



UNIVERSIDADE FEDERAL DO CEARÁ
PRÓ-REITORIA DE PESQUISA E PÓS-GRADUAÇÃO
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM BIOTECNOLOGIA - RENORBIO

PEDRO MIKAEL DA SILVA COSTA

**INVESTIGAÇÃO DA ENZIMA NAD(P)H QUINONA DESIDROGENASE 1 (NQO1)
RECOMBINANTE COMO ALVO MOLECULAR DA NAFTOQUINONA RCDFC NA
AÇÃO CITOTÓXICA CONTRA CÉLULAS DE CÂNCER DE PULMÃO**

FORTALEZA

2024

PEDRO MIKAEL DA SILVA COSTA

INVESTIGAÇÃO DA ENZIMA NAD(P)H QUINONA DESIDROGENASE 1 (NQO1)
RECOMBINANTE COMO ALVO MOLECULAR DA NAFTOQUINONA RCDFC NA
AÇÃO CITOTÓXICA CONTRA CÉLULAS DE CÂNCER DE PULMÃO

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia da Rede Nordeste de Biotecnologia (RENORBIO) nucleado na Universidade Federal do Ceará, como requisito à obtenção do título de Doutor em Biotecnologia. Área de concentração: Biotecnologia em Saúde.

Orientadora: Dra. Claudia do Ó Pessoa
Coorientador: Dr. Carlos Roberto Koscky Paier

FORTALEZA

2024

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação
Universidade Federal do Ceará
Sistema de Bibliotecas

Gerada automaticamente pelo módulo Catalog, mediante os dados fornecidos pelo(a) autor(a)

- C875i Costa, Pedro Mikael da Silva.
Investigação da enzima NAD(P)H quinona desidrogenase 1 (NQO1) recombinante como alvo molecular da naftoquinona RCDFC na ação citotóxica contra células de câncer de pulmão / Pedro Mikael da Silva Costa. – 2024.
126 f. : il. color.
- Tese (doutorado) – Universidade Federal do Ceará, Pró-Reitoria de Pesquisa e Pós-Graduação, Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia (Rede Nordeste de Biotecnologia), Fortaleza, 2024.
Orientação: Profa. Dra. Cláudia do Ó Pessoa.
Coorientação: Prof. Dr. Carlos Roberto Koscky Paier.
1. Naftoquinona;. 2. Agente citotóxico;. 3. Quinona redutase;. 4. Estresse oxidativo.. I. Título.
CDD 660.6
-

PEDRO MIKAEL DA SILVA COSTA

INVESTIGAÇÃO DA ENZIMA NAD(P)H QUINONA DESIDROGENASE 1 (NQO1)
RECOMBINANTE COMO ALVO MOLECULAR DA NAFTOQUINONA RCDFC NA
AÇÃO CITOTÓXICA CONTRA CÉLULAS DE CÂNCER DE PULMÃO

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia da Rede Nordeste de Biotecnologia (RENORBIO) nucleado na Universidade Federal do Ceará, como requisito à obtenção do título de Doutor em Biotecnologia. Área de concentração: Biotecnologia em Saúde.

Aprovado em 24/04/2024

BANCA EXAMINADORA

Profª Drª Cláudia do Ó Pessoa (Orientadora)
Universidade Federal do Ceará (UFC)

Profª Drª Cristiana Libardi Miranda Furtado
Universidade de Fortaleza (UNIFOR)

Prof. Dr. Roner Ferreira da Costa
Universidade Federal Rural do Semi-Árido (UFERSA)

Prof. Dr. Ronaldo Alves Pinto Nagem
Universidade Federal de Minas Gerais (UFMG)

Prof. Dr. Vitor Francisco Ferreira
Universidade Federal Fluminense (UFF)

Dedico esse trabalho à toda a minha família,
pois foram meu suporte nos momentos mais
desafiadores. Vocês fazem parte dessa
conquista!

AGRADECIMENTOS

À Prof^ª Dr^ª Claudia Pessoa pela disponibilidade na orientação da tese, por acreditar no meu potencial e por dar suporte para o meu aperfeiçoamento profissional. Muito obrigado!

Ao Prof. Dr. Carlos Paier, pela coorientação, pela paciência, pelos muitos conhecimentos repassados e pelo aprendizado contínuo durante as dificuldades e também nas vitórias.

Ao Prof. Dr. Victor Ferreira da Universidade Federal Fluminense, pela síntese, purificação e fornecimento da RCDFC, que possibilitou o desenvolvimento desse trabalho.

À Prof^ª Dr^ª Cristiana Libardi, pela amizade, colaboração e por me apresentar ao “epimundo”.

Ao Prof. Dr. Ronaldo Nagem da Universidade Federal de Minas Gerais, pela disponibilidade em ajudar nos estudos de interação proteína-ligante.

Aos pesquisadores Prof. Dr. Eufrânio Nunes (UFMG), Prof^ª Dr^ª Nágila Ricardo (UFC), Dr^ª Louhana Rebouças e Prof. Elcio Barros (IFMA), pela frutífera colaboração científica ao longo desses últimos quatro anos.

Aos professores do Grupo de Bioinorgânica (UFC), Prof. Dr. Luiz Lopes, Prof. Dr. Eduardo Sousa e Prof^ª Izaura Diógenes, pela abertura e suporte para realização dos experimentos de fluorescência e de dicroísmo circular.

Aos queridos amigos que fiz durante o doutorado, Celina Guimarães, Bruno Rodrigues e Sarah Leyenne. Muito obrigado pela amizade, pelo encorajamento, pela nossa feliz convivência e por compartilharmos cada momento. Vocês fizeram com que essa jornada fosse mais leve!

Aos estudantes de iniciação científica João Victor, Mariana Manso, Jéssica e Fernanda Guerra pela oportunidade de repassar e discutir ensinamentos, pela grande ajuda nos experimentos, e pelos momentos de descontração.

Aos demais doutorandos do Laboratório de Oncologia Experimental, Renan Santos, José Neto, Nathaly Mendoza, Fernanda Madrid, Daisy Jereissati, Gabriel Gusmão, Lina Castelo, Maria da Conceição, Eduardo Moraes e Davi Nascimento, pela troca de experiências.

Aos mestrandos Gabriel Caetano e Melquisedeque Viana, pela convivência.

À pós-doc Sarah Sant’Ana, pela ajuda nos experimentos de citometria de fluxo e nas valiosas discussões científicas.

À técnica Silvana França, por toda a ajuda nos experimentos com cultura de células, pela ajuda na aquisição de insumos e reagentes e pela organização das inúmeras festinhas.

À Fundação Cearense de Apoio ao Desenvolvimento Científico e Tecnológico (Funcap), pelos auxílios financeiros que permitiram a realização deste trabalho.

Aos meus pais, Iramar e Ronaldo, por me amarem e acreditarem na minha educação e no meu conhecimento. Amo vocês infinitamente!

Aos meus irmãos, Miqueias e Rafael, por todos os momentos que compartilhamos juntos.

Aos meus avós *in memoriam* Arnolando, Pedroca e Nenem, por me ensinarem a importância de amar e ser amado.

À minha avó Neide Monteiro, por me dar carinho, transmitir paz e dar suporte à minha formação como pessoa e como profissional. Te amo!

Aos meus tios e tias, Imaculada, Fátima, Irismar, Anísio, Tino, Auristela, Bona, Maria, Chico, Aderson, Glória, Mônica, Teixeira, Carla, Neuma, Teta, Obadias, Mauro e Nazaré por me receberem tão bem em suas casas.

Aos primos Jordânia, Bianca, Beatriz, Felipe, Nitinha, Carlim, Alexandre, Jorge, Lucas, Sarah, Roberto, Rellma, Rennon, Juliana, Julim, Abdias, Kaylane, Kauany, Mateus, Jonas, Andressa, Sabrina, Samantha, Tiago, Leandro, Keninha, Paulo Henrique e Paula Érica, pelas risadas, pelas festas e momentos de alegria.

Aos amigos Jocélia, Melissa, Diana, Alan, Hiago, Clarisse, Ernando, Eliziane, Ana Karla, Diene, Marcia, Ana, Cleane, Rita e Tarciane por torcerem para o meu bem e a minha felicidade.

Aos eternos amigos da Bioinorgânica Carlos, Wellinson, Vivânia, Gilmara, Auri, Ednilton e Caio, pela oportunidade de discutir ciência enquanto nos divertimos.

Aos icônicos amigos Carol Viana, Allandeiverson, Alice e Iago Torres por darmos nosso nome nos rolês dessa cidade.

À amiga Mayara Amélia e sua família: Maria Flor, Yago, Dona Francisca e meu afilhado João Batista, pelos afetos compartilhados.

A todas as pessoas que diretamente ou indiretamente contribuíram para realização deste trabalho.

“We keep moving forward, opening new doors,
and doing new things, because we're curious
and curiosity keeps leading us down new
paths.”

Walt Disney

RESUMO

O acúmulo de mutações e modificações epigenéticas em células neoplásicas confere características como a sinalização sustentada para proliferação, resistência à morte celular e reprogramação metabólica. Devido ao estado pró-oxidativo, uma das estratégias que as células tumorais utilizam para resistirem ao incremento de espécies reativas de oxigênio é o aumento da expressão de enzimas antioxidantes, como a NAD(P)H-Quinona Oxidorredutase 1 (NQO1). A enzima NQO1 catalisa a conversão de quinonas a semiquinonas protegendo a célula contra o estresse oxidativo, encontrando-se superexpressa em tumores sólidos como o câncer de pulmão, mama e próstata. Esse trabalho buscou compreender a interação da proteína NQO1 com a naftoquinona RCDFC. A proteína NQO1 recombinante foi produzida utilizando *Escherichia coli* como plataforma de expressão e purificada por IMAC seguida de SEC, sendo caracterizada por SDS-PAGE e DLS. A avaliação da interação NQO1-RCDFC ocorreu por ensaio enzimático ponto final, ensaio de monitoramento do consumo de NADH, fluorimetria diferencial de varredura, avaliação da fluorescência intrínseca do triptofano e avaliação de estrutura secundária por dicroísmo circular. Além disso, foi dado início nos ensaios de cristalografia de proteínas. O efeito antineoplásico da RCDFC foi investigado utilizando o ensaio do MTT, avaliação da morfologia celular, viabilidade celular, ciclo celular, formação de ERO, e expressão de DNA metil-transferases (DNMTs). Também foi avaliado se a RCDFC causa hemólise de eritrócitos. A proteína NQO1 foi obtida com rendimento de 1 mg/L de cultura e 80 % monodispersa. Foi demonstrado que a RCDFC inibe a atividade enzimática da NQO1, diminui o consumo de NADH, aumenta a T_m , altera a conformação de estruturas secundárias e modifica o ambiente químico dos triptofanos. O valor de K_d da RCDFC em interação com a NQO1 foi estimado como 0,28 μM , sendo menor que o K_d do ligante controle dicumarol (0,48 μM). O ensaio do MTT mostrou que a RCDFC possui efeito antineoplásico em linhagens de tumores sólidos e tumores hematológicos. Foi demonstrado que a RCDFC causa condensação de cromatina, perda de conteúdo citoplasmático, retração do volume celular e vacuolização citoplasmática em células de câncer de pulmão A549. Nessas células a RCDFC exerce efeito citostático com parada de ciclo celular nas fases G1 e S, acúmulo de ERO e redução da expressão gênica de *DNMT1* e *DNMT2*. A RCDFC apresentou baixo potencial hemolítico em eritrócitos de camundongos. A inibição da NQO1 pela naftoquinona RCDFC se apresenta como uma estratégia promissora para a terapia farmacológica alvo-dirigida no combate ao câncer de pulmão.

Palavras-chave: naftoquinona; agente citotóxico; quinona redutase; estresse oxidativo.

ABSTRACT

Accumulation of mutations and epigenetic modifications in neoplastic cells confers characteristics such as sustained signaling for proliferation, resistance to cell death and metabolic reprogramming. Due to the pro-oxidative state, one of the strategies that tumor cells use to resist reactive oxygen species increasing is the expression of antioxidant enzymes, such as NAD(P)H-Quinone Oxidoreductase 1 (NQO1). The enzyme NQO1 catalyzes the conversion of quinones to semiquinones, protecting the cell against oxidative stress, and is overexpressed in solid tumors such as lung, breast and prostate cancer. This study sought to understand the interaction between NQO1 protein and the naphthoquinone RCDFC. Recombinant NQO1 protein was produced using *Escherichia coli* as expression platform, purified by IMAC followed by SEC and characterized by SDS-PAGE and DLS. The NQO1-RCDFC interaction was evaluated by end-point enzyme assay, NADH consumption monitoring assay, differential scanning fluorimetry, evaluation of intrinsic tryptophan fluorescence and secondary structure evaluation using circular dichroism. Protein crystallography tests were also started. The antineoplastic effect of RCDFC was investigated using the MTT assay, evaluation of cell morphology, membrane integrity, cell viability, cell cycle, ROS formation, and expression of DNMTs. It was also assessed whether RCDFC causes erythrocyte hemolysis. The NQO1 protein was obtained with a yield of 1 mg/L of culture and 80% monodisperse. It was shown that RCDFC inhibits the enzymatic activity of NQO1, decreases NADH consumption, increases T_m , alters conformation of secondary structures and modifies tryptophans chemical environment. The K_d value of RCDFC interacting with NQO1 was estimated at 0.28 μM , lower than the K_d of the control ligand dicumarol (0.48 μM). The MTT assay showed that RCDFC has antineoplastic effect on solid tumor cell lines and hematological tumors. RCDFC has been shown to cause chromatin condensation, loss of cytoplasmic content, cell volume shrinkage and cytoplasmic vacuolization in A549 lung cancer cells. In these cells, RCDFC exerts a cytostatic effect with cell cycle arrest in the G1 and S phases, accumulation of ROS and reduction of *DNMT1* and *DNMT2* gene expression. RCDFC showed low hemolytic potential in mouse erythrocytes. The inhibition of NQO1 by the naphthoquinone RCDFC appears to be a promising strategy for target-directed pharmacological therapy in the fight against lung cancer.

