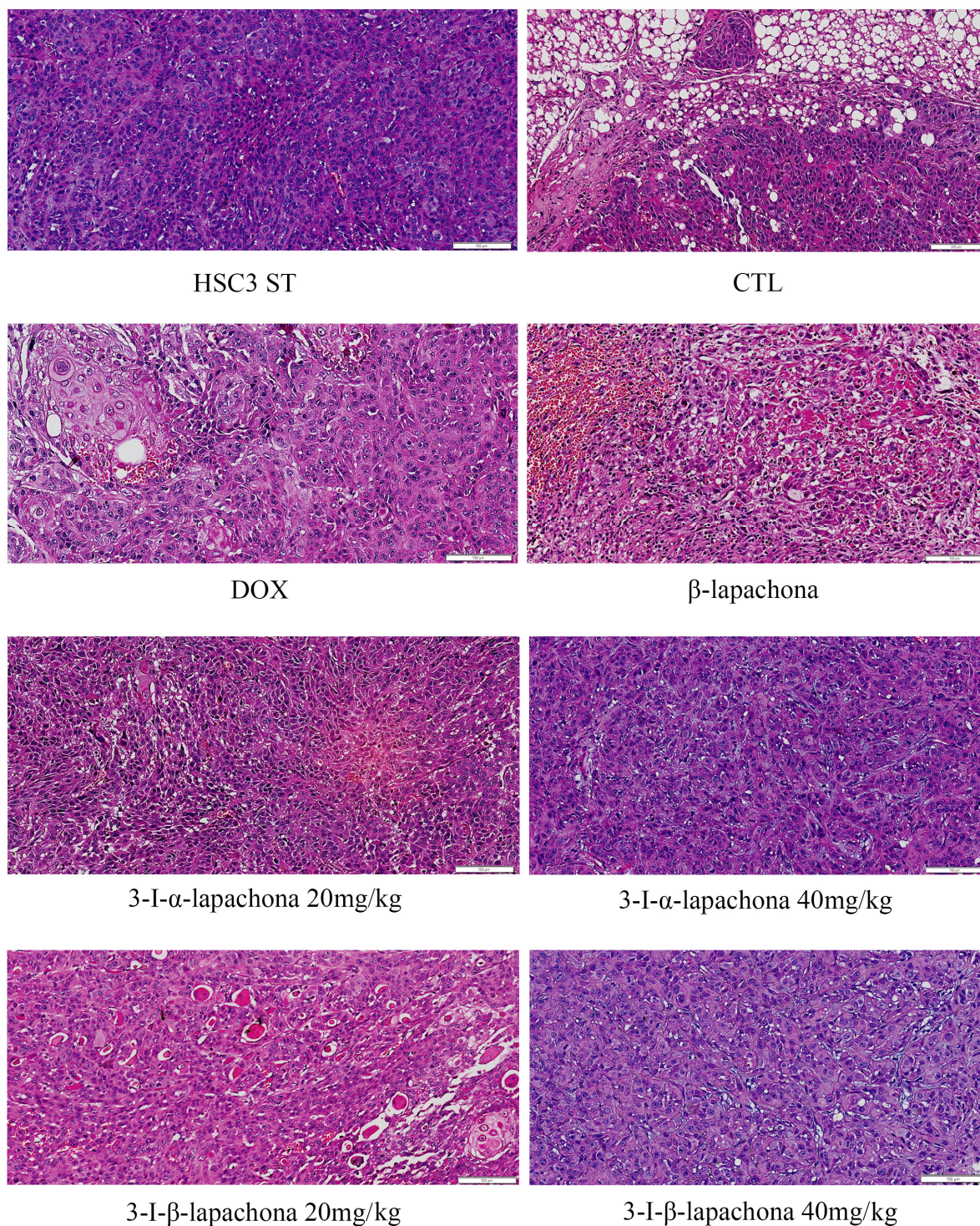


Figura 20. Fotomicrografias representativas dos tumores HSC3 tratados com β -lapachona e seus derivados 3-iodo. HSC3 ST representa o tumor sem tratamento. O controle negativo foi tratado com o veículo (DMSO 5%) utilizado para solubilizar e diluir as substâncias testes e a doxorrubicina (DOX 0,1 mg/kg) foi usada como controle positivo. Os cortes histológicos foram corados com hematoxilina-eosina e analisados através da microscopia óptica. Após 72 h da implantação do tumor, os animais foram tratados através da via intraperitoneal durante 27 dias consecutivos com os compostos-teste.

6.5.2 Efeito da β -lapachona e de seus derivados 3-iodo na toxicidade sistêmica de camundongos inoculados com células HSC3

O efeito tóxico sistêmico da β -lapachona e de seus derivados 3-iodo em camundongos inoculados com células HSC3 foi avaliado após 27 dias de tratamento diário. A tabela 8 apresenta os resultados encontrados em relação à massa corpórea e massa úmida dos órgãos dos animais tratados. Nenhuma diferença foi encontrada na massa corpórea final dos animais tratados quando comparados com o grupo controle. Em relação à massa úmida dos órgãos (fígado, rins, pulmão e coração), também não foram observadas alterações significantes ($p > 0,05$).

A tabela 9 apresenta os resultados encontrados em relação aos parâmetros hematológicos. Observou-se uma diminuição significativa no número de eosinófilos em todos os grupos tratados quando comparados com o grupo controle negativo (DMSO 5%). Contudo, não foram encontradas diferenças entre os grupos em relação à quantidade de basófilos, neutrófilos, linfócitos e monócitos.

Em relação aos parâmetros bioquímicos, não foram encontradas alterações significantes nos níveis plasmáticos dos parâmetros bioquímicos analisados em nenhum dos grupos tratados (Tabela 10).

Tabela 8. Efeito da β -lapachona e de seus derivados 3-iodo sobre a massa corpórea e a massa úmida dos órgãos de camundongos inoculados com células HSC3

Tratamento	Dose (mg/Kg)	<i>n</i>	Fígado (g/100g de massa corpórea)	Rins (g/100g de massa corpórea)	Pulmão (g/100g de massa corpórea)	Coração (g/100g de massa corpórea)	Peso inicial (g)	Peso Final (g)
CTL	-	11	5,69±0,30	1,67±0,05	0,80±0,03	0,59±0,02	22,00±0,51	17,92±0,38
DOX	0,1	12	5,70±0,42	1,80±0,08	0,79±0,05	0,59±0,03	20,72±0,54	17,25±0,93
β -lapachona	20	13	6,23±0,65	1,67±0,06	0,83±0,03	0,57±0,03	21,93±0,49	18,38±0,90
3-I- α -lapachona	20	15	5,39±0,40	1,77±0,06	0,79±0,06	0,69±0,03	21,57±0,63	16,83±0,67
	40	14	4,58±0,18	1,33±0,06	0,78±0,06	0,44±0,02	22,03±0,49	23,19±0,70
3-I- β -lapachona	20	13	5,26±0,44	1,73±0,11	0,74±0,06	0,65±0,06	20,69±0,59	16,35±0,60
	40	13	4,81±0,26	1,48±0,07	0,73±0,04	0,48±0,04	21,97±0,46	21,81±0,84

Os valores correspondentes à média \pm E.P.M. O controle negativo foi tratado com o veículo (DMSO 5%) utilizado para solubilizar e diluir as substâncias testes. A doxorubicina (DOX) foi usada como controle positivo.

