



**Ministério da Saúde
Instituto Nacional de Câncer
Coordenação de Pós-Graduação**

**INSTITUTO NACIONAL DE CÂNCER
Pós-Graduação em Oncologia**

PAULA PRISCILLA DE FREITAS DOS SANTOS

**AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE DE COMPOSTOS INÉDITOS DERIVADOS DE
NAFTOQUINONAS SOBRE A VIABILIDADE DE LINHAGENS METASTÁTICAS
DE CÂNCER DE PRÓSTATA**

Orientadora: Prof^o. Dra. Etel Rodrigues Pereira Gimba

**RIO DE JANEIRO
2019**



**Ministério da Saúde
Instituto Nacional de Câncer
Coordenação de Pós-Graduação**

INSTITUTO NACIONAL DE CÂNCER

Pós-Graduação em Oncologia

PAULA PRISCILLA DE FREITAS DOS SANTOS

**AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE DE COMPOSTOS INÉDITOS DERIVADOS DE
NAFTOQUINONAS SOBRE A VIABILIDADE DE LINHAGENS METASTÁTICAS DE
CÂNCER DE PRÓSTATA**

Dissertação apresentada ao Instituto Nacional de Câncer José Alencar Gomes da Silva, como parte dos requisitos para obtenção do título de Mestre em Oncologia.

Orientadora: Prof^o. Dra. Etel Rodrigues Pereira Gimba

RIO DE JANEIRO

2019

FICHA CATALOGRÁFICA

S237a Santos, Paula Priscilla de Freitas

Avaliação da atividade de compostos inéditos derivados de naftoquinonas sobre a viabilidade de linhagens metastáticas de câncer de próstata / Paula Priscila de Freitas Santos. – Rio de Janeiro, 2019.

101 f.: il. color.

Dissertação (Mestrado em Oncologia) – Programa de Pós-Graduação em Oncologia, Instituto Nacional de Câncer José Alencar Gomes da Silva, 2019.

Orientadora: Dra. Etel Rodrigues Pereira Gimba

1. Neoplasias da Próstata. 2. Naftoquinonas. 3. Sobrevivência Celular. I. Gimba, Etel Rodrigues Pereira (Orient.). II. Instituto Nacional de Câncer José Alencar Gomes da Silva. III. Título.

CDD 616.9946305



**Ministério da Saúde
Instituto Nacional de Câncer
Coordenação de Pós-Graduação**

**INSTITUTO NACIONAL DE CÂNCER
Pós-Graduação em Oncologia**

AUTOR: PAULA PRISCILLA DE FREITAS DOS SANTOS

**AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE DE COMPOSTOS INÉDITOS DERIVADOS DE
NAFTOQUINONAS SOBRE A VIABILIDADE DE LINHAGENS METASTÁTICAS
DE CÂNCER DE PRÓSTATA**

Orientadora: Prof^o. Dra. Etel Rodrigues Pereira Gimba

Aprovada em: 20/02/2019

EXAMINADORES:

**Prof. Dra. Raquel Ciuvalski Maia
Prof. Dra. Claudia Esther Alicia Rocio Hassan
Prof. Dra. Aurea Echevarria Aznar Neves Lima
Prof. Dr. Marcelo Alex de Carvalho
Prof. Dra. Danielly Cristiny Ferraz da Costa**

**RIO DE JANEIRO
2019**

Dedico este trabalho aos meus pais e ao meu marido, pois sem eles eu não teria chegado tão longe de maneira tão consciente.

AGRADECIMENTOS

Ao meu grandioso Deus, por ter me sustentado e por ter me dado sabedoria para iniciar e finalizar algo que nunca imaginei que teria capacidade de conseguir. Obrigada pelo privilégio de ter me permitido passar por todas as experiências que vivi, durante os meus sete anos de INCA.

Aos meus pais, Paulo Roberto de Freitas e Sandra de Freitas, que nunca mediram esforços pela minha educação, que com muito suor criaram eu e meu irmão com a consciência que eu nunca teria que passar por cima de ninguém. Tudo aquilo que herdei de vocês são valores inestimáveis. Vocês sempre serão essenciais na minha vida, a cada degrau que subo e todas as conquistas que alcanço é para vocês. Obrigada por me mostrarem sempre que não é vergonha nenhuma ser filha de um feirante e de uma comerciante. Mestre, por vocês! Amo vocês!

Ao meu marido, Deivison Lopes dos Santos, o melhor presente que eu poderia receber do meu Senhor. Obrigada por toda paciência, força, segurança e companheirismo. Obrigada por cada vez que você me incentivou, porque sempre teve certeza que eu iria conseguir, mesmo eu tendo “certeza” que não daria conta. Obrigada por entender e respeitar todos os momentos, de conquistas nos experimentos que funcionaram e de frustração quando tudo desandava. Sem o seu apoio essa fase teria sido insuportável. Glorifico à Deus por ter você ao meu lado, Amor. Obrigada por me apoiar. Te amo para sempre e sempre.

Ao meu irmão de sangue, Paulo R. F. Filho, por sempre se orgulhar da caçula e por mesmo em meio aos ciúmes e implicâncias me amar e me apoiar incondicionalmente. Obrigada por ter me feito ser a menina dos seus olhos e por me dar uma sobrinha que reflete o nosso amor. Ao meu cunhado, e irmão de coração, Jheison Lopes, por ser “o cara” e me fazer ouvir Rock para relaxar e conseguir escrever, por me fazer ver amor na licenciatura, por me motivar e incentivar a ser uma profissional diferenciada e por me fazer acreditar na profissão que nós escolhemos. Obrigada por ser sempre o melhor. Obrigada por me fazer acreditar e confiar mais em mim. Continue assim.

Agradeço imensamente à minha orientadora, Dr^a Etel Gimba, por ter me aceitado em seu grupo de pesquisa. Eu tão imatura e inexperiente, hoje me sinto

uma profissional madura e bem formada graças aos seus conselhos, puxões de orelha, palavras de incentivo e de repreensão. Obrigada pela dedicação e compreensão de todos esses anos, por estar atenta a cada detalhe e por me ajudar a crescer. Obrigada pelo desafio do Curso de Verão mesmo em meio à escrita da dissertação. Eu sabia que quando me deu aquela missão era porque acreditava que eu conseguiria dar conta, e foi só por causa disso que consegui. E por último, muito obrigada por mesmo em Portugal continuar tão presente. Em certos momentos eu sentida como se você estivesse aqui do lado, e a cada vez que nos víamos no Skype era o mesmo frio na barriga do dia em que fiz a entrevista para ingressar no grupo. Você é um exemplo de profissional e de mulher que vou levar pra minha vida. Sou grata por todos os nossos momentos. Obrigada pelo apoio incondicional de sempre.

Agradeço à Dr^a Isabela Guimarães, pela amizade, conselhos, e por todo o auxílio necessário com os experimentos de citometria. Obrigada pela parceria, pelos cafés na copa e por toda a diferença que você fez na minha formação. Obrigada por dividir comigo um pouco do que você é, para que eu me tornasse melhor do que eu era.

Ao grupo de Biomarcadores Neoplásicos, ou, as Eteletes. Obrigada por serem sempre tão sorridentes e amigáveis, obrigada por tantos anos de aprendizado mútuo. Foram anos onde entraram e saíram meninas, mas foram amizades ganhas e que foram se fortalecendo. Em especial: Ana Emília, pela co-orientação na IC, Ingridy pela parceria, Abigail, Aline Matos, Kivvi, Vanessa Mignone, por terem sido ótimas companheiras de bancada, Nataly Melo por ter me auxiliado com os experimentos no início do mestrado, sem a sua ajuda eu não teria conseguido aprender a me organizar para fazer tantos experimentos, e obrigada por ser minha best de sempre, Mari e Ana Clara por estarem junto comigo nesse momento mais pesado e por poder contar com vocês, Luciana Bueno, por esclarecer dúvidas, estatísticas e por se mostrar sempre presente. Não menos importante, às mais recentes: Dani, Bruna e Gabi, agradeço à Deus por vocês terem entrado para nosso grupo e por alegrarem nossos dias, obrigada pela amizade e por todas as risadas, sejam grandes e lutem!

Ao Dr^o Vitor Ferreira, pela parceria e colaboração durante todo esse projeto. Ao Dr^o Ruan e à Dr^a Mariana pelas sínteses dos compostos, sem os quais esse projeto não teria acontecido.

Ao Dr^o José Morgado, por ter nos recebido em seu programa e a todos do Programa de Biologia Celular e Molecular pelo convívio diário, pelos cafés, pelos choros, desabafos e pela amizade. Em especial à Annie e ao Wallace, que me mostraram que eu devia lutar pelo que eu queria, quando todas as vozes eram contrárias. À Annie e ao Perony pelo auxílio com as formatações. À amiga Jéssica, do Grupo de Glicobiologia, por ter feito do nosso convívio o mais agradável possível, pelas maquiagens, risadas com nosso último neurônio.

Aos meus amigos da vida, por entenderem toda a ausência e estresse, principalmente da reta final. Obrigada por me fazerem rir e por saberem o que estou sentindo sem eu dizer. Em especial, agradeço à Aimêe, Johny e Nataly, por serem os donos dos meus segredos profundos e dos melhores abraço e conselhos.

Aos meus mestres, que tive o prazer de receber, tanto na UEZO quando no INCA. Obrigada por todo aprendizado e sabedoria de vida compartilhados.

À banca, por aceitar o convite e por tudo que irá acrescentar ao nosso trabalho.

À pós graduação, em especial ao Rodrigo, Daniele e Andrea, por estarem sempre dispostos à nos ajudar e a resolver nossos probleminhas e desesperos.

À Alê e Amanda, assim como à todos os colegas e corpo técnico do Programa de Biologia Celular, por todo auxílio e amizade no primeiro ano do mestrado.

Aos colegas, Giovani, Jéssica e Douglas, por estarem sempre dispostos à ajudar, a fim de tornar tudo possível para nossos experimentos, tornando nossa rotina possível.

Gratidão à todos!

Às agências de fomento INCa/MS, CNPQ e FAPERJ pelo auxílio no projeto, pois sem ele não poderíamos dar prosseguimento aos experimentos.

"Ele verá o fruto do penoso trabalho de sua alma e ficará satisfeito; o meu Servo, o Justo com o seu conhecimento, justificará a muitos porque as iniquidades deles levará sobre si."

Isaías 53:11



**Ministério da Saúde
Instituto Nacional de Câncer
Coordenação de Pós-Graduação**

**AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE DE COMPOSTOS INÉDITOS DERIVADOS DE
NAFTOQUINONAS SOBRE A VIABILIDADE DE LINHAGENS METASTÁTICAS DE
CÂNCER DE PRÓSTATA**

RESUMO

PAULA PRISCILLA DE FREITAS DOS SANTOS

Pacientes com câncer de próstata (CaP) metastático em geral adquirem resistência à terapias anti-androgênicas e ao docetaxel (DXT). Novas abordagens tem sido testadas no sentido de propor novas alternativas terapêuticas, incluindo a avaliação de produtos inéditos derivados de compostos naturais, ou combinação destes compostos com as drogas quimioterapêuticas usadas como primeira linha de tratamento do CaP. O objetivo deste estudo foi avaliar o efeito citotóxico de compostos sintéticos derivados de naftoquinonas em linhagens celulares de CaP metastático e investigar os mecanismos celulares relacionados aos seus efeitos sobre a viabilidade celular. Avaliamos o efeito citotóxico de 34 compostos sintéticos inéditos derivados de naftoquinonas, classificados como bis-quinonas (n=3), tióis (n=3), bases de mannich (n=18) e cumarinas tióis (n=10) nas linhagens celulares PC3 e DU145, derivadas de CaP metastático, através de ensaios de 3-(4,5-dimethylthiazol -2-yl)-2,5-di-phenyl tetrazolium bromide (MTT). Marcação com iodeto de propideo (PI) foi utilizada para análise do ciclo celular e determinação da porcentagem de células em apoptose. Dentre os 34 compostos testados, 4 destes promoveram inibição de pelo menos 50% da viabilidade das células PC3 e DU145, efeito maior que o promovido pelo tratamento com o DXT nas mesmas linhagens celulares. Em células não tumorais HUVEC, foi observado que apenas para o composto RC10 na maior concentração avaliada promoveu diminuição na viabilidade celular. Entretanto, esta foi menor que a diminuição de viabilidade observada em células tumorais. Dois destes compostos pertencem à classe das bis-quinonas, enquanto outros dois correspondem à classe dos tióis. Esses compostos foram avaliados em concentrações entre 0,69 μM e 100 μM . As concentrações de 6,75 μM e 12,5 μM promoveram diminuição na viabilidade celular, com correspondente aumento na proporção de células na fase Sub G0/G1 do ciclo celular, além de induzir pelo menos 10% de morte celular por apoptose, o que não foi observado na linhagem não tumoral testada. Em conjunto, nossos resultados evidenciam a caracterização de 4 compostos inéditos derivados de naftoquinonas pertencentes às famílias de bis-quinonas e tióis, com significativo efeito citotóxico sobre as linhagens de CaP metastático. Estes compostos promoveram bloqueio da progressão do ciclo celular e indução da apoptose, o que não foi observado quando a linhagem não tumoral HUVEC foi testada. Mais estudos serão necessários para investigar os mecanismos e vias de sinalização pelas quais esses compostos inibem a viabilidade de células de CaP e como os mesmos atuariam em combinação com quimioterápicos de uso clínico, como o DXT.

Palavras-chave: Câncer de próstata; naftoquinonas, citotoxicidade; viabilidade celular



Ministério da Saúde
Instituto Nacional de Câncer
Coordenação de Pós-Graduação

EVALUATION OF THE CYTOTOXICITY ACTIVITY OF NOVEL SYNTHETIC
NAPHTHOQUINONE-DERIVED-COMPOUNDS ON THE VIABILITY IN
METASTATIC PROSTATE CANCER CELL LINES

ABSTRACT

PAULA PRISCILLA DE FREITAS DOS SANTOS

Patients with metastatic prostate cancer (PCa) generally acquire resistance to androgen deprivation and docetaxel (DXT) therapies. New approaches have been tested in order to propose innovative therapeutic approaches, including testing of novel products derived from natural compounds or their combination with current chemotherapeutic drugs used at first line treatment in PCa. Objectives: The aim of this study was to test the cytotoxic effect and related molecular mechanisms of synthetic compounds derivated from naphthoquinones in metastatic prostate cancer cells lines. We evaluated cytotoxic effect of 34 synthetic distinct naphthoquinone-derived compounds, classified into bis-quinones (n=3), thiols-quinones (n=3), mannich bases (n=18) and coumarin thiols (n=10) over PC-3 and DU-145 metastatic prostate cancer cells lines by using 3-(4,5-dimethylthiazol -2-yl)-2,5-di-phenyl tetrazolium bromide (MTT) assays. Propidium iodide staining for simultaneous cell cycle analysis and apoptosis determination have been performed. Among these 34 tested compounds, 4 of them significantly promoted at least 50% inhibition on PC-3 and DU-145 cell viability, which was greater than that promoted by docetaxel (DXT) in these same cell lines. Two of these compounds are bis-quinone, while the other 2 corresponded to coumarin thiols. Concentrations of these 4 compounds ranging from 0,69 μM to 100 μM have been tested. In non-tumoral HUVEC cells, we found that only in 100 μM of the RC10 compound promoted a decrease in cell viability. However this effect was lower than the decrease in viability observed in tumor cells. The concentrations of 6,75 μM and 12,5 μM significantly induced decreased cell viability, by increasing the proportion of cells in Sub G0/G1 phase of cell cycle, besides inducing at most 10% of apoptotic cell death, the same was not observed in the normal cells line, HUVEC. Altogether, our data evidenced the characterization of 4 novel naphthoquinone-derived compounds pertaining to bis-quinones and thiols-quinones classes, with significant cytotoxic effect over metastatic prostate cancer cells. These compounds promoted cell cycle progression arrest and induction of apoptosis, which was not observed for the HUVEC cells. Further studies should better investigate the mechanisms and signaling pathways by which these compounds inhibit PCa cell viability and how it could behave in combination to currently used chemotherapy, such as DXT.

Keyword: prostate cancer; naphthoquinone; cytotoxicity; cell viability

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1.1.1 - Distribuição proporcional dos dez tipos de câncer mais incidentes na população brasileira do sexo masculino para o ano de 2018, exceto câncer de pele não melanoma.....	16
Quadro 4.1 - Fórmula e estrutura química dos compostos bioativos estudados.....	30
Figura 5.1 - Análise de viabilidade celular de células PC3 e DU145 em resposta ao tratamento com os compostos BM.....	41
Figura 5.2 - Análise de viabilidade celular de células PC3 e DU145 em resposta ao tratamento com os compostos CT.....	43
Figura 5.3 - Análise de viabilidade celular de células PC3 e DU145 em resposta ao tratamento com os compostos BQ.....	45
Figura 5.4 - Análise de viabilidade celular de células PC3 e DU145 em resposta ao tratamento com os compostos T.....	47
Figura 5.5 - Avaliação do IC50 em células metastáticas de CaP.....	51
Figura 5.6 - Histograma representativo da proporção de células em cada fase do ciclo celular.....	53
Figura 5.7 - Análise do ciclo celular por citometria de fluxo na linhagem DU145 tratada com os compostos RC10, RCDFC, 3-CH3 Tiol e 4F-Tiol.....	57
Figura 5.8 - Análise do ciclo celular por citometria de fluxo na linhagem PC3 tratada com compostos derivados de naftoquinonas.....	61
Figura 5.9 - Histograma representativo da proporção de células marcadas por Anexina V/Iodeto de Propídeo.....	63
Figura 5.10 - Ensaio de Anexina V FITC/PI na linhagem DU145 tratada com compostos derivados de naftoquinonas.....	67
Figura 5.11 - Ensaio de Anexina V FITC/PI na linhagem PC3 tratada com compostos derivados de naftoquinonas.....	71
Figura 5.12 - Avaliação do IC50 em células endoteliais HUVEC.....	73
Figura 5.13 - Análise do ciclo celular por citometria de fluxo na linhagem não tumoral HUVEC tratada com compostos derivados de naftoquinonas.....	76
Figura 5.14 - Histograma representativo do ensaio de Anexina V FITC/PI na linhagem não tumoral HUVEC tratada com compostos derivados de naftoquinonas.....	77

LISTA DE QUADROS

Quadro 1.1 - Dados da literatura dos compostos derivados de naftoquinonas estudados em câncer e as concentrações utilizadas.	24
Quadro 4.1- Fórmula e estrutura química dos compostos bioativos estudados	30

LISTA DE ABREVIATURAS

AR	Receptor de androgênio
BM	Bases de Mannich
BQ	Bis quinona
CaP	Câncer de próstata
CPRC	Câncer de próstata resistente à castração
CO ₂	Dióxido de carbono
CT	Cumarina Tiol
DMEM	<i>Dulbecco's Modified Eagle Medium</i>
DMSO	Dimetil sulfóxido
DNA	Ácido desoxirribonucleico
DOX	Doxorrubicina
DU145 cerebral	Linhagem celular humana de tumor de próstata derivada de metástase cerebral
DXT	Docetaxel
EDTA	Ácido etilenodiamino tetra-acético
EMT	Transição epitélio-mesenquimal
FITC	Isotiocianato de fluoresceína
FL-2	Detector de fluorescência 2
<i>g</i>	Força gravitacional
HEPES	Ácido 2-[4-(2-hidroxietil)1-piperazinil]-etanosulfônico
HUVEC	Células endoteliais da veia umbilical humana
IC ₅₀	Inibição da concentração em 50%
INCa	Instituto Nacional de Câncer
KCl	Cloreto de potássio
LABSOA	Laboratório de Síntese Orgânica Aplicada
L-glu	L-glutamina

MgCl ₂	Cloreto de magnésio
MMP	Potencial de membrana mitocondrial
MTT	Brometo de [3-(4,5-dimetiltiazol-2yl)-2,5-difenil tetrazolium
NaCl	Cloreto de sódio
NADPH	Nicotinamida adenina dinucleótido fosfato
P/S	Penicilina e Streptomicina
PBS	Tampão fosfato salino
PC3 cerebral	Linhagem celular humana de tumor de próstata derivada de metástase
PSA	Antígeno prostático específico
pH	Potencial hidrogeniônico
PI	Iodeto de propídeo
Q	Substrato quinonoídico
RNAse	Ribonuclease
ROS	Espécies reativas de oxigênio
SFB	Soro fetal bovino
T	Tiol
TA	Temperatura ambiente
UFF	Universidade Federal Fluminense
USTR	Ultrassonografia transretal

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	16
1.1. Câncer de Próstata.....	16
1.2. Quinonas.....	18
1.3. Naftoquinonas e câncer.....	20
2. JUSTIFICATIVA	26
3. OBJETIVOS	27
3.1. Objetivo principal	27
3.2. Objetivos específicos	27
4. MATERIAIS E MÉTODOS.....	28
4.1. Linhagens Celulares e Cultura de Células	28
4.2. Tratamento com Naftoquinonas	28
4.3. Ensaio de Viabilidade Celular	33
4.4. Ensaio de Citometria de Fluxo	34
4.4.1. Análise do Ciclo Celular.....	34
4.4.2. Análise de Indução de Apoptose	35
4.5. Análises Estatísticas.....	36
5. RESULTADOS	37
5.1. Avaliação da viabilidade celular em células de CaP metastático em resposta ao tratamento com os compostos derivados de naftoquinonas	37
5.2. Os compostos RC10, RCDFC, 4F-Tiol e 3-CH3 Tiol induzem redução da viabilidade em células DU145 e PC3	42
5.3. O tratamento com compostos RC10, RCDFC, 4F-Tiol e 3-CH3 Tiol altera o perfil de distribuição de células de CaP no ciclo celular	45
5.4. O tratamento com compostos RC10, RCDFC, 4F-Tiol e 3-CH3 Tiol induz morte celular por apoptose nas linhagens DU145 e PC3 de CaP metastático	51
5.5. Os compostos RC10 e RCDFC não alteram a viabilidade, ciclo celular e apoptose de linhagens celulares não tumorais HUVEC	57


6. DISCUSSÃO	62
7. CONCLUSÕES	68
8. BIBLIOGRAFIA	69

1. INTRODUÇÃO

1.1. Câncer de Próstata

O câncer de próstata (CaP) é a neoplasia maligna da próstata. Dados da *International Agency for Research on Cancer* (GLOBOCAN/IARC, 2018) revelam que em 2018 a estimativa mundial de incidência de CaP foi de 1,3 milhões de novos casos, estimando-se 359 mil mortes associadas à este tumor. No mundo, este é o segundo tipo de câncer mais incidente, atrás apenas do câncer de pulmão. É também a quinta causa de morte por câncer, em homens, em países desenvolvidos.

Segundo o Instituto Nacional de Câncer (INCa), foi estimado para o biênio de 2018-2019 cerca de 68 mil (31,7%) novos casos da neoplasia, no Brasil (Figura 1.1).

Localização Primária	Casos	%	
Próstata	68.220	31,7%	Homens 
Traqueia, Brônquio e Pulmão	18.740	8,7%	
Cólon e Reto	17.380	8,1%	
Estômago	13.540	6,3%	
Cavidade Oral	11.200	5,2%	
Esôfago	8.240	3,8%	
Bexiga	6.690	3,1%	
Laringe	6.390	3,0%	
Leucemias	5.940	2,8%	
Sistema Nervoso Central	5.810	2,7%	

*Números arredondados para múltiplos de 10.

Figura 1.1 - Distribuição proporcional dos dez tipos de câncer mais incidentes na população brasileira do sexo masculino para o ano de 2018, exceto câncer de pele não melanoma. Foram estimados 68.220 novos casos de CaP no Brasil.

Em sua fase inicial é uma doença silenciosa. Os pacientes são assintomáticos, ou apresentam sintomas semelhantes aos observados em pacientes

com hiperplasia prostática benigna (HPB), como dificuldades para urinar, ou necessidade de urinar mais vezes. Pela localização da próstata, os pacientes em fase avançada, apresentam infecções generalizadas, insuficiência renal, e ainda dores ósseas (“Câncer de próstata”, 2018). Os casos de metástases mais comuns podem ser observados nos ossos, linfonodos fígado e pulmão, podendo ainda, em casos mais raros, serem observadas no cérebro (BUBENDORF et al., 2000; YAO et al., 2017).

O CaP é considerado como o câncer da terceira idade, uma vez que cerca de 75% dos casos no mundo ocorrem a partir dos 65 anos. Podemos justificar o aumento das taxas de incidência no Brasil, devido a evolução dos exames de diagnósticos, a melhoria na qualidade dos sistemas de informação do país e ainda devido o aumento na expectativa de vida (“Câncer de próstata”, 2018).

Os fatores de risco para este tipo de câncer incluem principalmente idade avançada, histórico familiar, estilo de vida, etnia e hábitos alimentares. Podem ser considerados ainda fatores como o tempo de exposição a andrógenos e a exposição a infecções sexualmente transmissíveis (STASIEWICZ et al., 2012).

A hereditariedade é um dos principais fatores de risco relacionados ao acometimento desta neoplasia, fazendo com que homens que possuem histórico de parentes de primeiro grau com a doença tenham duas vezes mais chances de ter este tipo de câncer do que os que não tem (GIRI; BEEBE-DIMMER, 2016; LYNCH et al., 2016).