Keywords: naphthoquinone; citotoxic agent; quinone reductase; oxidative stress.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1	– Origem e evolução das neoplasias.....	21
Figura 2	– Propriedades distintivas do câncer.....	23
Figura 3	– Representação esquemática de algumas modificações epigenéticas.....	24
Figura 4	– Distribuição da incidência (A) e mortalidade (B) dos diversos tipos de câncer no mundo no ano de 2020, considerando ambos os sexos e todas as idades.....	24
Figura 5	– Mecanismo da ativação de genes antioxidantes pelo fator de transcrição Nfr2.....	28
Figura 6	– Estrutura cristalográfica da NQO1 humana em complexo com FAD.....	29
Figura 7	– Ciclo Catalítico da NQO1.....	31
Figura 8	– Funções celulares relacionadas à proteína NQO1.....	32
Figura 9	– Classificação das quinonas de acordo com estrutura química.....	34
Figura 10	– Naftoquinonas com atividade antineoplásica.....	35
Figura 11	– Estrutura química da RCDFC.....	37
Figura 12	– Estudo do efeito citotóxico da RCDFC.....	39
Figura 13	– Produção da NQO1 recombinante e avaliação da interação NQO1-RCDFC.....	39
Figura 14	– Sequência codificante em formato FASTA da construção recombinante da isoforma a da proteína NQO1.....	45
Figura 15	– Mapa do vetor pET28a(+)......	46
Figura 16	– Perfil citotóxico da RCDFC em linhagem não-tumoral e em diferentes linhagens tumorais após 72 h.....	56
Figura 17	– Curva de inibição do crescimento celular da RCDFC na linhagem tumoral A549 após 72 h.....	56
Figura 18	– Micrografias de células A549 após 48 h de tratamento com RCDFC.....	57
Figura 19	– Efeito da RCDFC sobre a viabilidade celular após 12 h.....	59
Figura 20	– Efeito da RCDFC sobre a viabilidade celular após 24 h.....	60
Figura 21	– Efeito da RCDFC sobre a viabilidade celular após 48 h.....	61
Figura 22	– Monitoramento do número total de células A549 após tratamento com RCDFC.....	62
Figura 23	– Ciclo celular da linhagem A549 após 24 h de tratamento com RCDFC...	63
Figura 24	– Ciclo celular da linhagem A549 após 48 h de tratamento com RCDFC...	64

Figura 25	– Expressão dos genes <i>DNMT1</i> , <i>DNMT2</i> , <i>DNMT3A</i> e <i>DNMT3B</i> em células A549 após 48 h de tratamento com RCDFC.....	65
Figura 26	– Efeito da RCDFC na produção de ERO em células A549 após 3 h de incubação.....	66
Figura 27	– Atividade hemolítica da RCDFC em eritrócitos de camundongos (<i>Mus musculus</i>) após 60 minutos de incubação.....	67
Figura 28	– Cromatograma da purificação da proteína NQO1 recombinante por IMAC.....	68
Figura 29	– Perfil eletroforético das frações obtidas durante a purificação da proteína NQO1 recombinante por IMAC.....	69
Figura 30	– Cromatograma da purificação da proteína NQO1 recombinante por SEC.....	70
Figura 31	– Perfil eletroforético das frações obtidas durante a purificação da proteína NQO1 recombinante por SEC.....	70
Figura 32	– Curva de padrão de albumina sérica bovina.....	71
Figura 33	– Efeito da RCDFC na atividade enzimática da NQO1.....	72
Figura 34	– Efeito da RCDFC no consumo de NADH pela NQO1 durante 1 h.....	73
Figura 35	– Efeito da RCDFC sobre a estabilidade térmica da NQO1.....	73
Figura 36	– Efeito da RCDFC na emissão de fluorescência dos triptofanos presentes na NQO1.....	74
Figura 37	– Fluorescência intrínseca da NQO1 após titulação com RCDFC e DIC....	75
Figura 38	– Espectros de dicroísmo circular da NQO1 e RCDFC na região UV distante.....	76
Figura 39	– Estabilidade térmica da NQO1 na presença da RCDFC monitorada por dicroísmo circular na região UV distante.....	77
Figura 40	– Perfil eletroforético da NQO1 após a remoção da cauda de histidina.....	78
Figura 41	– Cromatograma da purificação da proteína NQO1 recombinante por SEC após digestão com protease TEV.....	79
Figura 42	– Distribuição de tamanho das partículas proteicas por intensidade (A) e volume (B).....	80
Figura 43	– Microcristais da proteína NQO1 obtidos em diferentes condições.....	82
Figura 44	– Sítio catalítico da NQO1.....	84
Figura 45	– Ligação do dicumarol com a NQO1.....	87

Figura 46	– Ligação da naftoquinona E6a com a NQO1.....	88
Figura 47	– Estrutura química de inibidores da proteína NQO1.....	90
Figura 48	– Morfologia de células com deleção de NQO1 e p53.....	98
Figura 49	– Principais achados durante a realização desse trabalho.....	101

LISTA DE TABELAS

Tabela 1	– Estimativas de distribuição dos dez tipos de câncer mais incidentes no Brasil para o ano de 2023 (excluindo o câncer de pele não melanoma).....	25
Tabela 2	– Proteínas que são protegidas pela NQO1 contra a degradação proteassomal.....	32
Tabela 3	– Efeito citotóxico da RCDFC em linhagens de tumores sólidos, tumores hematológicos e em linhagem não-tumoral após 72 h de incubação.....	54
Tabela 4	– Valores de Índice de Seletividade da RCDFC em diferentes linhagens tumorais.....	55
Tabela 5	– Percentual de estrutura secundária da NQO1 na ausência e presença de RCDFC.....	76
Tabela 6	– Parâmetros obtidos durante o ensaio de DLS com a proteína NQO1 sem his-tag.....	80
Tabela 7	– Condições cristalizáveis para a proteína NQO1.....	81
Tabela 8	– Expressão gênica de NQO1 nas linhagens tumorais utilizadas nesse estudo.....	93

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

ANOVA	análise de variância
APS	persulfato de amônio
ARE	<i>antioxidant response element</i>
AU	unidades arbitrárias
AZA	azacitidina
BAX	<i>Bcl-2-associated X protein</i>
BCA	<i>bicinchoninic acid assay</i>
BCL-2	<i>B-cell lymphoma 2 protein</i>
BSA	<i>bovine serum albumin</i>
C-	controle negativo
CAT	catalase
CD	<i>circular dichroism</i>
cDNA	DNA complementar
céls/mL	células por mililitro
CEUA	comissão de ética no uso de animais
CI ₅₀	concentração inibitória média
CM-H2DCFDA	5-(6)-clorometil-2',7'-diclorodihidrofluoresceína
CNPEM	Centro Nacional de Pesquisa em Energia e Materiais
CV	volume de coluna
DIC	dicumarol
DLS	<i>dynamic light scattering</i>
DMEM	<i>Dulbecco's Modified Eagle Medium</i>
DMSO	dimetilsulfóxido
DNA	ácido desoxirribonucléico
DNMT	DNA metil transferase
DNMT1	DNA metil transferase 1
DNMT2	DNA metil transferase 2
DNMT3A	DNA metil transferase 3A
DNMT3B	DNA metil transferase 3B
DO ₆₀₀	densidade óptica a 600 nm
DOX	doxorrubicina

DP	Desvio Padrão
DTT	ditiotreitól
E.P.M.	erro padrão da média
EORTC	<i>European Organization for Research and Treatment of Cancer</i>
ERO	espécie reativas de oxigênio
EUA	Estados Unidos da América
FAD	dinucleotídeo flavina adenina
FADH ₂	dinucleotídeo flavina adenina reduzido
FDA	<i>Food and Drug Administration</i>
FF	<i>fast flow</i>
FPLC	<i>fast protein liquid chromatography</i>
GCL	glutamina-cisteína ligase
GPx	glutaciona peroxidase
GR	glutaciona redutase
GS	glutaciona sintetase
GST	glutaciona S-transferase
GST	glutaciona transferase
HEPES	<i>N-(2-Hydroxy ethyl)-piperazine-N'-(2-ethane sulfonic acid)</i>
HO-1	heme oxigenase 1
HP	<i>high performance</i>
IMAC	<i>immobilized metal affinity chromatography</i>
IMDM	<i>Iscoe's Modified Dulbecco's Medium</i>
INCA	Instituto Nacional do Câncer
IPTG	isopropil β-d-1-tiogalactopiranosídeo
IS	índice de seletividade
Keap1	<i>kelch-like ECH-associated protein 1</i>
LB	Luria-Bertani
LNBio	Laboratório Nacional de Biociências
LOE	Laboratório de Oncologia Experimental
MTT	3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difenil brometo de tetrazólio
NADH	dinucleotídeo de nicotinamida e adenina
NADPH	fosfato de dinucleotídeo de nicotinamida e adenina
NCI	<i>National Cancer Institute</i>

NPDM	Núcleo de Pesquisas e Desenvolvimento de Medicamentos
NQO1	NAD(P)H quinona oxidoreductase 1
Nrf2	<i>nuclear factor erythroid 2-related factor 2</i>
P.A.	para análise
PBS	salina tamponada com fosfato
PCR	reação em cadeia da polimerase
PdI	índice de polidispersividade
PEG	polietilenoglicol
PI	iodeto de propídeo
PM	peso molecular
Rh	raio hidrodinâmico
RNA	ácido ribonucleico
RNA _m	RNA mensageiro
RPMI	<i>Roswell Park Memorial Institute</i>
RT-qPCR	reação da transcriptase reversa seguida de reação em cadeia da polimerase
SDS	duodecilsulfato de sódio
SDS-PAGE	<i>sodium duodecil sulfate polyacrilamide gel electrophoresis</i>
SEC	<i>size exclusion chromatography</i>
SFB	soro fetal bovino
SOD	superóxido dismutase
TB	<i>Terrific Broth</i>
TEMED	1,2-bis(dimetilamino)etano
TEV	<i>tobacco etch virus</i>
Tris	hidroximetilaminometano
UFC	Universidade Federal do Ceará
UFF	Universidade Federal Fluminense
UFMG	Universidade Federal de Minas Gerais
UK	Reino Unido

LISTA DE SÍMBOLOS

%	porcentagem
®	marca registrada
°C	graus Celsius
μ	micro
μg	micrograma
μL	microlitro
μM	micromolar
cm	centímetro
CO ₂	dióxido de carbono
dRFU	derivada da fluorescência
dT	derivada da temperatura
g	graus centígrados
h	hora
H ₂ O ₂	peróxido de hidrogênio
HCl	cloreto de hidrogênio
kb	quilobase
Kd	constante de dissociação
kDa	quilodalton
L	litro
M	molar
mg	miligrama
min	minuto
mL	mililitro
mm	milímetro
mM	milimolar
ng	nanograma
nm	nanometro
°	graus
O ₂ ⁻	ânion superóxido
pH	potencial hidrogeniônico
rpm	rotações por minuto

T_m	temperatura média de desnaturação
™	trademark
V	volts
α	alfa
β	beta
β -LAP	β -lapachona

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO.....	19
2	REVISÃO DE LITERATURA.....	21
2.1	Aspectos gerais de células neoplásicas.....	21
2.2	Câncer de pulmão: epidemiologia, diagnóstico e tratamento farmacológico.....	24
2.3	A enzima NAD(P)H quinona desidrogenase 1 (NQO1).....	26
2.4	Naftoquinonas.....	33
2.4.1	<i>Naftoquinona RCDFC.....</i>	36
3	MATERIAL E MÉTODOS.....	38
3.1	Delineamento experimental.....	38
3.2	Estudo de citotoxicidade in vitro da RCDFC.....	40
3.2.1	<i>Cultivo e manutenção das linhagens celulares.....</i>	40
3.2.2	<i>Avaliação da citotoxicidade.....</i>	40
3.2.3	<i>Avaliação da morfologia celular.....</i>	41
3.2.4	<i>Avaliação do efeito dos compostos sobre o número e a viabilidade celular.....</i>	41
3.2.5	<i>Avaliação do efeito dos compostos sobre a progressão do ciclo celular.....</i>	42
3.2.6	<i>Avaliação da formação de espécies reativas de oxigênio (EROS).....</i>	42
3.2.7	<i>Avaliação da atividade hemolítica.....</i>	43
3.2.8	<i>Avaliação da expressão gênica de DNA metil transferases (DNMTs).....</i>	44
3.3	Avaliação da interação entre a proteína NQO1 e a naftoquinona RCDFC..	44
3.3.1	<i>Produção e caracterização da proteína NQO1 recombinante.....</i>	44
3.3.1.1	<i>Planejamento da construção genética para produção da NQO1.....</i>	44
3.3.1.2	<i>Transformação bacteriana para amplificação do vetor.....</i>	46
3.3.1.3	<i>Transformação bacteriana para expressão da NQO1 recombinante</i>	47
3.3.1.4	<i>Expressão de proteínas e lise de bactérias.....</i>	47
3.3.1.5	<i>Purificação da NQO1.....</i>	47
3.3.1.6	<i>Identificação da proteína recombinante por SDS-PAGE.....</i>	48
3.3.1.7	<i>Quantificação da proteína NQO1 recombinante</i>	49
3.3.2	<i>Ensaio bioquímicos e biofísicos para avaliação de interação entre RCDFC e NQO1.....</i>	49
3.3.2.1	<i>Ensaio enzimático de ponto final.....</i>	49

3.3.2.2	<i>Ensaio enzimático cinético de NQO1 por monitoramento do consumo de NADH.....</i>	50
3.3.2.3	<i>Thermal Shift Assay.....</i>	50
3.3.2.4	<i>Avaliação da fluorescência intrínseca do triptofano.....</i>	51
3.3.2.5	<i>Avaliação da estrutura secundária da NQO1 por dicroísmo circular.....</i>	51
3.3.2.6	<i>Teste de Cristalização.....</i>	52
3.3.2.6.1	<i>Remoção da cauda de histidina da NQO1.....</i>	52
3.3.2.6.2	<i>Avaliação da polidispersividade e do tamanho molecular.....</i>	53
3.3.2.6.3	<i>Pesquisa de condições de cristalização.....</i>	53
4	RESULTADOS.....	54
4.1	Estudo do efeito antineoplásico <i>in vitro</i>.....	54
4.1.1	<i>Avaliação do efeito citotóxico em painel com linhagens tumorais e não-tumoral.....</i>	54
4.1.2	<i>Avaliação das alterações morfológicas.....</i>	56
4.1.3	<i>Avaliação do efeito da RCDFC sobre a viabilidade celular e número de células.....</i>	58
4.1.4	<i>Avaliação do efeito da RCDFC sobre a progressão do ciclo celular.....</i>	62
4.1.5	<i>Avaliação da expressão gênica de DNA metil transferases (DNMTs).....</i>	65
4.1.6	<i>Avaliação da formação de espécies reativas de oxigênio (ERO).....</i>	65
4.1.7	<i>Avaliação da atividade hemolítica.....</i>	67
4.2	Avaliação da interação entre a proteína NQO1 e a naftoquinona RCDFC	67
4.2.1	<i>Produção e purificação da proteína NQO1 recombinante.....</i>	67
4.2.2	<i>Quantificação da proteína NQO1 recombinante e rendimento da expressão..</i>	71
4.2.3	<i>Ensaios bioquímicos e biofísicos para avaliação de interação entre RCDFC e NQO1.....</i>	71
4.2.3.1	<i>Ensaio enzimático de ponto final.....</i>	71
4.2.3.2	<i>Ensaio enzimático cinético de NQO1 por monitoramento do consumo de NADH.....</i>	72
4.2.3.3	<i>Fluorimetria Diferencial de Varredura (Thermal Shift Assay).....</i>	73
4.2.3.4	<i>Avaliação da fluorescência intrínseca do triptofano.....</i>	74
4.2.3.5	<i>Avaliação da estrutura secundária da NQO1 por dicroísmo circular.....</i>	75

4.2.3.6	<i>Teste de Cristalização para Determinação da Estrutura de Alta Resolução de NQO1 e do Complexo NQO1-RCDFC por Cristalografia Macromolecular de Raios-X.....</i>	77
4.2.3.6.1	Remoção da cauda de histidina da NQO1 recombinante.....	77
4.2.3.6.2	Avaliação da polidispersividade e do tamanho molecular da NQO1 recombinante em solução.....	79
4.2.3.6.3	Pesquisa de condições de cristalização.....	80
5	DISCUSSÃO.....	83
5.1	A NQO1 como alvo da naftoquinona RCDFC.....	83
5.2	A RCDFC como potencial antineoplásico no tratamento de tumores de pulmão.....	92
6	CONCLUSÃO.....	101
7	PERSPECTIVAS FUTURAS.....	102
	REFERÊNCIAS.....	103
	APÊNDICE A - LINHAGENS CELULARES UTILIZADAS NESSE TRABALHO.....	122
	APÊNDICE B – PRIMERS UTILIZADOS NA ANÁLISE DE EXPRESSÃO GÊNICA.....	123
	ANEXO A – CERTIFICADO DA COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS.....	124

1 INTRODUÇÃO

Mundialmente, o câncer é configurado como um importante problema de saúde pública, sendo uma das principais causas de morte, estando entre os principais desafios para que a expectativa de vida das pessoas possa aumentar (WEIDERPASS; STEWART, 2020). As estimativas reportam que um a cada cinco indivíduos terão câncer durante a vida e um em cada dez morrerá da doença (FERLAY; COLOMBET; SOERJOMATARAM; PARKIN *et al.*, 2021). No Brasil, são esperados cerca de 704 mil novos casos de câncer em cada ano do triênio 2023-2025 (SANTOS; LIMA; MARTINS; OLIVEIRA *et al.*, 2023).