Tabela 9. Efeito da β -lapachona e de seus derivados 3-iodo sobre os parâmetros hematológicos de sangue periférico de camundongos inoculados com células HSC3

Tratamento	Dose (mg/kg)	n	Eritrócitos (10^6 cél./ μ L)	Leucócitos totais (10^3 cél./ μ L)	Contagem diferencial de leucócitos (%)				
					Basófilos	Eosinófilos	Neutrófilos	Linfócitos	Monócitos
CTL	-	9	7,17 \pm 0,74	11,06 \pm 1,69	1,22 \pm 0,86	18,44 \pm 3,11	31,89 \pm 5,42	45,67 \pm 6,97	2,77 \pm 0,87
DOX	0,1	12	7,30 \pm 0,72	10,18 \pm 1,27	0,66 \pm 0,41	11,25 \pm 1,56*	44,50 \pm 4,55	38,25 \pm 5,98	6,25 \pm 0,57
β -lapachona	20	12	7,80 \pm 0,30	9,42 \pm 1,14	0,58 \pm 0,22	2,91 \pm 0,66*	48,75 \pm 4,26	43,67 \pm 4,60	5,08 \pm 0,64
3-I- α -lapachona	20	13	8,43 \pm 0,44	9,85 \pm 1,05	0,23 \pm 0,16	1,92 \pm 0,67*	51,31 \pm 5,98	44,62 \pm 6,40	1,84 \pm 0,24
	40	14	4,19 \pm 2,35*	5,70 \pm 0,75	0,0 \pm 0,0	0,12 \pm 0,12*	61,13 \pm 4,43	36,88 \pm 4,60	1,62 \pm 0,56
3-I- β -lapachona	20	13	7,79 \pm 0,84	12 \pm 1,86	1,30 \pm 0,41	2,92 \pm 0,93*	40,92 \pm 7,77	44,46 \pm 6,31	10,38 \pm 4,49
	40	13	6,20 \pm 0,39	6,25 \pm 0,80	0,0 \pm 0,0	0,25 \pm 0,16*	88,13 \pm 2,31*	10,00 \pm 1,85*	1,25 \pm 0,72

Os valores correspondem a média \pm E.P.M. O controle negativo foi tratado com o veículo (DMSO 5%) utilizado para solubilizar e diluir as substâncias testes. A doxorubicina (DOX) foi usada como controle positivo. * $p < 0,05$ quando comparado ao grupo controle negativo por ANOVA (análise de variância) seguido por Student Newman-Keuls.

Tabela 10. Efeito da β -lapachona e de seus derivados 3-iodo sobre os parâmetros bioquímicos de sangue periférico de camundongos inoculados com células HSC3

Parâmetro			β -lapachona	3-I- α -lapachona		3-I- β -lapachona	
	CTL	DOX	20 mg/kg	20 mg/kg	40 mg/kg	20 mg/kg	40 mg/kg
	n=4	n=7	n=7	n=7	n=5	n=4	n=5
TGO (AST)	137,8 \pm 41,72	163,3 \pm 58,49	79,86 \pm 22,94	148,3 \pm 17,39	240,8 \pm 108,1	88,50 \pm 25,58	218,2 \pm 40,09
TGP (ALT)	74,50 \pm 35,72	26,50 \pm 5,13	33,40 \pm 9,11	54 \pm 8,38	10,00 \pm 7,34	51,50 \pm 18,68	2,40 \pm 1,22
Amilase	217,0 \pm 41,76	370,3 \pm 116,3	202,5 \pm 31,59	291,1 \pm 34,32	302 \pm 157,2	232,0 \pm 37,41	335 \pm 48,13
Uréia nitrogenada	5,57 \pm 1,22	7,52 \pm 2,36	3,75 \pm 0,61	5,82 \pm 1,19	23,44 \pm 2,80	4,80 \pm 0,98	20,72 \pm 1,48
Glicose	24,25 \pm 4,55	31,71 \pm 3,75	59,71 \pm 41,93	23,29 \pm 3,24	200,4 \pm 21,01	28 \pm 1,58	186,4 \pm 26,00
Fósforo	8,25 \pm 0,34	8,61 \pm 0,55	9,18 \pm 1,71	8,0 \pm 0,30	14,66 \pm 2,49	7,52 \pm 0,31	12,88 \pm 1,64
Cálcio	0,33 \pm 0,12	0,38 \pm 0,06	1,25 \pm 0,87	0,45 \pm 0,05	8,54 \pm 0,82	0,40 \pm 0,10	9,08 \pm 0,77
Ác. Úrico	2,77 \pm 0,81	2,20 \pm 0,49	1,81 \pm 0,42	3,34 \pm 0,59	1,44 \pm 0,27	1,77 \pm 0,27	1,77 \pm 0,27
Creatina quinase	238,8 \pm 82,56	265,0 \pm 73,53	302,4 \pm 82,12	555,6 \pm 103,8	N.d.	339,3 \pm 134,9	N.d.
Proteínas totais	5,20 \pm 1,07	4,81 \pm 0,57	3,91 \pm 0,60	5,54 \pm 0,25	2,46 \pm 0,17	4,97 \pm 1,00	2,48 \pm 0,15
Globulina	5,86 \pm 0,23	4,83 \pm 0,89	4,50 \pm 0,52	5,08 \pm 0,67	N.d.	5,50 \pm 0,40	N.d.

Os valores correspondem a média \pm E.P.M. O controle negativo foi tratado com o veículo (DMSO 5%) utilizado para solubilizar e diluir as substâncias testes. A doxorrubicina foi usada como controle positivo. N.d. não determinado.

6.5.3 *Análise histopatológica dos órgãos dos animais após tratamento com β -lapachona e seus derivados 3-iodo*

Todas as análises foram realizadas através de microscopia de luz, nos aumentos finais de 4x, 100x, 200x e 400x (quando necessário). Em cada grupo, os órgãos de 5 animais foram analisados, sendo que as descrições abaixo consideram a totalidade das alterações encontradas em cada grupo. De forma geral, as alterações observadas nos órgãos dos animais foram mais evidentes nos grupos tratados com a maior dose (40 mg/kg) dos novos derivados 3-iodo. As fotomicrografias representativas das alterações histopatológicas dos órgãos dos animais tratados com β -lapachona e seus derivados 3-iodo podem ser observadas na Figura 21.

Fígado

Controle negativo (DMSO)

A arquitetura acinar e a veia centrolobular estavam preservadas em todos os fígados analisados. Uma inflamação crônica discreta foi observada no espaço portal da maioria dos fígados. Outros achados como congestão, necrose coagulativa, degeneração hidrópica, foram observados apenas em um animal deste grupo.

Controle positivo (Doxorrubicina)

Neste grupo, a arquitetura acinar e a veia centrolobular estavam preservadas em todos os fígados analisados como o grupo do controle negativo. As alterações histopatológicas observadas foram: congestão vascular, degeneração hidrópica e inflamação do sistema porta, que variou de mista a crônica. Estas alterações estavam presentes em 2 animais e variaram de discretas a moderadas.

β -lapachona e seus derivados 3-iodo

A arquitetura acinar e a veia centrolobular também estavam preservadas nos fígados dos grupos tratados com β -lapachona e seus derivados 3-iodo. A inflamação crônica observada no espaço portal, na maioria dos fígados, foi discreta. Em adição, observou-se uma menor frequência de células inflamatórias nos animais tratados com os derivados 3-iodo da β -lapachona. Outros achados como congestão, degeneração hidrópica e gordurosa foram observados nestes grupos, variando de discretas a moderadas.

Pulmão

Controle negativo (DMSO)

A arquitetura do parênquima pulmonar estava parcialmente mantida. As alterações histológicas variaram de moderadas a intensas. Observou-se, com frequência, inflamação aguda importante, edema, congestão, hemorragia e aumento do espaço aéreo. Além disso, nódulos tumorais foram observados em todos os animais e êmbolos em 2 animais.

Controle positivo (Doxorrubicina)

A arquitetura do parênquima pulmonar variou de parcialmente mantida a modificada. As alterações morfológicas significantes dos animais deste grupo foram moderadas. Observou-se, com frequência, inflamação mista importante, edema, congestão, hemorragia e calcificações pontuais. Ainda, nódulos tumorais foram observados em todos os animais e êmbolos apenas em um animal deste grupo experimental.

β -lapachona e seus derivados 3-iodo

Nos grupos tratados com β -lapachona e seus derivados 3-iodo, observou-se, com frequência, inflamação mista importante, edema, congestão e hemorragia. Estas alterações histopatológicas variaram de discretas a intensas. A arquitetura do tecido pulmonar dos animais apresentava-se parcialmente modificada. Ainda, nódulos e êmbolos tumorais foram observados com menor frequência quando comparados com os animais do controle negativo.

Rins

A arquitetura tecidual estava mantida em todos os grupos experimentais. De forma geral, as alterações histopatológicas observadas neste órgão foram congestão vascular e hialinização glomerular em todos os grupos. Estas alterações histológicas foram mais intensas nos animais do controle negativo (DMSO 5%) e, ainda, apresentaram necrose de coagulação no córtex renal de 2 animais e diminuição discreta do espaço urinário em 3 animais.

Coração

Para todos os grupos experimentais, não observamos alterações arquiteturais e morfológicas dignas de nota para este órgão.