Os métodos diagnósticos mais comumente utilizados são o toque retal, a dosagem sérica do antígeno prostático específico (PSA), a ultrassonografia transretal (USTR), além da biópsia da próstata. O toque retal é a principal metodologia para detecção do tumor, e possui vantagem frente a avaliação da dosagem do PSA, uma vez que este é tecido específico, porém não tumor específico e pode se mostrar alterado frente doenças não malignas, resultando em resultados falsos positivos (PEZARO; WOO; DAVIS, 2014; BARRY; SIMMONS, 2017).

O tratamento para essa neoplasia é recomendado de acordo com o estágio da doença, dependendo da progressão, e se o tumor se encontra localizado ou metastático (HEIDENREICH et al., 2014). A maioria dos pacientes diagnosticados, possuem CaP localizado. Para esses pacientes, a conduta sugerida inclui

prostatectomia radical, radioterapia ou ainda as abordagens terapêuticas atuais, em combinação com a hormonal (ANANTHARAMAN; FRIEDLANDER, 2016).

Embora haja abordagens eficazes para o tratamento do CaP localizado, a doença metastática continua sendo incurável (SINGH; LILLARD; SINGH, 2017). Apesar disso, estudos tem sido feitos a fim de utilizar novas estratégias para o CaP avançado e/ou metastático, incluindo a imunoterapia, os análogos hormonais, as terapias direcionadas e as drogas citotóxicas (LAUER et al., 2015). Especialmente dentre os pacientes com CaP metastático tratados com hormonioterapia, muitos ainda demonstram resposta clínica limitada aos agentes hormonais atuais, gerando o CaP resistente à castração (CPRC), que continua sendo uma doença letal (ANTONARAKIS et al., 2016). O desenvolvimento de resistência às atuais terapias hormonais e sua potencial biologia subjacente têm sido cada vez mais discutida (ANTONARAKIS et al., 2014; BIANCHINI et al., 2014; THOMSEN et al., 2014; CHENG et al., 2015). Atualmente, o docetaxel (DXT) é o medicamento de primeira linha utilizado para pacientes com metástases ósseas do CaP que não respondem à terapia anti-androgênica (CORNFORD et al., 2017). Entretanto, 90% dos pacientes desenvolvem resistência ao tratamento (SERUGA; OCANA; TANNOCK, 2011), limitando sua eficácia.

Uma vez que cada paciente possui diferentes susceptibilidades na resposta à distintos fármacos, estudos têm sido desenvolvidos a fim de utilizar a combinação quimioterapêutica ideal para cada paciente de forma mais eficaz, podendo envolver a combinação de um amplo número de fármacos já utilizados na clínica, associados a compostos naturais, de sabida atividade anti-tumorigênica, além de ação sobre a diminuição do tamanho tumoral (LERNOUX et al., 2018; LIU et al., 2018).

1.2. Quinonas

Dentre as moléculas naturais bioativas estudadas para o tratamento de neoplasias incluem-se as quinonas (CATANZARO et al., 2018). As quinonas são uma classe de compostos orgânicos que possuem como propriedades químicas a interação com alvos biológicos com base na transferência de elétrons, na formação de espécies reativas de oxigênio (ROS) e no estresse oxidativo (CADENAS;

HOCHSTEIN; ERNSTER, 1992; PENNING et al., 1999; MONKS; JONES, 2002; KOVACIC; SOMANATHAN, 2011). As quinonas estão relacionadas à processos bioquímicos e atividades biológicas das células, ligadas principalmente ao ciclo redox, envolvendo ânions, diânions, ânions superóxido, radicais semi-quinona, que aceleram as condições intracelulares de hipóxia, promovendo a síntese de espécies reativas de oxigênio (SILVA; FERREIRA; SOUZA, 2003), que podem danificar componentes celulares importantes (DEBATTISTI et al., 2017). Os radicais livres podem ainda interferir no processo de divisão celular, induzindo apoptose de células que não conseguem eliminar o estresse oxidativo (SILVA; FERREIRA; SOUZA, 2003) (Figura 1.2). As quinonas e seus derivados podem ser obtidos da natureza ou sintetizadas em laboratório (Kumagai, Y., et al., 2012).

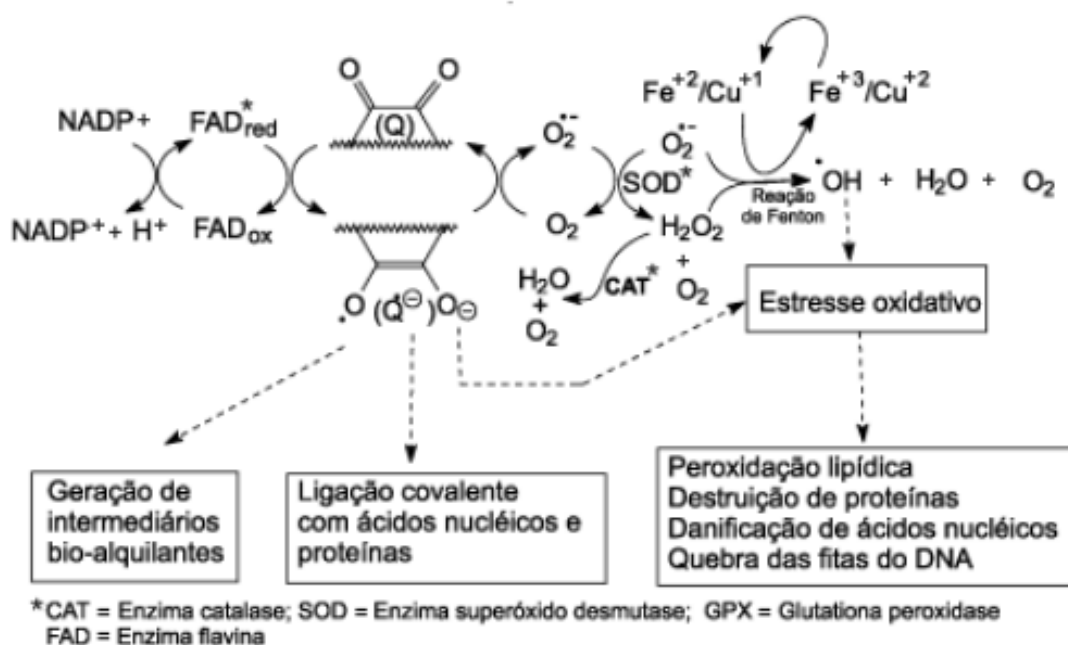


Figura 1.2 – Ciclo redox induzido por quinonas. O substrato quinonoídico (Q) sofre biorredução por um ou dois elétrons, que é catalisado por enzimas como nicotinamida adenina dinucleótido fosfato (NADPH), formando a espécie ânion radical semiquinona. Em presença de oxigênio molecular, esse ânion radical transfere um elétron para o oxigênio e gera o radical superóxido. Esse radical, sofre a ação da enzima superóxido desmutase, gerando peróxido de hidrogênio, e, paralelamente, uma reação de Fenton catalisada por Fe^{+2} produz o radical hidroxila. A transferência de elétrons e a cinética do processo de geração destas espécies são dependentes do potencial de redução das quinonas envolvida no processo. (FERREIRA et al., 2010).

As quinonas são compostos aromáticos, onde seu grupo carbonila pode ser encontrado separado ou conjugado a uma dupla ligação. Dessa forma, podemos encontrar três grupos principais de quinonas: benzoquinonas – que possuem um anel benzênico; antraquinonas – que possuem um anel antracênico linear ou angular; e ainda as naftoquinonas – que possuem um anel naftalênico. (Figura 1.3) (COSTANTINO; BARLOCCO, 2006; HILLARD et al., 2008)

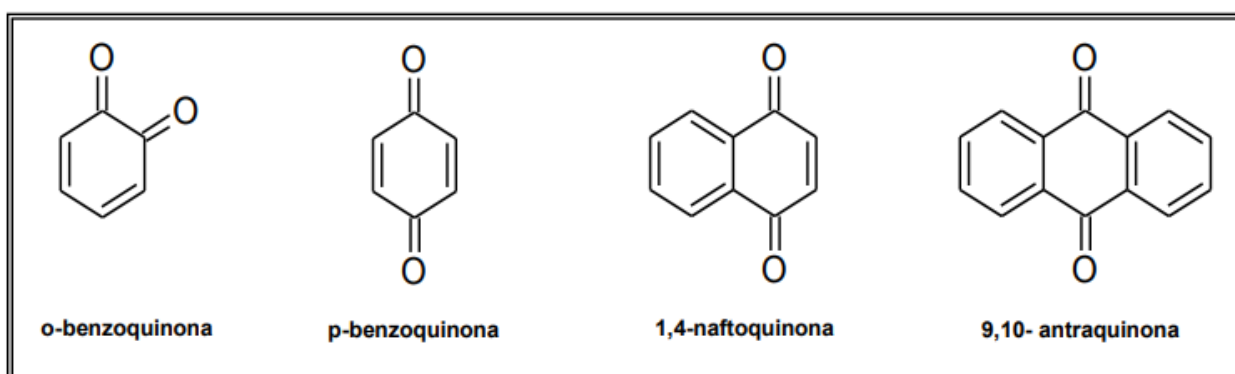


Figura 1.3 – Estrutura química e classificação das quinonas. As quinonas mais reativas e abundantes dentre as estudadas e identificadas: o-benzoquinona, p-benzoquinona, 1,4-naftoquinona e 9,10-antraquinona (Adaptado de FERREIRA et al., 2010).

A atividade antineoplásica das quinonas ocorre através de diferentes mecanismos de ação. Algumas quinonas atuam no processo de inibição das topoisomerasas, afetando a ligação das topoisomerasas ao DNA e induzindo a apoptose, impedindo que as células malignas se multipliquem e a progressão do tumor (SILVA; FERREIRA; SOUZA, 2003; KUMAR et al., 2017; DAMIANI et al., 2018). Há relatos de algumas drogas derivadas de naftoquinonas que podem inibir a topoisomerase I e/ou II, levando a desestabilização do DNA, seguido de quebra das fitas simples e duplas, induzindo a apoptose (GURBANI et al., 2012; XU et al., 2016). Essas enzimas se ligam e clivam o DNA, impedindo que funções como transcrição, reparação, replicação e estruturação do cromossomo ocorram normalmente (BELOTSERKOVSKII; ARIMONDO; COZZARELLI, 2006). Uma variedade de fármacos com estrutura quinoidal, como a doxorubicina, mitomicina e a mitoxantrona, tem sido utilizados contra diversos tipos de tumores sólidos (KOVACIC; SOMANATHAN, 2011).

Entre as naftoquinonas naturais, o lapachol é o mais conhecido e pode ser encontrado na casca e na madeira do Ipê. Dentre suas várias propriedades, possui atividades anti-inflamatórias, tripanomissida, analgésicas, antimaláricas, antivirais, antifúngicas, anticancerígenas e antiulcerativas (SILVA; FERREIRA; SOUZA, 2003; LI et al., 2003; SILVA et al., 2005). Dessa forma, o interesse por estas substâncias tem aumentado, devido às suas propriedades biológicas (FERREIRA et al., 2010).

1.3. Naftoquinonas e câncer

O lapachol possui dois principais análogos naturais descritos: a α -lapachona e a β -lapachona (NAGATA et al., 1998). Além de suas inúmeras ações farmacológicas, a β -lapachona, apresenta atividade anti-tumoral em diversas linhagens tumorais como câncer pancreático, mama, próstata, melanoma, entre outros (COSTA et al., 2016; KEE et al., 2017a; SILVERS et al., 2017; YANG et al., 2017). A ação inibitória da naftoquinona β -lapachona proporciona grande potencial para uso quimioterapêutico contra o câncer, particularmente no CaP (DE MORAES et al., 2014). Um dos mecanismos pelos quais as naftoquinonas podem induzir morte celular apoptótica, é através do acúmulo de fármaco nas mitocôndrias, gerando alteração no potencial de membrana mitocondrial (MMP), e posterior ruptura desta organela (WIENCH et al., 2012). Dessa forma, haveria acúmulo de espécies reativas a oxigênio (ROS) devido ao estresse oxidativo, desencadeando a ativação de caspase 9 e consequente liberação de citocromo C, levando à morte celular por apoptose (WIENCH et al., 2012). Há relatos que demonstram que o derivado de naftoquinona artesunato inibe o crescimento de células de CaP (WANG et al., 2017), e ainda que a naftoquinona DCDMNQ provoca uma parada na fase G1 do ciclo celular, levando a célula a entrar em apoptose (COPELAND et al., 2007).

A β -Lapachona, uma orto-naftoquinona, tem sido amplamente estudada devido a seus efeitos em linhagens celulares de diversos tipos tumorais. Vários mecanismos de ação das naftoquinonas são observados de maneira dose e tempo dependentes.

A inibição do crescimento celular pode ocorrer, principalmente, devido à apoptose, à inibição da topoisomerase II- α e ao estresse oxidativo (LI et al., 1999). A

ação inibitória da β -lapachona proporciona grande potencial para uso quimioterapêutico contra câncer, particularmente no CaP (DE MORAES et al., 2014).

Além disso, o tratamento com a naftoquinona ramentaceone, em células de câncer de mama, aumenta os níveis de proteínas pró-apoptóticas, Bax e Bak, e diminui os níveis de proteínas anti-apoptóticas, como BCL-2 (KAWIAK; LOJKOWSKA, 2016).

Pardee *et al.* demonstrou que a β -lapachona inibe tanto a proliferação quanto a sobrevivência celular desencadeadas pela apoptose, e que essa indução de morte promove um atraso na fase G1/S, ao contrário da maioria dos agentes que causam dano ao DNA, que induzem arraste da fase G2/M do ciclo celular. Além da morte celular por apoptose, a β -lapachona leva à morte por necrose via ativação de caspase 3.

Estudos *in vitro*, sugerem ainda que a Topoisomerase poderia ser um outro possível alvo das naftoquinonas, por inibição da sua atividade em linhagens celulares de diferentes tipos de câncer (COELHO-CERQUEIRA et al., 2014). Várias drogas derivadas de naftoquinonas se ligam a um domínio ATPase ou ao domínio de ligação ao DNA, modificando dessa forma a atividade da topoisomerase, que irá então quebrar a fita de DNA levando a célula à morte (BOONYALAI et al., 2013).

Alguns estudos já evidenciam a ação anti-tumoral de derivados de naftoquinonas em células de CaP (Tabela 01). Um destes compostos é a plumbagina, a qual já foi demonstrada possuir baixa citotoxicidade, e que o tratamento inibe marcadores da transição epitélio-mesenquimal (EMT), assim como inibe o crescimento tanto de tumores primários quanto de CPRC (HAFEEZ et al., 2015). Já foi visto também que o tratamento com a Plumbagina é eficaz em combinação com drogas que impedem a conversão de testosterona em dihidrotestosterona, que irá ativar a via do receptor de androgênio (AR). Entretanto, uma limitação seria o uso deste composto em combinação com drogas que se ligam ao AR, uma vez que os antagonistas do AR isoladamente apresentaram efeito semelhante ao combinado (ABEDINPOUR et al., 2017). Além disso, análogos de β -lapachona demonstraram induzir apoptose em células DU145 (GOPINATH et al., 2016), assim como híbridos de menadiona revelam ser citotóxicos em células

DU145, e induzem acúmulo de células na fase sub-G0 do ciclo celular e apoptose em células de câncer de mama, MCF-7 (PRASAD et al., 2018).

Quadro 1.1 - Dados da literatura dos compostos derivados de naftoquinonas estudados em câncer e as concentrações utilizadas.

Compostos	Concentrações	Referência
Selenium-containing quinone-based 1,2,3-triazoles	IC ₅₀ – valores abaixo de 1 μ M	(JARDIM et al., 2017)
Plumbagina	IC ₅₀ – valores abaixo de 10 μ M	(HAFEEZ et al., 2013; HUANG et al., 2018)
Menadione-based triazole hybrids ; triazoles 5 and 6	IC ₅₀ – valores abaixo de 10 μ M	(PRASAD et al., 2018)
Análogos da β -lapachona; 1,2-naphthoquinone scaffold ;	300nM – 1000Nm	(GOPINATH et al., 2016)
encapsulation of Nor- β -lapachone (N β L) in poly(d,l-lactide-co-glycolide) (PLGA) microcapsules	IC ₅₀ – valores abaixo de 10 μ M	(COSTA et al., 2016)
bromohydroxy dimeric naphthoquinones	---	(PIDUGU et al., 2016, p. 01)
naphthoquinone Shikonin; an active naphthoquinone isolated from the Chinese medicine Zi Cao	IC ₅₀ – valores abaixo de 10 μ M	(CHEN et al., 2014; JANG et al., 2014; GARA et al., 2015)
N-, S-, O-substituted-1,4-naphtho- and 2,5-bis(amino-substituted)-1,4-benzoquinone derivatives	IC ₅₀ – valores abaixo de 20 μ M	(DENIZ et al., 2015)
series of synthetic aminonaphthoquinones resulting from the reaction	IC ₅₀ – valores entre de 1 e	(DE MORAES et al.,

of suitable aminoacids with 1,4-naphthoquinone	100µg·mL ⁻¹	2014)
1,2,3-triazole-, arylamino- and thio-substituted 1,4-naphthoquinones	IC ₅₀ – valores abaixo de 2 µM	(DA CRUZ et al., 2014, p. 3)
Hygrocins C-G	IC ₅₀ – valores abaixo de 5 µM	(LU et al., 2013)
1,4-naphthoquinones; 1,4-Naphthoquinone, Juglone, Menadione, Plumbagin and LLL12.1 were used as lead molecules to design PD compounds	IC ₅₀ – valores entre 1 µM e 3 µM	(BHASIN et al., 2013)
Several chlorido and amino Pt(2+) complexes of 2-hydroxy-3-(aminomethyl)-1,4-naphthoquinone Mannich bases	IC ₅₀ – valores abaixo de 20 µM	(NEVES et al., 2013)
2-bromo-1,4-naphthoquinone (BrQ)	10 µM	(GRACIANI; XIMENES, 2012)
2-arylnaphtho[2,3-d]oxazole-4,9-dione derivatives	IC ₅₀ – valores entre 0.03 µM e 0.08 µM	(BRANDY et al., 2012)
platinum(II) complexes of 3-(aminomethyl)naphthoquinone Mannich bases	IC ₅₀ = 29.9 e 15.6 µmol L ⁻¹	(NEVES et al., 2010b)
7-chloro-6-(2-morpholin-4-ylethylamino) quinoline-5, 8-dione (DA 3003-2)	10 µM	(NEMOTO, 2010)
N-(3-chloro-1,4-dioxo 1,4-dihydro-naphthalen-2-yl)-benzamide (NCDDNB)	IC ₅₀ = 2.5, 2.5, 6.5 e 25 uM	(KANAAAN et al., 2010)
2,3-dichloro-5,8-dimethoxy-1,4-naphthoquinone (DCDMNQ)	IC ₅₀ = 1, 3, 1.5, 3 e 10 uM	(COPELAND et al., 2007)
1-(1,4-dihydro-5,8-dihydroxy-1,4-dioxonaphthalen-2-yl)-4-methylpent-3-enylfuran-2-carboxylate (SH-7)	Tumoral IC ₅₀ = 7,75 uM	(YANG et al., 2006, p. 7)

	Não tumoral $IC_{50} = 1,95 \mu M$	
2,3-bis-[2-hydroxyethylsulfonyl]-[1,4] naphthoquinone (NSC 95397)	10 μM e 20 μM	(NEMOTO et al., 2004)
1,2-naphthoquinones	$IC_{50} > 32 \mu M$	(DOLAN et al., 1998)

2. JUSTIFICATIVA

O câncer de próstata (CaP) metastático é uma malignidade que permanece incurável e que acomete 90 % dos pacientes. Uma vez que os tratamentos atuais não são tão eficazes contra essa neoplasia, o estudo de novas substâncias e a necessidade de novos compostos com ação citotóxica é crucial para o tratamento do CaP metastático. Além disso, o tratamento empregado na clínica possui uma toxicidade elevada. Sendo assim, o estudo e a testagem de novas substâncias bioativas vem de encontro à essa necessidade. Dentre estas substâncias bioativas sendo estudadas, incluem-se as naftoquinonas, que já possuem atividade antineoplásica descrita para diversos modelos tumorais (COSTA et al., 2016; SILVERS et al., 2017; YANG et al., 2017; KEE et al., 2017b).

Dessa forma, é necessário uma melhor compreensão a respeito das vias alteradas e moléculas alvo das naftoquinonas, para que ocorram avanços no tratamento de pacientes resistentes aos quimioterápicos utilizados como padrão na clínica. Contudo, as naftoquinonas se apresentam como potenciais compostos a serem usados como tratamento contra o câncer, podendo ainda, serem utilizadas em combinação com moléculas já estabelecidas, de forma a atuar na indução de células tumorais à apoptose, promovendo assim uma diminuição na massa tumoral. Assim, novos compostos derivados de naftoquinonas tem sido promissores na identificação de moléculas com atividade citotóxica mais eficiente de acordo com suas alterações químicas inerentes.

3. OBJETIVOS

1.4. Objetivo principal

Rastrear dentre substâncias bioativas inéditas (Bases de Mannich, Cumarinas, Bis-Quinonas e Tióis), aquelas que apresentam efeito citotóxico sobre linhagens celulares metastáticas de CaP.

1.5. Objetivos específicos

- 1) Avaliar o efeito citotóxico de novos compostos inéditos sobre a viabilidade celular de linhagens celulares metastáticas de CaP;
- 2) Dentre os compostos de efeito citotóxico, testar seus efeitos sobre a viabilidade de linhagens celulares não tumorais;
- 3) Investigar os efeitos desses compostos de ação citotóxica sobre o ciclo celular e morte celular por apoptose.

4. MATERIAIS E MÉTODOS

1.6. Linhagens Celulares e Cultura de Células

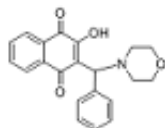
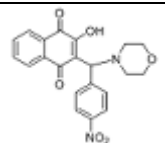
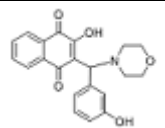
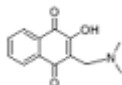
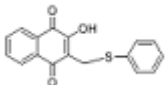
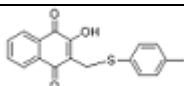
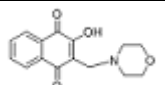
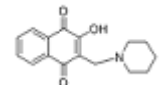
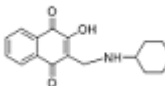
Para a realização do estudo, foram utilizados dois modelos de linhagens celulares de CaP metastático. A linhagem celular PC3 foi originada a partir de um tumor de próstata do tipo adenocarcinoma de grau IV, derivado de metástase óssea. Já a linhagem DU145 corresponde a uma linhagem de CaP derivada de metástase cerebral. Estas linhagens foram cultivadas mediante condições recomendadas pela *American Type Culture Collection* (ATCC), em meio RPMI (RPMI-1640 Medium HEPES Modification R5886 - Sigma Aldrich) contendo 10% de soro fetal bovino (SFB), 1% de L-glutamina (L-Glu) e 1% de Penicilina/Estreptomicina (P/S), até que atingissem confluência de 80/90%. As células foram incubadas à 37°C em atmosfera com 5% de CO₂.

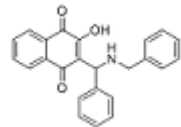
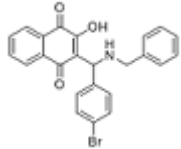
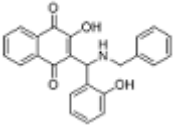
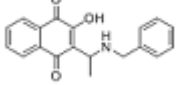
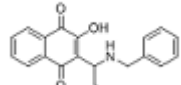
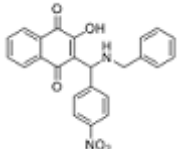
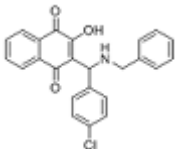
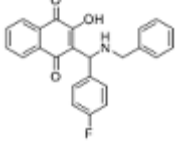
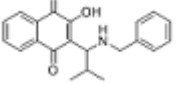
Utilizamos como modelo não tumoral a linhagem não tumoral endotelial HUVEC foi cultivada em meio DMEM (Sigma Aldrich) contendo 10% de soro fetal bovino (SFB), 1% de L-glutamina (L-Glu) e 1% de Penicilina/Estreptomicina (P/S), até que atingissem confluência de 80/90%. As células foram incubadas à 37°C em atmosfera com 5% de CO₂.

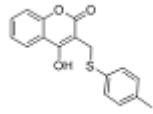
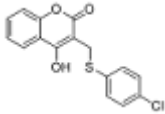
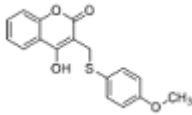
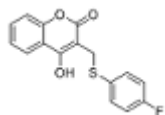
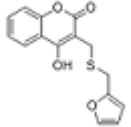
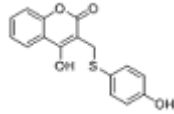
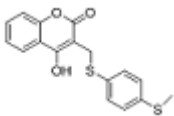
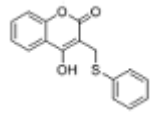
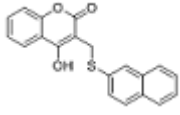
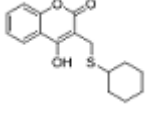
1.7. Tratamento com Naftoquinonas

Os compostos avaliados neste estudo foram sintetizados no Instituto de Química – Departamento de Química Orgânica, no Laboratório de Síntese Orgânica Aplicada (LABSOA) da Universidade Federal Fluminense (UFF), coordenado pelo Dr. Vitor Ferreira (Quadro 4.1).