O câncer é uma doença que frequentemente tem um mau prognóstico. Apesar do desenvolvimento de diversas estratégias terapêuticas, incluindo quimioterapia, terapia-alvo, radioterapia e imunoterapia, a resistência a essas abordagens frequentemente impede bons resultados clínicos (NUSSINOV; TSAI; JANG, 2021; WU; GAO; SU; NICE *et al.*, 2021).

Células neoplásicas tendem a desenvolver diversos mecanismos de resistência a medicamentos, como a alteração de alvos celulares (YAEGER; CORCORAN, 2019), diminuição da concentração intracelular de fármacos (PISCO; JACKSON; HUANG, 2014), supressão da parada do ciclo celular (LUNDHOLM; HÅÅG; ZONG; JUNTTI *et al.*, 2013), e redução da apoptose (CHEN; ZENG; ZHOU, 2018). Além disso, também podem ativar vias relacionadas à sobrevivência e à proliferação celular (MCCUBREY; STEELMAN; CHAPPELL; ABRAMS *et al.*, 2007), transição epitélio- mesenquimal (XU; ZHANG; DAI; HAN, 2022) e geração de células-tronco tumorais (PHI; SARI; YANG; LEE *et al.*, 2018). Adicionalmente, a expressão desregulada de microRNAs (MIRZAEI; ZARRABI; ASNAF; HASHEMI *et al.*, 2021), a reprogramação metabólica (LIN; XIA; LIANG; HAN *et al.*, 2019), a modificação epigenética (KARAMI FATH; AZARGOONJAHROMI; KIANI; JALALIFAR *et al.*, 2022), e a interação com microambientes tumorais também podem levar à resistência do tumor a diferentes estratégias terapêuticas (ERIN; GRAHOVAC; BROZOVIC; EFFERTH, 2020).

Em todo o mundo, grande aporte de recursos é aplicado em pesquisas para prevenção, diagnóstico e tratamento do câncer. A descoberta e o desenvolvimento de novos agentes anticancerígenos são o foco principal de várias empresas farmacêuticas e de organizações governamentais e não governamentais, como o *National Cancer Institute* (NCI) nos Estados Unidos (EUA), a *European Organization for Research and Treatment of Cancer* (EORTC) e o *Cancer Research UK* (NARANG; DESAI, 2009). No entanto, algumas drogas anticancerígenas que são aprovadas pelas agências reguladoras, como o *Food and Drug*

Administration (FDA), tem pouco efeito sobre a sobrevivência global do paciente com câncer. Observa-se também que a maioria das terapias alvo-dirigidas disponíveis atualmente possuem alto custo e por conseguinte, são pouco acessíveis (HAIT, 2010).

Novas moléculas com ação antineoplásica e com mecanismos de ação inovadores poderiam ajudar a reduzir o problema da resistência à terapia antitumoral, de forma a promover mais efetividade e segurança (FENG; CHEN; VAZIRI; GUO *et al.*, 2020; ZHONG; LI; XIONG; WANG *et al.*, 2021). Além disso, pacientes com baixa responsividade aos tratamentos atuais possuem poucas alternativas para o manejo clínico e novas substâncias poderiam ajudar a aumentar a taxa de cura desses pacientes, ajudando a diminuir as altas taxas de mortalidade do câncer no mundo, incluindo o câncer de pulmão (GAO; LI; JIN; JIANG *et al.*, 2019; MISRI; KAUL; MISHRA; CHARAN *et al.*, 2022).

Nesse contexto, a proteína NQO1 reduz completamente dois elétrons do substrato quinona, evitando a formação de semiquinonas reativas e protegendo a célula do dano oxidativo. Essa proteína também se associa a algumas proteínas relacionadas ao controle do ciclo celular e à adaptação metabólica e evita que estas sejam degradadas pelo proteossoma (ZHANG; CHEN; MA; WU *et al.*, 2018). A NQO1 é considerada um alvo específico para a terapia anticâncer, pois se encontra anormalmente superexpressa em muitos tumores e está intimamente ligada a múltiplos processos carcinogênicos (TOSSETTA; FANTONE; GOTERI; GIANNUBILO *et al.*, 2023). A utilização da capacidade da NQO1 em bioativar quinonas quimioterápicas é uma abordagem promissora para uma terapia anticâncer mais seletiva e menos tóxica (PARKINSON; HERGENROTHER, 2015). Portanto, essa enzima é um alvo interessante para o desenvolvimento de novas terapias antineoplásicas alvo-dirigidas.

O presente trabalho teve como objetivo investigar o efeito antineoplásico da naftoquinona sintética RCDFC em células de adenocarcinoma de pulmão A549 e avaliar a interação dessa substância com a proteína NQO1.

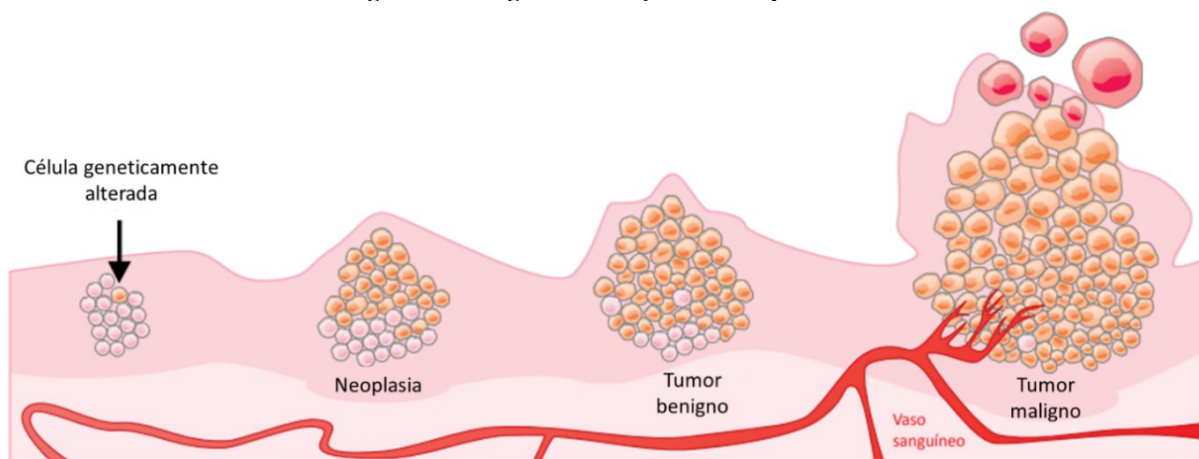
2 REVISÃO DE LITERATURA

1.1 Aspectos gerais de células neoplásicas

O termo neoplasia vem da língua grega, em que *neo* significa “novo” e *plasis* significa “crescimento, multiplicação celular”. Assim, as neoplasias podem ser caracterizadas como distúrbios do crescimento celular iniciados por mutações adquiridas ou herdadas por uma célula ou por sua progênie clonal. As mutações permitem a modificação da função de genes, criando vantagens de sobrevivência e de crescimento às células neoplásicas. Como resultado, ocorre proliferação excessiva, que não depende de estímulos de crescimento e de controles fisiológicos (KUMAR; ABBAS; ASTER; DEYRUP, 2022).

As observações macro e microscópicas, evolutivas e clínicas permitem classificar as neoplasias como benignas ou malignas (Figura 1). A neoplasia benigna é caracterizada pela ausência de sinais de invasividade, indicando que a massa tumoral formada crescerá somente a partir do seu local de origem. Por causarem compressão nos órgãos e tecidos adjacentes o tratamento geralmente é a remoção cirúrgica. Na neoplasia maligna, o tumor tende a apresentar capacidade de invadir e destruir tecidos circundantes. Os tumores malignos são coletivamente chamados de cânceres. Células malignas podem atingir um vaso sanguíneo ou linfático e se disseminar para tecidos ou órgãos distantes do local de início do tumor (metástase). Na maior parte dos casos, quanto maior o número de metástases mais difícil é o tratamento do tumor e maior a chance de óbito do paciente (BOGLIOLO; BRASILEIRO FILHO; BARBOSA, 2013).

Figura 1 – Origem e evolução das neoplasias



O desenvolvimento de neoplasias inicia-se quando uma única célula sofre alterações genéticas e adquire características próprias de células tumorais e começa a proliferar de forma anormal. Mutações adicionais,

seguidas da seleção de células de crescimento mais rápido dentro da população alterada, resultam na progressão do tumor para um crescimento cada vez mais rápido e maligno com a formação de novos vasos, invasão de tecidos adjacentes, e penetração na corrente sanguínea e linfática espalhando-se por todo o corpo. Fonte: Adaptado de (SILVA, 2020).

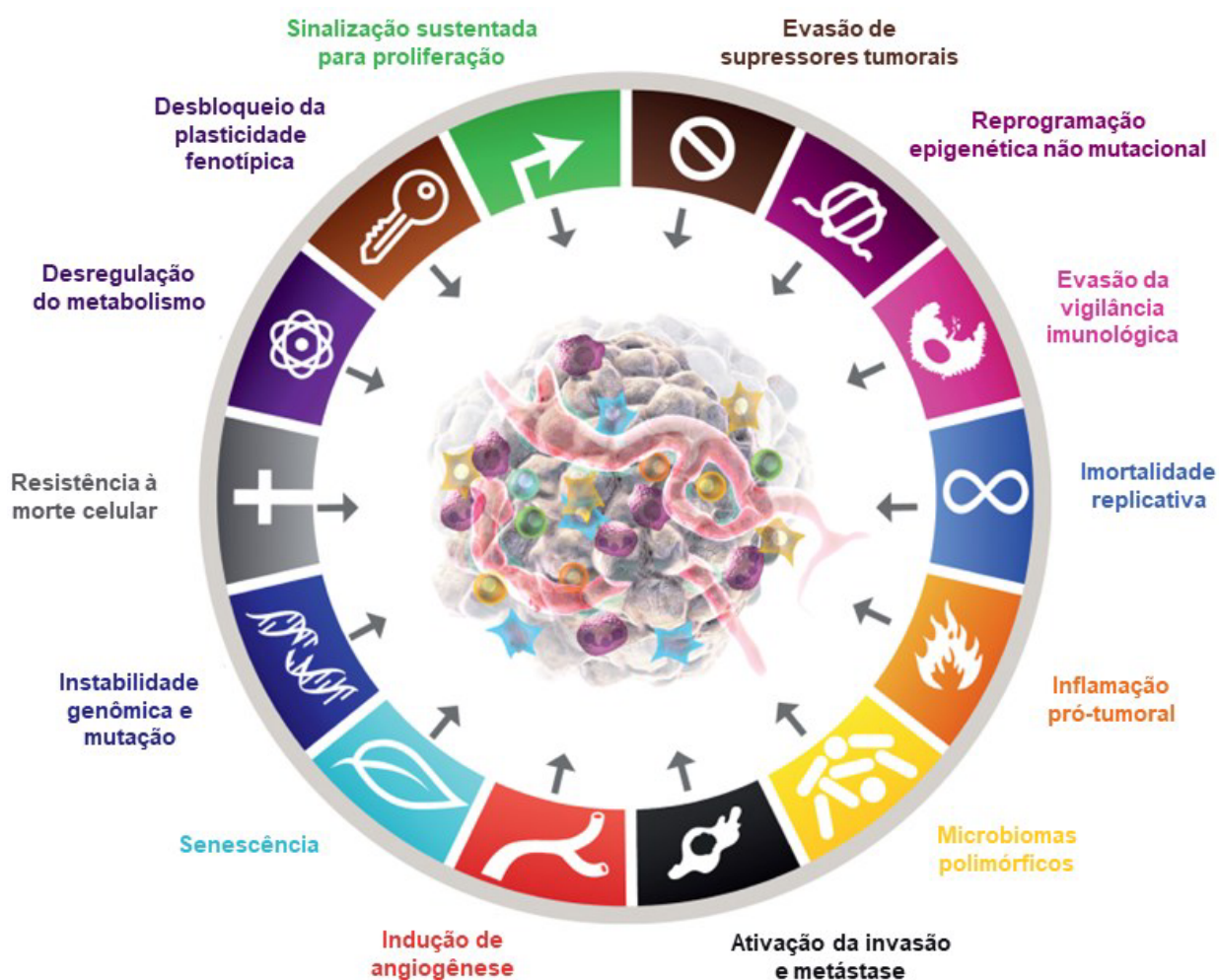
As células neoplásicas malignas estão mutando, multiplicando, competindo, evoluindo e diversificando-se constantemente. A população inicial de células evolui em ciclos de proliferação, acumulando mutações seguidas de seleção darwiniana. Quanto maior o número de células tumorais, maior a possibilidade de que ao menos uma delas apresente uma mutação ou uma mudança epigenética que lhe confira vantagem seletiva em relação às demais. Assim, a célula cancerígena torna-se mais capaz de sobreviver em ambientes inóspitos, como o interior de um tumor, que possui níveis reduzidos de oxigênio, deficiência de nutrientes e barreiras naturais do tecido normal adjacente. À medida que fazem metástases, colonizam novos nichos no organismo e à medida que sofrem tratamentos de erradicação, são submetidas a novas pressões de seleção, tornando cada vez mais difícil extirpar o tumor (ALBERTS; JOHNSON; LEWIS; MORGAN *et al.*, 2017).

O conjunto das diversas características fenotípicas que as neoplasias malignas demonstram é conhecido como propriedades distintivas do câncer (do inglês, *cancer hallmarks*) (HANAHAN; WEINBERG, 2000). Propriedades biológicas como a proliferação excessiva, o potencial de replicação ilimitado, a invasão local, a capacidade de formar metástases, a angiogênese e a resistência à morte celular são comuns às células tumorais (Figura 2) (HANAHAN; WEINBERG, 2011). Esses atributos decorrem das diversas modificações em nível genômico e epigenômico, que alteram a expressão e a função de genes essenciais, conferindo um fenótipo de malignidade às células que passam por transformação neoplásica (HANAHAN, 2022).