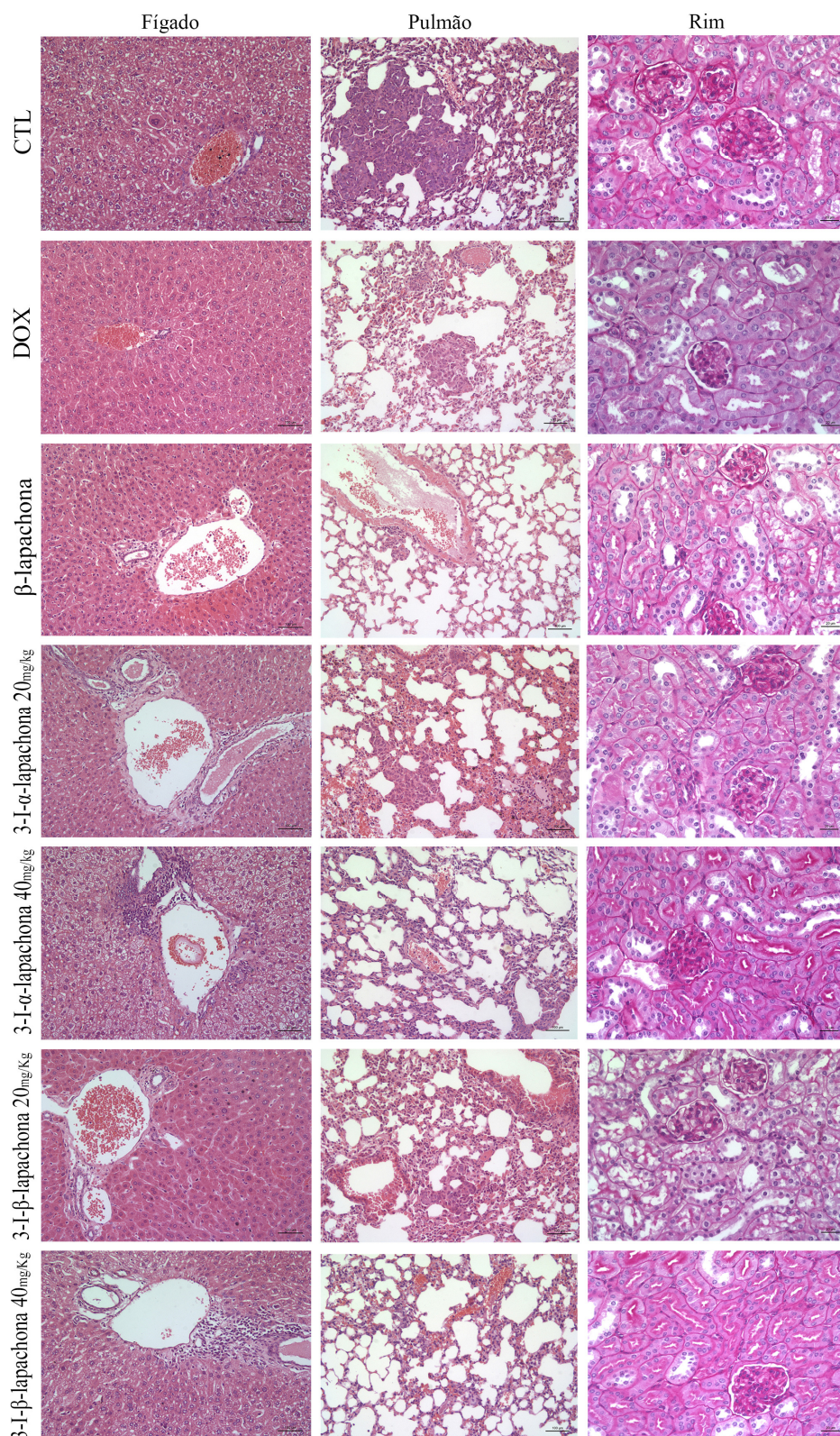


Figura 21. Fotomicrografias representativas dos órgãos dos animais tratados com β -lapachona e seus derivados 3-iodo. O controle negativo foi tratado com o veículo (DMSO 5%) utilizado para solubilizar e diluir as substâncias testes e a doxorrubicina (DOX 0,1 mg/kg) foi usada como controle positivo. Os cortes histológicos de fígado e pulmão foram corados com hematoxilina-eosina e os rins foram corados pelo ácido periódico-Schiff (PAS).

7 DISCUSSÃO

Os produtos naturais são uma das principais fontes de novos compostos para o desenvolvimento de fármacos com potencial antitumoral, sendo considerados como alternativa para um tratamento mais conservador e efetivo das neoplasias malignas (COSTA-LOFUFO et al., 2010). Dentro desta perspectiva, o objetivo deste trabalho foi estudar os efeitos da β -lapachona e seus derivados 3-iodo (3-I- α -lapachona e 3-I- β -lapachona) sobre a proliferação, morte celular e expressão de genes alvos relacionados ao câncer em células de CEO. Ainda, é importante ressaltar que o presente trabalho é pioneiro em avaliar a atividade antitumoral dos derivados 3-iodo em células tumorais humanas.

Inicialmente, a avaliação da citotoxicidade da β -lapachona e seus derivados (3-I- α -lapachona e 3-I- β -lapachona) demonstrou que esses compostos possuem uma atividade citotóxica promissora em diversas células tumorais humanas por apresentarem $CI_{50} < 4 \mu\text{g/mL}$, conforme parâmetros descritos pelo Instituto Nacional do Câncer dos Estados Unidos (SUFFNESS, PEZZUTO, 1990; BOIK, 2001). Adicionalmente, demonstramos que os compostos 3-I- α -lapachona e 3-I- β -lapachona apresentaram citotoxicidade superior ao protótipo β -lapachona.

Os agentes antitumorais convencionais acumulam-se em células normais e tumorais devido a não especificidade. Diante disso, um dos objetivos da quimioterapia é reduzir a toxicidade sistêmica e melhorar a qualidade de vida dos pacientes (MITRA et al., 2015). Neste sentido, a β -lapachona e seus derivados 3-iodo apresentaram uma maior seletividade quando os valores de CI_{50} das células tumorais foram comparados aos valores das células mononucleares, PBMC.

Com o objetivo de estudar o potencial terapêutico da β -lapachona e seus derivados 3-iodo em células de CEO, experimentos *in vitro* foram realizados para avaliar os efeitos e mecanismos de ação destes fármacos em células HSC3. Essa célula foi escolhida por estar entre as linhagens com maior sensibilidade ao tratamento com os compostos-teste do presente estudo.

O uso do modelo de cultura tridimensional (3D) utilizando géis de colágeno ou de sistemas mais complexos que representam a matriz extracelular, como Matrigel[®], tem sido bem aceito por proporcionar um ambiente tumoral semelhante ao modelo *in vivo* (BONNIER et al., 2015). Diante disso, a citotoxicidade dos compostos-teste foi avaliada no modelo 3D com formação de esferas utilizando placas repelentes de células

e Matrigel® com células HSC3. As alterações morfológicas observadas após o tratamento de 72 horas com β -lapachona e seus derivados 3-iodo indicam permeabilidade destes fármacos na cultura 3D. Mesmo apresentando valores de CI_{50} no modelo 3D superiores aos valores de CI_{50} do modelo 2D, os compostos-teste foram ativos em ambos os modelos 2D e 3D. De acordo com o presente resultado, uma maior resistência à doxorrubicina também foi observada em modelo 3D utilizando células de osteossarcoma e parece ter uma relação com a presença da matriz extracelular, que dificulta a liberação do fármaco para a célula (HARISI et al., 2007).

Para confirmar os resultados encontrados no ensaio de citotoxicidade, avaliamos número de células viáveis por meio da integridade de membrana. A β -lapachona e seus derivados 3-iodo reduziram significativamente o número de células HSC3 viáveis a partir de 12 horas de tratamento. Em adição, as alterações morfológicas, avaliadas por microscopia óptica e citometria de fluxo, demonstraram que os compostos-teste reduziram o volume celular e aumentaram a fragmentação nuclear e condensação da cromatina das células HSC3. Ainda, os resultados do presente estudo demonstraram que os efeitos observados foram concentração e tempo dependente.

A β -lapachona e seus derivados 3-iodo induziram parada no ciclo celular na fase G_2/M a partir de 24 horas de incubação, seguido de aumento da fragmentação do DNA internucleosomal pelo aumento significativo de células HSC3 em sub- G_1 (fragmentação do DNA internucleosomal). De maneira semelhante, estudos *in vitro* com células de carcinoma gástrico (YU et al., 2014), câncer de pulmão (JEON et al., 2015a) e carcinoma escamocelular oral (JEON et al., 2015b) demonstraram um aumento significativo da fragmentação do DNA após o tratamento com a β -lapachona.