Quadro 4.1- Fórmula e estrutura química dos compostos bioativos estudados

COMPOSTOS BIOATIVOS		
Nome	Fórmula Química	Estrutura Química
BASES DE MANNICH		
RC 01	$C_{21}H_{19}NO_4$	
RC 02	$C_{21}H_{18}N_2O_6$	
RC 03	$C_{21}H_{18}NO_5$	
RC 04	$C_{13}H_{13}NO_3$	
RC 05	$C_{17}H_{12}O_3S$	
RC 06	$C_{18}H_{14}O_3S$	
RC 07	$C_{15}H_{15}NO_4$	
RC 08	$C_{16}H_{17}NO_3$	
RC 09	$C_{17}H_{19}NO_3$	

RCE-11	$C_{24}H_{19}NO_3$	
RCE-12	$C_{24}H_{18}BrNO_3$	
RCE-13	$C_{24}H_{19}NO_4$	
RCE-14	$C_{19}H_{17}NO_3$	
RCE-15	$C_{20}H_{19}NO_3$	
RCE-16	$C_{24}H_{18}N_2O_5$	
RCE-17	$C_{24}H_{18}ClNO_3$	
RCE-18	$C_{24}H_{18}FNO_3$	
RCE-19	$C_{21}H_{21}NO_3$	
CUMARINAS TIÓIS		

CA-02	$C_{17}H_{14}O_3S$	
CA-05	$C_{16}H_{11}ClO_3S$	
CA-06	$C_{17}H_{14}O_4S$	
CA-07	$C_{16}H_{11}FO_3S$	
CA-08	$C_{15}H_{12}O_4S$	
CA-09	$C_{16}H_{12}O_4S$	
CA-10	$C_{17}H_{14}O_3S_2$	
CA-12	$C_{16}H_{12}O_3S$	
CA-13	$C_{20}H_{14}O_3S$	
CA-16	$C_{16}H_{18}O_3S$	

BIS QUINONAS		
RC 10	$C_{21}H_{12}O_7$	
RCDFC	$C_{21}H_{12}O_6$	
RCDOH	$C_{21}H_{12}O_8$	
TIÓIS		
4F-Tiol	$C_{20}H_{15}FO_3S$	
Fenil Sulfona	$C_{20}H_{16}O_5S$	
3-CH3-Tiol	$C_{21}H_{18}O_3S$	

Previamente ao tratamento das linhagens celulares com cada um dos 34 compostos derivados de naftoquinonas avaliados, os mesmos foram reconstituídos em temperatura ambiente (TA) em dimetil sulfóxido (DMSO) numa concentração de 10nM.

Cada um destes compostos foram em seguida diluídos em tampão fosfato-salina (PBS), de forma a atingir a concentração de 1nM, correspondendo à solução de trabalho.

Inicialmente, foi realizada a determinação da densidade celular a ser plaqueada, de modo que em 24 h de cultivo, elas viessem a atingir uma confluência de 80-90%. Observamos que 24 h após o plaqueamento de 2×10^4 células por poço, as linhagens PC3 e DU145 atingiram a confluência desejada, se plaqueadas em placas de 96 poços.

Para o rastreamento inicial, as células foram plaqueadas em placas de 96 poços por um período de 24h. Após esse tempo, as linhagens celulares DU145 ou PC3 foram tratadas por 24h, 48h e 72h com 100 μ M dos distintos compostos a serem testados para sua atividade citotóxica. Como controle negativo destes ensaios, utilizamos poços das placas contendo as duas linhagens celulares tratadas apenas com a solução de DMSO/PBS (1:9).

1.8. Ensaios de Viabilidade Celular

Para avaliação da viabilidade celular, as células que foram plaqueadas e tratadas com os distintos compostos sendo testados foram mantidas em exposição às drogas por 24h, 48h e 72h por meio do ensaio de MTT (brometo de [3-(4,5-dimetiltiazol-2yl)-2,5-difenil tetrazolium]). O ensaio de MTT é utilizado para avaliar as células que se encontram metabolicamente ativas, através da redução do sal amarelo tetrassólio (membrana permeável) em cristais de formazam, que possui uma colocação azul. Após a incubação, o meio foi removido e 20 μ L de uma solução de MTT na concentração de 5 mg/mL foi adicionado em cada poço. Foi então feita a incubação com o MTT por 4 horas com proteção da luz. Em seguida, adicionou-se 100 μ L de DMSO para dissolução dos cristais formados. A quantificação das células foi obtida através da leitura da absorbância no comprimento de onda de 538 nm no espectrofotômetro *Spectra Max 190* (Molecular Devices). O experimento foi realizado em quadruplicatas (para cada célula em cada tempo) e em três experimentos independentes.

Após os resultados obtidos nesta primeira triagem, os compostos que demonstraram resultados de diminuição da viabilidade celular de pelo menos 50%, seguiram para determinação do IC₅₀, que corresponde à concentração de um determinado fármaco ou outra substância necessária para inibir um dado processo biológico à metade. Os ensaios de MTT para determinação do IC₅₀ foram realizados no tempo de 72h de tratamento com os compostos testados nas concentrações de 100 µM, 50 µM, 25 µM, 12,5 µM, 6,75 µM, 3,375 µM, 1,69 µM e 0,84 µM.

Utilizamos poços com 3 controles: Controle 1 – célula + meio + DMSO/PBS (sem composto), controle 2 – célula + meio (sem DMSO/PBS e sem composto) e controle 3 – meio + DMSO/PBS (sem células e sem composto). As análises foram feitas relativas ao controle 1, que foi considerado como 100%. O controle 2 apresentou absorbância semelhante ao controle 1, e o controle 3 foi utilizado como branco, para descontar o valor de absorbância gerado pelo DMSO/PBS.

As análises estatísticas foram realizadas através do teste *t-student*, com nível de significância estabelecido em $p < 0,05$. As concentrações estabelecidas dos compostos a serem utilizadas nos demais experimentos realizados foram baseadas nos ensaios de determinação do IC₅₀ obtido por meio do ensaio MTT.

1.9. Ensaios de Citometria de Fluxo

O procedimento para a avaliação do efeito dos 4 compostos que apresentaram maior atividade citotóxica sobre as linhagens de CaP metastático por citometria de fluxo foi realizado utilizando placas de cultura contendo 6 poços, com densidade celular de $3,5 \times 10^5$ células por poço, por um período de 72h. Para esses experimentos, foram utilizados como controle positivo de ação citotóxica os seguintes fármacos: Docetaxel (DXT) (Baxter LTDA), que é utilizado na clínica no tratamento de pacientes com CaP resistentes ao tratamento anti-androgênio, seu mecanismo de ação está envolvido na despolimerização de microtúbulos, ocasionando bloqueio do ciclo celular (CHURCHILL; KLOBUKOWSKI; TUSZYNSKI, 2015); e a doxorubicina (DOX) (Bergamo LTDA), por possuir mecanismo de ação celular similar às naftoquinonas. A DOX exerce efeito por

intercalação de DNA e inibição da enzima Topoisomerase I e II, causando dano ao DNA, além de geração de espécies reativas de oxigênio (ROS), gerando stress oxidativo e resultando na ativação de caspases que levarão a apoptose (FRANCO; VAIDYA; AIT-LOUDHIA, 2018).

As amostras foram adquiridas pelo citômetro *BD Accuri™ C6 FlowCytometer* (Biosciences). O citômetro detecta a fluorescência gerada pelos fluorocromos que se intercalam do DNA das células e faz a leitura de cada uma das células que são adquiridas pelo equipamento.

4.1. Análise do Ciclo Celular

Para análise do ciclo celular, foi utilizado iodeto de propídeo (PI), um intercalante de DNA fluorescente, que entra na célula após a permeabilização da membrana. É então detectada a fluorescência emitida pelo PI através de citometria de fluxo, sendo possível avaliar o conteúdo de DNA referente a cada fase do ciclo celular.

Após 72h de tratamento, foi coletado o sobrenadante da cultura celular. As células foram em seguida tripsinizadas com 200µL de Tripsina/EDTA. Realizou-se a inativação da tripsina com o sobrenadante coletado e as amostras foram centrifugadas por 10 min à 450 g. Em seguida, o sobrenadante foi descartado e o precipitado foi lavado 2x com PBS, e centrifugado novamente por 10 minutos à 450 g entre cada lavagem. Em seguida, descartou-se o sobrenadante e o pellet foi ressuspensionado em 500µL de tampão de permeabilização, composto por Tris-Cl 3,4 mM em pH 7,6, NaCl 10 mM, NP40 0,1% (v/v), RNase 700u/L e PI 0,075 mM (Sigma-Aldrich, Steinheim, Alemanha). As amostras ficaram incubadas com este tampão por 15 min no gelo e protegidas da luz. A leitura das amostras foi efetuada pelo citômetro *BD Accuri™ C6 FlowCytometer* (Biosciences), utilizando os canais FL-1 (530nm) para Anexina-V/FITC e FL-2 (585nm) para o PI. Foram adquiridos 10.000 eventos (células) por amostra e os dados foram analisados pelo programa do próprio citômetro.

4.2. Análise de Indução de Apoptose

Para determinar a porcentagem de células que foram induzidas à morte celular através dos tratamentos realizados, foi utilizado o ensaio de detecção precoce de apoptose por Anexina V/PI. A anexina V se liga em resíduos de fosfatidilserina expostos na membrana citoplasmática como resultado de translocação deste fosfolipídeo para a fase extracelular nos estágios iniciais da apoptose. Para análise de citometria de fluxo, utilizou-se a anexina conjugada ao fluorocromo (FITC). Para diferenciar as células viáveis, das células em apoptose inicial, daquelas em apoptose tardia ou em necrose, utiliza-se o intercalante de DNA PI. Assim, são consideradas células viáveis aquelas que não possuem marcação nem por anexina V, nem por PI; células em apoptose inicial serão marcadas positivamente para anexina V e negativamente para PI; células em apoptose tardia serão marcadas positivamente tanto para anexina V quanto para PI; células em necrose serão marcadas positivamente apenas para PI.

Após 72h de tratamento com os compostos, foi coletado o sobrenadante e as células foram tripsinizadas com 200µL de Tripsina/EDTA. Realizou-se a inativação da tripsina com o sobrenadante coletado. As amostras foram centrifugadas por 10 min à 450 g. Em seguida, o sobrenadante foi descartado e o precipitado foi lavado 2x com PBS, sendo centrifugado novamente por 10 min à 450 g entre cada lavagem. O sobrenadante foi em seguida descartado e o precipitado foi ressuspenso em 100µL tampão de ligação, composto por HEPES 10 mM, NaCl 150 mM, KCl 5 mM, MgCl₂ 1 mM e CaCl₂ 1,8 mM. As amostras foram incubadas com o tampão de ligação por 15 min, em TA, protegidas da luz, com 100 µL de tampão com adição de 5µL de anexina V (BD Biosciences, califórnia, EUA), exceto nos tubos controle. No momento da leitura, adicionou-se 5 µL de PI na concentração de 1 mg/mL. A leitura foi efetuada pelo citômetro *BD Accuri™ C6 FlowCytometer* (Biosciences), utilizando o canal FL-2 (585nm). Foram adquiridos 10.000 eventos (células) por amostra e os dados foram analisados pelo programa do próprio citômetro.

1.10. Análises Estatísticas

A significância estatística das diferenças observadas dos parâmetros utilizados foi realizada através do teste *T Student's* com valor de $p < 0,05$ considerado significativo.

5. RESULTADOS

1.11. Avaliação da viabilidade celular em células de CaP metastático em resposta ao tratamento com os compostos derivados de naftoquinonas

Com o objetivo de verificar o potencial efeito citotóxico dos 34 compostos, contidos nas 4 classes denominadas de Bases de Mannich (BM), Cumarina Tióis (CT), Bis Quinonas (BQ) e Tióis (T), realizamos experimentos de avaliação da viabilidade celular através de ensaios de MTT. Nestes ensaios iniciais, as linhagens celulares metastáticas de CaP DU145 e PC3 foram tratadas com estes compostos na concentração de 100 μ M. A viabilidade celular foi avaliada nos tempos de 24h, 48h e 72h após o tratamento destas linhagens celulares com os compostos. Os resultados estão apresentados abaixo, segundo cada uma destas classes de compostos derivadados de naftoquinonas.

Observamos que o tratamento das linhagens DU145 e PC3 com os compostos BM (Figura 5.1) e CT (Figura 5.2) não alteraram significativamente a viabilidade celular destas duas linhagens analisadas, independente do tempo avaliado após o tratamento.

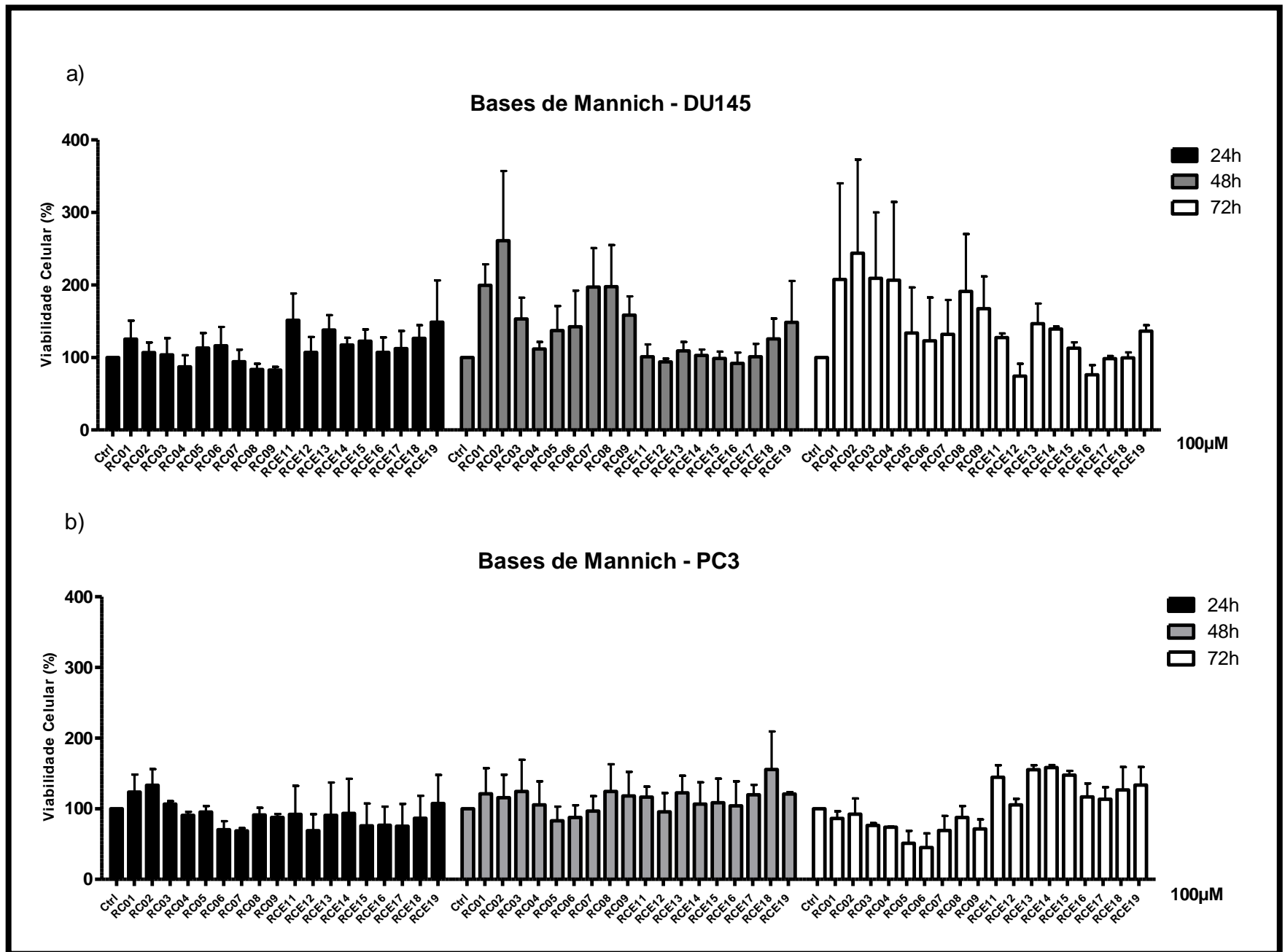


Figura 5.1 - Análise de viabilidade celular de células PC3 e DU145 em resposta ao tratamento com os compostos BM. As linhagens (a) DU145 e (b) PC3 foram tratadas com 100 μ M de cada um dos composto da classe BM testados por 24h, 48h e 72h e a viabilidade celular (%) foi avaliada por MTT. Os resultados estão apresentados com a média \pm desvio padrão (SD). Análises estatísticas foram realizadas através do teste *t-student*.

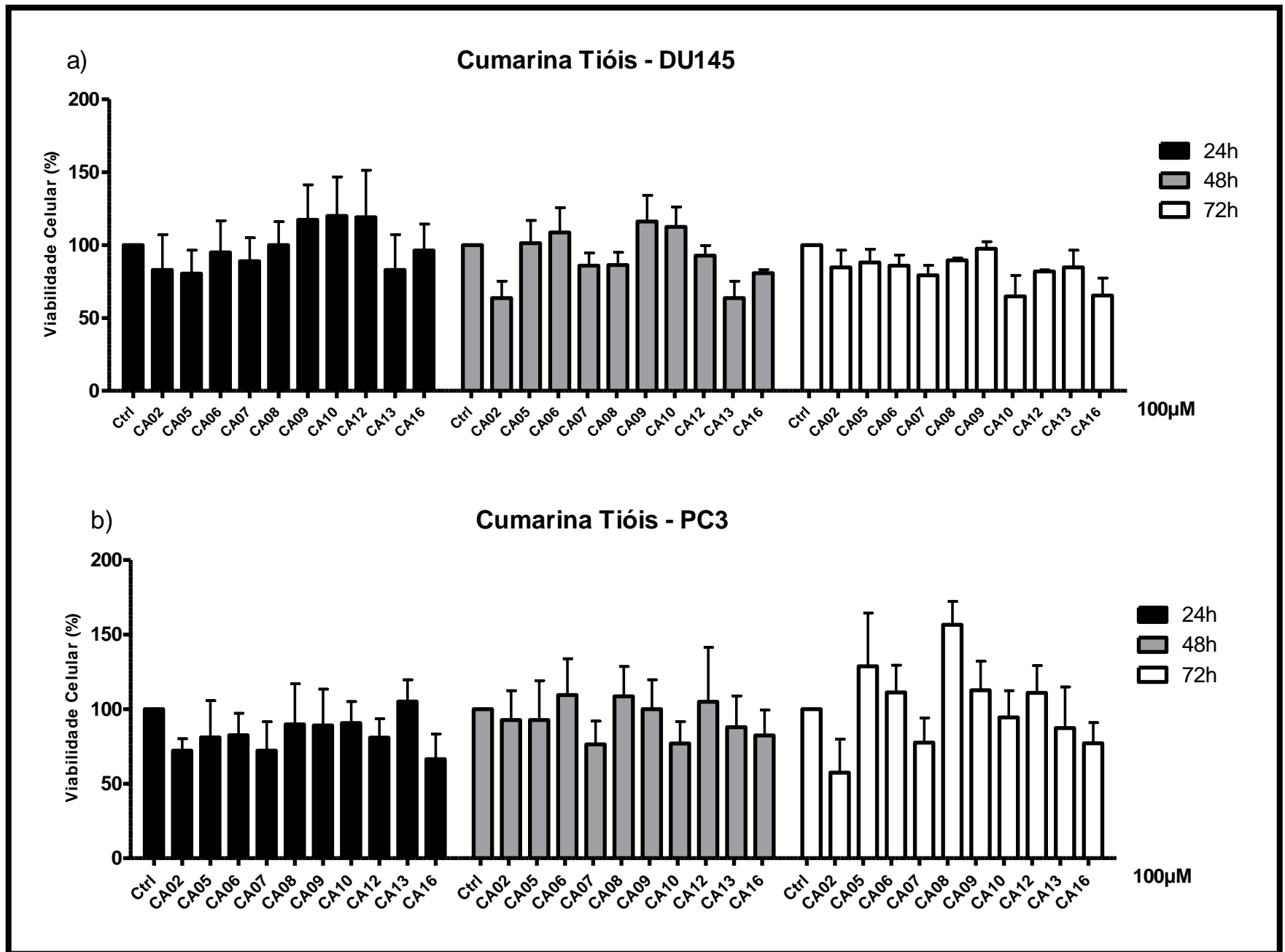


Figura 5.2 - Análise de viabilidade celular de células PC3 e DU145 em resposta ao tratamento com os compostos CT. As linhagens (a) DU145 e (b) PC3 foram tratadas com 100 μ M de cada um dos composto da classe CM testados por 24h, 48h e 72h e a viabilidade celular (%) foi avaliada por MTT. Os resultados estão apresentados com a média \pm desvio padrão (SD). Análises estatísticas foram realizadas através do teste *t-student*.

Por outro lado, os ensaios de viabilidade celular em resposta ao tratamento da linhagem DU145 com os compostos da classe das BQ revelaram que o composto denominado de RC10 promoveu redução significativa da viabilidade celular em cerca de 50% em 24h após o tratamento desta linhagem ($p < 0,005$). Esta diminuição de viabilidade se mantém em 48h ($p < 0,05$) e 72h ($p > 0,05$) após o tratamento. Na linhagem PC3, em resposta ao tratamento com o composto, houve redução significativa da viabilidade celular (cerca de 75%) apenas no tempo de 72h ($p < 0,0005$) após o tratamento.

O composto da classe BQ denominado de RCDFC também promoveu diminuição da viabilidade celular, mas de maneira tempo dependente em ambas as linhagens celulares. Na linhagem DU145, houve uma redução significativa da viabilidade celular em 48h após o tratamento ($p < 0,005$). Em 72h de tratamento com este composto, também observou-se uma redução da viabilidade celular, embora não tenha atingido significância estatística. Na linhagem PC3 houve uma diminuição significativa da viabilidade celular em 48h ($p < 0,05$) e 72h ($p < 0,005$) após o tratamento com o composto RCDFC.

Com relação ao composto da classe BQ denominado de RCDOH, apesar deste demonstrar ação sobre a redução na viabilidade da linhagem PC3, o mesmo não foi selecionado para estudos posteriores, uma vez que utilizamos o critério de selecionar compostos com efeitos similares nas duas linhagens celulares de CaP (Figura 5.3).

Dessa forma, podemos observar que o composto RC10 parece atuar diminuindo a viabilidade de células DU145 de maneira tempo dependente, enquanto na linhagem PC3, observamos redução significativa em 72 h. Para o composto RCDFC, observamos que ele promove uma redução na viabilidade a partir do tempo de 48h, que se estende até 72h, em ambas as linhagens analisadas.

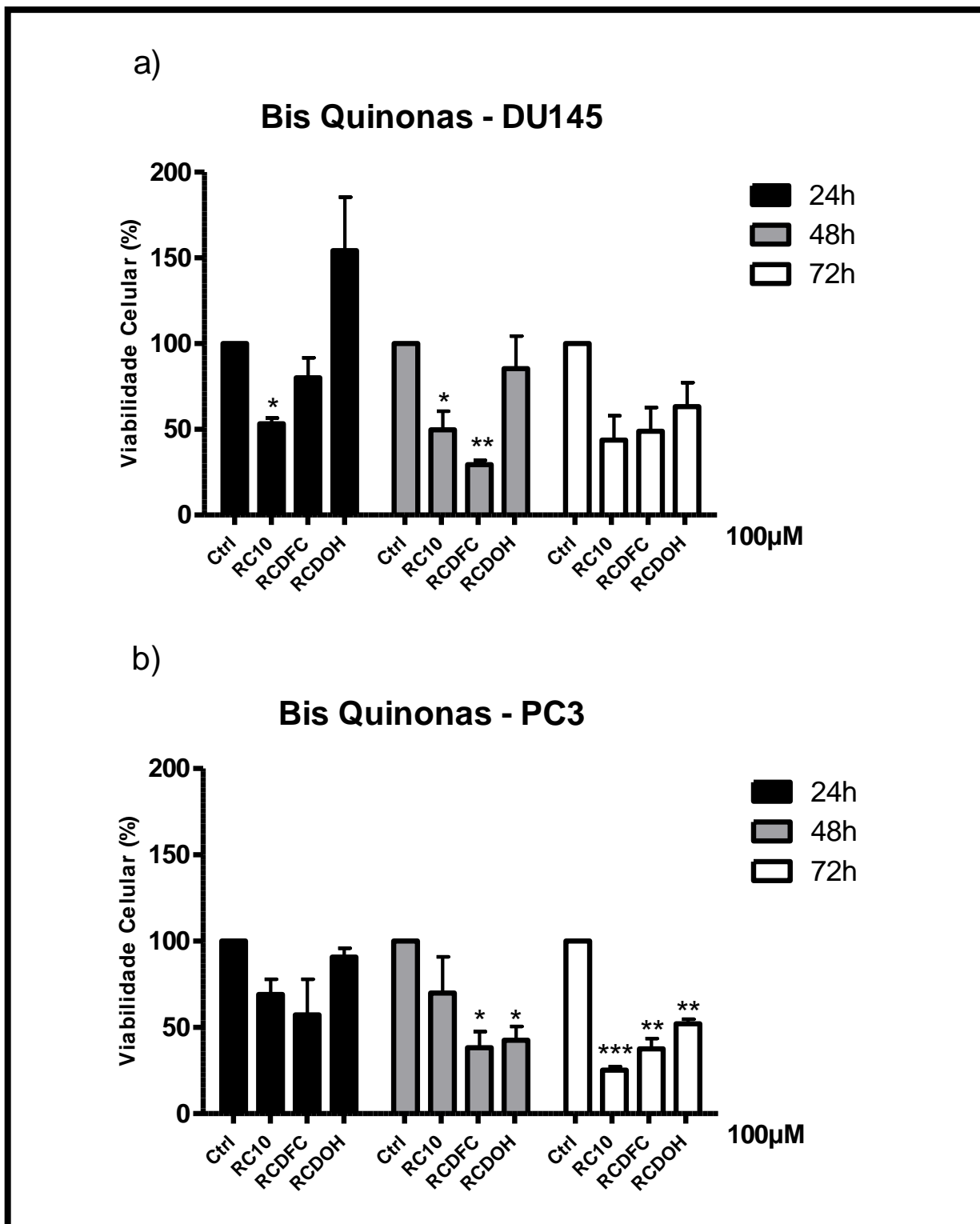


Figura 5.3 - Análise de viabilidade celular de células PC3 e DU145 em resposta ao tratamento com os compostos BQ. As linhagens (a) DU145 e (b) PC3 foram tratadas com 100 μ M de cada um dos compostos da classe BQ testados por 24 h, 48 h e 72 h e a viabilidade celular (%) foi avaliada por MTT. Os resultados estão apresentados com a média \pm desvio padrão (SD). Análises estatísticas foram realizadas através do teste *t-student* (* $p < 0.05$, ** $p < 0.005$, *** $p < 0.0005$).