Adicionalmente às mutações no DNA, as alterações epigenéticas também contribuem para o estabelecimento dos atributos do câncer. Entre as modificações epigenéticas destacam-se a metilação do DNA, que geralmente está associada à repressão dos genes, e a modificação das histonas, proteínas envolvidas no enovelamento do DNA na cromatina. As alterações nas histonas podem causar tanto aumento quanto diminuição da expressão gênica, pois modulam o nível de condensação do DNA e, conseqüentemente, a interferência espacial no acesso de diferentes complexos enzimáticos à dupla-hélice. A regulação epigenética orquestrará quais os genes serão expressos pelas células normais e neoplásicas, por exemplo, em relação ao comprometimento da linhagem e ao estado de diferenciação (KUMAR; ABBAS; ASTER; DEYRUP, 2022). O processo de metilação do DNA é catalisado pelas enzimas DNA metil transferases (DNMT). Nas células tumorais, a

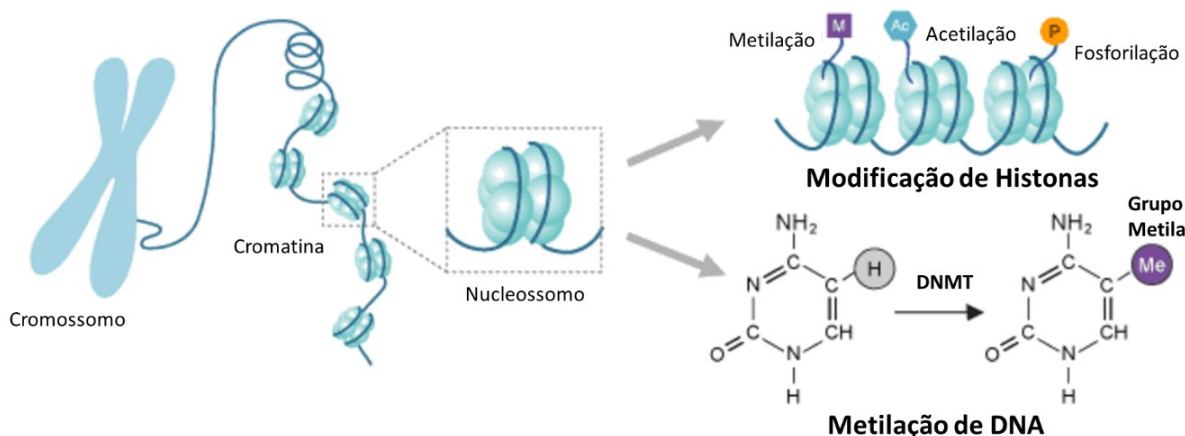
metilação é importante para o silenciamento de genes supressores tumorais. Em relação às proteínas histonas, as modificações mais conhecidas são a acetilação, fosforilação, metilação e ubiquitinação de caudas aminoterminais (Figura 3). No processo neoplásico, as modificações de histonas resultam em desregulação da transcrição, reparo e replicação do DNA, interferindo também no grau de condensação da cromatina e na acessibilidade ao DNA (COSTA; SALES; PINHEIRO; PONTES *et al.*, 2023). Diferentemente das mutações do DNA, as alterações epigenéticas são potencialmente reversíveis por fármacos que diminuem ação de agentes modificadores de DNA ou de proteínas histonas. Nesse contexto, é crescente o interesse na pesquisa e desenvolvimento de fármacos com capacidade de corrigir aberrações epigenéticas (FURTADO; LUCIANO; SANTOS; FURTADO *et al.*, 2019).

Figura 2 – Propriedades distintivas do câncer



Propriedades distintivas que permitem a diferenciação, crescimento, progressão e resistência de células tumorais. Fonte: Adaptado de HANAHAN, 2022.

Figura 3 – Representação esquemática de algumas modificações epigenéticas

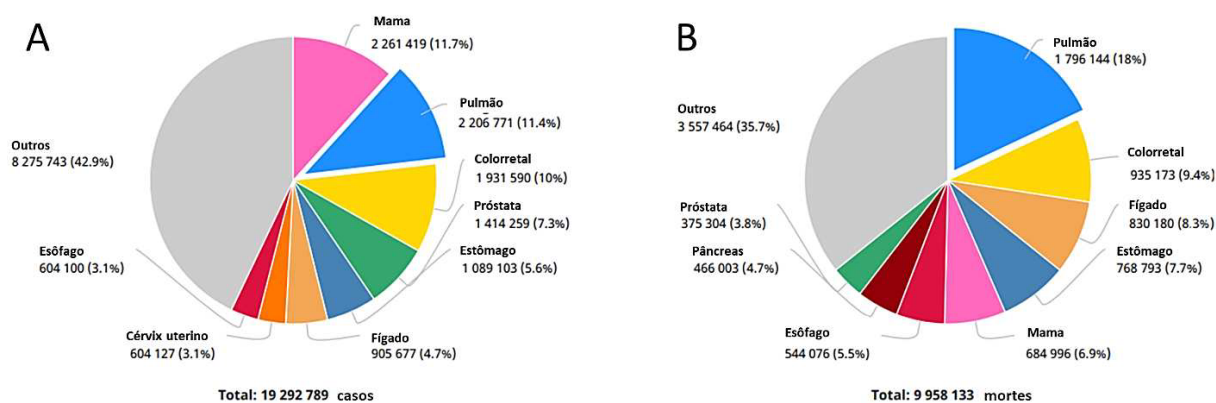


Visão geral das modificações epigenéticas mais comuns e atividade das enzimas modificadoras da cromatina. A metilação do DNA ocorre mais frequentemente em regiões de nucleotídeos CpG "ilhas CpG" e é realizada pelas DNA metiltransferases (DNMTs), que depositam marcas de metilação e utilizam o metabolismo da metionina como substrato. O DNA é enovelado com auxílio das proteínas histonas que sofrem diversas modificações como a metilação, acetilação e fosforilação alterando o perfil de acessibilidade ao DNA e regulando a expressão de genes. Fonte: Adaptado de <http://www.abnova.com/support/resources.asp?switchfunctionid=%7B20892EE5-F9D3-48BF-A87F-48992A61F82E%7D> acesso em 17.07.2023.

1.2 Câncer de pulmão: epidemiologia, diagnóstico e tratamento farmacológico

O câncer de pulmão é o segundo mais incidente no mundo, com cerca de 2,2 milhões de novos casos, correspondendo a 11,4 % entre todos os tipos de câncer, ficando atrás apenas do câncer de mama no ano de 2020 (Figura 4A). Nesse mesmo ano, esse tipo de câncer apresentou a maior taxa de mortalidade, com cerca de 1,7 milhões de mortes no mundo (Figura 4B) (SUNG; FERLAY; SIEGEL; LAVERSANNE *et al.*, 2021).

Figura 4 – Distribuição da incidência (A) e mortalidade (B) dos diversos tipos de câncer no mundo no ano de 2020, considerando ambos os sexos e todas as idades



Fonte: Adaptado de (SUNG; FERLAY; SIEGEL; LAVERSANNE *et al.*, 2021).

No Brasil, o risco estimado é de 17,06 novos casos de câncer de pulmão a cada 100 mil homens e de 13,15 a cada 100 mil mulheres. Com exceção dos tumores de pele não melanoma, os cânceres de traqueia, brônquio e pulmão ficam na terceira colocação entre os homens e na quarta entre as mulheres (SANTOS; LIMA; MARTINS; OLIVEIRA *et al.*, 2023) (Tabela 1).

Tabela 1 – Estimativas de distribuição dos dez tipos de câncer mais incidentes no Brasil para o ano de 2023 (excluindo o câncer de pele não melanoma)

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

Fonte: (SANTOS; LIMA; MARTINS; OLIVEIRA *et al.*, 2023).

O tabagismo e a exposição passiva ao tabaco estão relacionados com cerca de 90% dos casos de câncer de pulmão diagnosticados, sendo o principal fator de risco (SILVA; OLIVEIRA; SANTOS; RIBEIRO *et al.*, 2019). Merecem destaque também os fatores de risco relacionados com a exposição ambiental e ocupacional da produção de alumínio, da gaseificação de carvão, da mineração de hematita (subterrânea), das fundições de ferro e aço, da exposição a metais (arsênico, cádmio, cromo hexavalente, arsênio, berílio, níquel) e das poeiras (amianto, sílica, poeira de couro e de madeira). A combustão de motores a diesel, a poluição do ar e as radiações também são importantes fatores de risco e apontam mal prognóstico quando associados ao consumo de tabaco (MELLO; OTERO, 2021).

De forma geral, a neoplasia maligna de pulmão é classificada em dois grupos: os carcinomas de células pequenas, que correspondem a cerca de 20% dos casos e os carcinomas de células não-pequenas, que representam cerca de 80% dos casos (ZHENG, 2016). Em razão da diversidade dos carcinomas de células não-pequenas estes são ainda subdivididos em adenocarcinoma, carcinoma de células escamosas e carcinoma de grandes células (NICHOLSON; TSAO; BEASLEY; BORCZUK *et al.*, 2022). Atualmente o diagnóstico do câncer de pulmão visa identificar as alterações moleculares em diferentes famílias de genes (*KRAS*, *EGFR*, *ALK*, *ROS1*, *BRAF*, *RET*, *MET*, *NTRK*) e eventos mutagênicos em cada tipo histológico (CONDE; ROJO; GÓMEZ; ENGUITA *et al.*, 2022; SHIM; CHOI; KIM; CHANG

et al., 2017). O diagnóstico molecular aumenta a possibilidade de melhores prognósticos, com abordagens mais assertivas para o tratamento, aumentando as chances de sucesso.

Entre os fármacos comumente utilizados na quimioterapia do câncer de pulmão estão os derivados de platina (carboplatina, cisplatina) (COSAERT; QUOIX, 2002), taxanos (paclitaxel, docetaxel) (CHU; VINCENT; LOGAN; MACKAY *et al.*, 2005), análogos de nucleosídeo (gemcitabina) (MANEGOLD, 2004), alcalóides (etoposídeo, vinorelbina) (MASCAUX; PAESMANS; BERGHMANS; BRANLE *et al.*, 2000) e antimetabólitos (pemetrexede) (FULD; DRAGNEV; RIGAS, 2010). Combinações de terapias são frequentes no tratamento do câncer de pulmão, como a quimioterapia associada à terapia-alvo, imunoterapia, radioterapia e cirurgia (WU; LENG; CUN; FOGED *et al.*, 2017).

A terapia-alvo do câncer de pulmão engloba diversas classes de fármacos como os inibidores de angiogênese (bevacizumabe e ramucirumabe), inibidores de KRAS (sotorasibe e adagrasibe), inibidores de EGFR (erlotinibe, gefitinibe, afatinibe, dacomitinibe, osimertinibe), inibidores de ALK e ROS1 (crizotinibe, ceritinibe, lortatinibe), inibidores BRAF (dabrafenibe), inibidores de MEK (trametinibe), inibidores de MET (capmatinibe e tepotinibe), inibidores de RET (selpercatinibe e pralsetinibe), e inibidores de NTRK (larotrectinibe e entrectinibe) (JAYAN; ANANDU; MADHU; SAIPRABHA, 2022; TAN; TAN, 2022; YUAN; HUANG; CHEN; WU *et al.*, 2019). Além disso também podem ser utilizados anticorpos monoclonais para pontos de checagem imunológicos, como anti-PD-1 (nivolumabe, pembrolizumabe, cemiplimabe) e anti-PD-L1 (durvalumabe, atezolizumabe), e conjugados droga-anticorpo anti-HER-2 (trastuzumabe deruxtecan e trastuzumabe emtansina) (MAJEED; MANOCHAKIAN; ZHAO; LOU, 2021).

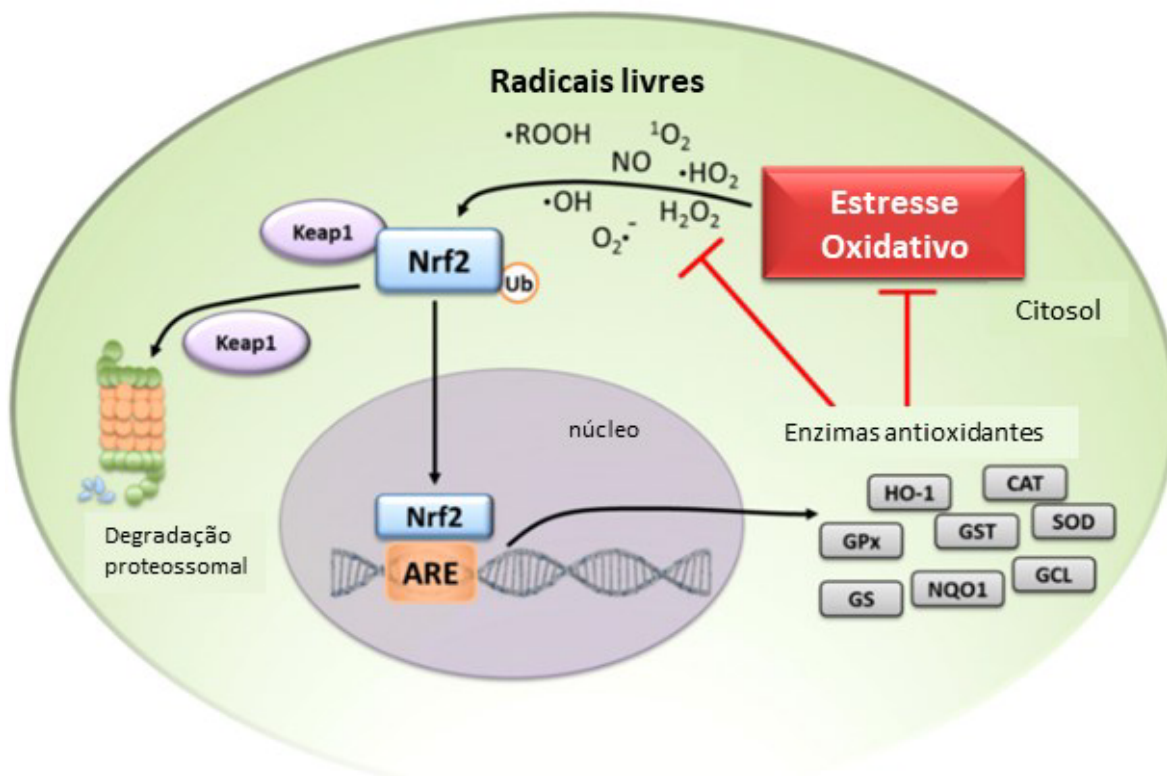
Muitos medicamentos quimioterápicos possuem sérios efeitos colaterais, como a neuropatia periférica e a mielossupressão, observados em pacientes submetidos a tratamentos com cisplatina, vinorelbina e paclitaxel (HART; OGBONNAYA; BOYKIN; DEYOUNG *et al.*, 2023; KUSUNOKI; SAITO, 2008). Apesar das terapias alvo-dirigidas e imunoterapias apresentarem menos efeitos adversos graves, frequentemente os pacientes desenvolvem efeitos dermatológicos como erupção acneiforme, xerose e eczema, que também estão presentes nos tratamentos com os quimioterápicos tradicionais (RICCIARDI; TOMAO; DE MARINIS, 2009; SU; WANG; LIU; GUO *et al.*, 2020).

1.3 A enzima NAD(P)H quinona desidrogenase 1 (NQO1)

Durante a carcinogênese, as células tumorais são conhecidas por aumentarem a produção de espécies reativas de oxigênio (ERO) em relação às células normais (LIOU; STORZ, 2010). O excesso de estresse oxidativo pode gerar efeitos danosos para as células neoplásicas, podendo causar genotoxicidade, ativar vias que levam à morte celular e aumentar sensibilidade a agentes quimioterápicos (SÁ JUNIOR; CÂMARA; PORCACCHIA; FONSECA *et al.*, 2017; PERILLO; DI DONATO; PEZONE; DI ZAZZO *et al.*, 2020; SCHUMACKER, 2006). Como forma de lidar com o alto nível de estresse oxidativo e garantir a sobrevivência, as células neoplásicas elevam a expressão de genes citoprotetores como o gene *NQO1* (NAD(P)H quinona desidrogenase 1) (BELINSKY; JAISWAL, 1993), que é superexpresso em diversos tipos de tumores sólidos, como o câncer de próstata (THAPA; HUANG; MUÑOZ; YANG *et al.*, 2020), pulmão (LI; ZHANG; JIN; MEN *et al.*, 2015), pâncreas (AWADALLAH; DEHN; SHAH; NASH *et al.*, 2008), mama (YANG; ZHANG; WU; CUI *et al.*, 2014) e estômago (JIANG; AHMED; WANG; SHI *et al.*, 2021).