O ciclo celular é controlado por duas famílias de proteínas: as ciclinas e as cinases dependentes de ciclinas (CDKs). Em tumores, a amplificação e hiperativação das ciclinas e CDKs contribuem para desregulação do ciclo celular, culminando em proliferação celular (KATO et al., 1993; WEINBERG, 1995). Neste estudo, o tratamento com a β -lapachona e 3-I- β -lapachona não reduziu a expressão dos transcritos de ciclinas e CDKs após 12h. Por outro lado, o tratamento com o 3-I- α -lapachona resultou em baixa expressão de CCND2, enquanto níveis de transcritos similares ao grupo controle foram observados para CCND1, CCND3 e CDK4.

Sabe-se que alguns quimioterápicos inibem a ação das ciclinas e CDKs através da ativação dos inibidores dessas proteínas (ESPOSITO et al., 2013; BONELLI et al., 2014; SÁNCHEZ-MARTÍNEZ et al., 2015). No presente estudo, o tratamento com β -

lapachona promoveu uma superexpressão do gene p21, inibidor de CDK1A, quando comparado com o controle negativo. Corroborando com este resultado, foi observado um aumento da expressão da proteína p21 em células de câncer de próstata tratadas com β -lapachona (DON et al., 2001; CHOI et al., 2003a). Adicionalmente, o tratamento com 3-I- β -lapachona promoveu um aumento da expressão dos transcritos dos inibidores CDKN1A, CDKN1B e CDKN2A.

As naftoquinonas, como a β -lapachona e seus derivados, são conhecidas por induzirem morte celular por apoptose (SUNASSEE et al., 2013; KUNG et al., 2014; JEON et al., 2015b; WU et al., 2016; YANG et al., 2017). Conforme demonstrado nos resultados, a 3-I- β -lapachona foi capaz de induzir apoptose nas células HSC3 em todos os tempos avaliados quando comparado ao grupo controle negativo. Em adição, observamos uma superexpressão dos genes pró-apoptóticos como o receptor da cadeia extrínseca (FAS), BAX e das caspases iniciadoras 8 e 9 em células HSC3 tratadas por 12h com a 3-I- β -lapachona quando comparados com o controle negativo. Por outro lado, as células tratadas com a β -lapachona e 3-I- α -lapachona apresentaram um aumento significativo da apoptose com 72 horas de incubação, sugerindo que os mecanismos de citotoxicidade desses compostos também estão relacionados com morte celular por apoptose, contudo, mais tardiamente que as células tratadas com 3-I- β -lapachona. Adicionalmente, demonstramos que o tratamento com β -lapachona e seus derivados foi capaz de aumentar a atividade das caspases 8 e 9 em todas as concentrações testadas após 72 horas de incubação com os compostos-teste. Em seguida, observamos que o pré-tratamento com o inibidor de caspases (Z-VAD-fmk) foi capaz de reduzir significativamente a apoptose em células HSC3 após 72h de tratamento com β -lapachona e seus derivados 3-iodo, ratificando a participação das caspases na indução da apoptose por estes compostos. Com isso, estes resultados indicam que a apoptose é uma importante via de morte celular induzida pelos compostos-teste.

Sabendo que as mitocôndrias exercem um papel fundamental na fisiologia e sobrevivência das células tumorais, a interferência no seu potencial transmembrânico está relacionada como uma das estratégias para indução da apoptose em fármacos antitumorais (MA et al., 2015). Neste contexto, observamos que a β -lapachona e seus derivados 3-iodo reduzem significativamente o potencial da membrana mitocondrial após 48h de tratamento, indicando que a apoptose induzida por estes compostos está relacionada com ativação da via intrínseca ou mitocondrial.

A via intrínseca ou mitocondrial da apoptose é uma das vias essenciais para indução da apoptose por fármacos antitumorais (HASSAN et al., 2014). Esta via é controlada pelas proteínas da família Bcl-2, importantes reguladoras apoptóticas, as quais determinam a sobrevivência celular por duas subfamílias: as anti-apoptóticas (por exemplo, Bcl-2, Bcl-xL, Bcl-W, Mcl-1 e Bfl-1/A1) e as pró-apoptóticas (por exemplo, Bad, Bik, Bmf, Hrk, Noxa e Puma) (GALLUZZI et al., 2012).

O sucesso de cada estratégia terapêutica depende principalmente da capacidade do fármaco em induzir a apoptose, seja por atuação nas proteínas antiapoptóticas superexpressas, ou pela estimulação da expressão das moléculas pro-apoptóticas. No entanto, muitos dos agentes terapêuticos ainda são desafiados pelas manobras das células cancerosas para sobreviver aos tratamentos. Sendo assim, alterações nos níveis de expressão ou mutação de genes-alvo de um quimioterápico podem ter um impacto na apoptose induzida pelo fármaco (HASSAN et al., 2014).

Neste contexto, com o objetivo de verificar se o gene BAD é essencial para a ativação da via intrínseca da apoptose pelos compostos-teste, avaliamos a citotoxicidade da β -lapachona e seus derivados 3-iodo em fibroblastos embrionários imortalizados *knockout* para BAD (linhagem BAD KO SV40 MEF) e sua linhagem celular não mutada (WT SV40 MEF). De acordo com os resultados apresentados, não houve diferenças dos valores de CI_{50} entre essas células, indicando que o gene BAD pode não ser essencial para a atividade citotóxica induzida por β -lapachona e seus derivados 3-iodo.

O aumento da produção de espécies reativas de oxigênio em células cancerosas é um dos principais mecanismos de ação de muitos agentes antitumorais para induzir a morte dessas células e, portanto, representa uma estratégia eficaz para a terapia do câncer (MA et al., 2015). Dentro deste contexto, observamos que a β -lapachona e seus derivados 3-iodo aumentaram significativamente os níveis de ERO, atribuído ao peróxido de hidrogênio, nas células HSC3 após 1 h de tratamento. Conforme demonstrado nos resultados, o pré-tratamento com o antioxidante NAC impediu a apoptose e reduziu a produção dos níveis de ERO. Adicionalmente, o pré-tratamento com a enzima catalase também foi capaz de reduzir a produção de ERO nas células HSC3 tratadas com os compostos-teste. Diante do exposto, estes achados demonstraram que a β -lapachona e seus derivados 3-iodo promoveram um estresse oxidativo nas células HSC3, indicando que a apoptose induzida também pode ser mediada por ERO.

Uma vez que alguns quimioterápicos interagem com o DNA e podem intercalar entre os nucleotídeos do DNA, investigamos se β -lapachona e seus derivados 3-iodo são capazes de induzir intercalação do DNA através da capacidade de deslocar o brometo de etídio do DNA do timo do bezerro (ctDNA). Os resultados observados demonstraram que β -lapachona e seus derivados 3-iodo não conseguiram diminuir a fluorescência do brometo de etídio, indicando que não são intercaladores de DNA fortes, sugerindo que a apoptose induzida por estes compostos-teste não é mediada por dano ao DNA. Por outro lado, a doxorrubicina, um intercalador de DNA conhecido, reduziu significativamente a fluorescência neste ensaio.

As vias de sinalização celular possuem um papel fundamental no desenvolvimento e progressão do câncer e representam uma fonte de estudos farmacológicos direcionada para o desenvolvimento de moléculas bloqueadoras para seus componentes. Neste contexto, a via de sinalização fosfatidilinositol-3-quinase/serina-treonina quinase (PI3K/Akt) tem alcançado grande importância como um alvo terapêutico no câncer. A ativação de Akt aumenta a sobrevivência celular através da inibição de proteínas pró-apoptóticas e ativação de proteínas anti-apoptóticas, promovendo assim a sobrevivência celular (YU et al., 2014).

No presente estudo, as células tratadas com β -lapachona e 3-I- α -lapachona apresentaram uma subexpressão dos genes PIK3CA e PIK3R1 quando comparadas com o controle negativo. Ainda, observou-se uma expressão relativa do gene AKT1 e subexpressão de AKT2 nas células tratadas com 3-I- α -lapachona. Por outro lado, β -lapachona promoveu uma superexpressão de AKT1 e expressão relativa de AKT2 nas células HSC3. Entretanto, o tratamento com 3-I- β -lapachona promoveu uma superexpressão dos genes AKT1, AKT2 e PIK3CA e, além disso, uma expressão equivalente do gene PIK3R1 foi observada quando comparada com o controle negativo.