Para os compostos da classe dos T, observamos que o composto denominado de 4F-Tiol promoveu redução 60% e 75% na viabilidade celular respectivamente da linhagem DU145 e PC3 em 72 h após do tratamento com este composto ($p < 0,0001$). O mesmo é observado para o composto 3-CH3 Tiol, que reduz significativamente a viabilidade celular da linhagem DU145 ($p < 0,0005$) e PC3 ($p < 0,005$) em 72 h após o tratamento com este composto. O composto Fenil Sulfona não apresentou efeitos significativos sobre a alteração da viabilidade celular. Com isso, não prosseguimos com as análises de efeitos destes compostos sobre mecanismos celulares relacionados à perda da viabilidade celular. Logo, dentro da família dos Tióis, selecionamos para as análises de seus efeitos sobre o ciclo celular e a apoptose os compostos 4F-Tiol e 3-CH3 Tiol (Figura 5.4).

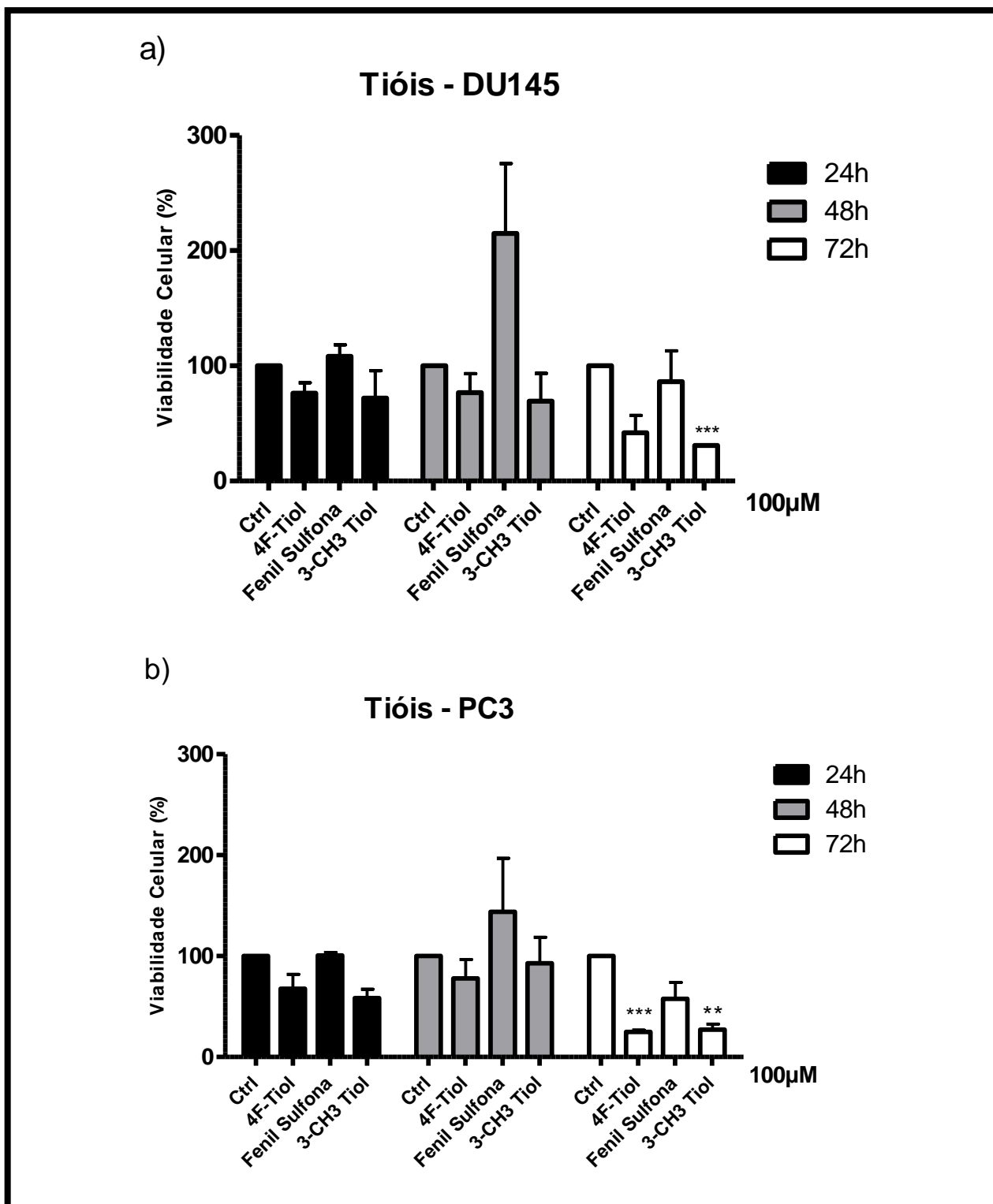


Figura 5.4 - Análise de viabilidade celular de células PC3 e DU145 em resposta ao tratamento com os compostos T. As linhagens (a) DU145 e (b) PC3 foram tratadas com 100 μM de cada um dos composto da classe T testados por 24h, 48h e 72h e a viabilidade celular (%) foi avaliada por MTT. Os resultados estão apresentados com a média \pm desvio padrão (SD). Análises estatísticas foram realizadas através do teste *t-student* (** $p < 0.005$, *** $p < 0.0005$).

Com base nos resultados gerados nesta primeira etapa de rastreamento dos compostos de maior atividade citotóxica, selecionamos aqueles que promoveram diminuição da viabilidade celular em pelo menos 50% em 72 h de tratamento para investigações posteriores dos mecanismos celulares relacionados ao efeito destes compostos sobre a viabilidade celular.

1.12. Os compostos RC10, RCDFC, 4F-Tiol e 3-CH3 Tiol induzem redução da viabilidade em células DU145 e PC3

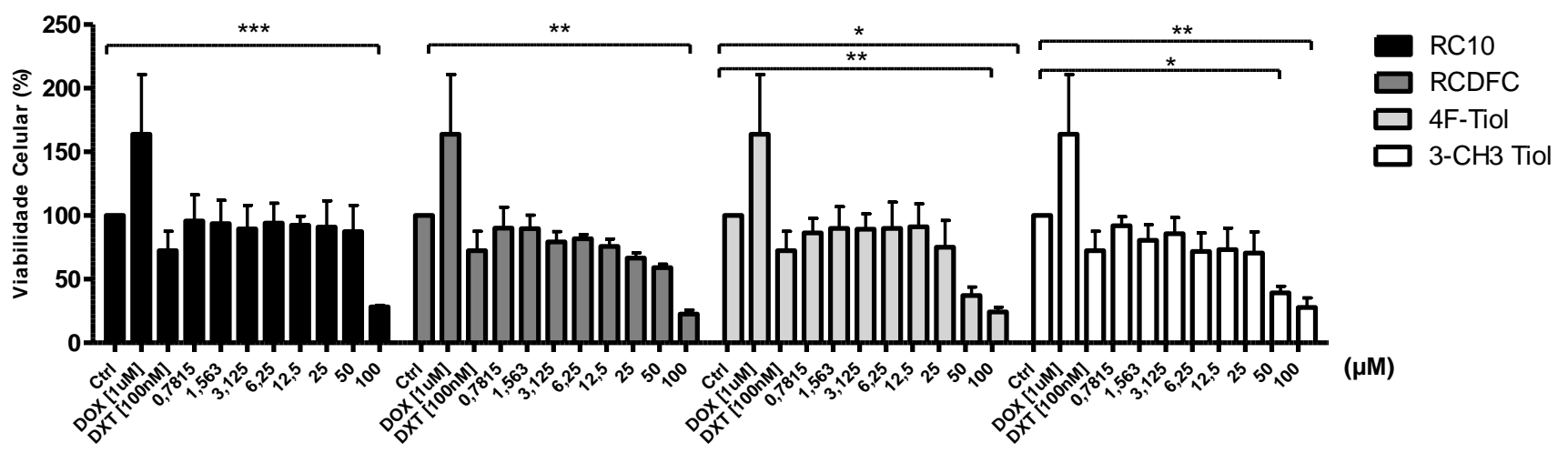
Uma vez que selecionamos 4 compostos (RC10, RCDFC, 4F-Tiol e 3-CH3 Tiol) na concentração de 100 μM que promoveram redução da viabilidade celular em pelo menos 50% no tempo 72h após o tratamento com os compostos, seguimos para a determinação da IC_{50} de cada um desses compostos. As linhagens DU145 e PC3 foram tratadas com concentrações destes compostos no intervalo entre 0,78 μM – 100 μM por um tempo de 72h, seguido de análise da viabilidade celular.

Os ensaios de viabilidade celular revelaram que o tratamento apenas promoveu redução significativa da viabilidade celular na concentração de 100 μM com os compostos RC10 (DU145 $p < 0,0005$ e PC3 $p < 0,005$) e RCDFC (DU145 $p < 0,005$ e PC3 $p < 0,0005$). Nas demais concentrações, não foram observadas alterações na viabilidade celular. Na linhagem DU145, os compostos 4F-Tiol e 3-CH3 Tiol promoveram redução significativa na viabilidade celular na concentração de 50 μM ($p < 0,05$ e $p < 0,005$, respectivamente) e 100 μM ($p < 0,005$ e $p < 0,05$ respectivamente). O mesmo foi observado para a linhagem PC3, onde foi observada redução significativa na viabilidade na concentração de 50 μM ($p < 0,005$ e $p < 0,05$ respectivamente) e 100 μM ($p < 0,0005$ e $p < 0,005$ respectivamente). Nas de

mais concentrações analisadas, não foram observadas alterações na viabilidade celular em ambas as linhagens (Figura 5.5).

a)

DU145



b)

PC3

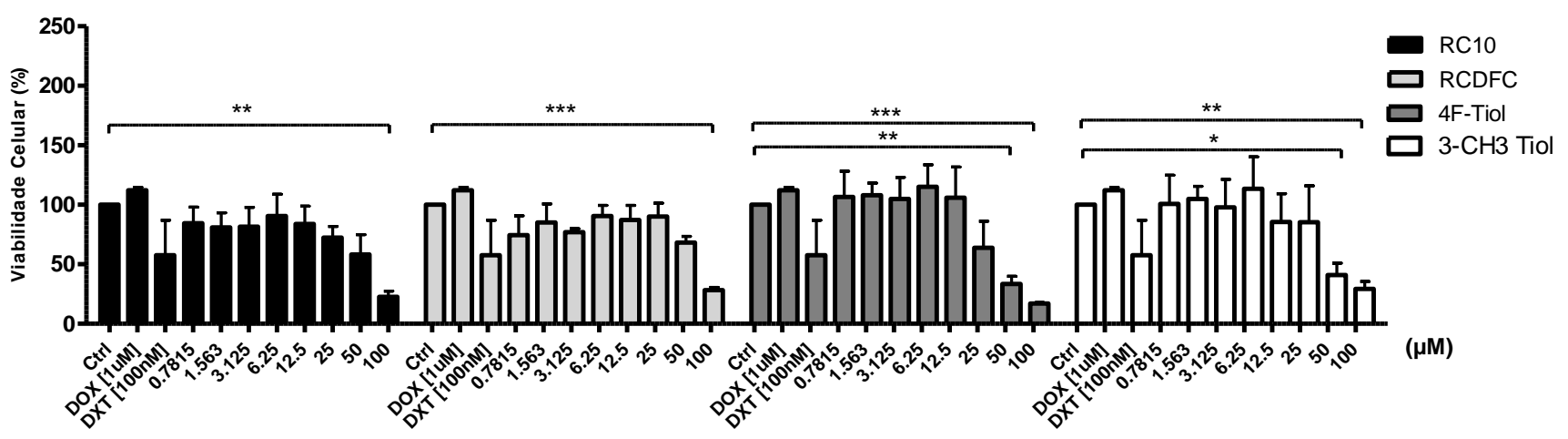


Figura 5.5 - Avaliação do IC50 em células metastáticas de CaP. Células (a) DU145 e (b) PC3 foram tratadas com concentrações entre 0,78 μM e 100 μM de cada composto (RC10, RCDFC, 4F-Tiol E 3-CH3 Tiol) por 72h e a viabilidade celular (%) foi avaliada por MTT. DXT (100nM) e DOX (1 μM) foram utilizados como controles de morte, onde DXT é o fármaco padrão para pacientes com metástases ósseas e DOX possui mecanismo de ação similar aos compostos avaliados. Os resultados estão apresentados com a média \pm desvio padrão (SD). Análises estatísticas foram realizadas através do teste *t-student* (* $p < 0.05$, ** $p < 0.005$, *** $p < 0.0005$).

1.13. O tratamento com compostos RC10, RCDFC, 4F-Tiol e 3-CH3 Tiol altera o perfil de distribuição de células de CaP no ciclo celular

Uma vez que demonstramos que o tratamento com os compostos derivados de naftoquinonas RC10, RCDFC, 4F-Tiol e 3-CH3 Tiol reduzem a viabilidade de células DU145 e PC3 (Figura 5.5), fomos investigar os mecanismos celulares relacionados a estes efeitos citotóxicos.

Investigamos inicialmente se o tratamento das linhagens DU145 e PC3 com estes compostos levaria à alterações no ciclo celular. Para isso, optamos por avaliar as concentrações entre 3,125 μM e 100 μM no tempo de 72h após o tratamento com estes compostos. Após esse intervalo de tempo, marcamos as células com PI e avaliamos o ciclo celular por citometria de fluxo. Os histogramas apresentados na Figura 5.6 correspondem a um resultado representativo da leitura de 10.000 eventos para as diferentes concentrações testadas do composto RC10 na célula PC3. onde podemos observar a proporção de células em cada fase do ciclo celular.

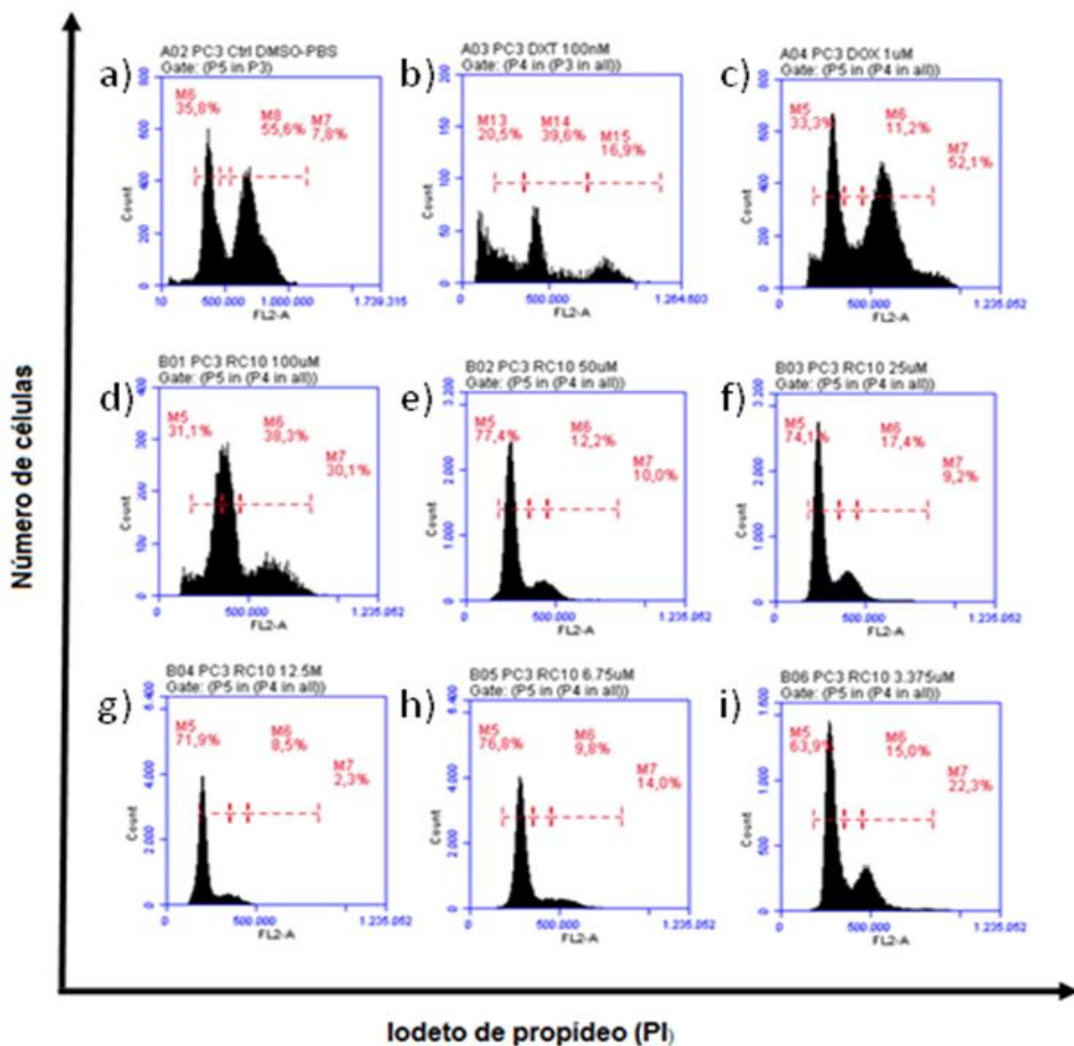
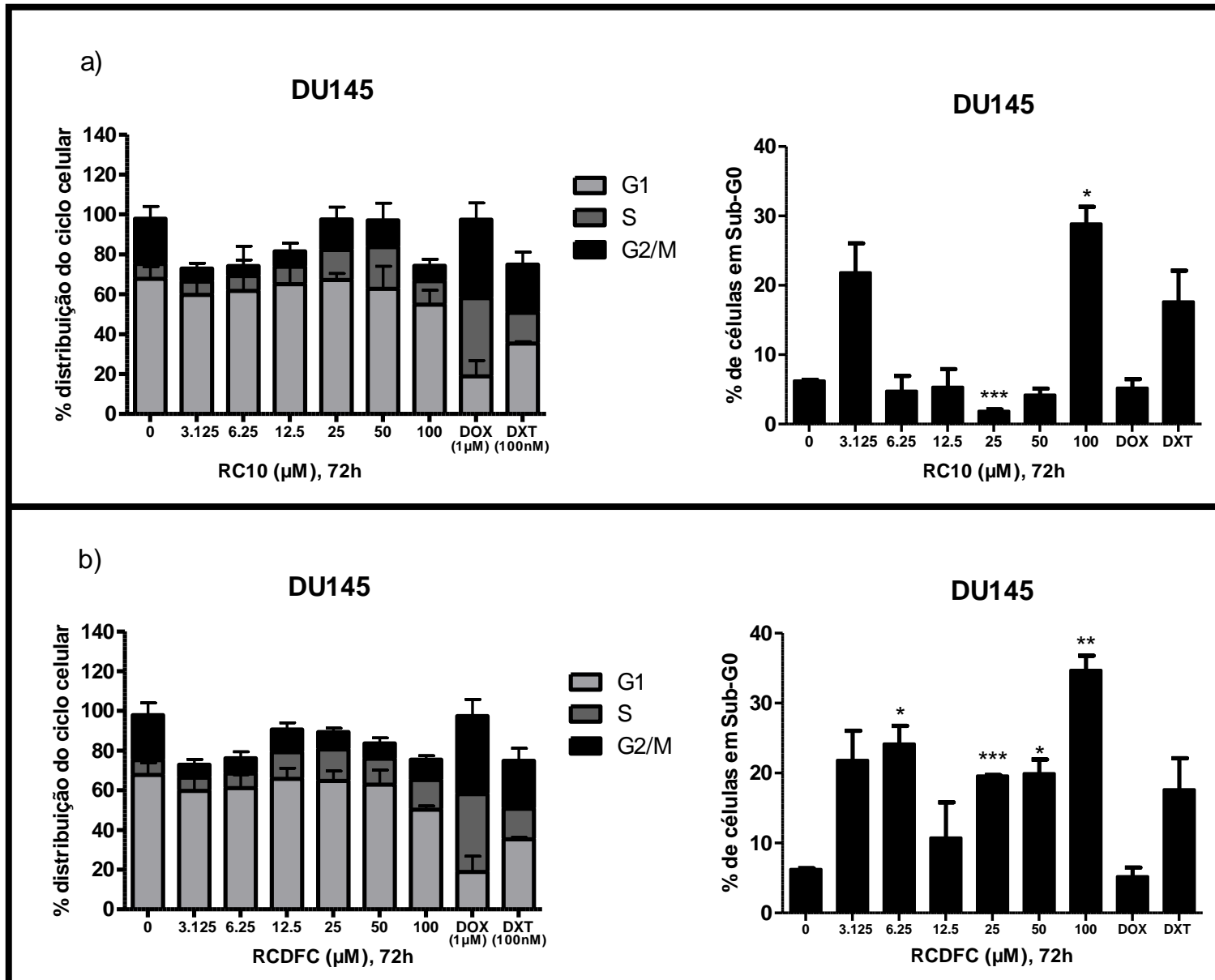


Figura 5.6 - Histograma representativo da proporção de células em cada fase do ciclo celular. Histogramas representativos referentes à linhagem celular DU145 tratada por 72h com (a) DMSO/PBS, (b) DXT, (c) DOX, (d) 100 μ M, (e) 50 μ M, (f) 25 μ M, (g) 12,5 μ M, (h) 6,25 μ M e (i) 3,375 μ M. DXT (100nM) e DOX (1 μ M) foram utilizados como controles de morte, onde DXT é o fármaco padrão para pacientes com metástases ósseas e DOX possui mecanismo de ação similar aos compostos avaliados. Foram adquiridos 10.000 eventos (células) por amostra utilizando o canal FL-2 (585nm).

Observamos que o tratamento da linhagem DU145 com 3,125 μ M e 100 μ M do composto RC10 aumentou em 15,55 % (não significativo) e 22,65 % ($p < 0,05$), respectivamente, a proporção de células na fase Sub-G0 do ciclo celular (Figura 5.7a). Por outro lado, quando estas mesmas células foram tratadas com concentrações entre 3,125 μ M e 100 μ M do composto RCDFC, observamos respectivamente um aumento em 15,55 % ($p > 0,05$), 17,95 % ($p < 0,05$), 4,5 % ($p > 0,05$), 13,35 % ($p < 0,0005$), 13,7 % ($p < 0,05$) e 28,45 % ($p < 0,005$) na proporção de células na fase Sub-G0 do ciclo celular (Figura 5.7b).

Já quando as células DU145 foram tratadas com o composto 3-CH3 Tiol, observamos um aumento não significativo de 11,3 % à 45,45 % na proporção de células em Sub-G0 no intervalo de concentração entre 6,25 μ M - 100 μ M deste composto (Figura 5.7c).

Em resposta ao tratamento da linhagem DU145 com o composto 4F-Tiol, observamos um aumento na proporção de células em Sub-G0 de 33,45% ($p < 0,05$) e 34,1% ($p < 0,005$) no intervalo de concentração entre 50 μ M e 100 μ M, em comparação às células tratadas com DMSO (aumento de 6,25%) (Figura 5.7d).