O gene *NQO1* se localiza no cromossomo 16q22.1, possui cerca de 20 kb de comprimento e compreende seis éxons e 5 íntrons (JAISWAL, 1991). Esse gene é expresso de forma constitutiva em baixos níveis em vários tecidos normais sob condições fisiológicas (BELINSKY; JAISWAL, 1993). Esse gene contém a sequência ARE (elemento de resposta antioxidante), também chamada de elemento de resposta a eletrófilos, em sua região promotora (NIOI; MCMAHON; ITOH; YAMAMOTO *et al.*, 2003). A sequência ARE atua como um elemento regulador *cis* ou sequência intensificadora e é encontrada na região promotora de genes que codificam enzimas de desintoxicação e proteínas citoprotetoras (RUSHMORE; MORTON; PICKETT, 1991). A expressão de *NQO1* é regulada pelo fator de transcrição Nrf2 (*Nuclear factor erythroid 2-related factor 2*) (NIOI; MCMAHON; ITOH; YAMAMOTO *et al.*, 2003). Em condições de estresse oxidativo o fator Nrf2 se dissocia de seu repressor Keap1 (*Kelch-like ECH-associated protein 1*) e transloca-se para o núcleo, onde se liga-se à sequência ARE, ativando a transcrição de genes de proteínas antioxidantes como *NQO1*, glutationa transferase (GST) e heme oxigenase (HO-1) (Figura 5) (HE; RU; WEN, 2020; ITOH; CHIBA; TAKAHASHI; ISHII *et al.*, 1997; KOBAYASHI; OHTA; YAMAMOTO, 2004).

Figura 5 – Mecanismo da ativação de genes antioxidantes pelo fator de transcrição Nrf2



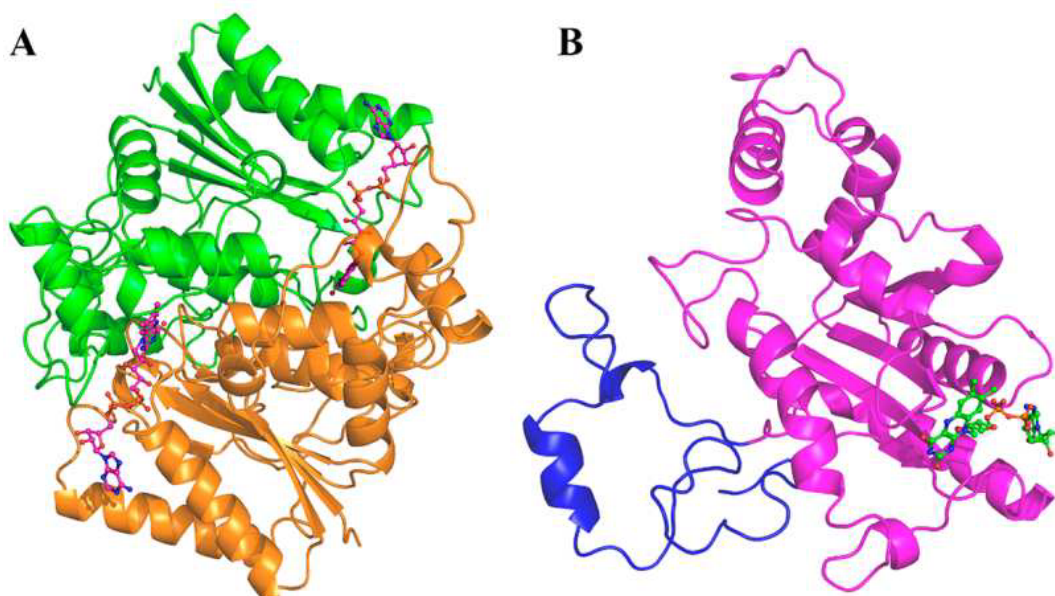
Fonte: Adaptado de Francisqueti e colaboradores (2019). Em condições homeostáticas, o fator de transcrição citosólico Nrf2 é mantido em níveis baixos pela degradação proteossômica desencadeada pelo complexo proteico Keap1. No estresse oxidativo, os radicais livres induzem o Nrf2 a se dissociar de Keap1, escapando da degradação proteossômica e se translocando para o núcleo. No núcleo, o Nrf2 liga-se ao ARE e inicia a transcrição de enzimas antioxidantes como heme oxigenase-1 (HO-1), glutaciona peroxidase (GPx), glutaciona S-transferase (GST), superóxido dismutase (SOD), catalase (CAT), glutaciona redutase (GR), NAD(P)H:quinona oxidoredutase 1 (NQO1), glutamina-cisteína ligase (GCL) e glutaciona sintetase (GS). Essas enzimas atuam reduzindo o estresse oxidativo celular e os radicais livres. As setas pretas indicam a ativação das vias; barras T vermelhas indicam bloqueio ou inibição das vias.

A proteína NQO1 (também conhecida como DT-diaforase; EC.1.6.99.2) é classificada como uma enzima flavoproteica capaz de catalisar a conversão de quinonas em hidroquinonas, usando o dinucleotídeo de nicotinamida e adenina (NADH) ou fosfato de dinucleotídeo de nicotinamida e adenina (NADPH) como coenzima (BEALL; MURPHY; SIEGEL; HARGREAVES *et al.*, 1995; MA; WANG; YANG; LU, 1990).

Estruturalmente, a NQO1 forma homodímeros pela interação de duas subunidades funcionais de 31 kDa (quilodalton), permitindo a formação de dois sítios ativos localizados na interface monômero:monômero (Figura 6) (CHEN; DENG; BAILEY; SWIDEREK, 1994; VANKOVA; SALIDO; TIMSON; MAN *et al.*, 2019). Cada monômero consiste em dois domínios diferentes: um domínio aminoterminal (resíduos 1-224), que contém parte do sítio ativo e que está envolvido na forte interação com a coenzima flavina adenina dinucleotídeo

(FAD), essencial para a dimerização e atividade catalítica, e um domínio carboxiterminal (resíduos 225–274) que, além de contribuir para estabilizar a estrutura dimérica, estabiliza também a ligação da coenzima NAD(P)H e dos substratos (FAIG; BIANCHET; TALALAY; CHEN *et al.*, 2000; LI; BIANCHET; TALALAY; AMZEL, 1995; MEDINA-CARMONA; NEIRA; SALIDO; FUCHS *et al.*, 2017).

Figura 6 – Estrutura cristalográfica da NQO1 humana em complexo com FAD



Fonte: Adaptado de (FAIG; BIANCHET; TALALAY; CHEN *et al.*, 2000; ZHANG; CHEN; MA; WU *et al.*, 2018). Estrutura geral da holoenzima NQO1. (A) Estrutura homodimérica em que um monômero é mostrado em verde e o outro em laranja. Os átomos de carbono do FAD são mostrados em roxo. (B) Estrutura monomérica da holoenzima NQO1. O domínio catalítico é mostrado em roxo e o domínio C-terminal em azul. Os átomos de carbono do FAD são representados em verde.

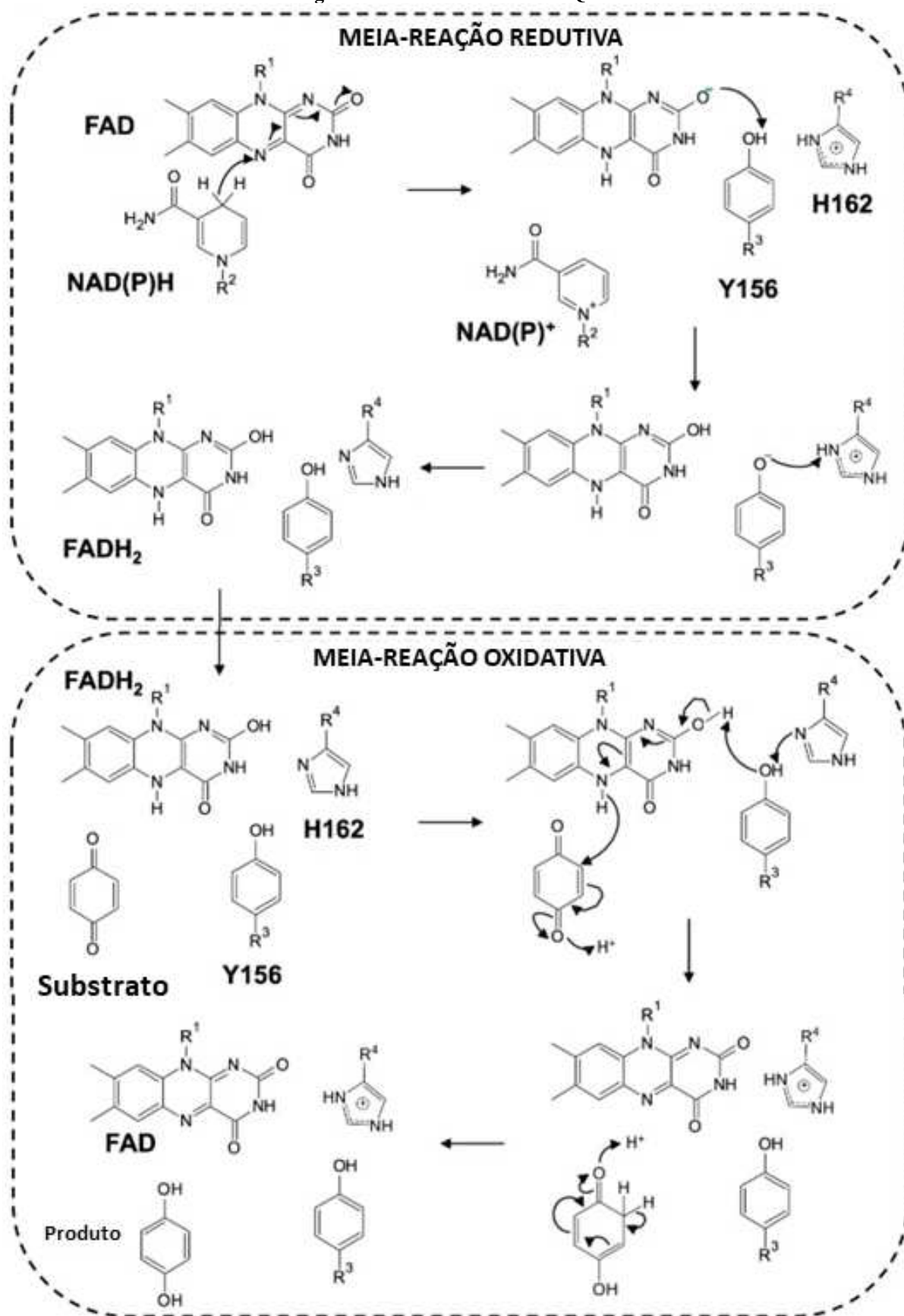
O ciclo catalítico da NQO1 envolve um mecanismo de duas etapas chamado de pingue-pongue (LI; BIANCHET; TALALAY; AMZEL, 1995). Inicialmente, durante a meia-reação redutora, uma molécula de NAD(P)H se liga à enzima e reduz rapidamente o FAD a FADH₂ (apresentando constante de segunda ordem de $\sim 10^6 \text{ M}^{-1} \cdot \text{s}^{-1}$), o dinucleotídeo de nicotinamida oxidado é liberado em sequência. Posteriormente, numa rápida meia-reação oxidativa (com uma constante de velocidade de segunda ordem $> 10^9 \text{ M}^{-1} \cdot \text{s}^{-1}$), o substrato quinona se liga e é reduzido pelo FADH₂, regenerando assim a flavina na forma oxidada e liberando o produto quinona reduzido (Figura 7) (ANOZ-CARBONELL; TIMSON; PEY; MEDINA, 2020; LI; BIANCHET; TALALAY; AMZEL, 1995; NOLAN; TIMSON; STRATFORD; BRYCE, 2006; ROSS; KEPKA; WINSKI; BEALL *et al.*, 2000).

Moléculas à base de cumarina, como o dicumarol (DIC) são capazes de inibir o ciclo catalítico da NQO1, atuando como inibidor competitivo, pois ocupam parcialmente o sítio de ligação do NAD(P)H e impedem seu acesso ao centro ativo da enzima (ASHER; DYM; TSVETKOV; ADLER *et al.*, 2006; NOLAN; DONCASTER; DUNSTAN; SCOTT *et al.*, 2009; NOLAN; ZHAO; FAULDER; FRENKEL *et al.*, 2007).

Ao catalisar a reação de redução de dois elétrons das quinonas, a NQO1 previne a formação de semiquinonas e diminui a formação de espécies reativas de oxigênio (ERO) como o ânion superóxido (O_2^-) e o peróxido de hidrogênio (PREETHI; ARTHIGA; PATIL; SPANDANA *et al.*, 2022). O ânion superóxido, liberado quando hidroquinonas se auto-oxidam, é removido pela NQO1 (Figura 8) (SIEGEL; GUSTAFSON; DEHN; HAN *et al.*, 2004). A concentração de espécies O_2^- é fator determinante para a oxidação de hidroquinonas, assim, ao remover o superóxido O_2^- , a reação de auto-oxidação é retardada e a hidroquinona é eliminada (ZHU; JIA; MAHANEY; ROSS *et al.*, 2007).

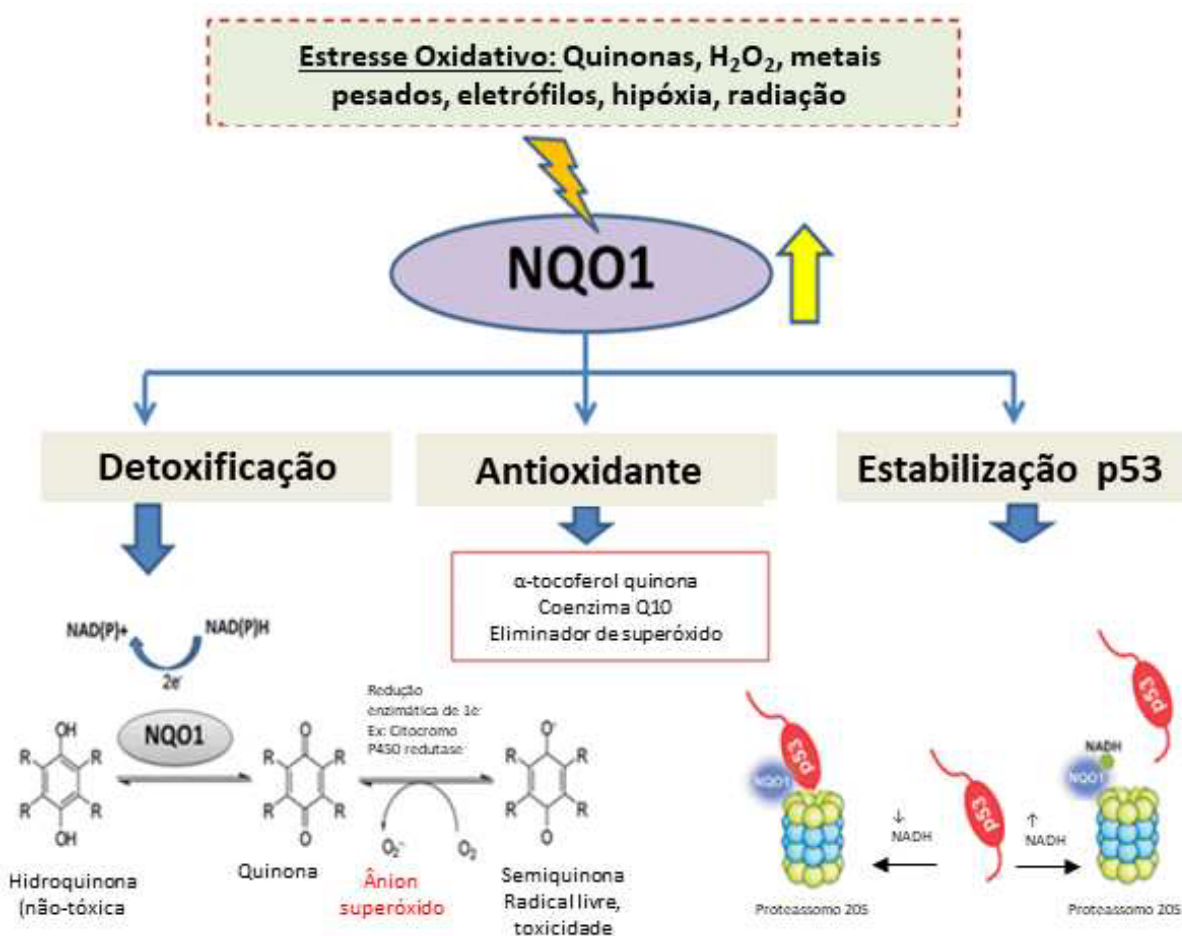
Além de sua função antioxidante, a NQO1 está implicada na regulação da meia-vida citoplasmática de importantes proteínas intracelulares, como p53, Pol- β , HIF-1 α , Sirtuína-6 e outras (Tabela 2). A enzima NQO1 pode se associar tando com a subunidade 20S do proteassoma quanto pode interagir diretamente com essas proteínas, evitando que sejam degradadas pelo complexo proteico do proteassomo. Muitas dessas proteínas se destacam como alvos para o tratamento das neoplasias, e participam também de processos como envelhecimento, diabetes, neurodegeneração, processos inflamatórios e infecciosos (DINKOVA-KOSTOVA; TALALAY, 2010). De forma geral, a interação das proteínas com NQO1 costuma ser dependente da concentração de NAD(P)H ou NADH. No entanto, estudos mostraram que a NQO1 também é capaz de se associar diretamente à subunidade 20S do proteassomo de forma NADH-independente (Figura 8) (MOSCOVITZ; TSVETKOV; HAZAN; MICHAJELEVSKI *et al.*, 2012).