A avaliação da expressão de genes relacionados ao câncer é fundamental para uma melhor compreensão da patogênese dos tumores e também direciona o estudo de mecanismos moleculares envolvidos no tratamento com quimioterápicos. No presente estudo, os resultados da expressão gênica pelo PCR Array demonstraram uma diferença dos efeitos entre os compostos-teste na expressão de genes relacionados ao câncer. Com isso, para ratificar e complementar estes resultados, alguns ensaios mais específicos são necessários para uma melhor avaliação, como, por exemplo, a avaliação da expressão de proteínas associadas às vias de sinalização ou de proteínas relacionadas

à proliferação e morte celular em diferentes tempos de incubação com os compostos-teste e em momentos diferentes.

Diante dos resultados promissores com a β -lapachona e seus derivados 3-iodo *in vitro*, avaliamos o efeito e a eficácia *in vivo* destes compostos-teste por meio de um modelo de estudo utilizando xenotransplante. Conforme demonstrado, o tratamento com a β -lapachona e seus derivados 3-iodo, em sua maior dose, foi capaz de diminuir significativamente o volume tumoral em relação aos animais do controle negativo. Este resultado corrobora com os achados descritos em camundongos transplantados com células de adenocarcinoma de mama e tratados com β -lapachona (SEOANE et al., 2013; YANG et al., 2017).

No presente estudo, a análise histopatológica dos tumores foi realizada com a finalidade de melhor avaliar as características e alterações morfológicas observadas com o tratamento. De acordo com as análises histológicas, observamos que os tumores apresentaram uma diferenciação celular variável dentro de um mesmo grupo experimental. Esta variação não estava relacionada ao tipo de tratamento farmacológico, mas deve ter ocorrido pela resposta do hospedeiro durante o processo de desenvolvimento tumoral. Outro achado interessante foi a ausência de êmbolos tumorais nos grupos tratados com os novos derivados 3-iodo da β -lapachona, sugerindo um maior controle da migração celular para as vias hematológicas. Ainda, observamos que os tumores tratados com 3-I- α -lapachona e 3-I- β -lapachona apresentaram efeitos antiinflamatórios eficazes pela menor frequência e intensidade de eventos inflamatórios.

O conhecimento sobre a toxicidade de uma substância é de grande importância para o seu direcionamento farmacoterápico e uma forma de ser avaliada é observando-se a massa, o aspecto macroscópico e as características histológicas dos órgãos dos animais. Conforme demonstrado, a massa corporal absoluta dos animais e a massa dos órgãos não apresentaram diferenças significativas entre os grupos testes e o grupo controle negativo, indicando que as doses testadas da β -lapachona e seus derivados 3-iodo não produziram toxicidade a níveis macroscópicos. Ainda em relação à avaliação toxicológica sistêmica, os resultados demonstraram que os compostos não produzem nenhuma alteração significativa dos parâmetros hematológicos e bioquímicos avaliados.

Por fim, este estudo apresenta resultados que demonstram que a β -lapachona e seus derivados 3-iodo possuem potencial antitumoral promissor *in vitro* e *in vivo*, contribuindo para os estudos farmacológicos que visam o desenvolvimento de novos quimioterápicos. Os resultados sobre os mecanismos de ação, a níveis celulares e

moleculares, demonstraram que estes compostos promovem uma morte celular por apoptose em células HSC3 (Figura 22).

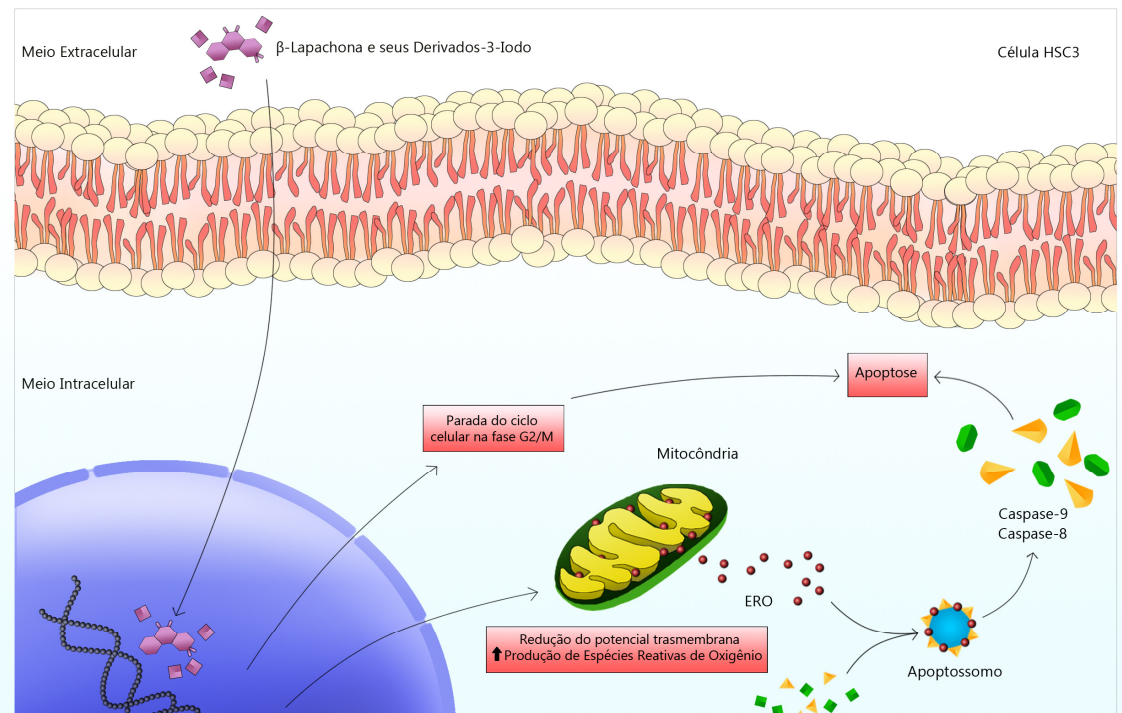


Figura 22. Resumo dos mecanismos de ação da β-lapachona e seus derivados 3-iodo em células HSC3.

8 CONCLUSÕES

Diante dos resultados apresentados, pode-se considerar que a β -lapachona e seus derivados 3-iodo apresentam atividade citotóxica promissora em células tumorais humanas, incluindo células de CEO. Esses compostos induzem parada do ciclo celular na fase G_2/M , o qual é seguido de aumento da fragmentação do DNA internucleosomal, superexpressão de genes relacionados à apoptose, aumento de externalização de fosfatidilserina, despolarização mitocondrial, aumento da produção de espécies reativas de oxigênio e morfologia típica de morte celular apoptótica em células de CEO. Estes resultados sugerem que os compostos-teste promovem uma redução da população celular através da indução de morte celular por apoptose mediada por caspases e ERO. Além disso, a β -lapachona e os derivados 3-iodo foram capazes de reduzir o crescimento tumoral de células de CEO em modelo de xenotransplante, indicando que estes compostos-teste representam novos candidatos a fármacos antitumorais.

REFERÊNCIAS

ANTUNES, R. M. P. et al. Atividade antimicrobiana “in vitro” e determinação da concentração inibitória mínima (CIM) de fitoconstituintes e produtos sintéticos sobre bactérias e fungos leveduriformes. **Rev. Bras. Farmacognosia**, v. 16, n. 4, p. 517-524, 2006.

BANG, W. et al. β -lapachone suppresses the proliferation of human malignant melanoma cells by targeting specificity protein 1. **Oncol. Rep.**, v. 35, n. 2, p. 1109-1116, 2016.

BARBOSA FILHO, J. M. et al. Processo de síntese da 3-iodo-alfa-lapachona e 3-iodo-beta-lapachona e usos como biomodulador, antimicrobiano e antiinflamatório. **Rev. Propriedade Ind.**, n. 1843, 2006.

BEG, M. S. et al. Using a novel NQO1 bioactivatable drug, beta-lapachone (ARQ761), to enhance chemotherapeutic effects by metabolic modulation in pancreatic cancer. **J. Surg. Oncol.**, v. 116, n. 1, p. 83-88, 2017.

BHARGAVA, A.; SAIGAL, S.; CHALISHAZAR, M. **Histopathological Grading Systems in Oral Squamous Cell Carcinoma : A Review**. p. 1–10, 2010.

BOIK, J. **Natural compounds in cancer therapy**. Oregon Medical Press, Minnesota, USA, 2001. p. 25.

BONELLI, P. et al. CDK/CCN and CDKI alterations for cancer prognosis and therapeutic predictivity. **Biomed. Res. Int.**, 2014.