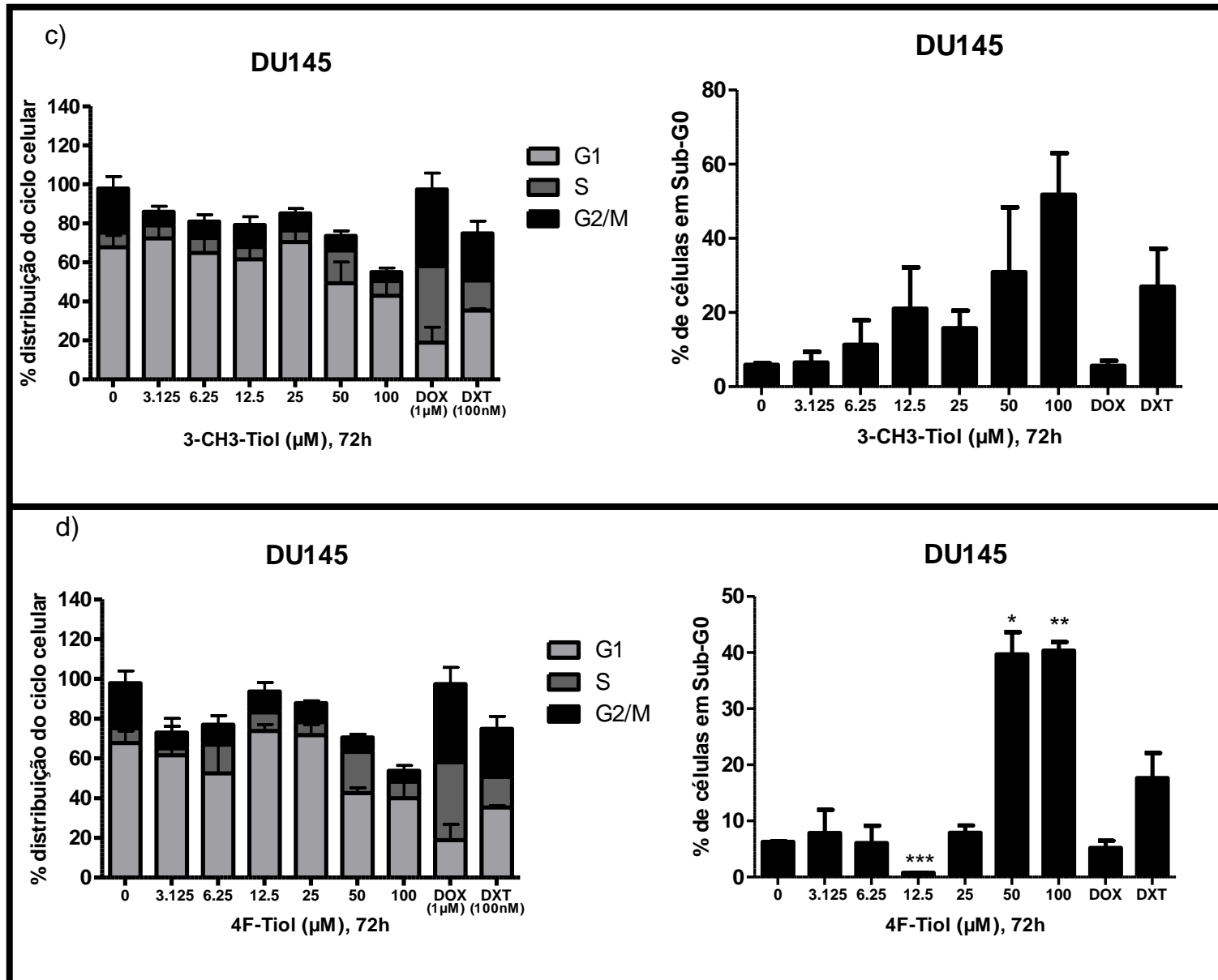
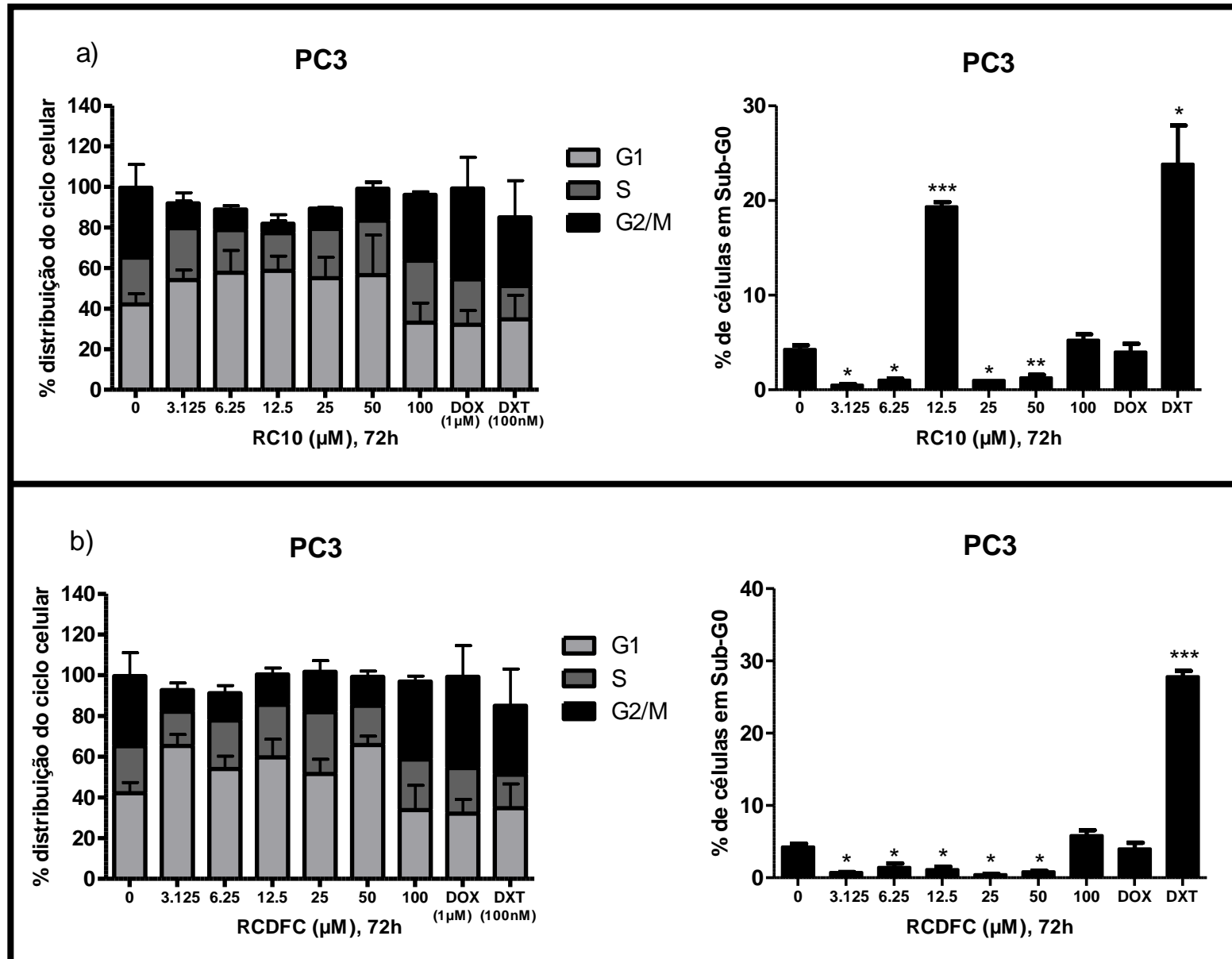


Figura 5.7 - Análise do ciclo celular por citometria de fluxo na linhagem DU145 tratada com os compostos RC10, RCDFC, 3-CH3 Tiol e 4F-Tiol A linhagem DU145 foi tratada com concentrações crescentes (3,125 μM – 100 μM) dos compostos (a) RC10, (b) RCDFC, (c) 3-CH3 Tiol e (d) 4F-Tiol por 72h. Os Gráficos à esquerda representam a proporção de células nas fases G1 (cinza claro), S (cinza escuro) e G2/M (preto), o gráfico à direita é referente à fase Sub-G0 do ciclo celular. DXT (100nM) e DOX (1 μM) foram utilizados como controles de morte, onde DXT é o fármaco padrão para pacientes com metástases ósseas e DOX possui mecanismo de ação similar aos compostos avaliados. As análises foram feitas no equipamento BD Accuri C6 FlowCytometer, utilizando o software Summit v.4.3, a partir de três experimentos independentes. Foram adquiridos 10.000 eventos (células) por amostra. Os resultados estão apresentados com a média \pm desvio padrão (SD). Análises estatísticas foram realizadas através do teste *t-student* (* $p < 0.01$, ** $p < 0.001$, *** $p < 0.0001$).

Com relação à linhagem PC3, observamos que o tratamento com 12,5 μM do composto RC10 promoveu um aumento de 15,05 % ($p < 0,0005$) na proporção de células na fase Sub-G0 do ciclo celular em relação ao controle (Figura 5.8a). Já quando estas mesmas células foram tratadas com o composto RCDFC, independente da concentração, não foram observadas alterações na proporção de células na fase Sub-G0 do ciclo celular (Figura 5.8b).

Já quando as células PC3 foram tratadas com o composto 3-CH3 Tiol, observamos um aumento de 5,2 % e 9,45 %, na proporção de células em Sub-G0 no intervalo de concentração entre respectivamente 50 μM e 100 μM deste composto (Figura 5.8c).

Em resposta ao tratamento da linhagem PC3 com o composto 4F-Tiol, observamos um aumento, embora, não estatisticamente significativo, na proporção de células em Sub-G0 de 5,05 %, 8,35 % e 15,8 %, respectivamente nas concentrações de 25 μM , 50 μM e 100 μM , em comparação às células tratadas com DMSO (Figura 5.8d).



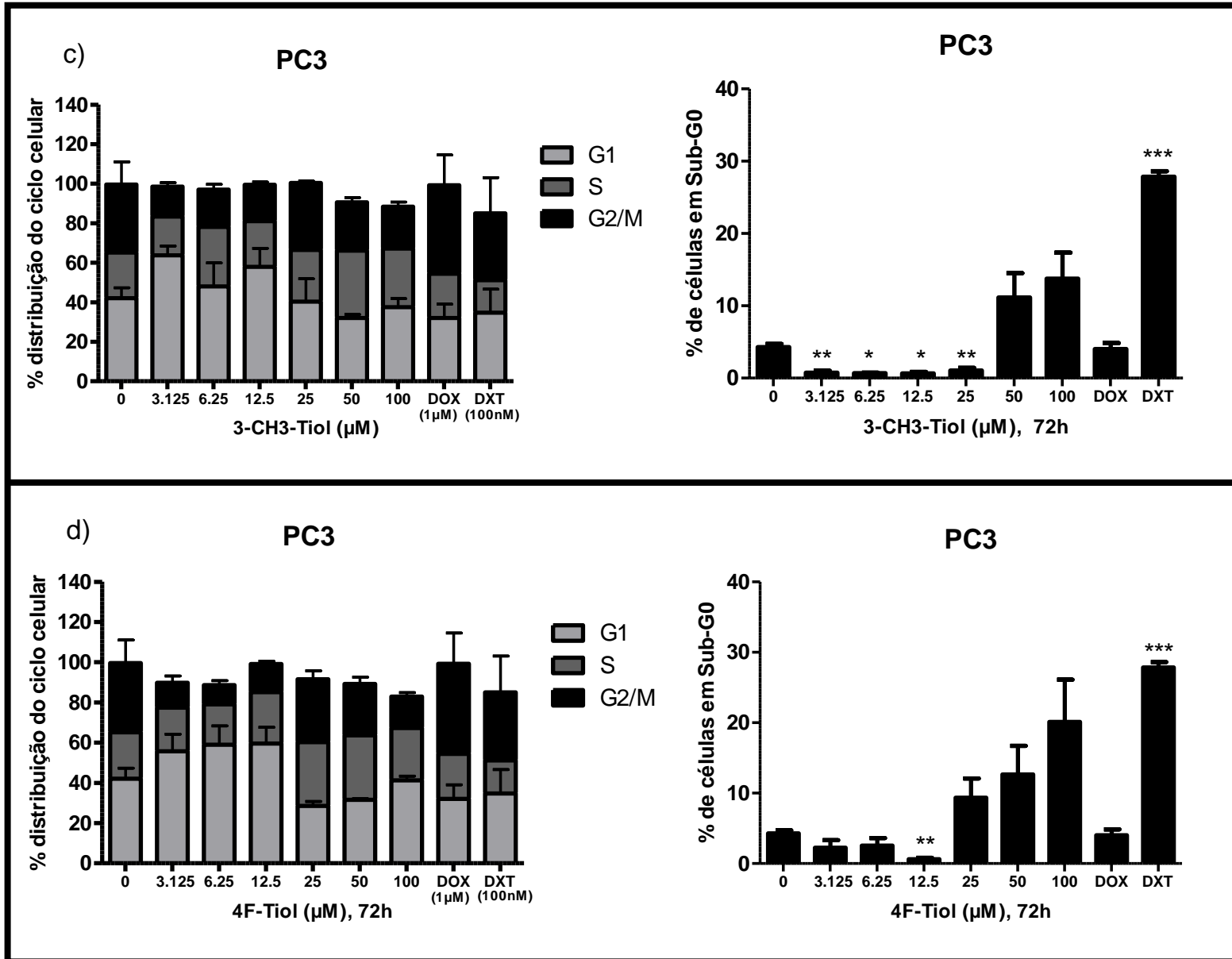


Figura 5.8 - Análise do ciclo celular por citometria de fluxo na linhagem PC3 tratada com compostos derivados de naftoquinonas. A linhagem PC3 foi tratada por 72h com concentrações crescentes (3,125 μM – 100 μM) dos compostos (a) RC10, (b) RCDFC, (c) 3-CH3 Tiol e (d) 4F-Tiol. Os gráficos à esquerda representam a proporção de células nas fases G1 (cinza claro), S (cinza escuro) e G2/M (preto). Os gráficos são referentes à fase Sub-G0 do ciclo celular. DXT (100nM) e DOX (1 μM) foram utilizados como controles de morte, onde DXT é o fármaco padrão para pacientes com metástases ósseas e DOX possui mecanismo de ação similar aos compostos avaliados. As análises foram feitas no equipamento BD Accuri C6 FlowCytometer, utilizando o software Summit v.4.3, a partir de três experimentos independentes. Foram adquiridos 10.000 eventos (células) por amostra. Os resultados estão apresentados com a média \pm desvio padrão (SD). Análises estatísticas foram realizadas através do teste *t-student* (* $p < 0.01$, ** $p < 0.001$, *** $p < 0.0001$).

Em conjunto, esses resultados sugerem que o acúmulo de células na fase Sub-G0 do ciclo celular, induzido pelos compostos derivados de naftoquinonas RC10, RCDFC, 4F-Tiol e 3-CH3 Tiol, varia de acordo com a concentração testada, com a estrutura química do composto e também de acordo com a linhagem celular testada.

1.14. O tratamento com compostos RC10, RCDFC, 4F-Tiol e 3-CH3 Tiol induz morte celular por apoptose nas linhagens DU145 e PC3 de CaP metastático

Sabe-se que a diminuição na viabilidade celular pode também ser promovida pelo aumento de morte celular, em especial por apoptose (ADAN; KIRAZ; BARAN, 2016). Assim, avaliamos se o tratamento com os compostos derivados de naftoquinonas RC10, RCDFC, 4F-Tiol e 3-CH3 Tiol diminuem a viabilidade das células DU145 e PC3 também por efeito sobre a apoptose. Para estes experimentos, selecionamos as concentrações de 6,25 μM e 12,5 μM para prosseguir, uma vez que as concentrações mais altas induziam alto percentual de células não viáveis, não havendo quantidade suficiente para avaliação por citometria de fluxo.

A avaliação da indução de morte celular por apoptose foi realizado por meio de ensaio de marcação com Anexina V/PI (AV/PI) em citometria de fluxo, após o tratamento das linhagens DU145 e PC3 com os compostos RC10, RCDFC, 4F-Tiol e 3-CH3 Tiol nas concentração entre 6,25 μM e 12,5 μM por 72h.

Os histogramas (Figura 5.9) correspondem à resultados representativos das leitura de 10.000 eventos para as diferentes concentrações dos compostos sendo testados na linhagem DU145.

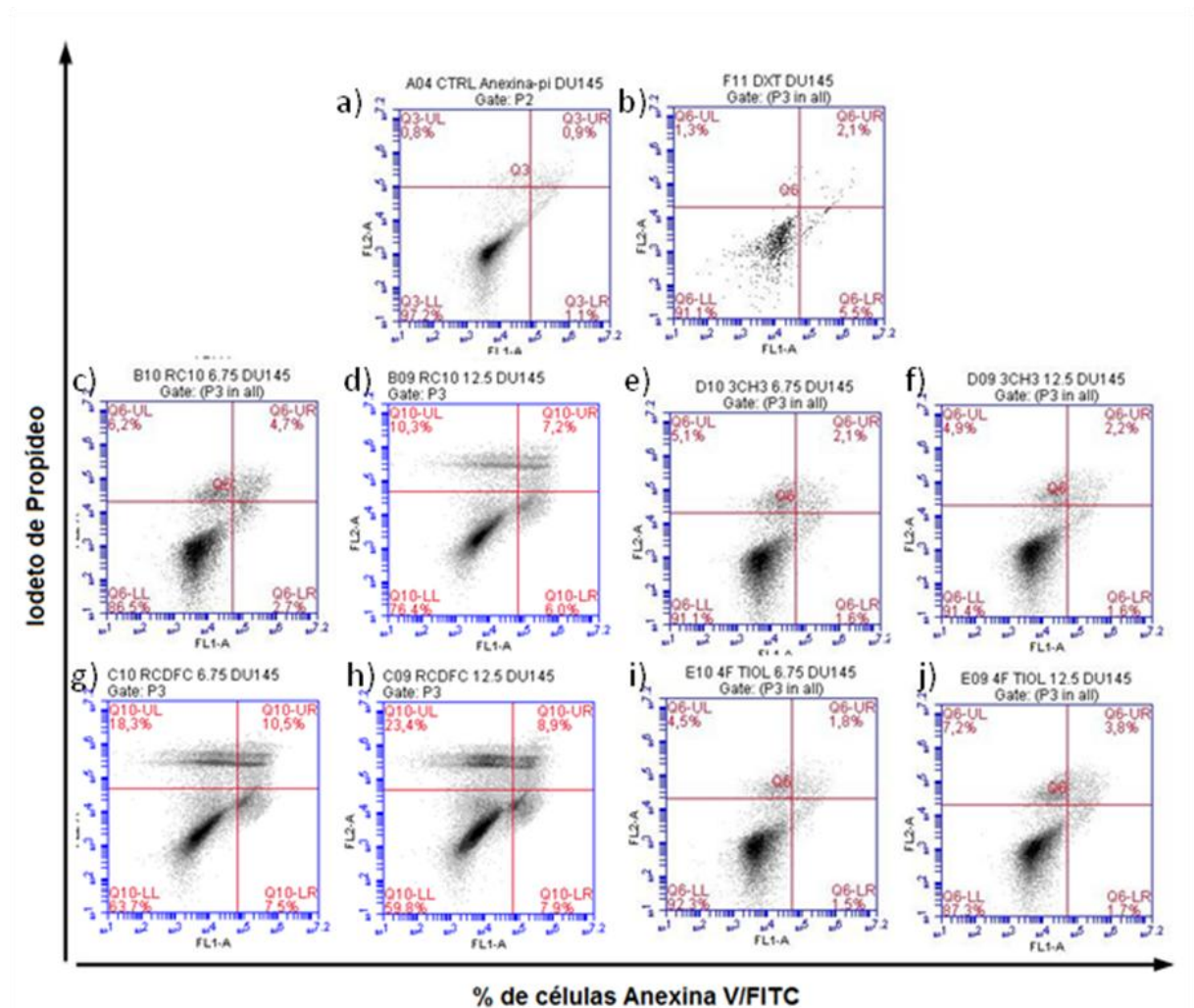
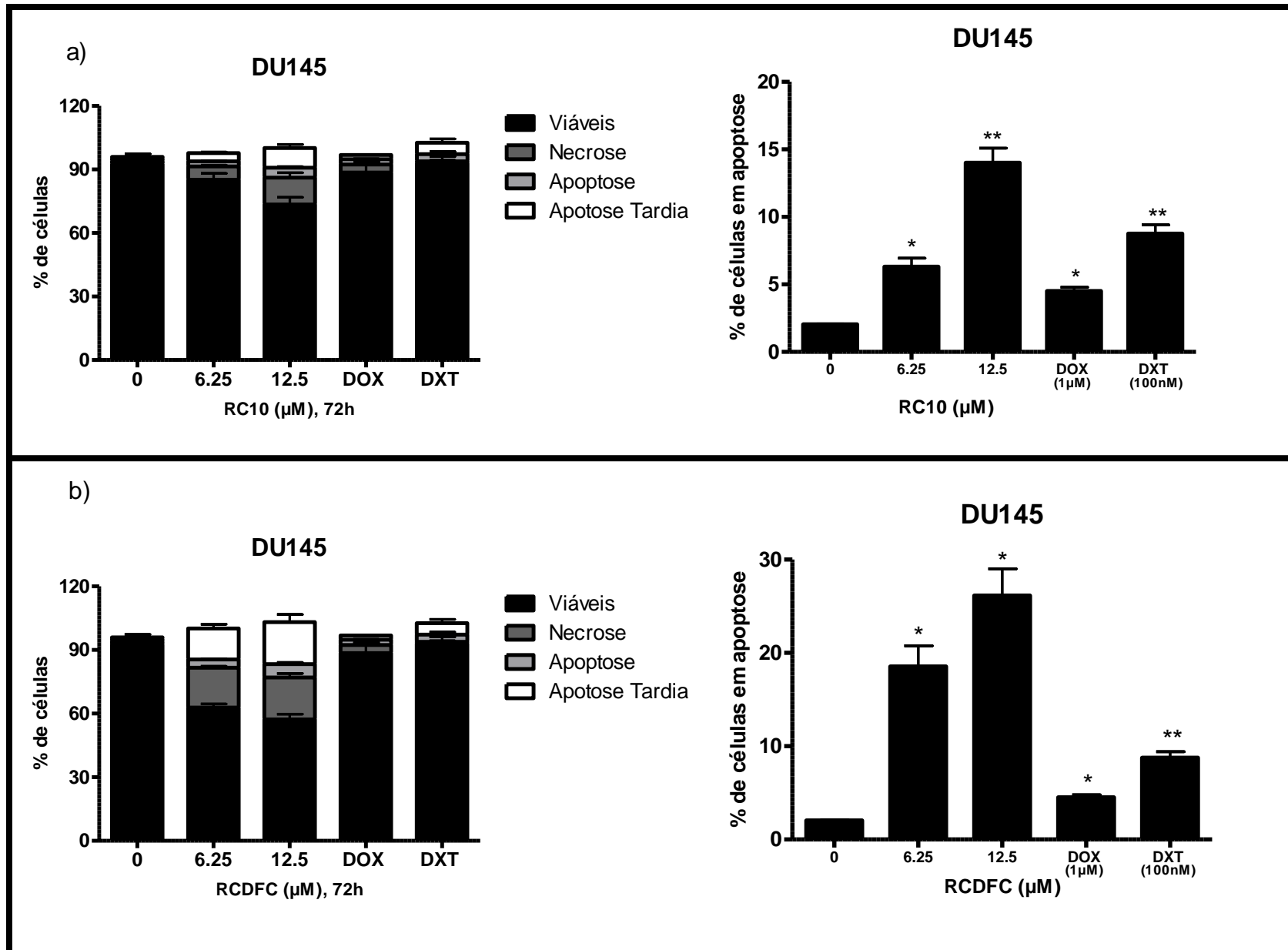


Figura 5.9 - Histograma representativo da proporção de células marcadas por Anexina V/Iodoto de Propídeo. Histogramas representativos referentes à linhagem celular DU145 tratada por 72h com (a) DMSO/PBS, (b) DXT, (c) 6,25 μ M de RC10, (d) 12,5 μ M de RC10, (e) 6,25 μ M de 3CH3-Tiol, (f) 12,5 μ M de 3CH3-Tiol, (g) 6,25 μ M de RCDFC, (h) 12,5 μ M de RCDFC, (i) 6,25 μ M de 4F-Tiol e (j) 12,5 μ M de 4F-Tiol. DXT (100nM) foi utilizado como controle de morte, por ser o fármaco padrão para pacientes com metástases ósseas. As células negativas para ambos os marcadores (Anexina V/PI⁻) foram consideradas viáveis; positivas para anexina V e negativas para PI (Anexina V⁺/PI⁻) em apoptose inicial; positivas para ambos os marcadores (Anexina V⁺/PI⁺) em apoptose tardia e negativas para anexina V e positivas para PI (Anexina V⁻/PI⁺) em necrose. Foram adquiridos 10.000 eventos (células) por amostra utilizando o canal FL-2 (585nm).

O tratamento da linhagem DU145 com o composto RC10 promoveu uma diminuição de 7,37 % e 19,1 % na proporção de células viáveis mediante o tratamento com 6,25 μ M e 12,5 μ M respectivamente ($p > 0,05$). Além disso, o tratamento com este composto RC10, aumenta a proporção de células em apoptose em 4,25 % ($p < 0,05$) e em 11,95 % ($p < 0,005$), de maneira dose dependente (Figura 5.10a). O mesmo foi observado quando estas células foram tratadas com o composto RCDFC, que promoveu uma diminuição de 28,7 % e 35,3 % na proporção

de células viáveis após o tratamento com 6,25 μM ($p < 0,05$) e 12,5 μM ($p < 0,05$), respectivamente. Correspondentemente, o composto RCDFC promoveu um aumento na proporção de células em apoptose em 16,5 % e 24,1 %, de maneira dose dependente (Figura 5.10b).