Figura 7 – Ciclo Catalítico da NQO1



Fonte: Adaptado de (ANOZ-CARBONELL; TIMSON; PEY; MEDINA, 2020)

Figura 8 – Funções celulares relacionadas à proteína NQO1



O esquema destaca os papéis da NQO1 na resposta contra o estresse oxidativo. A desintoxicação da NQO1 é inerente ao seu mecanismo catalítico da redução de dois elétrons de quinonas formando hidroquinonas utilizando NADPH ou NADH como doador de hidretos. A proteína NQO1 pode diretamente eliminar íons superóxido e realizar manutenção dos antioxidantes endógenos ubiquinona e α -tocoferolquinona (coenzima Q10 e um análogo da vitamina E, respectivamente) em sua forma reduzida. Além disso, a proteína também se associa fisicamente à subunidade 20S do proteassoma protegendo diversas proteínas da degradação. Fonte: Adaptado de (SRIJIWANGSA; NA-BANGCHANG, 2017).

Tabela 2 – Proteínas que são protegidas pela NQO1 contra a degradação proteassomal

Proteína	Função	Referência
p53	Resposta a estresses celulares e regulação da expressão de genes que induzem parada do ciclo celular, apoptose, senescência, reparo de DNA e alterações no metabolismo.	(ASHER; LOTEM; KAMA; SACHS <i>et al.</i> , 2002; ASHER; LOTEM; SACHS; KAHANA <i>et al.</i> , 2002)
p63	Parada de ciclo celular, apoptose, desenvolvimento e manutenção da pele, regulação de células-tronco/progenitoras, desenvolvimento do coração, envelhecimento prematuro.	(ROKAH; SHPILBERG; GRANOT, 2010)
p73	Resposta a estresses celulares.	(ASHER; TSVETKOV; KAHANA; SHAUL, 2005)
ODC1	Metabolismo celular: via de biossíntese da poliamina, que catalisa a conversão de ornitina em putrescina.	(ASHER; BERCOVICH; TSVETKOV; SHAUL <i>et al.</i> , 2005)

p33(ING1b)	Parada de ciclo celular e apoptose.	(GARATE; WONG; CAMPOS; WANG <i>et al.</i> , 2008)
eIF4GI	Síntese proteica: recrutamento de mRNA para o ribossomo.	(ALARD; FABRE; ANESIA; MARBOEUF <i>et al.</i> , 2010)
PGC-1α	Metabolismo energético: regulação da função mitocondrial. Controle da pressão arterial, homeostase do colesterol celular e desenvolvimento de obesidade.	(ADAMOVICH; SHLOMAI; TSVETKOV; UMANSKY <i>et al.</i> , 2013)
HIF1α	Regulação da resposta celular e sistêmica à hipóxia, ativação da transcrição de genes, envolvidos com o metabolismo energético, angiogênese, apoptose e outros genes que aumentam a oferta de oxigênio ou facilitam a adaptação metabólica à hipóxia.	(OH; KIM; KIM; KIM <i>et al.</i> , 2016; SALIDO; TIMSON; BETANCOR-FERNÁNDEZ; PALOMINO-MORALES <i>et al.</i> , 2022)
HERP	Resposta a estresses no retículo endoplasmático.	(MAEDA; TANABE-FUJIMURA; FUJITA; ABE <i>et al.</i> , 2016)
Pol-β	Excisão e reparo de bases durante a síntese de DNA.	(FANG; ANDREWS; SHARMA; WILK <i>et al.</i> , 2019)
SIRT6	Resposta ao estresse celular, estabilidade genômica, envelhecimento e homeostase energética, reparo de DNA, manutenção da cromatina telomérica, inflamação, metabolismo de lipídios e glicose.	(ZHOU; ZENG; YUAN; REN <i>et al.</i> , 2019)
TAT	Infecção pelo 33anam da imunodeficiência humana (HIV).	(LATA; ALI; SOOD; RAJA <i>et al.</i> , 2015)
HBx	Infecção pelo 33anam da hepatite B humana.	(CHENG; HU; REN; YU <i>et al.</i> , 2021)

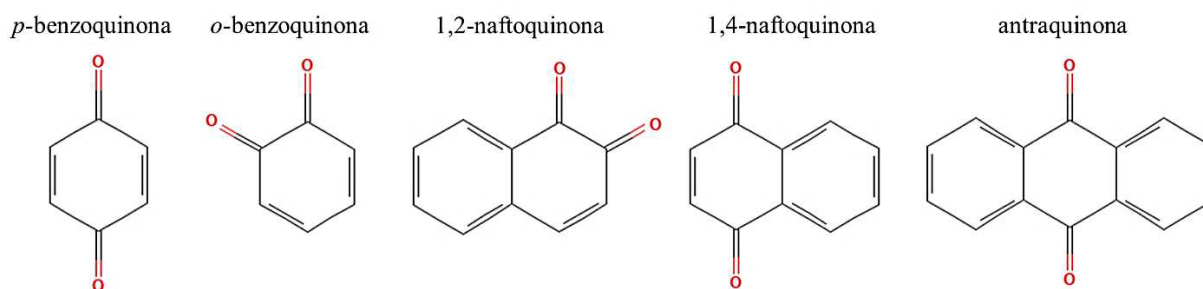
Fonte: Adaptado de (ROSS; SIEGEL, 2021).

1.4 Naftoquinonas

As quinonas são uma classe de moléculas orgânicas cíclicas caracterizadas pela presença um anel de seis átomos de carbono contendo dois grupos carbonila e duas ligações duplas carbono-carbono (ciclohexadiendiona) (OUELLETTE; RAWN, 2018). Geralmente, quinonas possuem conjugação suficiente para apresentar cor e são classificadas em três principais grupos, a depender da estrutura do anel aromático ligado ao anel quinona: benzoquinonas (derivadas anel benzeno), naftoquinonas (derivadas do anel naftaleno) e antraquinonas (derivadas do anel antraceno) (Figura 9) (DULO; PHAN; GITHAIGA; RAES *et al.*, 2021).

Estruturalmente, as naftoquinonas podem variar em relação à variação das posições das carbonilas: o isômero 1,4-naftoquinona (para-naftoquinona) é o mais estável e estudado, enquanto que os isômeros 1,2-naftoquinona (orto-naftoquinona) e 2,6-naftoquinona são menos frequentes (MANCINI; VIGNA; SIGHEL; DEFANT, 2022).

Figura 9 – Classificação das quinonas de acordo com estrutura química



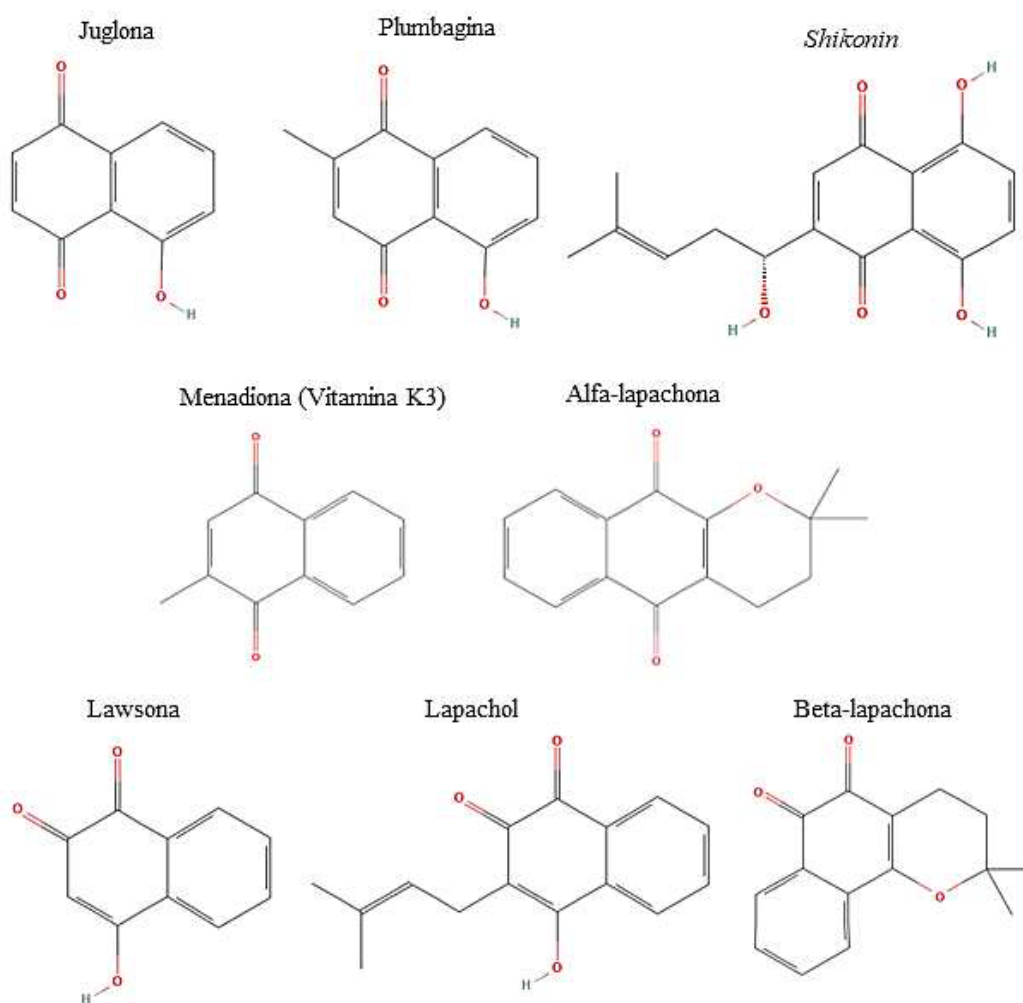
Fonte: Adaptado de <https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov> acesso em 20.07.2023.

A presença da estrutura naftoquinônica é constante na natureza, sendo observada em animais, plantas e microorganismos (HOOK; MILLS; SHERIDAN, 2014). No homem, as vitaminas K1 e K2 são naftoquinonas oriundas da alimentação ou produzidas por bactérias intestinais e participam de importantes mecanismos fisiológicos, como a resposta da coagulação sanguínea. Inclusive, deficiência de vitamina K aumenta o risco de aparecimento de distúrbios da coagulação (HALL; HALL, 2020). Além disso, o anel naftoquinônico integra a estrutura de muitas moléculas bioativas: lapachona, menadiona, plumbagina, juglona, lawsona e os análogos sintéticos dessas substâncias (QIU; WANG; LIN; TANG *et al.*, 2018). Por apresentarem as mais diversas atividades biológicas, como a atividade analgésica (BAWAZEER; RAUF, 2021), antiinflamatória (DONG; LIU; LI; CHEN *et al.*, 2017), antifúngica (FERREIRA; NICOLETTI; BORBA-SANTOS; SILVA *et al.*, 2018), antibacteriana (WANG; CHANG; ZHANG, 2022), antiviral (PACHECO; GONZAGA; CIRNE-SANTOS; BARROS *et al.*, 2022), antiparasitária (ARAÚJO; DAVID; NETO; OLIVEIRA *et al.*, 2017) e antitumoral (Figura 10) (HUANG; JING; HUANG; PAN *et al.*, 2020), as naftoquinonas despertam grande interesse da comunidade científica para a pesquisa e para o desenvolvimento de novos produtos farmacêuticos (AMININ; POLONIK, 2020; PEREYRA; DANTAS; FERREIRA; GOMES *et al.*, 2019).

A juglona (5-hidroxi-1,4-naftoquinona) é uma naftoquinona identificada em plantas do gênero *Juglans*, *Carya* e *Pterocarya* (DENAXA; TSAFOUROS; ROUSSOS, 2022). Inicialmente, identificou-se que essa substância é liberada pelas raízes de plantas como a noz-preta e a noz-manteiga, durante a estação de crescimento, exercendo toxicidade para outras espécies de plantas. Acredita-se que a produção desse “herbicida natural” tenha ocorrido durante a evolução das espécies produtoras para reduzir a competição das árvores ao redor (TATTAR, 2012). Estudos recentes destacam o potencial de aplicação da juglona e de seus análogos no tratamento do câncer (TANG; LI; CHU; MA *et al.*, 2022). Essas substâncias são capazes de exercer efeitos sobre a progressão do ciclo celular (ZHANG; ZHANG; ZHANG;

THAKUR *et al.*, 2019), indução de apoptose e de autofagia (WANG; GAO; WANG; YAO *et al.*, 2018), efeito anti-angiogênico (GOKTURK; ERKOC-KAYA; ARIKOGLU, 2021), efeito de inibição da migração celular e de aumento do estresse oxidativo em células neoplásicas (SESHADRI; RAJARAM; RAJARAM, 2011; XIAO; MING; XU, 2020).

Figura 10 – Naftoquinonas com atividade antineoplásica



Fonte: Adaptado de <https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov> acesso em 20.07.2023.