BONNIER, F. et al. Cell viability assessment using the Alamar blue assay: a comparison of 2D and 3D cell culture models. **Toxicol. In Vitro**, v. 29, n. 1, p. 124-131, 2015.

BOUKAMP, P. et al. Normal keratinization in a spontaneously immortalized aneuploid human keratinocyte cell line. **J. Cell Biol.**, v. 106, n. 3, p. 761-771, 1988.

BRADFORD, M. M. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. **Anal. Biochem.**, v. 72, p. 248-254, 1976.

BRASIL. Ministério da Saúde. INCA: Instituto Nacional do Câncer. Disponível em: <http://www.inca.gov.br/estimativa/2014/estimativa-24042014.pdf>. Acesso: 05 fev. 2014.

BRASIL. Ministério da Saúde. INCA: Instituto Nacional do Câncer. Disponível em: <http://www.inca.gov.br/wcm/dncc/2018/dados-apresentados.pdf>. Acesso: 20 fev. 2018.

BRETON, C. S. et al. Combinative effects of β -Lapachone and APO866 on pancreatic cancer cell death through reactive oxygen species production and PARP-1 activation. **Biochimie**, v.116, p.141-153, 2015.

CHI, A. C.; DAY, T. A.; NEVILLE, B. W. Oral Cavity and Oropharyngeal Squamous Cell Carcinoma: An Update. **CA: A Cancer J. Clin.**, v. 65, n. 5, p. 401–421, 2015.

CHOI, Y. H., KANG, H. S., YOO, M. A. Suppression of human prostate cancer cell growth by beta-lapachone via down-regulation of pRB phosphorylation and induction of Cdk inhibitor p21 (WAF1/CIP1). **J. Biochem. Mol. Biol**, v. 36, p. 223-229, 2003a.

CHOI, B. T.; CHEONG, J.; CHOI, Y. H. Beta-Lapachone-induced apoptosis is associated with activation of caspase-3 and inactivation of NF-kappaB in human colon cancer HCT-116 cells. **Anticancer Drugs**, v. 14, n. 10, p. 845-850, 2003b.

CLATOT, F. et al. The gene expression profile of inflammatory, hypoxic and metabolic genes predicts the metastatic spread of human head and neck squamous cell carcinoma. **Oral Oncol.**, v. 50, n. 3, p. 200-207, mar. 2014.

COSTA-LOFUFO, L.V. et al. A Contribuição dos produtos naturais como fonte de novos fármacos anticâncer: estudos no laboratório nacional de oncologia experimental da Universidade Federal do Ceará. **Rev. Virtual de Quim**, v. 2, n. 1, p.47-58, 2010.

DAWOOD, S.; AUSTIN, L.; CRISTOFANILLI, M. Cancer stem cells: implications for cancer therapy. **Oncology**, v. 28, n. 12, p. 1101-1107, 2014.

DON, M. J. et al. Induction of CDK inhibitors (p21(WAF1) and p27(Kip1)) and Bak in the beta-lapachone-induced apoptosis of human prostate cancer cells. **Mol. Pharmacol.**, v. 59, n. 4, p. 784-794, 2001.

EFFERTH, T. Personalized cancer medicine: from molecular diagnostics to targeted therapy with natural products. **Planta Med.**, v. 76, p. 1143-1154, 2010.

ESPOSITO, L. et al. Anticancer therapeutic strategies based on CDK inhibitors. **Curr. Pharm. Des.**, v. 19, n. 30, p. 5327-5332, 2013.

ESQUELA-KERSCHER, A.; SLACK, F. J. Oncomirs – microRNAs with a role in cancer. **Nat. Publishing Group**, v. 6, 6259-6269, 2006.

FERLAY, J. et al. Cancer incidence and mortality worldwide: sources, methods and major patterns in GLOBOCAN 2012. **Int. J. Cancer**, v. 136, n. 5, p. E359-386, 2015.

FIORITO, S. et al. Growth inhibitory activity for cancer cell lines of lapachol and its natural and semi-synthetic derivatives. **Bioorg Med. Chem. Lett.**, v. 15, n. 24, p. 454-457, 2014.

GALLUZZI, L. et al. Molecular definitions of cell death subroutines: recommendations of the Nomenclature Committee on Cell Death 2012. **Cell Death Differ.**, v.19, p.107, 2012.

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

HANAHAN, D.; WEINBERG, R. A. Hallmarks of cancer: the next generation. **Cell**, v. 144, n. 5, p. 646-674, 2011.

HARISI, R. et al. Extracellular matrix induces doxorubicin-resistance in human osteosarcoma cells by suppression of p53 function. **Cancer Biol. Ther.**, v. 6, n. 8, p. 1240-1246, 2007.

HASSAN, M. et al. Apoptosis and molecular targeting therapy in cancer. **Biomed. Res. Int.**, Epub:150845, 2014.

HUNTER, K. D.; PARKINSON, E. K.; HARRISON, P. R. Profiling early head and neck cancer. **Nat. Rev. Cancer**, v. 5, n. 2, p. 127-135, fev. 2005.

JACOBS, J. P.; JONES, C. M.; BAILLIE, J. P. Characteristics of a human diploid cell designated MRC-5. **Nature**, v. 227, p. 168-170, 1970.

JEMAL, A.; BRAY, F.; FERLAY, J. **Global Cancer Statistics**, v. 61, n. 2, p. 69–90, 2011.

JEON, Y. J. et al. Beta-Lapachone suppresses non-small cell lung cancer proliferation through the regulation of specificity Protein 1. **Biol. Pharm. Bull.**, v. 38, n. 9, p. 1302-8, 2015a.

JEON, Y. J. et al. Downregulation of Sp1 is involved in β -lapachone-induced cell cycle arrest and apoptosis in oral squamous cell carcinoma. **Int. J. Oncol.**, v. 46, n. 6, p. 2606-2612, 2015b.

JOHNSON, N.; FRANCESCHI, S.; FERLAY, J. Tumours of the oral cavity and oropharynx-squamous cell carcinoma. In: **Pathology and genetics of head and neck tumours**. Lyon, France: World Health Organization/ IARC Press, 2005. p. 168–175.

KATO, J. et al. Direct binding of cyclin D to the retinoblastoma gene product (pRb) and pRb phosphorylation by the cyclin D-dependent kinase CDK4. **Genes and Development**, v. 7, n. 3, p. 331-342, 1993.

KEE, J. Y. et al. β -Lapachone inhibits lung metastasis of colorectal cancer by inducing apoptosis of CT26 cells. **Integr. Cancer Ther.**, v. 16, n. 4, p. 585-596, 2017a.

KEE, J. Y. et al. β -Lapachone suppresses the lung metastasis of melanoma via the MAPK signaling pathway. **PLoS One**, v. 12, n. 5, e0176937, 2017b.

KIM, J. H. et al. Cloning large natural product gene clusters from the environment: piecing environmental DNA gene clusters back together with TAR. **Biopolymers**, n. 93, p. 833-844, 2010.

KUNG, H. N. et al. Sulindac compounds facilitate the cytotoxicity of β -lapachone by up-regulation of NAD(P)H quinone oxidoreductase in human lung cancer cells. **PLoS One**, v. 9, n. 2, e88122, 2014.

LAMBERT, R. et al. Epidemiology of cancer from the oral cavity and oropharynx. **Eur. J. Gastroenterol. & Hepatol.**, v. 23, n. 8, p. 633–641, ago. 2011.

MA, J. et al. Mitochondrial targeted β -lapachone induces mitochondrial dysfunction and catastrophic vacuolization in cancer cells. **Bioorg. Med. Chem. Lett.**, v. 25, n. 21, p. 4828-4833, 2015.

MARKOPOULOS, A. Current Aspects on Oral Squamous Cell Carcinoma. **The Open Dent. J.**, v. 6, n. 1, p. 126–130, 2012.

MASLIAH-PLANCHON, J.; GARINET, S.; PASMANT, E. RAS-MAPK pathway epigenetic activation in cancer: miRNAs in action. **Oncotarget**, 2015.
doi:10.18632/oncotarget.6476. [Epub ahead of print] Review.

MÉNDEZ, E. et al. Transcriptional expression profiles of oral squamous cell carcinomas. **Cancer**, v. 95, n. 7, p. 1482–1494, 2002.

MIMEAULT, M.; BATRA, S.K. Frequent gene products and molecular pathways altered in prostate cancer and metastasis-initiating cells and their progenies and novel promising multitargeted therapies. **Mol. Med.**, v. 17, p. 949–964, 2011.