Quando as células DU145 foram tratadas com 6,25 μM e 12,5 μM do composto 3-CH3 Tiol, observamos respectivamente uma diminuição de 11,2 % e 19,2 % na proporção de células viáveis ($p > 0,05$). Resultado similar foi observado quando estas células foram tratadas com o composto 4F-Tiol, que promoveu uma diminuição de 8,8 % e 16,3 % na proporção de células viáveis após o tratamento com respectivamente com, 6,25 μM ($p < 0,05$) e 12,5 μM ($p < 0,05$), de maneira dose-dependente. Entretanto, quando avaliamos a proporção de células apoptóticas, vemos aumento significativo na proporção em células em apoptose apenas quando as células DU145 foram tratadas com 6,25 μM dos compostos 3-CH3 Tiol e 4F-Tiol, respectivamente em 1,2 % ($p < 0,05$) e em 1,2 % ($p < 0,0005$), na concentração de (Figura 5.10c e 5.10d).



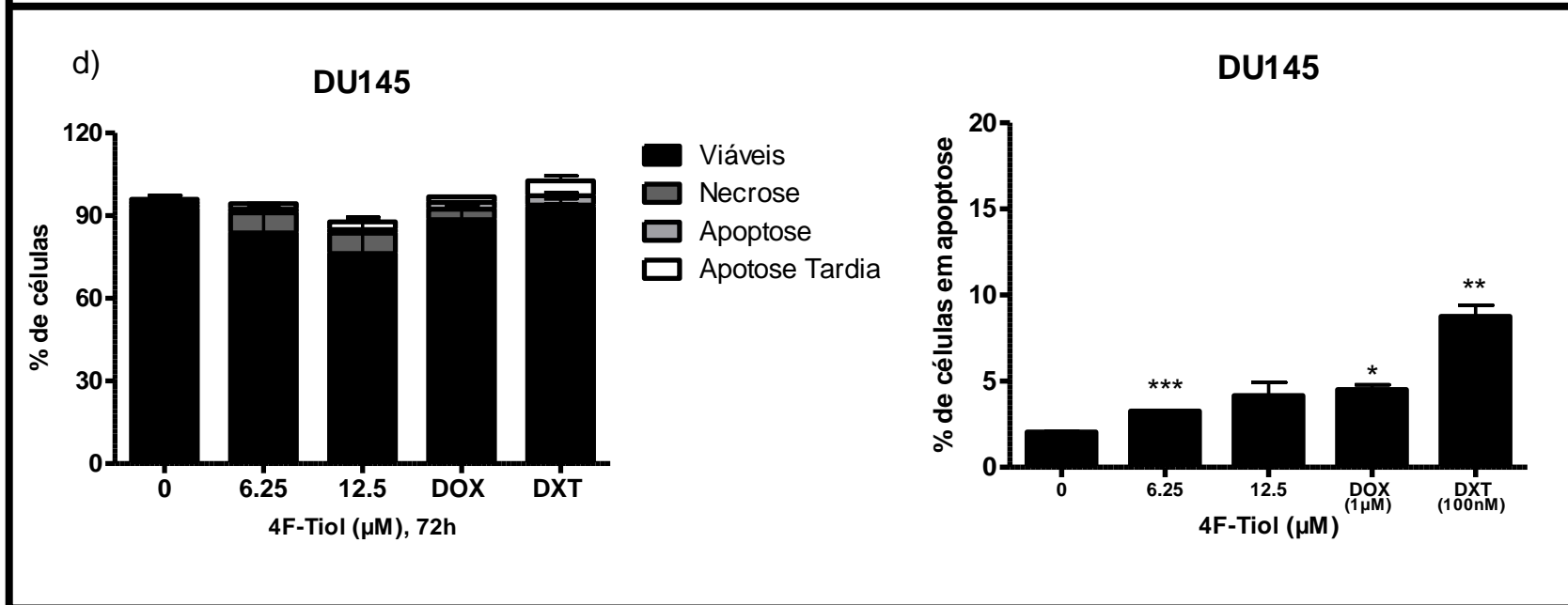
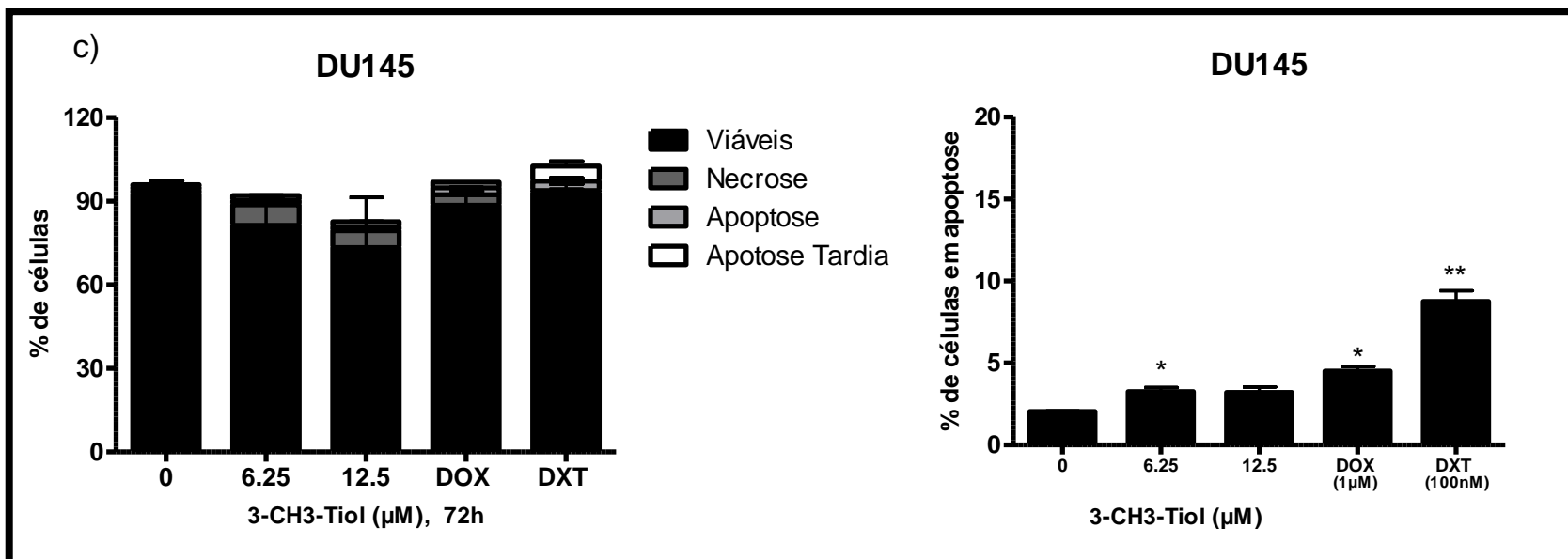
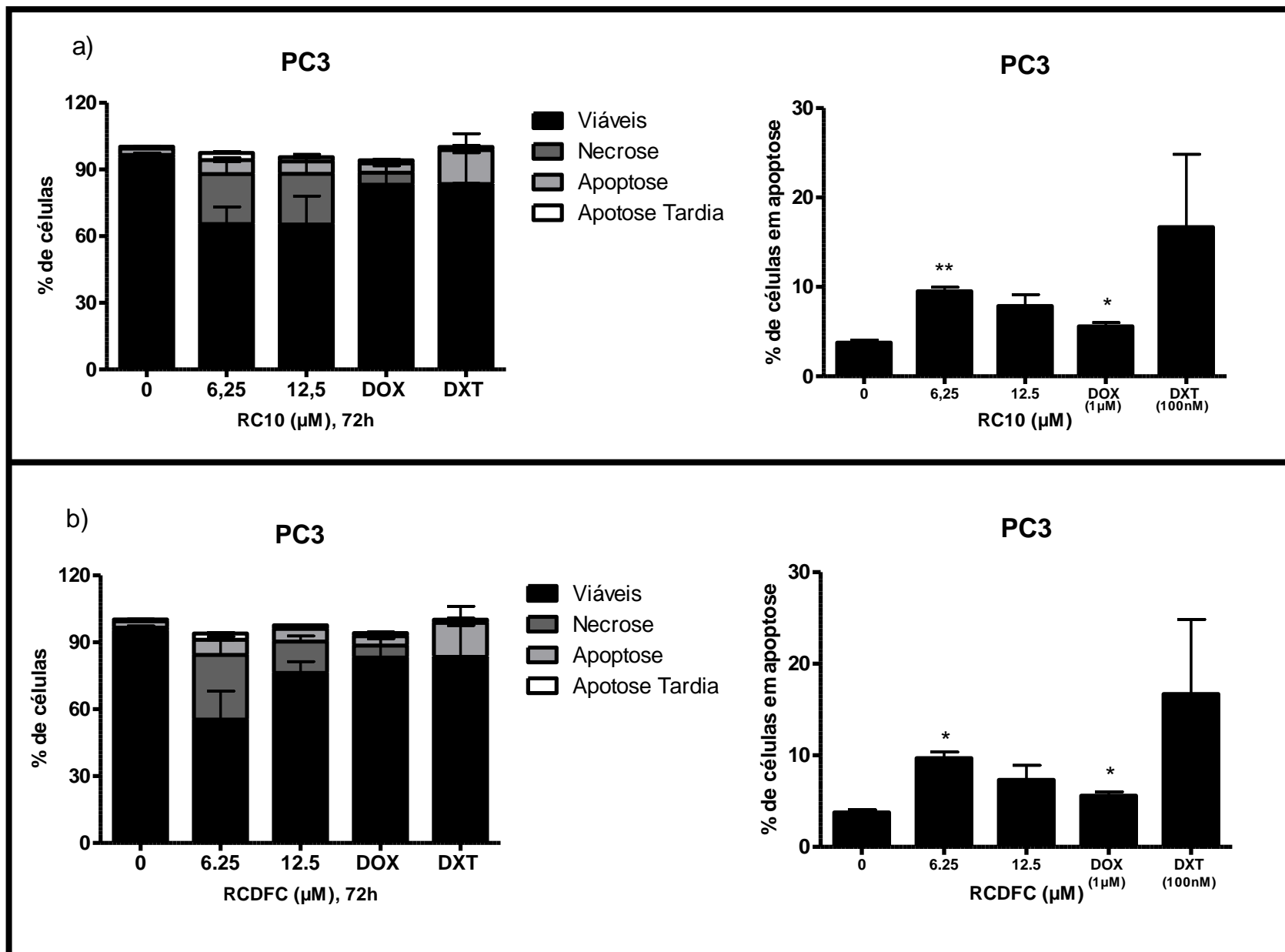


Figura 5.10 - Ensaio de Anexina V FITC/PI na linhagem DU145 tratada com compostos derivados de naftoquinonas. A linhagem DU145 foi plaqueada, tratada por 72h com 6,25 μ M e 12,5 μ M dos compostos (a) RC10, (b) RCDFC, (c) 3-CH3 Tiol e (d) 4F-Tiol, e coradas com Anexina V/PI. Os gráficos à esquerda representam a proporção de células viáveis (preto), em necrose (cinza escuro), em apoptose (cinza claro) e em apoptose tardia (branco), o gráfico à direita é referente ao somatório de células em apoptose e apoptose tardia. DXT (100nM) e DOX (1 μ M) foram utilizados como controles de morte, onde DXT é o fármaco padrão para pacientes com metástases ósseas e DOX possui mecanismo de ação similar aos compostos avaliados. As análises foram feitas no equipamento BD Accuri C6 FlowCytometer, utilizando o software Summit v.4.3, a partir de três experimentos independentes. Foram adquiridos 10.000 eventos (células). Os resultados estão apresentados com a média \pm desvio padrão (SD). Análises estatísticas foram realizadas através do teste *t-student* (* $p < 0.01$, ** $p < 0.001$, *** $p < 0.0001$).

Já quando a linhagem PC3 foi tratada com o composto RC10, observamos uma diminuição de 30,2 % e 54,8 % na proporção de células viáveis, mediante o tratamento com 6,25 μ M e 12,5 μ M respectivamente ($p > 0,05$). Além disso, o tratamento com o composto RC10, aumenta, significativamente a proporção de células em apoptose em 8,25 % ($p < 0,005$) e 8,05 % ($p > 0,05$) (Figura 5.11a). Resultado similar foi observado quando estas células PC3 foram tratadas com o composto RCDFC, que promoveu uma diminuição de 40,2 % e 19,4 % na proporção de células viáveis após o tratamento com 6,25 μ M ($p > 0,05$) e 12,5 μ M ($p > 0,05$), respectivamente. Correspondentemente, o composto RCDFC promoveu um aumento na proporção de células em apoptose em 11,86 % ($p < 0,05$) e 1,55 % ($p > 0,05$), respectivamente (Figura 5.11b).

Quando tratadas com 6,25 μ M e 12,5 μ M do composto 3-CH3 Tiol, observamos que as células PC3, respectivamente apresentam uma diminuição de 18,2 % e 36,2 % na proporção de células viáveis ($p > 0,05$), e um aumento significativo a proporção de células em apoptose em 2,8 % ($p < 0,05$) e 2,05 % ($p < 0,05$), respectivamente (Figura 5.11c).

Resultado similar foi observado quando estas células foram tratadas com o composto 4F-Tiol, que promoveu uma diminuição de 12,8 % e 20,9 % na proporção de células viáveis após o tratamento com respectivamente com 6,25 μ M ($p > 0,05$) e 12,5 μ M ($p > 0,05$) do composto, de maneira dose-dependente. Quando avaliamos a proporção de células apoptóticas, vemos aumento significativo na proporção em células em apoptose de 2,75 % e 3,3 % após o tratamento com 6,25 μ M ($p > 0,05$) e 12,5 μ M ($p > 0,05$) (Figura 5.11d).



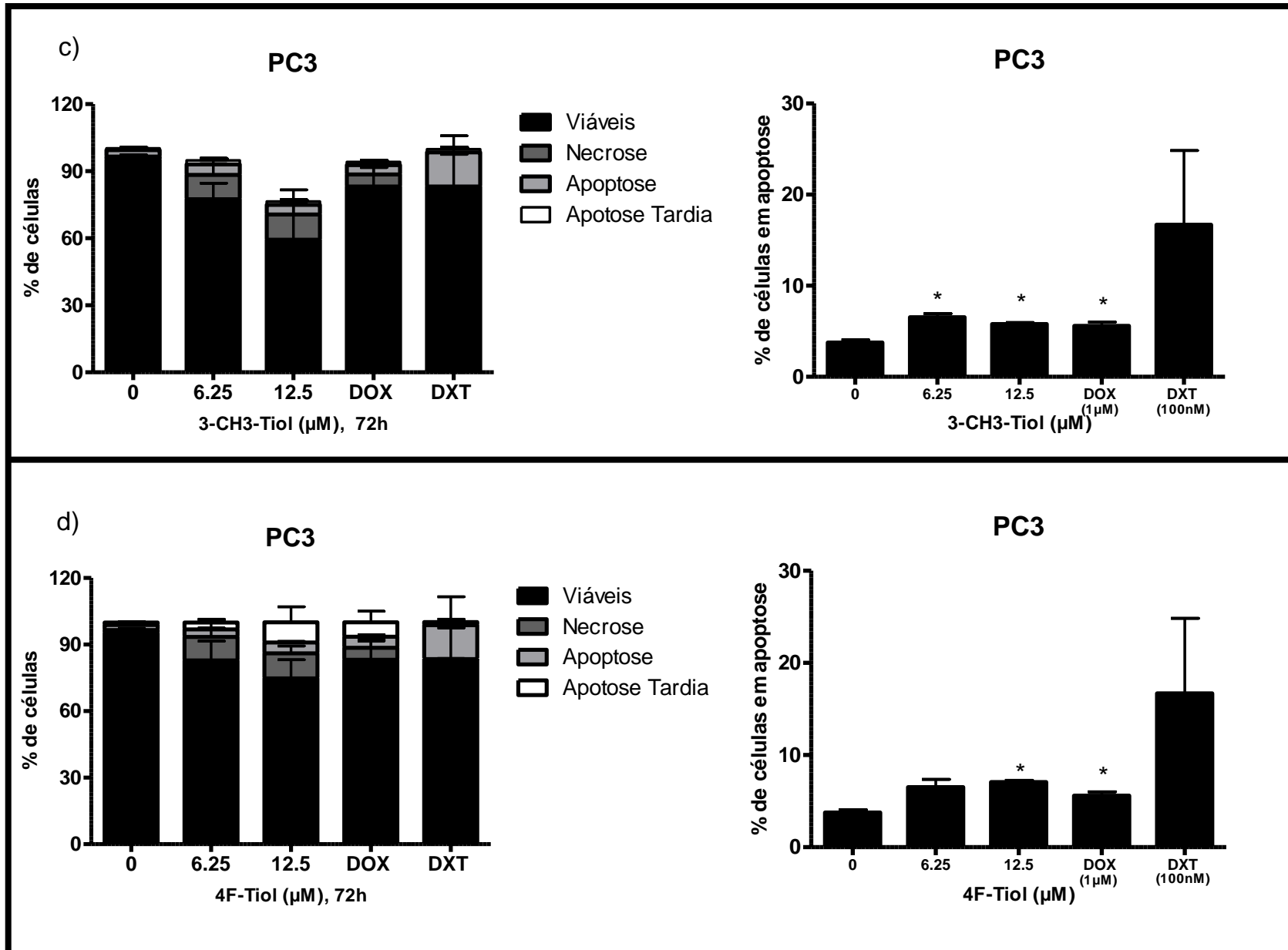


Figura 5.11 - Ensaio de Anexina V FITC/PI na linhagem PC3 tratada com compostos derivados de naftoquinonas. A linhagem DU145 foi plaqueada, tratada por 72h com 6,25 μM e 12,5 μM dos compostos (a) RC10, (b) RCDFC, (c) 3-CH₃ Tiol e (d) 4F-Tiol, e coradas com Anexina V/PI. Os Gráficos à esquerda representam a proporção de células viáveis (preto), em necrose (cinza escuro), em apoptose (cinza claro) e em apoptose tardia (branco). O gráfico à direita é referente ao somatório de células em apoptose e apoptose tardia. DXT (100nM) e DOX (1 μM) foram utilizados como controles de morte, onde DXT é o fármaco padrão para pacientes com metástases ósseas e DOX possui mecanismo de ação similar aos compostos avaliados. As análises foram feitas no equipamento BD Accuri C6 FlowCytometer, utilizando o software Summit v.4.3, a partir de três experimentos independentes. Foram adquiridos 10.000 eventos (células). Os resultados estão apresentados com a média \pm desvio padrão (SD). Análises estatísticas foram realizadas através do teste *t-student* (* $p < 0.01$, ** $p < 0.001$, *** $p < 0.0001$).

1.15. Os compostos RC10 e RCDFC não alteram a viabilidade, ciclo celular e apoptose de linhagens celulares não tumorais HUVEC

Para os compostos RC10 e RCDFC, avaliamos também seus potenciais efeitos citotóxicos em linhagens celulares não tumorais. Nestes ensaios, usamos como modelos de células não tumorais a linhagem HUVEC de células endoteliais humanas. A linhagem celular HUVEC foi tratada nas mesmas condições experimentais que as linhagens metastáticas de CaP (DU145 e PC3).

Nestas condições experimentais, observamos que independente dos tempos de tratamento analisados (24h, 48h e 72h), os compostos RC10 e RCDFC não alteraram a viabilidade das células HUVEC no intervalo de concentração entre 0,78 μM e 100 μM ($p > 0,05$). Entretanto, na concentração 100 μM o composto RC10 promoveu uma diminuição significativa de 45 % ($p < 0,05$) na viabilidade das células HUVEC, o mesmo não tendo sido observado para o composto RCDFC. Entretanto, o tratamento com os compostos RC10 e RCDFC promove menor efeito citotóxico sobre as células HUVEC que o composto DXT (93%; $p < 0,0005$), o qual é utilizado na clínica no tratamento de pacientes com CaP metastático na concentração de 100nM (Figura 5.12).

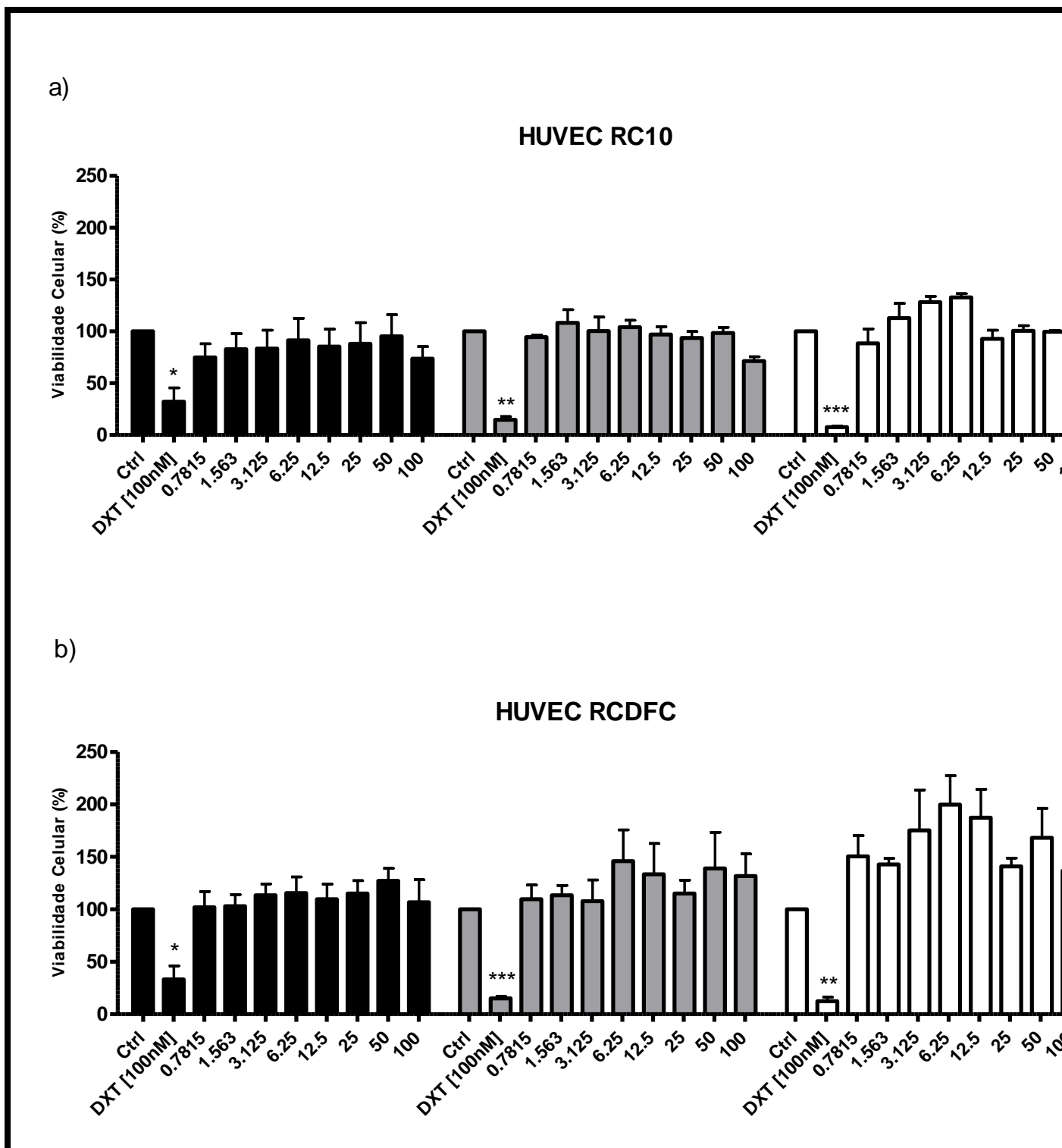


Figura 5.12 - Avaliação do IC50 em células endoteliais HUVEC. O tratamento com os compostos a) RC10 e b) RCDFC foi avaliado em concentrações entre 0,78 μM e 100 μM por 24h, 48h e 72h e a viabilidade celular foi avaliada por MTT. Os resultados estão apresentados com a média \pm desvio padrão (SD). DXT (100nM) foi utilizado como controle de morte, por ser o fármaco padrão para pacientes com metástases ósseas. Análises estatísticas foram realizadas através do teste *t-student* (* $p < 0.05$, ** $p < 0.005$, *** $p < 0.0005$).

Uma vez que demonstramos que o tratamento com os compostos derivados de naftoquinonas RC10 e RCDFC não alteram a viabilidade de células não tumorais HUVEC, (Figura 5.12), fomos também investigar se haveria alteração nos mecanismos celulares relacionados ao ciclo celular e apoptose.

Observamos que o tratamento da linhagem não tumoral HUVEC com o composto RC10 diminuiu em 68 % ($p < 0,0005$), 72,05 % ($p < 0,0005$), 65,9 % ($p < 0,005$) a proporção de células na fase G1 do ciclo celular quando tratadas respectivamente com 25 μM , 50 μM e 100 μM deste composto. Além disso, o tratamento das células HUVEC com 25 μM do composto RC10 aumenta de forma significativa a proporção de células na fase S em 31,1 % ($p < 0,05$). Quando estas células são tratadas com 25 μM , 50 μM e 100 μM , promove respectivamente aumentos na proporção de células na fase G2/M de 42,3 % ($p > 0,05$), 63,55 % ($p < 0,005$) e 21,25 % ($p < 0,05$). Os tratamentos com 50 μM e 100 μM do composto RC10 induzem ainda em células HUVEC um aumento na proporção de células na fase Sub-G0 do ciclo celular de 7,95 % ($p > 0,05$) e 46,2 % ($p < 0,05$), respectivamente (Figura 5.13a).