A lawsona (2-hidroxi-1,4-naftoquinona) é uma naftoquinona existente nas folhas da espécie *Lawsonia inermis* (*Henna*), que possui extensa aplicabilidade cosmética no tingimento de cabelos, unhas e pele, e também tecidos como o couro, lã e seda (PAN; SUN, 2011). Suas propriedades bioativas são atribuídas à sua capacidade de se ligar covalentemente às proteínas, especialmente a queratina no cabelo e na pele, por meio de reações de adição de Michael (PASHA; ANEBOUSELVY; RAMACHARY, 2022). Estudos demonstram a ação antineoplásica dessa substância e análogos em diversas linhagens tumorais. Derivados 2-

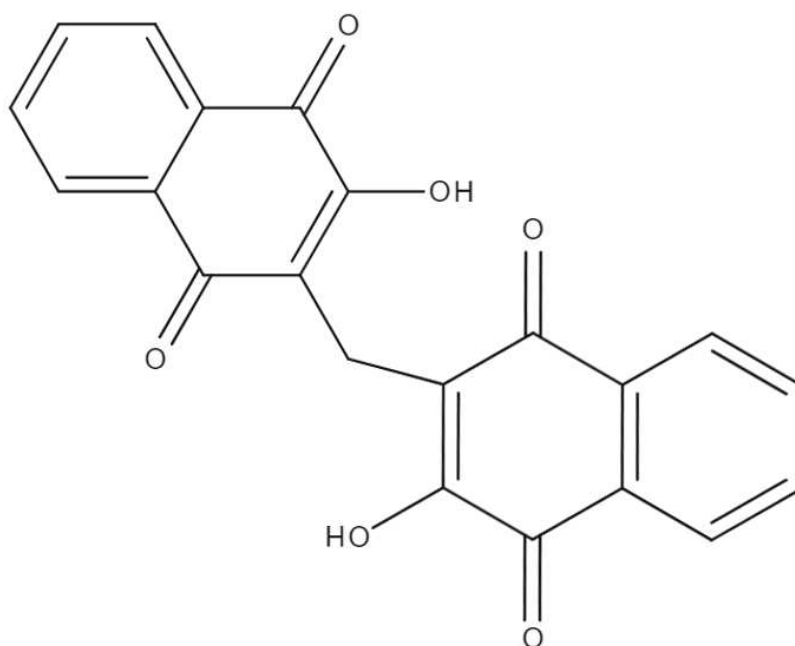
benzillawsona foram capazes de induzir apoptose através da ativação de caspases e parada do ciclo celular na fase S em linhagens de carcinoma de células escamosas (FaDu). Além disso, os derivados também apresentaram atividade de inibição da enzima DNA topoisomerase II (KUMAR; RAVI; VERMA; FATIMA *et al.*, 2017). Complexos fosfínicos de rutênio contendo a lawsona como ligante apresentaram atividade anticancerígena aproximadamente trinta e quatro vezes maior que a cisplatina e cinco vezes maior que a doxorrubicina em linhagem de câncer de próstata. Essa atividade foi relacionada à capacidade de aumento da geração de espécies reativas de oxigênio, aumento da relação BAX/BCL-2 (pró-apoptose/anti-apoptose) e subsequente indução de apoptose (GRANDIS; SANTOS; OLIVEIRA; MACHADO *et al.*, 2019).

1.4.1 Naftoquinona RCDFC

A hibridização molecular é uma ferramenta que vem ganhando destaque na obtenção de novas moléculas sintéticas no desenvolvimento racional de fármacos. A ideia central da hibridização é a combinação covalente de pelo menos dois grupamentos farmacofóricos de dois fármacos e/ou moléculas bioativas (MANCINI; VIGNA; SIGHEL; DEFANT, 2022). As naftoquinonas são consideradas estruturas privilegiadas e modelos úteis no planejamento de híbridos. Em geral, os híbridos apresentam vantagens quando comparados com as moléculas de origem (JARDIM; GUIMARAES; MARIA DO CARMO; CAVALCANTI *et al.*, 2015).

A RCDFC ((3,3'-metileno)-bis-2-hidroxi-1,4 naftoquinona) (Figura 11) foi sintetizada durante o desenvolvimento de híbridos bis-naftoquinonas contendo dois centros redox formados pela lawsona e pela 2-hidroxi-juglona. Tanto o híbrido lawsona-lawsona (RCDFC) quanto lawsona-2-hidroxi-juglona (RC10) apresentaram efeitos antiproliferativos contra linhagens de câncer de próstata metastáticos DU145 e PC3. Observou-se que o efeito antineoplásico está associado à redução da viabilidade celular, indução de apoptose e alteração das fases G1/S e G2/M do ciclo celular. A RCDFC também se mostrou mais seletiva por células não-tumorais HUVEC que a RC10 (FREITAS; RIBEIRO; GUIMARÃES; MOREIRA *et al.*, 2021). O somatório dessas características torna a RCDFC uma molécula promissora para a investigação de seus mecanismos de ação antineoplásicos, incluindo a identificação e validação de seus alvos celulares.

Figura 11 – Estrutura química da RCDFC



Fonte: Elaborado pelo autor.

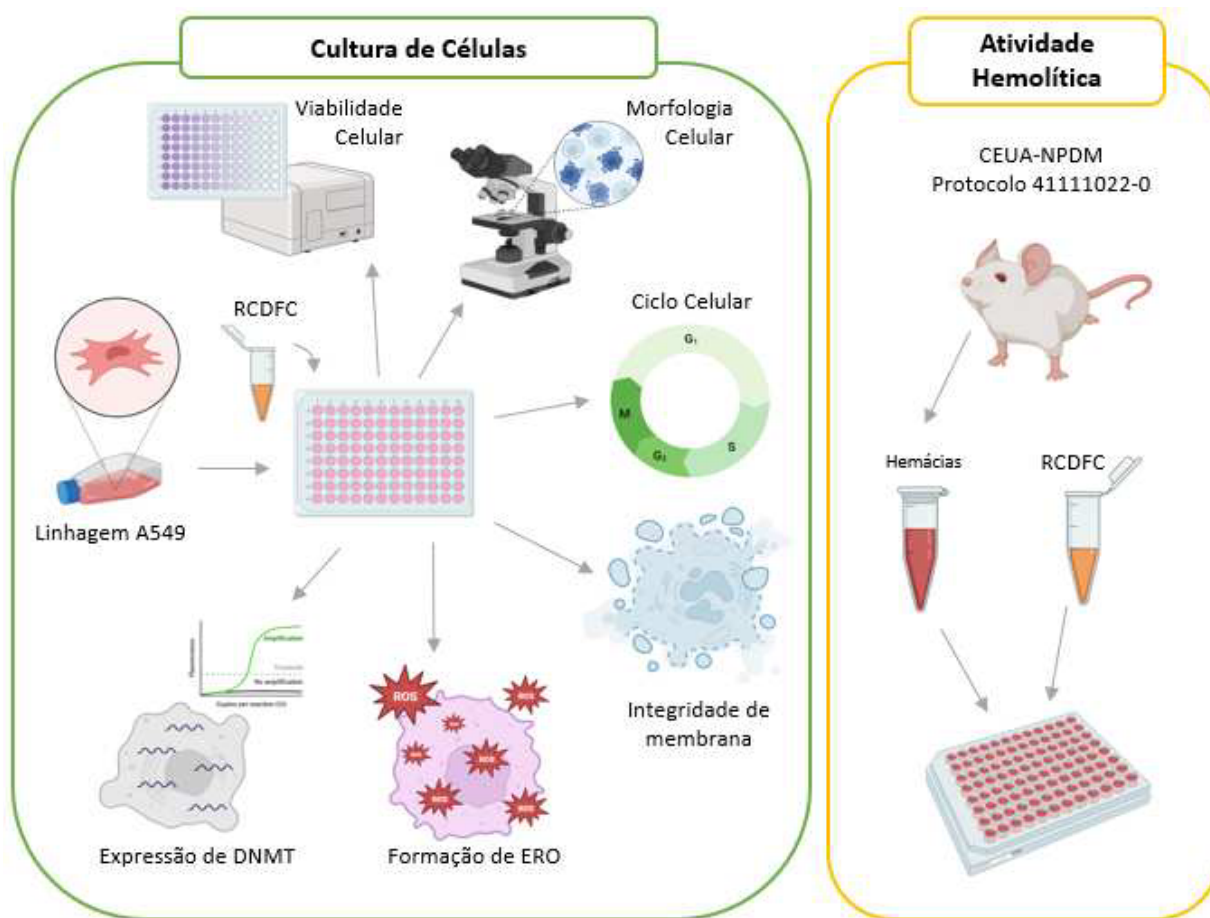
3 MATERIAL E MÉTODOS

Este trabalho foi realizado no Laboratório de Oncologia Experimental (LOE) do Núcleo de Pesquisas e Desenvolvimento de Medicamentos (NPDM) da Universidade Federal do Ceará (UFC). Os experimentos envolvendo microscopia, centrifugação e citometria de fluxo foram realizados na Central Multiusuário do NPDM. Os experimentos de fluorescência, dicroísmo circular e espalhamento de luz dinâmico foram realizados no Departamento de Química Orgânica e Inorgânica da UFC. A naftoquinona RCDFC foi sintetizada, purificada e caracterizada na Universidade Federal Fluminense (UFF) pelo grupo de pesquisa do Prof. Vitor Ferreira. A pesquisa de condições de cristalização foi realizada no RoboLab – Laboratório Automatizado de Cristalização de Macromoléculas, localizado no Laboratório Nacional de Biociências (LNBio) do Centro Nacional de Pesquisa em Energia e Materiais (CNPEM).

1.5 Delineamento experimental

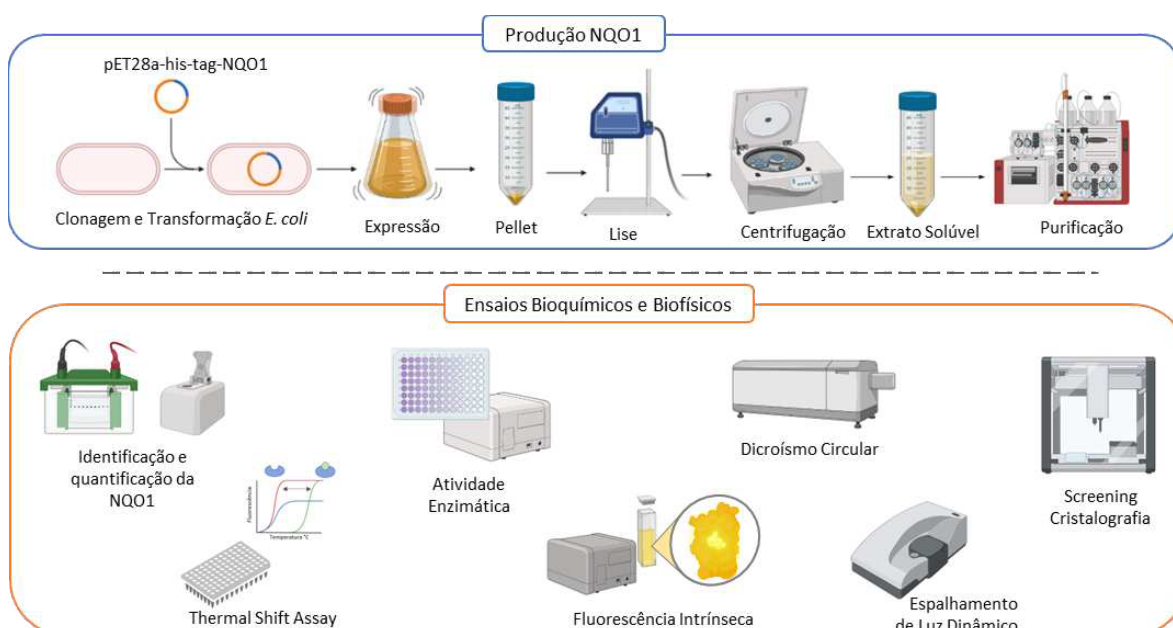
O trabalho foi dividido em duas etapas. Na primeira etapa foi investigado o efeito citotóxico *in vitro* da RCDFC, com ênfase no efeito antineoplásico na linhagem A549 (adenocarcinoma de pulmão) (Figura 12). Na segunda etapa a proteína NQO1 recombinante foi produzida para análise de interação com a naftoquinona RCDFC, por meio de ensaios de bioquímica e de biofísica de proteínas, com o intuito de validar o alvo ou receptor celular dessa substância (Figura 13).

Figura 12 – Estudo do efeito citotóxico da RCDFC



Fonte: Elaborado pelo autor.

Figura 13 – Produção da NQO1 recombinante e avaliação da interação NQO1-RCDFC



Fonte: Elaborado pelo autor.

1.6 Estudo de citotoxicidade *in vitro* da RCDFC

1.6.1 Cultivo e manutenção das linhagens celulares

As linhagens celulares utilizadas nesse estudo foram cedidas pelo NCI-EUA, tendo sido cultivadas em meio RPMI (*Roswell Park Memorial Institute*) 1640, meio DMEM (*Dulbecco's Modified Eagle Medium*) ou meio IMDM (*Iscove's Modified Dulbecco's Medium*), suplementados com 10 % (por cento) de SFB (soro fetal bovino), 100 U/mL (unidades por mililitro) de penicilina e 100 µg/mL (microgramas por mililitro) de estreptomicina, e/ou 0,4% de glicose.

Durante o estudo todas as células foram mantidas em estufa (Panasonic®) a 37 °C (graus celsius) e atmosfera contendo 5 % de CO₂ (dióxido de carbono). Todos os experimentos usando cultura de células eucarióticas foram realizados em três repetições independentes com triplicatas técnicas.

1.6.2 Avaliação da citotoxicidade

O teste do MTT (3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difenil brometo de tetrazólio) é uma análise colorimétrica que quantifica indiretamente a atividade mitocondrial das células viáveis, baseado na conversão enzimática do sal de MTT, de cor amarela, em formazan, de coloração púrpura, pelas desidrogenases mitocondriais (MOSMANN, 1983).

O teste foi utilizado para quantificar a citotoxicidade da RCDFC frente a diversas linhagens celulares, por meio da estimativa do valor da concentração inibitória média (CI₅₀) para cada tipo de célula. As linhagens celulares, tecidos de origem, meios de cultivo e concentrações de plaqueamento das células estão descritas no Apêndice A. A RCDFC foi dissolvida em DMSO (dimetilsulfóxido) P.A. na concentração estoque de 50 mM e testado nas concentrações de 0 – 250 µM em 0,5 % DMSO. O quimioterápico antraquinônico doxorubicina (DOX) foi utilizado como controle positivo de citotoxicidade. Depois de 72 h de incubação com as amostras, as placas foram centrifugadas a 1500 rpm (rotações por minuto) em centrífuga Eppendorf® modelo 5810R. O sobrenadante foi removido e 100 µL de solução MTT 0,5 mg/mL foram adicionados em cada poço. As placas foram incubadas em estufa durante 3 h e centrifugadas a 4000 rpm por 10 minutos. O sobrenadante foi removido e 100 µL de DMSO P.A. foram adicionados para solubilizar o formazan. A absorbância foi medida a 595 nm usando o leitor de placas Victor Nivo Multimode (PerkinElmer®). Os valores

de CI_{50} foram calculados por meio de regressão não linear com o *software Graphpad Prism* versão 8.0 (Dotmatics). O IS (índice de seletividade) foi determinado usando a seguinte fórmula:

$$IS = \frac{CI_{50} \text{ da linhagem não tumoral L929}}{CI_{50} \text{ da linhagem tumoral}}$$

1.6.3 Avaliação da morfologia 41anamicí

Foi realizada coloração com Giemsa (Laborclin®) para visualizar alterações fenotípicas nas células tratadas com as amostras.

Células A549 foram semeadas ($2,5 \times 10^4$ céls/mL) em placas de 24 poços contendo uma lamínula estéril. Depois de 24 h os poços foram tratados com 20 μ M de RCDFC, 40 μ M de RCDFC, 80 μ M de RCDFC, 50 μ M de DIC, 10 μ M de DOX e veículo (0,5% de DMSO). As placas foram incubadas por 12 h, 24 h e 48 h em incubadora a 37°C e 5% de CO₂. Depois, o meio foi removido e a lamínula foi fixada e corada de acordo com as especificações do fabricante. A morfologia das células foi observada em microscópio óptico (Opton®) e fotografadas com aumento de 400X.

1.6.4 Avaliação do número e da viabilidade 41anamicí

As células tratadas com RCDFC foram marcadas com o corante fluorescente PI, que interage com ácidos nucleicos. Células com membrana íntegra foram consideradas viáveis quando emitiam baixa fluorescência e as células marcadas pelo corante foram consideradas não viáveis quando emitia elevada fluorescência vermelha, após excitação por *laser* (NICOLETTI; MIGLIORATI; PAGLIACCI; GRIGNANI *et al.*, 1991).