MITRA, A. K. et al. Novel delivery approaches for cancer therapeutics. **J. Control Release**, n. 219, p. 248-268, 2015.

MOON, D. O. et al. Beta-lapachone (LAPA) decreases cell viability and telomerase activity in leukemia cells: suppression of telomerase activity by LAPA. **J. Med. Food**, v. 13, n. 3, p. 481-488, 2010.

PARK, E. J. et al. β -Lapachone induces programmed necrosis through the RIP1-PARP-AIF-dependent pathway in human hepatocellular carcinoma SK-Hep1 cells. **Cell Death Dis.**, v. 15, n.5, e1230, 2015.

PLANCHON, S. M. et al. β -Lapachone-mediated apoptosis in human promyelocytic leukemia (HL-60) and human prostate cancer cells: a p53-independent response. **Cancer Res.**, v. 55, p. 3706–3711, 1995.

O'BRIEN, J. et al. Investigation of the Alamar Blue (resazurin) fluorescent dye for the assessment of mammalian cell cytotoxicity. **Eur. J. Biochem.**, v. 267, p. 5421-5426, 2000.

OUGH, M. et al. Efficacy of beta-lapachone in pancreatic cancer treatment: exploiting the novel, therapeutic target NQO1. **Cancer Biol. Ther.**, v.4, n. 1, p. 95-102, 2005.

RODRIGUES, P. C. et al. Clinicopathological prognostic factors of oral tongue squamous cell carcinoma: a retrospective study of 202 cases. **Int. J. Oral Maxill. Surg.**, v. 43, n. 7, p. 795–801, 2014.

SAEZ-RODRIGUEZ, J.; MACNAMARA, A.; COOK, S. Modeling Signaling Networks to Advance New Cancer Therapies. **Annu Rev. Biomed. Eng.**, v. 17, p. 143-163, 2015.

SÁNCHEZ-MARTÍNEZ, C. et al. Cyclin dependent kinase (CDK) inhibitors as anticancer drugs. **Bioorg. Med. Chem. Lett.**, v. 25, n. 17, p. 3420-3435, 2015.

SCHUERCH, A. R.; WEHRLI, W. Beta-Lapachone, an inhibitor of oncornavirus reverse transcriptase and eukaryotic DNA polymerase-alpha. Inhibitory effect, thiol dependence and specificity. **Eur. J. Biochem.**, v. 84, n. 1, p. 197-205, 1978.

SEOANE, S. et al. Administration of the optimized β -Lapachone-poloxamer-cyclodextrin ternary system induces apoptosis, DNA damage and reduces tumor growth in a human breast adenocarcinoma xenograft mouse model. **Eur. J. Pharm. Biopharm.**, v. 84, n. 3, p. 497-504, 2013.

SIEGEL, R.; NAISHADHAM, D.; JEMAL, A. Cancer statistics. **CA: Cancer J. Clin.**, v. 63, n. 1, p. 11–30, jan. 2013.

SITÔNIO M. M. et al. Anti-inflammatory and anti-arthritic activities of 3,4 dihydro-2,2-dimethyl-2H-naphthol[1,2-b]pyran-5,6-dione (β -lapachone). **Inflamm. Res.**, v. 62, n.1, p. 107-113, 2013.

SOBIN, L.; WITTEKIND, C. **TNM Classification of Malignant Tumours**. 7. ed. [s.l.] John Wiley & Sons, INC., 2009.

SUFFNESS, M.; PEZZUTO, J. M. Assays related to cancer drug discovery. In: HOSTETTMANN K. (Ed.). **Methods in Plant Biochemistry: Assays for Bioactivity**. London: Academic Press, 1990. p. 71–133.

SUNASSE, S. N. et al. Cytotoxicity of lapachol, β -lapachone and related synthetic 1,4-naphthoquinones against oesophageal cancer cells. **Eur. J. Med. Chem.**, v. 62, p. 98-110, 2013.

TAKEBE, N.; WARREN, R. Q.; IVY, S. P. Breast cancer growth and metastasis: interplay between cancer stem cells, embryonic signaling pathways and epithelial-to-mesenchymal transition. **Breast Cancer Res.**, v. 13, p. 211, 2011.

TAKEBE, N. et al. Targeting Notch, Hedgehog, and Wnt pathways in cancer stem cells: clinical update. **Nat. Rev. Clin. Oncol.**, v. 12, n. 8, p. 445-464, 2015.

VAN ENGELAND, M. et al. Annexin V-affinity assay: a review on an apoptosis detection system based on phosphatidylserine exposure. **Cytometry**, v. 31, p. 1-9, 1998.

VANDESOMPELE, J. et al. Accurate normalization of real-time quantitative RT-PCR data by geometric averaging of multiple internal control genes. **Genome Biol.**, v. 3, n. 7, 2002.

VIEIRA, S. C. H. et al. Levantamento de fitoterápicos manipulados em farmácias magistrais de Dourados-MS. **Rev. Bras. Farmacog.**, v. 20, n. 1, p. 28-34, 2010.

WEINBERG, R. A. The retinoblastoma protein and cell cycle control. **Cell**, v. 81, n. 3, p. 323-330, 1995.

WELLER, M. et al. Topoisomerase-I inhibitors for human malignant glioma: differential modulation of p53, p21, bax and bcl-2 expression and of CD95-mediated apoptosis by camptothecin and beta-lapachone. **Int. J. Cancer**, v. 73, p. 707–714, 1997.

WOO, H. J. et al. Beta-lapachone, a quinone isolated from *Tabebuia avellanedae*, induces apoptosis in HepG2 hepatoma cell line through induction of Bax and activation of caspase. **J. Med. Food**, v. 9, n. 2, p. 161-168, 2006.

WORLD HEALTH ORGANIZATION. **Cancer control knowledge into action: WHO Guide for effective programmer**. World Health Organization, Geneva, 2007.

WORLD HEALTH ORGANIZATION. World Cancer Day 2013. Disponível em: <<http://www.who.int/cancer/en/index.html>> Acesso: 14 jan. 2014.

WU, Y. et al. β -Lapachone Induces NAD(P)H:Quinone Oxidoreductase-1- and Oxidative Stress-Dependent Heat Shock Protein 90 Cleavage and Inhibits Tumor Growth and Angiogenesis. **J. Pharmacol. Exp. Ther.**, v. 357, n. 3, p. 466-475, 2016.

WUERZBERGER, S. M. et al. Induction of apoptosis in MCF-7:WS8 breast cancer cells by beta-lapachone. **Cancer Res.**, v. 58, p. 1876–1885, 1998.

YANG, Y. et al. β -lapachone suppresses tumour progression by inhibiting epithelial-to-mesenchymal transition in NQO1-positive breast cancers. **Scient. Rep.**, n. 2681, 2017.

YU, H. Y. et al. β -lapachone-Induced Apoptosis of Human Gastric Carcinoma AGS Cells Is Caspase-Dependent and Regulated by the PI3K/Akt Pathway. **Biomol. Ther. (Seoul)**, v. 22, n. 3, p. 184-192, 2014

ZHANG, Q.; ZENG, S.X.; LU, H. Targeting p53-MDM2-MDMX loop for cancer therapy. **Subcell Biochem.**, v. 85, p. 281-319, 2014.