Em relação ao tratamento das células HUVEC com 50 μM e 100 μM do composto RCDFC, observamos respectivamente uma diminuição significativa de 59,25 % ($p < 0,05$) e 71,5 % ($p < 0,0005$), na proporção de células na fase G1 do ciclo celular. O tratamento com este composto aumenta também a proporção de células na fase S em 16,65 % ($p > 0,05$), 33,6 % ($p < 0,0005$) e 32,8 % ($p > 0,05$) quando tratadas com 25 μM , 50 μM e 100 μM , respectivamente. Quando tratadas com 50 μM e 100 μM deste composto, observamos respectivamente um aumento de 8,1 % ($p > 0,05$) e 43,15 % ($p > 0,05$) na proporção de células na fase G2/M do ciclo celular. O tratamento com 50 μM do composto RC10 nestas células também promove diminuição de 4,25 % na proporção de células na fase Sub-G0 do ciclo celular, embora não atinja significância estatística ($p > 0,05$) (Figura 5.13b).

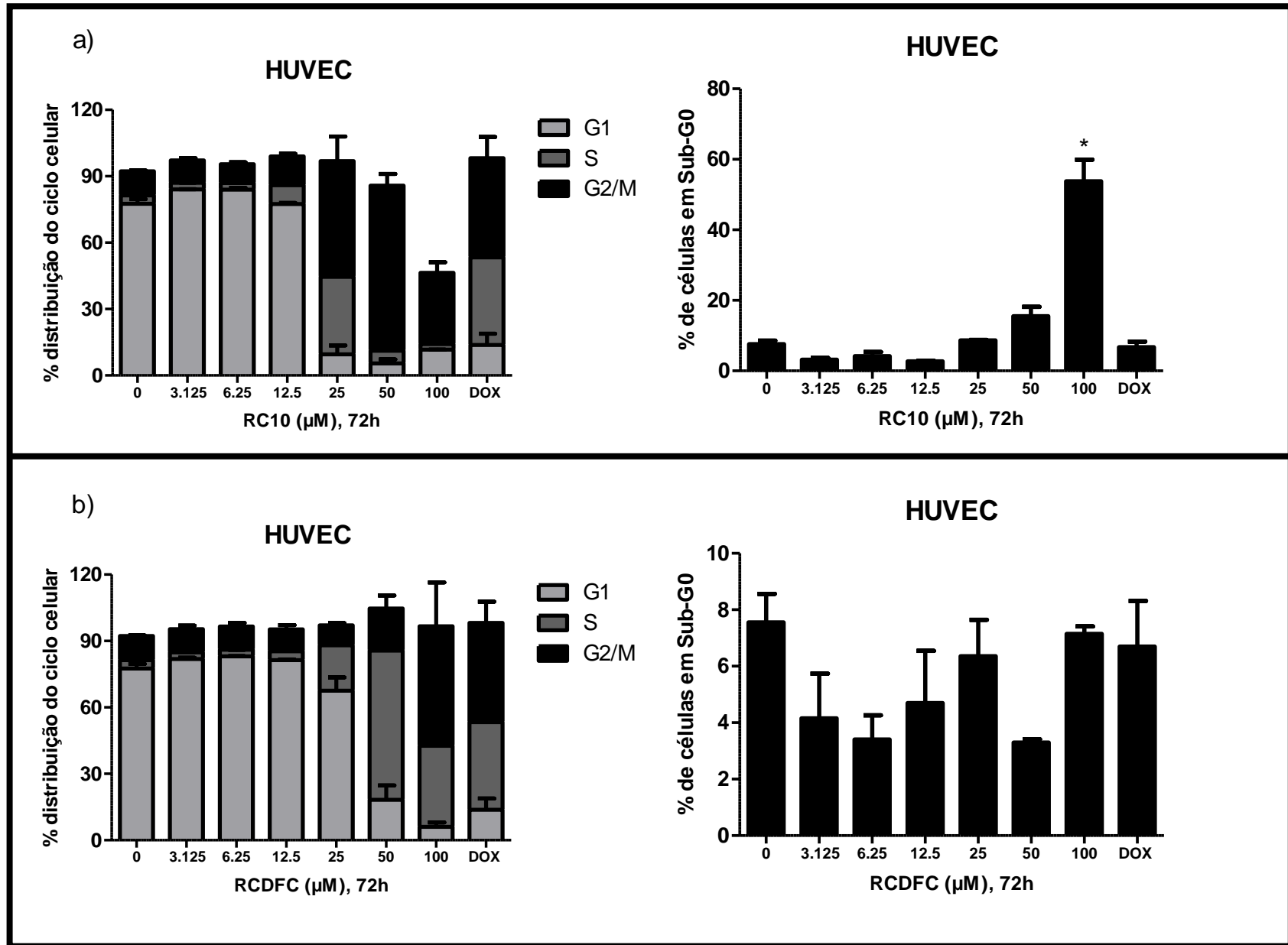


Figura 5.13 - Análise do ciclo celular por citometria de fluxo na linhagem não tumoral HUVEC tratada com compostos derivados de naftoquinonas. A

linhagem HUVEC foi tratada por 72h com concentrações crescentes (3,125 μM – 100 μM) dos compostos (a) RC10 e (b) RCDFC. Os Gráficos à esquerda representam a proporção de células nas fases G1 (cinza claro), S (cinza escuro) e G2/M (preto), o gráfico à direita é referente à fase Sub-G0 do ciclo celular. DXT (100nM) e DOX (1 μM) foram utilizados como controles de morte, onde DXT é o fármaco padrão para pacientes com metástases ósseas e DOX possui mecanismo de ação similar aos compostos avaliados. As análises foram feitas no equipamento BD Accuri C6 FlowCytometer, utilizando o software Summit v.4.3, a partir de três experimentos independentes. Foram adquiridos 10.000 eventos (células) por amostra. Os resultados estão apresentados com a média \pm desvio padrão (SD).

Análises estatísticas foram realizadas através do teste *t-student* (* $p < 0.01$, ** $p < 0.001$, *** $p < 0.0001$).

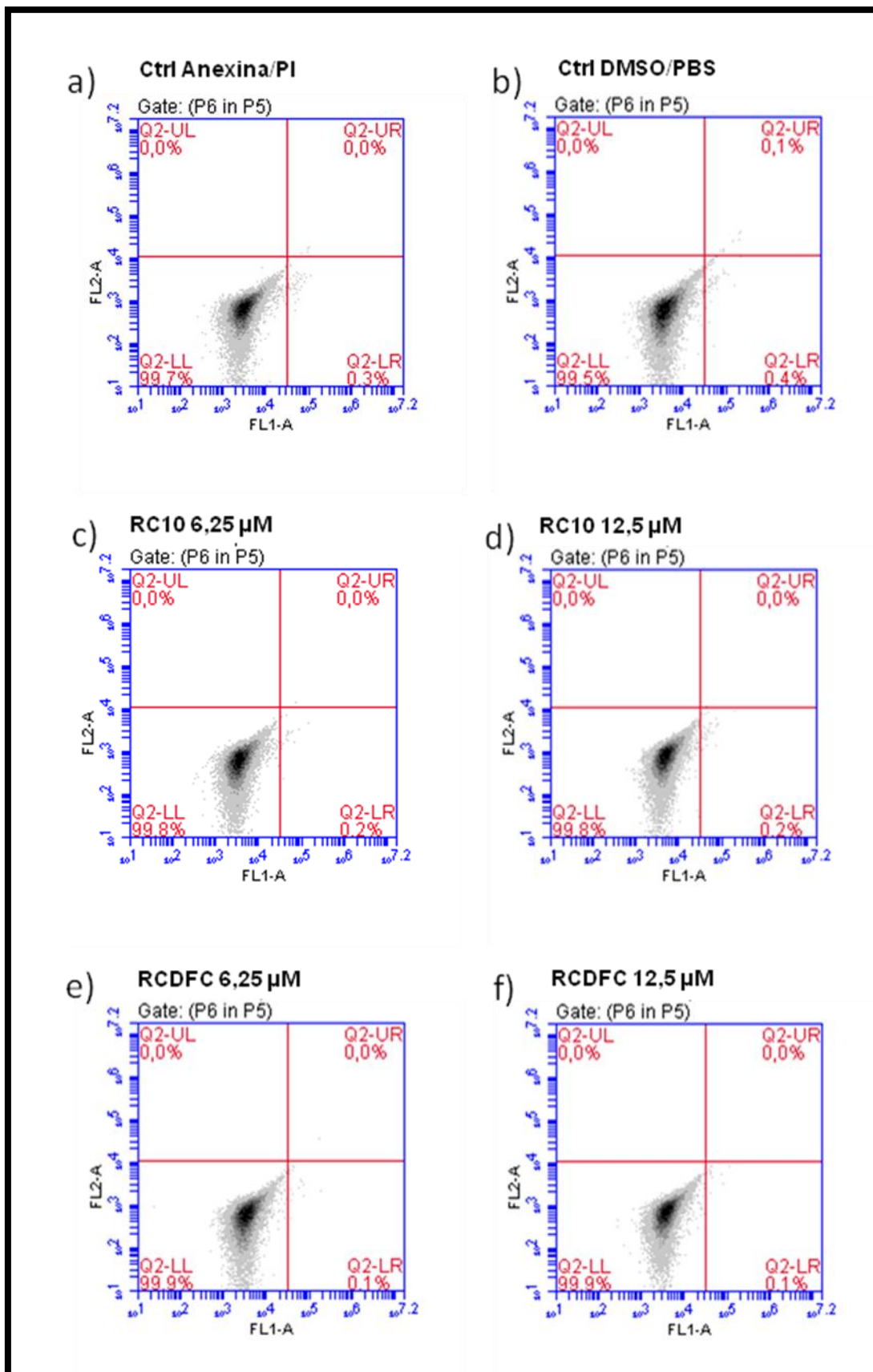


Figura 5.14 - Histograma representativo do ensaio de Anexina V FITC/PI na linhagem não tumoral HUVEC tratada com compostos derivados de naftoquinonas. A linhagem HUVEC foi plaqueada, tratada por 72h com os compostos RC10 e RCDFC, e coradas com Anexina V/PI. Nos quadrantes estão as células (a) controle sem tratamento, marcadas com Anexina/PI, (b) tratadas com

DMSO/PBS, tratadas com (c) 6,25 μM de RC10 e (d) 12,5 μM de RC10, e tratadas com (e) 6,25 μM de RCDFC e (f) 12,5 μM de RCDFC. As análises foram feitas no equipamento BD Accuri C6 FlowCytometer, utilizando o software Summit v.4.3, a partir de três experimentos independentes. Foram adquiridos 10.000 eventos (células).

Em conjunto, esses resultados sugerem que o tratamento com os compostos derivados de naftoquinonas RC10 e RCDFC apresentam significativa ação citotóxica sobre a viabilidade celular das linhagens celulares DU145 e PC3 metastáticas de CaP, porém apresentam menor efeito citotóxico sobre células endoteliais. Da mesma forma, não induzem apoptose nas células HUVEC na faixa de concentração entre 0,78 μM e 100 μM (Figura 5.14). Entretanto, o tratamento das células HUVEC com o composto RC10, especialmente na concentração de 100 μM , induz um aumento na proporção de células em Sub-G0, indicativo de morte celular apoptótica.

6. DISCUSSÃO

Grande parte dos pacientes com CaP metastático se tornam resistentes ao tratamento com o quimioterápico padrão, DXT. Além disso, o DXT é uma droga com alta citotoxicidade, que acaba afetando não só células tumorais, como também células normais. Diante deste cenário, este trabalho objetivou rastrear novas substâncias bioativas derivadas de naftoquinonas, a fim selecionar as que apresentariam melhor efeito citotóxico em modelos celulares metastáticos de CaP, assim como avaliar os mecanismos referentes à ciclo celular e apoptose. Avaliamos o papel de 34 compostos derivados de naftoquinonas na viabilidade celular. Observamos que 4 destes compostos promoveram uma diminuição na viabilidade de células de CaP, mas não em células não tumorais. Diante destes achados, avaliamos também se o tratamento com estes compostos afetaria a distribuição da proporção de células em cada fase do ciclo celular. Verificamos que o tratamento com estes compostos aumenta a proporção de células DU145 e PC3 na fase Sub-G0 do ciclo celular, enquanto que para as células HUVEC, observamos uma maior proporção de células na fase S e fase G2/M, de maneira dose-dependente, indicativo que essas células irão se duplicar e retornarão ao ciclo. Observamos também que em ambas as linhagens tumorais de CaP o tratamento com os compostos aumentam a proporção de células em apoptose. Entretanto não houve indicativos de indução de apoptose na linhagem não tumoral em resposta ao tratamento com estes compostos. Este conjunto de dados corresponde às primeiras evidências relatadas para os compostos avaliados, sugerindo que eles podem promover a alteração da proporção de células no ciclo celular e induzir células tumorais à apoptose, além de parecer possuir menor potencial de citotoxicidade em células não tumorais, se comparado ao DXT.

Ao avaliar o efeito citotóxico de novos compostos inéditos derivados de naftoquinonas sobre a viabilidade celular através de ensaio de MTT em distintos tempos com 100 μ M de cada um dos compostos avaliados nas células de CaP metastático (PC3 e DU145), observamos que apenas o tratamento com os compostos das famílias Bis Quinonas (RC10 e RCDFC) e Tióis (3-CH3 Tiol e 4F Tiol) promoveram uma redução da viabilidade celular no tempo de 72h.

Observamos que o tratamento com os compostos RC10 e RCDFC reduziram significativamente a viabilidade de células PC3 e DU145 na concentração de 100 μM , enquanto que os compostos 4F-Tiol e 3-CH3 Tiol diminuíram de maneira significativa a viabilidade celular em 50 μM e 100 μM . Para as células não tumorais HUVEC, apenas o composto RC10 diminuiu de maneira significativa a viabilidade das células em 100 μM , entretanto, este tratamento promove menor efeito citotóxico sobre as células HUVEC que o composto DXT (93%; $p < 0,0005$), o qual é utilizado na clínica no tratamento de pacientes com CaP metastático.

Estes achados revelam que os compostos RC10, RCDFC, 3-CH3 Tiol e 4F Tiol foram capazes de reduzir a viabilidade de células de CaP, DU145 e PC3. Isso vai de encontro à literatura, que apresenta resultados similares, que demonstram que o tratamento com 1 μM , 5 μM e 10 μM de β -lapachona diminuiu a viabilidade de células CT26 de câncer colorretal, de maneira dose e tempo-dependente (KEE et al., 2017a). O mesmo foi observado para células de mama, pâncreas e próstata, em que o tratamento com 1-50 μM dos compostos derivados de bases de Mannich testados neste estudo, como a Lausona, reduziram a viabilidade celular de maneira dose dependente (MAHAL et al., 2017). Os efeitos citotóxicos dos compostos RC10 e RCDFC podem ser sugeridos como sendo seletivos, uma vez que alteraram, em maior proporção, a viabilidade de células tumorais, em comparação ao observado na célula não tumoral HUVEC. Além disso, estes compostos se mostraram menos citotóxicos que o DXT. Esse resultado está de acordo com a literatura, onde foi observado que o tratamento com 2-7 μM dos compostos 1a e 1c, derivados de naftoquinonas pentacíclicas, induziram baixa citotoxicidade contra células mononucleares de sangue periférico (PBMC). Este resultado sugere seletividade para células tumorais, uma vez que os mesmos compostos induziram diminuição na viabilidade de linhagens celulares de leucemia, K562, Lucena-1 e Daudi, de maneira dose-dependente (SALUSTIANO et al., 2010). Substâncias que possam atuar de maneira seletiva sobre células tumorais seriam bons candidatos como estratégia terapêutica, uma vez que a terapia usual não se mostra seletiva, que é o caso do DXT, que é extremamente citotóxico, podendo gerar diversas reações no paciente, como náuseas, neuropatia e perda ou alteração da drenagem normal das lágrimas pelas vias lacrimais (KINTZEL; MICHAUD; LANGE, 2006). O DXT é bem conhecido por ser o medicamento de primeira linha administrado aos pacientes com CaP, principalmente para aqueles com metástases. Este medicamento apresenta uma

série de efeitos colaterais, como Apesar de aumentar a expectativa de vida dos pacientes e aliviar as dores, com o tempo os pacientes se tornam resistentes ao tratamento (HEIDENREICH et al., 2014).

O próximo passo do nosso estudo foi investigar através de quais mecanismos os compostos selecionados, RC10, RCDFC, 3-CH3 Tiol e 4F Tiol, diminuíam a viabilidade celular das células metastáticas de CaP. Para isso, avaliamos a modulação do ciclo celular para as concentrações entre 3,125 μ M e 100 μ M no tempo de 72h. Observamos que para a linhagem DU145, o tratamento com o composto RC10 promoveu um aumento na proporção de células em Sub-G0 em todas as concentrações analisadas, se comparado com o controle, assim como para o composto RCDFC. Para o composto 3-CH3 Tiol, observamos um aumento na proporção de células em Sub-G0 de maneira dose-dependente. Já para o composto 4F-Tiol, há um aumento na proporção de células em Sub-G0 nas concentrações de 50 μ M e 100 μ M, se comparado ao controle. Para a linhagem PC3, observamos que o tratamento com composto RC10 aumentou a proporção de células na fase Sub-G0 apenas na concentração de 12,5 μ M. Para o composto RCDFC, não foram observadas alterações na proporção de células na fase Sub-G0 em nenhuma das concentrações avaliadas. Para o composto 3-CH3 Tiol, observamos um aumento na proporção de células em Sub-G0 apenas no tratamento com 50 μ M e 100 μ M. Com relação ao composto 4F-Tiol, houve um aumento na proporção de células em Sub-G0 nas concentrações de 25 μ M, 50 μ M e 100 μ M se comparado ao controle com DMSO. Nossos resultados corroboram com os estudos da literatura, em relação à naftoquinonas, que em diferentes concentrações causam um acúmulo de células em Sub G0/G1, modulando o ciclo celular, além de levar as células à morte apoptótica (LIU et al., 2017; ZHAI et al., 2017; PRASAD et al., 2018). Além disso, o acúmulo de células em Sub-G0 pode ser indicativo de parada do ciclo, também sugestivo de senescência, o que proporia o uso desses compostos justamente para interromper ou alterar o ciclo celular. Assim, estes compostos apresentam potencial aplicação quimioterápica, atuando seletivamente sobre essas células que não estão ciclando. Já foi mostrado que compostos derivados de berberina induzem a expressão de moléculas do mecanismo de reparo do ciclo celular envolvidas na senescência, sugerindo que estes compostos possuem potencial como uso terapêutico contra câncer de mama (PIERPAOLI et al., 2018).

Quando avaliamos os resultados de ciclo celular obtidos na linhagem não tumoral HUVEC, observamos que especialmente o tratamento com 100 μM do composto RC10 aumenta significativamente a proporção de células em Sub-G0. Esse resultado corrobora nossos achados relacionados à a citotoxicidade observada nos ensaios de MTT, onde este foi o composto mais bioativo, apresentando maior citotoxicidade na concentração de 100 μM . Já para o composto RCDFC, assim como para as demais concentrações do composto RC10 avaliadas, não ocorre alteração na proporção de células na fase Sub-G0. Entretanto, ocorre uma maior proporção de células na fase S e fase G2/M, de maneira dose-dependente, indicando que essas células irão se duplicar e retornarão ao ciclo.

Sabe-se que a regulação do ciclo celular é um dos mecanismos essenciais para a manutenção e reparo aos danos gerados ao DNA da célula (ALBERTS et al., 2002). Além disso, a inibição da proliferação celular pode ocorrer pela indução de apoptose e/ou parada do ciclo celular. Sendo assim, uma vez feita a triagem dos compostos, e estes tendo sido testados quanto a sua influência no ciclo celular, foram feitos experimentos para avaliar se os compostos selecionados atuariam promovendo morte em linhagens celulares tumorais de próstata, pois além de serem seletivos sobre células tumorais, faz-se necessário que drogas antitumorais atuem na promoção da morte celular apoptótica.

Em um experimento preliminar, avaliamos a modulação da morte celular por marcação com Anexina V/PI e observamos que, para todos os compostos avaliados, as concentrações de 100 μM , 50 μM e 25 μM levavam as células à morte, de tal forma que não conseguíamos adquirir as amostras no citômetro. Em consequência, optamos por avaliar apenas as concentrações de 12,5 μM e 6,25 μM . Nossos dados indicaram que especialmente o tratamento da linhagem DU145 com os compostos RC10 e RCDFC levou a indução de morte celular por apoptose de maneira dose dependente, sendo ainda maior do que a indução causada pelo tratamento com DXT. Por outro lado, em relação aos tióis, há uma maior proporção de morte na concentração de 6,25 μM . Já para a linhagem PC3, podemos observar em todos os compostos analisados que há maior indução de apoptose (cerca de 10%) na concentração de 6,25 μM . Estes dados estão de acordo com os resultados de ciclo celular, onde observamos um acúmulo de células em Sub-G0 na presença dos compostos avaliados. Resultados similares demonstraram que o tratamento com 2,5 μM e 5 μM de diferentes naftoquinonas pode induzir apoptose em células EL-4 de

linfoma T de maneira dose dependente (DI ROSSO et al., 2013). Tem também sido descrito que o tratamento com 1-20 μM da naftoquinona Plumbagina induz morte celular apoptótica em uma série de modelos tumorais, assim como em CaP (LIU et al., 2017; DE et al., 2018). Sendo assim, especialmente os compostos RC10 e RCDFC correspondem à compostos que merecem estudos mais aprofundados para serem avaliados quanto à potencialidade de uso em abordagens terapêuticas adicionais para o tratamento de CaP metastático. Na linhagem não tumoral HUVEC, não foi observada nenhuma alteração nos níveis de morte, independente do composto ou da concentração avaliada. Talvez fosse necessário avaliarmos concentrações maiores, a fim de avaliar se ainda assim não haveria indução de morte nas linhagens não tumorais.

O composto RC10 é uma bis-quinona com estrutura não-simétrica, possuindo uma hidroxila no anel aromático que está ligado as duas carbonilas, e essa hidroxila faz com que a molécula perca a simetria. Na literatura não existem exemplos dessa molécula do tipo não simétrica, sendo o nosso trabalho o pioneiro nesse sentido. Acredita-se que a presença dessa hidroxila aumente a atividade biológica, uma vez que já há relatado para o composto hidroxí juglona que a hidroxila nesse anel aromático conjugado ao anel da quinona, melhora a atividade estrutural do composto (SILVA et al., 2013). O composto RCDFC, por outro lado, é uma bis-quinona com estrutura simétrica. Esse tipo de estrutura já é bem discutida na literatura por possuir potencial anti-neoplásico (NEVES et al., 2010a; BALA et al., 2014; CHEN et al., 2015; FRASINYUK et al., 2015; ISLAM et al., 2018).

Tem sido relatado que a linhagem DU145 e a linhagem PC3 apresentam respostas diferentes ao tratamento com naftoquinonas, assim como os resultados obtidos neste estudo, sugerindo que em cada uma destas linhagens possa haver mecanismos celulares e redutases que atuam diferencialmente em cada uma destas (PLANCHON et al., 2001; SUZUKI et al., 2006; ROSS et al., 2011). Além disso, o uso de diferentes concentrações de compostos naturais em diferentes modelos ou linhagens tumorais pode ser justificada pela heterogeneidade tumoral, pela complexidade molecular dos diferentes tipos de tumores (MITRA et al., 2015) , e ainda pela estrutura molecular de cada um dos compostos avaliados.

Em resumo, nossos achados são os primeiros à respeito dos compostos RC10, RCDFC, 3-CH₃ Tiol e 4F-Tiol, reunindo resultados quanto à citotoxicidade, ciclo celular e apoptose em células metastáticas de CaP, sendo ainda o pioneiro no

estudo de moléculas com estrutura não simétrica. Esses resultados propoem esses compostos como possíveis indutores de morte celular apoptótica, além de causarem um acúmulo de células em Sub-G0, que poderia ser indicativo de senescência.

Apesar de nosso estudo apontar compostos inéditos derivados de naftoquinonas como potenciais alvos à terapia, estudos futuros se fazem necessários para uma melhor compreensão sobre os mecanismos moleculares pelos quais as naftoquinonas estudadasno presente trabalho auxiliam na indução de morte celular.

7. CONCLUSÕES

- Dentre as famílias de compostos derivados de naftoquinonas avaliadas, 4 pertencentes às classes das Bis Quinonas e Tióis nomeados de RC10, RCDFC, 3-CH₃ Tiol e 4F-Tiol) foram os que apresentaram efeito citotóxico sobre linhagens celulares metastáticas de CaP, DU145 e PC3;
- Estes 4 compostos promoveram alteração da viabilidade células ao induzir acúmulo de células na fase Sub-G₀ do ciclo celular, bem como induziram apoptose sobre as linhagens celulares metastáticas de CaP DU145 e PC3.
- Este trabalho apresentou as primeiras evidências de que os sintéticos inéditos derivados de naftoquinonas denominados de RC10, RCDFC, 3-CH₃ Tiol e 4F-Tiol apresentam efeito citotóxico sobre células metastáticas de CaP e que estes efeitos parecem ser predominantes em células tumorais de CaP, uma vez que não apresentem os meus efeitos sobre uma linhagem celular endotelial testada no presente estudo.
- Estes achados abrem perspectivas de testagem destes compostos em combinação com demais quimioterápicos em uso clínico no CaP, abrindo perspectivas futuras de otimização dos efeitos citotóxicos destes fármacos.