ANEXO

Figura A1. Genes da placa *TaqMan Array Human Molecular Mechanisms of Cancer* (Life Technologies®)

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	18S Hs99999901_s1	GAPDH Hs99999905_m1	HPRT1 Hs99999909_m1	GUSB Hs99999908_m1	ABL1 Hs01104728_m1	AKT1 Hs00178289_m1	AKT2 Hs01086102_m1	APC Hs00181051_m1	BAX Hs00180269_m1	BCAR1 Hs00183953_m1	BCL2 Hs99999018_m1	BCL2L1 Hs00236329_m1
B	BCL2L11 Hs00197982_m1	BID Hs00609632_m1	BRAF Hs00269944_m1	CASP8 Hs01018151_m1	CASP9 Hs00154260_m1	CCND1 Hs00765553_m1	CCND2 Hs00153380_m1	CCND3 Hs00236949_m1	CCNE1 Hs01026536_m1	CDC42 Hs00741586_mH	CDH1 Hs01023894_m1	CDK2 Hs01548894_m1
C	CDK4 Hs00175935_m1	CDKN1A Hs00355782_m1	CDKN1B Hs00153277_m1	CDKN2A Hs00923894_m1	CDKN2B Hs00365249_m1	COL1A1 Hs00164004_m1	CRK Hs00180418_m1	CTNNB1 Hs00355045_m1	CYCS Hs01588973_m1	DVL1 Hs00182896_m1	E2F1 Hs00153451_m1	EGFR Hs01076078_m1
D	ELK1 Hs00428286_g1	ERBB2 Hs01001580_m1	FADD Hs00538709_m1	FAS Hs00531110_m1	FASLG Hs00181225_m1	FGF2 Hs00266645_m1	FN1 Hs01549976_m1	FOS Hs00170630_m1	FYN Hs00176628_m1	FZD1 Hs00268943_s1	GRB2 Hs00157817_m1	GSK3B Hs00275656_m1
E	HGF Hs00300159_m1	HRAS Hs00610483_m1	IGF1 Hs01547656_m1	IGF1R Hs00609566_m1	ITGA2B Hs01116228_m1	ITGAV Hs00233790_m1	ITGB1 Hs00559595_m1	ITGB3 Hs01001469_m1	JUN Hs99999141_s1	KDR Hs00911700_m1	KIT Hs00174029_m1	KRAS Hs00364282_m1
F	LEF1 Hs00212390_m1	MAP2K1 Hs00605615_mH	MAP3K5 Hs00178726_m1	MAPK1 Hs01046830_m1	MAPK14 Hs00176247_m1	MAPK3 Hs00385075_m1	MAPK8 Hs01548508_m1	MAX Hs00811070_m1	MDM2 Hs99999008_m1	MYC Hs99999003_m1	NFKB1 Hs00765730_m1	NFKB2 Hs00174517_m1
G	NFKBIA Hs00153283_m1	NRAS Hs00180035_m1	PIK3CA Hs00180679_m1	PIK3R1 Hs00381459_m1	PTEN Hs01920652_s1	PTK2 Hs00178587_m1	PTK2B Hs00169444_m1	RAC1 Hs01025984_m1	RAF1 Hs00234119_m1	RB1 Hs01078066_m1	RELA Hs00153294_m1	RHOA Hs00357608_m1
H	SHC1 Hs00427539_m1	SMAD4 Hs00929647_m1	SOS1 Hs00362308_m1	SPP1 Hs00960942_m1	SRC Hs00178494_m1	TCF3 Hs00413032_m1	TGFB1 Hs00998133_m1	TGFBR1 Hs00610318_m1	TGFBR2 Hs00234253_m1	TP53 Hs01034249_m1	VEGFA Hs00900055_m1	WNT1 Hs00180529_m1

APÊNDICE

Tabela A1. Efeito da β -lapachona e seus derivados 3-iodo sobre a expressão de genes relacionados ao câncer em células HSC3

Genes	DOX	β -lapachona	3-I- α -lapachona	3-I- β -lapachona
ABL1	364,45	1,47	0,68	10,74
AKT1	570,92	3,58	1,28	42,88
AKT2	211,03	1,53	0,66	17,13
APC	356,29	2,06	0,66	69,79
BAX	1.346,14	3,25	0,77	37,87
BCAR1	658,91	4,04	2,59	90,53
BCL2	372,27	N.d.	1,51	14,85
BCL2L1	263,93	1,37	0,65	12,32
BCL2L11	3.037,08	4,73	1,69	27,03
BID	N.d.	0,86	2,90	3,94
BRAF	147,39	1,75	1,40	48,26
CASP8	40,15	0,89	0,71	4,940
CASP9	N.d.	1,59	N.d.	104,90
CCND1	1.645,54	4,32	1,44	41,35
CCND2	658,45	2,59	0,63	25,82
CCND3	1.382,27	11,63	1,52	42,06
CCNE1	1.776,39	12,83	1,54	41,65
CDC42	N.d.	0,85	0,77	6,24
CDH1	318,79	2,44	1,27	21,00
CDK2	1.825,99	5,02	0,63	32,34
CDK4	383,89	2,61	1,02	22,37
CDKN1A	4.302,54	8,05	2,85	80,83
CDKN1B	335,79	1,64	0,61	22,38
CDKN2A	12,85	1,50	1,08	10,05
CDKN2B	N.d.	N.d.	N.d.	N.d.
COL1A1	1.624,54	5,57	1,53	19,23
CRK	N.d.	0,89	1,42	3,04
CTNNB1	45,15	2,46	1,19	12,35
CYCS	N.d.	1,02	1,32	N.d.
DVL1	246,68	4,26	1,88	72,05
E2F1	1.744,01	5,65	1,10	44,15
EGFR	121,20	2,21	0,88	41,98
ELK1	12,36	1,45	1,14	12,54
ERBB2	1.748,61	4,69	1,37	64,18
FADD	N.d.	0,82	1,51	9,95
FAZ	34,22	0,77	0,92	4,18
FASLG	N.d.	N.d.	N.d.	N.d.
FGF2	228,28	1,46	1,73	22,74
FN1	911,08	1,66	0,97	19,45
FOS	1.065,45	1,77	1,69	27,05
FYN	99,78	1,08	0,92	23,00
FZD1	1.221,62	5,46	0,97	47,94
GRB2	297,07	1,23	0,64	20,77
GSK3B	63,65	1,26	0,63	14,07
HGF	N.d.	N.d.	N.d.	N.d.
HRAS	392,22	3,02	1,14	28,15
IGF1	N.d.	N.d.	N.d.	N.d.

IGF1R	1.398,54	3,52	0,68	22,07
ITGA2B	N.d.	N.d.	N.d.	N.d.
ITGAV	497,32	2,80	0,96	24,22
ITGB1	449,13	1,67	0,78	19,38
ITGB3	N.d.	N.d.	N.d.	N.d.
JUN	6.603,58	4,55	1,93	51,82
KDR	N.d.	N.d.	N.d.	N.d.
KIT	N.d.	N.d.	N.d.	N.d.
KRAS	N.d.	2,71	2,95	13,26
LEF1	371,17	2,13	1,14	13,28
MAP2K1	18,71	1,41	1,30	20,22
MAP3K5	0,78	1,45	N.d.	0,78
MAPK	353,18	2,07	1,08	23,90
MAPK14	243,91	2,84	1,64	39,80
MAPK3	545,58	5,32	1,25	25,71
MAPK8	682,37	3,16	0,85	37,72
MAX	N.d.	N.d.	N.d.	N.d.
MDM2	466,63	2,51	1,24	36,63
MYC	662,49	1,72	0,73	26,03
NFKB1	536,35	3,03	0,74	11,69
NFKB2	1.563,61	2,86	1,93	65,77
NFKBIA	782,29	2,29	1,59	36,51
NRAS	84,45	0,87	0,83	16,06
PIK3CA	210,22	0,68	0,82	22,11
PIK3R1	32,11	0,45	0,24	2,41
PTEN	N.d.	0,62	0,57	1,07
PTK2	381,33	2,75	1,29	36,98
PTK2B	651,04	2,84	0,92	42,52
RAC1	24,82	0,77	0,66	2,25
RAF1	140,00	0,76	0,65	9,58
RB1	269,08	2,00	1,09	16,19
RELA	383,30	2,32	0,79	20,37
RHOA	255,88	2,01	1,04	25,95
SHC1	3,67	1,42	2,13	5,29
SMAD4	151,54	1,43	0,79	19,30
SOS1	781,00	3,57	2,90	49,91
SPP1	N.d.	N.d.	13,27	89,87
SRC	904,02	3,58	1,68	52,81
TCF3	146,83	3,26	2,83	58,32
TGFB1	1.930,19	4,80	1,15	52,17
TGFBR1	358,73	1,86	1,21	27,11
TGFBR2	330,90	0,09	0,76	55,39
TP53	95,53	2,54	2,91	2,84
VEGFA	605,92	1,70	2,76	50,53
WNT1	N.d.	N.d.	N.d.	N.d.

As células HSC3 foram tratadas com 1 μ M da β -lapachona, 4,5 μ M da 3-I- α -lapachona e 1 μ M da 3-I- β -lapachona durante 12 h. O controle negativo foi tratado com o veículo (DMSO 0,2%) utilizado para diluir os compostos testados. A doxorubicina (DOX, 1 μ M) foi utilizada como controle positivo. Os valores representam a quantificação relativa (QR) em comparação com o calibrador (células tratadas com o controle negativo, QR = 1,0). Os genes foram considerados com expressão aumentada se QR \geq 2 e foram considerados com expressão reduzida se QR \leq 0,5. N.d. Não determinado.