8. PERSPECTIVAS

Nosso trabalho iniciou os estudos preliminares à respeito dos compostos avaliados, RC10, RCDFC, 3CH3-Tiol e 4F-Tiol, Propomos como perspectivas deste estudo a combinação do uso desses compostos com o quimioterápico padrão da clínica, DXT, a fim de que a combinação dos possíveis mecanismos de ação promovam uma melhoria de seus efeitos citotóxicos.

Propomos ainda avaliação de vias de sinalização, como AKT, avaliação de p53 e PTEN, a fim de avaliar como se comporta a modulação da via e desses genes mediante o tratamento com os compostos selecionados.

9. BIBLIOGRAFIA

ABEDINPOUR, P. et al. Plumbagin improves the efficacy of androgen deprivation therapy in prostate cancer: A pre-clinical study. **The Prostate**, v. 77, n. 16, p. 1550–1562, dez. 2017.

ADAN, A.; KIRAZ, Y.; BARAN, Y. Cell Proliferation and Cytotoxicity Assays. **Current Pharmaceutical Biotechnology**, v. 17, n. 14, p. 1213–1221, 2016.

ALBERTS, B. et al. **Molecular Biology of the Cell**. 4th. ed. [s.l.] Garland Science, 2002.

ANANTHARAMAN, A.; FRIEDLANDER, T. W. Targeting the androgen receptor in metastatic castrate-resistant prostate cancer: A review. **Urologic Oncology**, v. 34, n. 8, p. 356–367, 2016.

ANTONARAKIS, E. S. et al. AR-V7 and resistance to enzalutamide and abiraterone in prostate cancer. **The New England Journal of Medicine**, v. 371, n. 11, p. 1028–1038, 11 set. 2014.

ANTONARAKIS, E. S. et al. Targeting the N-Terminal Domain of the Androgen Receptor: A New Approach for the Treatment of Advanced Prostate Cancer. **The Oncologist**, v. 21, n. 12, p. 1427–1435, dez. 2016.

BALA, S. et al. **Mannich Bases: An Important Pharmacophore in Present Scenario.** Research article. Disponível em: <<https://www.hindawi.com/journals/ijmc/2014/191072/>>. Acesso em: 18 dez. 2018.

BARRY, M. J.; SIMMONS, L. H. Prevention of Prostate Cancer Morbidity and Mortality: Primary Prevention and Early Detection. **The Medical Clinics of North America**, v. 101, n. 4, p. 787–806, jul. 2017.

BELOTSEKOVSKII, B. P.; ARIMONDO, P. B.; COZZARELLI, N. R. Topoisomerase action on short DNA duplexes reveals requirements for gate and transfer DNA segments. **The Journal of Biological Chemistry**, v. 281, n. 35, p. 25407–25415, 1 set. 2006.

BHASIN, D. et al. Anticancer activity and SAR studies of substituted 1,4-naphthoquinones. **Bioorganic & Medicinal Chemistry**, v. 21, n. 15, p. 4662–4669, 1 ago. 2013.

BIANCHINI, D. et al. Antitumour activity of enzalutamide (MDV3100) in patients with metastatic castration-resistant prostate cancer (CRPC) pre-treated with docetaxel and abiraterone. **European Journal of Cancer (Oxford, England: 1990)**, v. 50, n. 1, p. 78–84, jan. 2014.

BOONYALAI, N. et al. Biophysical and molecular docking studies of naphthoquinone derivatives on the ATPase domain of human Topoisomerase II. **Biomedicine & Pharmacotherapy**, v. 67, n. 2, p. 122–128, 1 mar. 2013.

BRANDY, Y. et al. Synthesis and cytotoxic activities of some 2-arylnaphtho[2,3-d]oxazole-4,9-dione derivatives on androgen-dependent (LNCaP) and androgen-independent (PC3) human prostate cancer cell lines. **Investigational New Drugs**, v. 30, n. 4, p. 1709–1714, ago. 2012.

BUBENDORF, L. et al. Metastatic patterns of prostate cancer: an autopsy study of 1,589 patients. **Human Pathology**, v. 31, n. 5, p. 578–583, maio 2000.

CADENAS, E.; HOCHSTEIN, P.; ERNSTER, L. Pro- and antioxidant functions of quinones and quinone reductases in mammalian cells. **Advances in Enzymology and Related Areas of Molecular Biology**, v. 65, p. 97–146, 1992.

Câncer de próstata. Disponível em: <<https://www.inca.gov.br/tipos-de-cancer/cancer-de-prostata>>. Acesso em: 18 mar. 2019.

CATANZARO, E. et al. Natural Products to Fight Cancer: A Focus on Juglans regia. **Toxins**, v. 10, n. 11, 14 nov. 2018.

CHEN, Y. et al. Shikonin inhibits prostate cancer cells metastasis by reducing matrix metalloproteinase-2/-9 expression via AKT/mTOR and ROS/ERK1/2 pathways. **International Immunopharmacology**, v. 21, n. 2, p. 447–455, ago. 2014.

CHEN, Y. et al. Synthesis, biological evaluation and structure-activity relationship studies of isoflavene based Mannich bases with potent anti-cancer activity. **Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters**, v. 25, n. 22, p. 5377–5383, 15 nov. 2015.

CHENG, H. H. et al. Activity of enzalutamide in men with metastatic castration-resistant prostate cancer is affected by prior treatment with abiraterone and/or docetaxel. **Prostate Cancer and Prostatic Diseases**, v. 18, n. 2, p. 122–127, jun. 2015.

CHURCHILL, C. D. M.; KLOBUKOWSKI, M.; TUSZYNSKI, J. A. Elucidating the Mechanism of Action of the Clinically Approved Taxanes: A Comprehensive Comparison of Local and Allosteric Effects. **Chemical Biology & Drug Design**, v. 86, n. 5, p. 1253–1266, 2015.

COELHO-CERQUEIRA, E. et al. Beyond topoisomerase inhibition: antitumor 1,4-naphthoquinones as potential inhibitors of human monoamine oxidase. **Chemical Biology & Drug Design**, v. 83, n. 4, p. 401–410, abr. 2014.

COPELAND, R. L. et al. Cytotoxicity of 2,3-dichloro-5,8-dimethoxy-1,4-naphthoquinone in androgen-dependent and -independent prostate cancer cell lines. **Anticancer Research**, v. 27, n. 3B, p. 1537–1546, jun. 2007.

CORNFORD, P. et al. EAU-ESTRO-SIOG Guidelines on Prostate Cancer. Part II: Treatment of Relapsing, Metastatic, and Castration-Resistant Prostate Cancer. **European Urology**, v. 71, n. 4, p. 630–642, 2017.

COSTA, M. P. et al. Controlled Release of Nor- β -lapachone by PLGA Microparticles: A Strategy for Improving Cytotoxicity against Prostate Cancer Cells. **Molecules (Basel, Switzerland)**, v. 21, n. 7, 2 jul. 2016.

COSTANTINO, L.; BARLOCCO, D. Privileged structures as leads in medicinal chemistry. **Current Medicinal Chemistry**, v. 13, n. 1, p. 65–85, 2006.

DA CRUZ, E. H. G. et al. 1,2,3-triazole-, arylamino- and thio-substituted 1,4-naphthoquinones: potent antitumor activity, electrochemical aspects, and bioisosteric replacement of C-ring-modified lapachones. **Bioorganic & Medicinal Chemistry**, v. 22, n. 5, p. 1608–1619, 1 mar. 2014.

DAMIANI, R. M. et al. Influence of PARP-1 inhibition in the cardiotoxicity of the topoisomerase 2 inhibitors doxorubicin and mitoxantrone. **Toxicology in vitro: an international journal published in association with BIBRA**, v. 52, p. 203–213, out. 2018.

DE MORAES, T. A. P. et al. Synthesis and cytotoxic evaluation of a series of 2-amino-naphthoquinones against human cancer cells. **Molecules (Basel, Switzerland)**, v. 19, n. 9, p. 13188–13199, 26 ago. 2014.

DE, U. et al. Plumbagin from a tropical pitcher plant (*Nepenthes alata* Blanco) induces apoptotic cell death via a p53-dependent pathway in MCF-7 human breast cancer cells. **Food and Chemical Toxicology: An International Journal Published for the British Industrial Biological Research Association**, v. 123, p. 492–500, 17 nov. 2018.

DEBATTISTI, V. et al. ROS Control Mitochondrial Motility through p38 and the Motor Adaptor Miro/Trak. **Cell Reports**, v. 21, n. 6, p. 1667–1680, 7 nov. 2017.

DENIZ, N. G. et al. Design, Synthesis, Biological Evaluation, and Antioxidant and Cytotoxic Activity of Heteroatom-Substituted 1,4-Naphtho- and Benzoquinones. **Chemical & Pharmaceutical Bulletin**, v. 63, n. 12, p. 1029–1039, 2015.

DI ROSSO, M. E. et al. Novel o-naphthoquinones induce apoptosis of EL-4 T lymphoma cells through the increase of reactive oxygen species. **Toxicology in Vitro**, v. 27, n. 7, p. 2094–2104, 1 out. 2013.

DOLAN, M. E. et al. Effects of 1,2-naphthoquinones on human tumor cell growth and lack of cross-resistance with other anticancer agents. **Anti-cancer drugs**, v. 9, n. 5, p. 437–448, jun. 1998.

FERREIRA, S. B. et al. beta-Lapachona: Sua Importância em Química Medicinal e Modificações Estruturais. **Revista Virtual de Química**, v. 2, n. 2, p. 140–160, 1 out. 2010.

FRANCO, Y. L.; VAIDYA, T. R.; AIT-LOUDHIA, S. Anticancer and cardio-protective effects of liposomal doxorubicin in the treatment of breast cancer. **Breast Cancer : Targets and Therapy**, v. 10, p. 131–141, 11 set. 2018.

FRASINYUK, M. S. et al. Application of Mannich bases to the synthesis of hydroxymethylated isoflavonoids as potential antineoplastic agents. **Organic & Biomolecular Chemistry**, v. 13, n. 46, p. 11292–11301, 14 dez. 2015.

GARA, R. K. et al. Shikonin selectively induces apoptosis in human prostate cancer cells through the endoplasmic reticulum stress and mitochondrial apoptotic pathway. **Journal of Biomedical Science**, v. 22, p. 26, 1 abr. 2015.

GIRI, V. N.; BEEBE-DIMMER, J. L. Familial prostate cancer. **Seminars in Oncology**, v. 43, n. 5, p. 560–565, out. 2016.

GOPINATH, P. et al. Understanding and predicting the potency of ROS-based enzyme inhibitors, exemplified by naphthoquinones and ubiquitin specific protease-2 †Electronic supplementary information (ESI) available: All experimental procedures, analytical data for small molecules. See DOI: 10.1039/c6sc02758j Click here for additional data file. **Chemical Science**, v. 7, n. 12, p. 7079–7086, 1 dez. 2016.

GRACIANI, F. S.; XIMENES, V. F. 2-Bromo-1,4-naphthoquinone: a potentially improved substitute of menadione in Apatone™ therapy. **Brazilian Journal of Medical and Biological Research**, v. 45, n. 8, p. 701–710, 18 maio 2012.

GURBANI, D. et al. Mechanism of inhibition of the ATPase domain of human topoisomerase II α by 1,4-benzoquinone, 1,2-naphthoquinone, 1,4-naphthoquinone, and 9,10-phenanthroquinone. **Toxicological Sciences: An Official Journal of the Society of Toxicology**, v. 126, n. 2, p. 372–390, abr. 2012.

HAFEEZ, B. B. et al. Plumbagin, a medicinal plant (*Plumbago zeylanica*)-derived 1,4-naphthoquinone, inhibits growth and metastasis of human prostate cancer PC-3M-luciferase cells in an orthotopic xenograft mouse model. **Molecular Oncology**, v. 7, n. 3, p. 428–439, jun. 2013.

HAFEEZ, B. B. et al. Plumbagin Inhibits Prostate Carcinogenesis in Intact and Castrated PTEN Knockout Mice via Targeting PKC ϵ , Stat3, and Epithelial-to-Mesenchymal Transition Markers. **Cancer Prevention Research (Philadelphia, Pa.)**, v. 8, n. 5, p. 375–386, maio 2015.

HEIDENREICH, A. et al. EAU guidelines on prostate cancer. Part II: Treatment of advanced, relapsing, and castration-resistant prostate cancer. **European Urology**, v. 65, n. 2, p. 467–479, fev. 2014.

HILLARD, E. A. et al. Electrochemical parameters and techniques in drug development, with an emphasis on quinones and related compounds. **Chemical Communications (Cambridge, England)**, n. 23, p. 2612–2628, 21 jun. 2008.

HUANG, H. et al. Plumbagin Triggers ER Stress-Mediated Apoptosis in Prostate Cancer Cells via Induction of ROS. **Cellular Physiology and Biochemistry: International Journal of Experimental Cellular Physiology, Biochemistry, and Pharmacology**, v. 45, n. 1, p. 267–280, 2018.

ISLAM, M. T. et al. Anticancer activity of thymol: A literature-based review and docking study emphasized on its anticancer mechanisms. **IUBMB life**, 11 out. 2018.

JANG, S. Y. et al. Shikonin inhibits the growth of human prostate cancer cells via modulation of the androgen receptor. **International Journal of Oncology**, v. 44, n. 5, p. 1455–1460, maio 2014.

JARDIM, G. A. M. et al. Synthesis of Selenium-Quinone Hybrid Compounds with Potential Antitumor Activity via Rh-Catalyzed C-H Bond Activation and Click Reactions. **Molecules (Basel, Switzerland)**, v. 23, n. 1, 30 dez. 2017.

KANAAN, Y. M. et al. Cytotoxic effects of N-(3-chloro-1,4-dioxo 1,4-dihydro-naphthalen-2-yl)-benzamide on androgen-dependent and -independent prostate cancer cell lines. **Anticancer Research**, v. 30, n. 2, p. 519–527, fev. 2010.

KAWIAK, A.; LOJKOWSKA, E. Ramentaceone, a Naphthoquinone Derived from *Drosera* sp., Induces Apoptosis by Suppressing PI3K/Akt Signaling in Breast Cancer Cells. **PloS One**, v. 11, n. 2, p. e0147718, 2016.

KEE, J.-Y. et al. β -Lapachone Inhibits Lung Metastasis of Colorectal Cancer by Inducing Apoptosis of CT26 Cells. **Integrative Cancer Therapies**, 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, p. e0176937, 2017b.

KINTZEL, P. E.; MICHAUD, L. B.; LANGE, M. K. Docetaxel-associated epiphora. **Pharmacotherapy**, v. 26, n. 6, p. 853–867, jun. 2006.

KOVACIC, P.; SOMANATHAN, R. Recent developments in the mechanism of anticancer agents based on electron transfer, reactive oxygen species and oxidative stress. **Anti-Cancer Agents in Medicinal Chemistry**, v. 11, n. 7, p. 658–668, set. 2011.

KUMAR, B. S. et al. Synthesis of pharmacologically important naphthoquinones and anticancer activity of 2-benzyllawsone through DNA topoisomerase-II inhibition. **Bioorganic & Medicinal Chemistry**, v. 25, n. 4, p. 1364–1373, 15 2017.

LAUER, R. C. et al. Drug design strategies for the treatment of prostate cancer. **Expert Opinion on Drug Discovery**, v. 10, n. 1, p. 81–90, jan. 2015.

LERNOUX, M. et al. Anti-cancer effects of naturally derived compounds targeting histone deacetylase 6-related pathways. **Pharmacological Research**, v. 129, p. 337–356, 2018.

LI, C. J. et al. Potent inhibition of tumor survival in vivo by beta-lapachone plus taxol: combining drugs imposes different artificial checkpoints. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 96, n. 23, p. 13369–13374, 9 nov. 1999.

LI, Y. et al. Selective killing of cancer cells by beta -lapachone: direct checkpoint activation as a strategy against cancer. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 100, n. 5, p. 2674–2678, 4 mar. 2003.

LIU, W.-Q. et al. NRPa-308, a new neuropilin-1 antagonist, exerts in vitro anti-angiogenic and anti-proliferative effects and in vivo anti-cancer effects in a mouse xenograft model. **Cancer Letters**, v. 414, p. 88–98, 01 2018.

LIU, Y. et al. Anticancer Properties and Pharmaceutical Applications of Plumbagin: A Review. **The American Journal of Chinese Medicine**, v. 45, n. 3, p. 423–441, 2017.

LU, C. et al. Hygrocins C-G, cytotoxic naphthoquinone ansamycins from gdmAl-disrupted *Streptomyces* sp. LZ35. **Journal of Natural Products**, v. 76, n. 12, p. 2175–2179, 27 dez. 2013.

LYNCH, H. T. et al. Screening for familial and hereditary prostate cancer. **International Journal of Cancer**, v. 138, n. 11, p. 2579–2591, 1 jun. 2016.

MAHAL, K. et al. Improved anticancer and antiparasitic activity of new lawsone Mannich bases. **European Journal of Medicinal Chemistry**, v. 126, p. 421–431, 27 jan. 2017.

MITRA, A. K. et al. Novel delivery approaches for cancer therapeutics. **Journal of Controlled Release: Official Journal of the Controlled Release Society**, v. 219, p. 248–268, 10 dez. 2015.

MONKS, T. J.; JONES, D. C. The metabolism and toxicity of quinones, quinonimines, quinone methides, and quinone-thioethers. **Current Drug Metabolism**, v. 3, n. 4, p. 425–438, ago. 2002.

NAGATA, K. et al. Antimicrobial Activity of Novel Furanonaphthoquinone Analogs. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v. 42, n. 3, p. 700–702, 1 mar. 1998.

NEMOTO, K. et al. Activation of the Raf-1/MEK/Erk kinase pathway by a novel Cdc25 inhibitor in human prostate cancer cells. **The Prostate**, v. 58, n. 1, p. 95–102, 2004.

NEMOTO, K. G2/M accumulation in prostate cancer cell line PC-3 is induced by Cdc25 inhibitor 7-chloro-6-(2-morpholin-4-ylethylamino) quinoline-5, 8-dione (DA 3003-2). **Experimental and Therapeutic Medicine**, v. 1, n. 4, p. 647–650, 1 jul. 2010.

NEVES, A. P. et al. Dinuclear copper(II) complexes of a novel 3-(aminomethyl)naphthoquinone Mannich base: Synthesis, structural, magnetic and electrochemical studies. **Polyhedron**, v. 29, n. 15, p. 2884–2891, 14 out. 2010a.

NEVES, A. P. et al. Novel platinum(II) complexes of 3-(aminomethyl)naphthoquinone Mannich bases: synthesis, crystal structure and cytotoxic activities. **Dalton Transactions**, v. 39, n. 42, p. 10203–10216, 19 out. 2010b.

NEVES, A. P. et al. Exploring the DNA binding/cleavage, cellular accumulation and topoisomerase inhibition of 2-hydroxy-3-(aminomethyl)-1,4-naphthoquinone Mannich bases and their platinum(II) complexes. **Journal of Inorganic Biochemistry**, v. 119, p. 54–64, 2013.

PENNING, T. M. et al. Dihydrodiol dehydrogenases and polycyclic aromatic hydrocarbon activation: generation of reactive and redox active o-quinones. **Chemical Research in Toxicology**, v. 12, n. 1, p. 1–18, jan. 1999.

PEZARO, C.; WOO, H. H.; DAVIS, I. D. Prostate cancer: measuring PSA. **Internal Medicine Journal**, v. 44, n. 5, p. 433–440, maio 2014.

PIDUGU, L. S. M. et al. A direct interaction between NQO1 and a chemotherapeutic dimeric naphthoquinone. **BMC Structural Biology**, v. 16, n. 1, p. 1, 28 jan. 2016.

PIERPAOLI, E. et al. Antitumor activity of NAX060: A novel semisynthetic berberine derivative in breast cancer cells. **BioFactors**, v. 44, n. 5, p. 443–452, 1 set. 2018.

PLANCHON, S. M. et al. beta-Lapachone-induced apoptosis in human prostate cancer cells: involvement of NQO1/xip3. **Experimental Cell Research**, v. 267, n. 1, p. 95–106, 1 jul. 2001.

PRASAD, C. V. et al. Novel menadione hybrids: Synthesis, anticancer activity, and cell-based studies. **Chemical Biology & Drug Design**, v. 91, n. 1, p. 220–233, jan. 2018.

ROSS, A. E. et al. Dimeric naphthoquinones, a novel class of compounds with prostate cancer cytotoxicity. **BJU international**, v. 108, n. 3, p. 447–454, ago. 2011.

SALUSTIANO, E. J. S. et al. Comparison of the cytotoxic effect of lapachol, alpha-lapachone and pentacyclic 1,4-naphthoquinones on human leukemic cells. **Investigational New Drugs**, v. 28, n. 2, p. 139–144, abr. 2010.

SERUGA, B.; OCANA, A.; TANNOCK, I. F. Drug resistance in metastatic castration-resistant prostate cancer. **Nature Reviews. Clinical Oncology**, v. 8, n. 1, p. 12–23, jan. 2011.

SILVA, M. N. DA; FERREIRA, V. F.; SOUZA, M. C. B. V. DE. An overview of the chemistry and pharmacology of naphthoquinones with emphasis on beta-lapachone and derivatives. **Química Nova**, v. 26, n. 3, p. 407–416, maio 2003.

SILVA, W. A. DA et al. **Synthesis of new naphthotriazoles derived from juglone as anticancer agents**. Blucher Chemistry Proceedings. **Anais...** In: BRAZILIAN MEETING ON ORGANIC SYNTHESIS 2013. 2013Disponível em: <<http://www.proceedings.blucher.com.br/article-details/8331>>. Acesso em: 18 dez. 2018

SILVA, T. M. S. et al. Molluscicidal activity of synthetic lapachol amino and hydrogenated derivatives. **Bioorganic & Medicinal Chemistry**, v. 13, n. 1, p. 193–196, 3 jan. 2005.

SILVERS, M. A. et al. The NQO1 bioactivatable drug, β -lapachone, alters the redox state of NQO1+ pancreatic cancer cells, causing perturbation in central carbon metabolism. **The Journal of Biological Chemistry**, v. 292, n. 44, p. 18203–18216, 03 2017.

SINGH, S. K.; LILLARD, J. W.; SINGH, R. Molecular basis for prostate cancer racial disparities. **Frontiers in Bioscience (Landmark Edition)**, v. 22, p. 428–450, 01 2017.

STASIEWICZ, D. et al. [Epidemiology and risk factors of the prostate cancer]. **Polski Merkuriusz Lekarski: Organ Polskiego Towarzystwa Lekarskiego**, v. 33, n. 195, p. 163–167, set. 2012.

SUZUKI, M. et al. Synergistic effects of radiation and beta-lapachone in DU-145 human prostate cancer cells in vitro. **Radiation Research**, v. 165, n. 5, p. 525–531, maio 2006.

THOMSEN, F. B. et al. Enzalutamide treatment in patients with metastatic castration-resistant prostate cancer progressing after chemotherapy and abiraterone acetate. **Scandinavian Journal of Urology**, v. 48, n. 3, p. 268–275, jun. 2014.

WANG, Z. et al. Artesunate Suppresses the Growth of Prostatic Cancer Cells through Inhibiting Androgen Receptor. **Biological & Pharmaceutical Bulletin**, v. 40, n. 4, p. 479–485, 2017.

WIENCH, B. et al. **Shikonin Directly Targets Mitochondria and Causes Mitochondrial Dysfunction in Cancer Cells**. Research article. Disponível em: <<https://www.hindawi.com/journals/ecam/2012/726025/>>. Acesso em: 4 dez. 2018.

XU, H. et al. Inhibitory effects of lapachol on rat C6 glioma in vitro and in vivo by targeting DNA topoisomerase I and topoisomerase II. **Journal of experimental & clinical cancer research: CR**, v. 35, n. 1, p. 178, 16 2016.

YANG, F. et al. SH-7, a new synthesized shikonin derivative, exerting its potent antitumor activities as a topoisomerase inhibitor. **International Journal of Cancer**, v. 119, n. 5, p. 1184–1193, 1 set. 2006.

YANG, Y. et al. β -lapachone suppresses tumour progression by inhibiting epithelial-to-mesenchymal transition in NQO1-positive breast cancers. **Scientific Reports**, v. 7, n. 1, p. 2681, 02 2017.

YAO, A. et al. Contemporary spinal oncology treatment paradigms and outcomes for metastatic tumors to the spine: A systematic review of breast, prostate, renal, and

lung metastases. **Journal of Clinical Neuroscience: Official Journal of the Neurosurgical Society of Australasia**, v. 41, p. 11–23, jul. 2017.

ZHAI, T. et al. Shikonin induces apoptosis and G0/G1 phase arrest of gallbladder cancer cells via the JNK signaling pathway. **Oncology Reports**, v. 38, n. 6, p. 3473–3480, dez. 2017.