As células A549 foram semeadas ($4,0 \times 10^4$ céls/mL) em placas de 24 poços. Após 24 h as placas foram tratadas com 20 μ M de RCDFC, 40 μ M de RCDFC, 80 μ M de RCDFC, 50 μ M de DIC, 10 μ M de DOX e veículo (0,5 % de DMSO). No intervalo de 12 h, 24 h e 48 h de incubação com as amostras, as células foram lavadas com PBS, tripsinizadas e transferidas para tubo de 1,5mL. A suspensão foi centrifugada a 500 g por 5 min a 4 °C e submetida a duas lavagens com PBS. O precipitado foi ressuspenso em 300 μ L de tampão de marcação (1 μ g/mL de iodeto de propídeo e 20 ng/mL de RNase A em PBS) e incubado no escuro por 10 min. Em seguida 10.000 eventos por replicata de amostra foram adquiridos no citômetro *Guava Easycyte* (Luminex Corporation). Os dados obtidos foram analisados

usando o *software FlowJo*. Foi realizada análise de variância (ANOVA) seguida por teste de *Tukey* para verificar existência de diferenças significativas entre os grupos.

1.6.5 Avaliação do efeito dos compostos sobre a progressão do ciclo 42anamicí

Considerando que muitos agentes antineoplásicos exercem efeitos sobre o ciclo celular, avaliou-se o efeito da RCDFC sobre o ciclo celular da linhagem A549. As concentrações utilizadas foram baseadas no valor de CI_{50} da RCDFC obtido no ensaio do MTT após 72 h: metade da IC_{50} (20 μ M), IC_{50} (~40 μ M) e o dobro da IC_{50} (80 μ M).

As células A549 foram semeadas ($4,0 \times 10^4$ céls/mL) em placas de 24 poços. Foi realizada privação de soro fetal bovino durante 24 h. Em seguida, as culturas foram tratadas com 20 μ M de RCDFC, 40 μ M de RCDFC, 80 μ M de RCDFC, 50 μ M de DIC, 10 μ M de DOX e veículo (0,5 % de DMSO). Depois de 24 h e 48 h de incubação, as células foram lavadas com PBS (cloreto de sódio (NaCl) 0,9 % + Tampão Fosfato pH 7.4), tripsinizadas e transferidas para tubo de 1,5 mL. A suspensão foi centrifugada a 500 g (graus centígrados) por 5 min a 4 °C e submetida a duas lavagens com PBS. O precipitado foi ressuspenso em 300 μ L de tampão de marcação (0,1 % de Triton X-100, 1 μ g/mL de iodeto de propídeo (PI) e 20 ng/mL de RNase A em PBS) e incubado à temperatura ambiente no escuro por 40 min. Em seguida 10.000 eventos por replicata de amostra foram adquiridos no citômetro *Guava Easycyte* (Luminex Corporation). Os dados obtidos foram analisados usando o *software ModFit* (Verity Software House). Foi realizada análise de variância (ANOVA) seguida por teste de *Tukey* para verificar existência de diferenças significativas entre os grupos.

1.6.6 Avaliação da formação de espécies reativas de oxigênio (ERO)

Foi monitorada a produção de ERRO (peróxido de hidrogênio, radicais hidroxila, peroxinitrito e outras espécies) por meio do tratamento das células com o reagente não fluorescente diacetato 5-(6)-clorometil-2',7'-diclorodihidrofluoresceína (CM-H2DCFDA), que sofre oxidação na presença de espécies reativas de oxigênio e é convertido em um produto altamente fluorescente (KOLAROVA; BAJGAR; TOMANKOVA; KRESTYN *et al.*, 2007).

Células A549 foram cultivadas em meio DMEM sem vermelho de fenol suplementado com 10 % de SFB e semeadas ($5,0 \times 10^4$ céls/mL) em placas de 24 poços. Após 24 h o meio de cultivo foi removido e as placas lavadas com 1 mL de PBS estéril. Em seguida foi adicionado em cada poço 360 μ L de CM-H2DCFDA diluído em PBS (concentração de

final a 10 μ M). A placa foi protegida da luz e incubada a 37°C e 5% CO₂ por 1 h. A solução de marcação foi removida e as células foram incubadas por 3 h com 20 μ M de RCDFC, 40 μ M de RCDFC, 80 μ M de RCDFC, 50 μ M de DIC, e veículo (0,5 % de DMSO) e 5 μ M de β -lapachona (controle positivo) diluídos em meio DMEM sem vermelho de fenol + 2 % de SFB. Em seguida, o meio foi removido dos poços e 150 μ L de tripsina 1X foi adicionada. A suspensão foi transferida para tubos de 1,5 mL e centrifugada a 2000 rpm e 4°C por 5 min. O sobrenadante foi descartado e o precipitado foi ressuspensionado em 150 μ L de PBS. A suspensão foi mantida em banho de gelo e protegida da luz até a análise. Em seguida, 10.000 eventos por replicata de amostra foram adquiridos no citômetro *FACSVerse* (BD Biosciences®). Os dados obtidos foram analisados usando o *software FlowJo* (BD Biosciences®). Foi realizada análise de variância (ANOVA) seguida por teste de *Tukey* para verificar existência de diferenças significativas entre os grupos.

1.6.7 Avaliação da atividade hemolítica

O ensaio de hemólise permite avaliar o potencial da substância em teste de causar dano na membrana celular de eritrócitos, seja pela formação de poros ou pela ruptura total, por meio da quantificação espectrofotométrica da hemoglobina liberada em solução salina (ARZUL; GENTIEN; CRASSOUS, 1994).

Foi previamente submetido e aprovado um projeto no comitê de ética animal (Anexo A). A coleta de sangue foi realizada em três camundongos Swiss (*Mus musculus*). Os animais receberam anestesia geral com cloridrato de xilazina (1,6 mg/kg) e cloridrato de cetamina (3,6 mg/kg). Em seguida, o sangue foi coletado (800 μ L) por punção cardíaca e armazenado em tubos contendo heparina em banho de gelo. A eutanásia dos animais foi realizada por hipovolemia.

O sangue coletado foi diluído cinco vezes em solução 0,9 % de NaCl, centrifugado por 5 min a 1500 rpm e o sobrenadante foi descartado. O processo anterior foi repetido mais duas vezes, obtendo-se um *pellet* de eritrócitos. O teste foi realizado em placa com 96 poços. A concentração final da suspensão de eritrócitos foi de 1 % de células. Soluções de DMSO 5 % e TRITON X-100 0,1 % foram utilizadas como controle negativo e controle positivo, respectivamente. A concentração de RCDFC no teste variou de 21,68 a 1387,7 μ M. Os eritrócitos foram incubados com as substâncias e a placa mantida sob agitação por 1 hora à temperatura ambiente. Logo em seguida, as placas foram centrifugadas a 5000 rpm por 3 min, à temperatura ambiente. O sobrenadante foi transferido para outra placa e foi realizada leitura

da absorvância da hemoglobina a 540 nm no espectrofotômetro *Victor Nivo Multimode* (*PerkinElmer*[®]). A atividade hemolítica das amostras foi normalizada em relação à média dos valores de absorvância do controle positivo.

1.6.8 Avaliação da expressão gênica de DNA metil transferases (DNMTs)

O efeito da RCDFC sobre a expressão do RNA mensageiro (RNAm) das enzimas epigenéticas DNMT1, DNMT2, DNMT3A e DNMT3B foi investigado utilizando reação de transcrição reversa seguida de reação de PCR quantitativa (RT-qPCR).

As células A549 foram semeadas ($4,0 \times 10^4$ céls/mL) em placas de 24 poços. Depois de 24 h as placas foram tratadas com 20 μ M de RCDFC, 80 μ M de RCDFC, 40 μ M de azacitidina (AZA) e veículo (0,5 % de DMSO) por 48 h. Posteriormente, as células foram tripsinizadas e armazenadas em *RNAlater* a -80°C . O RNA total foi extraído utilizando o *kit ReliaPrepTM RNA Cell Miniprep System* (*Promega*[®]). O DNA complementar (cDNA) foi sintetizado utilizando o *kit High-Capacity RNA-to-cDNATM* (*Applied Biosystems*[®]). Os genes foram amplificados utilizando o *kit PowerUpTM SYBRTM Green Master Mix* (*Applied Biosystems*[®]). Os primers utilizados na amplificação estão descritos no Apêndice B. O gene *GADPH* foi utilizado como gene de referência. Os valores de ciclo de quantificação (Cq) foram obtidos no sistema de detecção CFX96 (*Biorad*[®]). A expressão gênica foi normalizada utilizando a média dos valores de Cq do gene *GADPH*. A expressão relativa dos genes foi determinada pelo método $2^{\Delta\Delta\text{Cq}}$ (LIVAK; SCHMITTGEN, 2001), utilizando a linhagem RAJI (Linfoma de Burkitt) como amostra referência. Foi empregado Teste t de *Student* para determinar a significância estatística das diferenças entre as médias e identificar alterações no perfil de expressão das enzimas DNA metil transferases. As diferenças foram consideradas significativas quando apresentaram valores de $p \leq 0,05$.

1.7 Avaliação da interação entre a proteína NQO1 e a naftoquinona RCDFC

1.7.1 Produção e caracterização da proteína NQO1 recombinante

1.7.1.1 Planejamento da construção genética para produção da NQO1

A sequência codificante (*coding sequence*, CDS) da isoforma **a** da proteína NQO1 humana foi integralmente retirada da sequência do RNAm correspondente, com número de referência NM_000903.3, obtido no banco de dados público do National Center for Biotechnology Information (NCBI) (https://www.ncbi.nlm.nih.gov/nuccore/NM_000903.3?report=genbank). À extremidade 5' do CDS de NQO1, isoforma **a**, foram adicionadas as seguintes sequências: sítio de *Xba*I, sequência espaçadora, sítio de ligação ao ribossomo (*ribosome binding site*, RBS), ATG iniciador, códon de cisteína (TGC), polihistidina (6xHis), sequência espaçadora e sítio da protease TEV (*Tobacco etch virus*). À extremidade 3' foi adicionado o sítio de *Nde*I, após o códon de término da tradução. A sequência da construção recombinante (Figura 14) foi otimizada para expressão em *E. coli*, sintetizada quimicamente, clonada no vetor plasmidial pET28a(+) (Figura 15) (Merck KgaA – Darmstadt, Alemanha) e adquirida comercialmente da empresa GenOne Biotech (Rio de Janeiro, Brasil).

Figura 14 – Sequência codificante em formato FASTA da construção recombinante da isoforma a da proteína NQO1

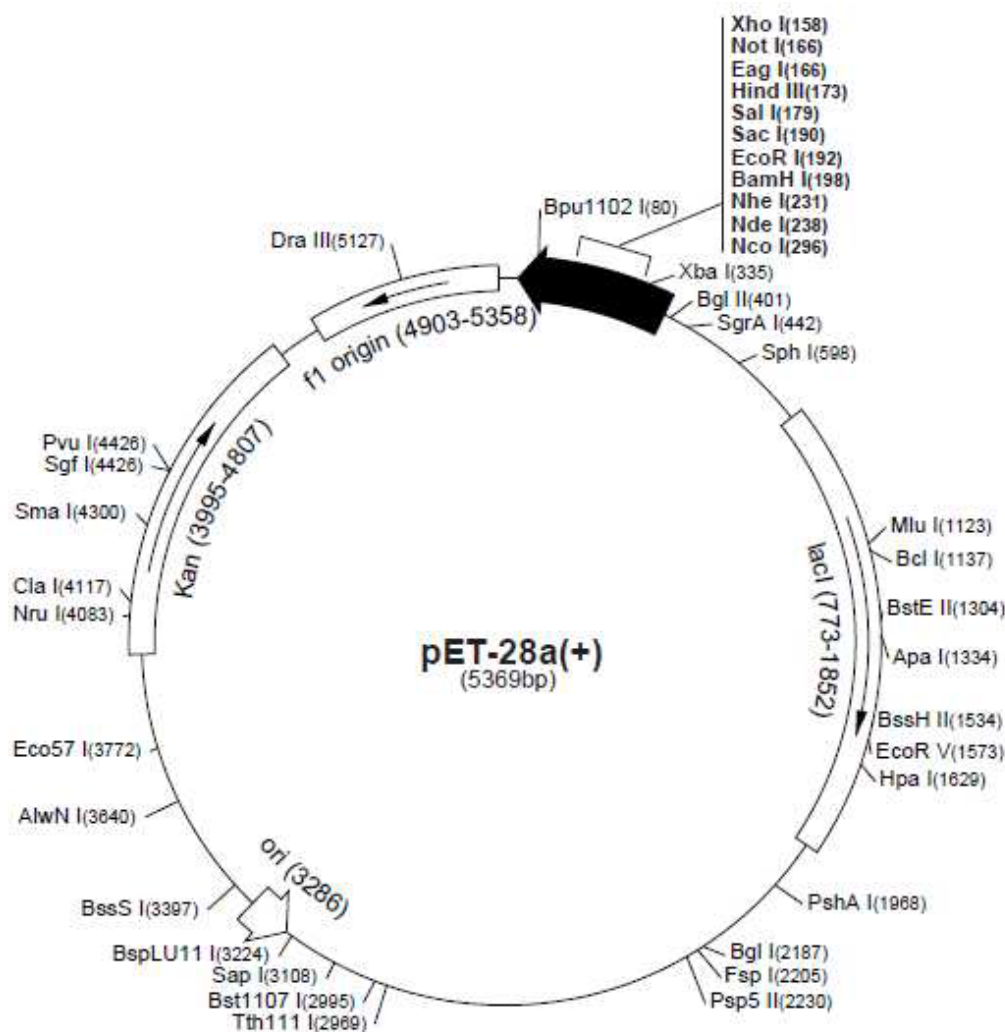
```

XbaI      Espaçadora      RBS      Códon      6xHis      Espaçadora      TEV
TCTAGA AATAATTTTGT TTAAC TTTAAG AAGGAGATATACCATCTGC CATCATCATCATCACGATTACGATA TCCCAACGACCGAAAACCTGTA
TTTTCAGGGC ATGGTCGGCAGAAGAGCACTGATCGTACTGGCTCACTCAGAGAGGACGTCCTTCAACTATGCCATGAAGGAGGCTGCTGCAGCGGCT
TTGAAGAAGAAAGGATGGGAGGTGGTGGAGTCGGACCTCTATGCCATGAACTTCAATCCCATCATTCCAGAAAGGACATCACAGTAAACTGAAGG
ACCCTGCGAACTTTCAGTATCCTGCCGAGTCTGTTCTGGCTTATAAAGAAGGCCATCTGAGCCCAGATATTGTGGCTGAACAAAAGAAGCTGGAAGC
CGCAGACCTTGTGATATTCCAGTTC CCCCCTGCAGTGGTTTGGAGTCCCTGCCATTCTGAAAGGCTGGTTTGAGCGAGTGTTCATAGGAGATTTGCT
TACACTTACGCTGCCATGTATGACAAAGGACCCCTCCGGAGTAAGAAGGCAGTGCTTTCCATCACCCTGGTGGCAGTGGCTCCATGTACTCTCTGC
AAGGGATCCACGGGGACATGAATGTCATTCTCTGGCCAATTCAGAGTGGCATTCTGCATTTCTGTGGCTTCCAAGTCTTAGAACCTCAACTGACATA
TAGCATTGGGCACACTCCAGCAGACGCCCGAATTCAAATCCTGGAAGGATGGAAGAAACGCCTGGAGAATATTTGGGATGAGACACCCTGTATTTT
GCTCCAAGCAGCCTCTTTGACCTAAACTTCCAGGCAGGATTCCTAATGAAAAAAGAGGTACAGGATGAGGAGAAAAACAAGAAATTTGGCCTTTCTG
TGGGCCATCACTTGGGCAAGTCCATCCCAACTGACAACCAGATCAAAGCTAGAAAATGACATATG
NdeI

```

Os códons de início e término da tradução estão hachurados em preto. Em amarelo está hachurada a sequência codificante do gene *NQO1*, retirada do mRNA de código NM_000903.3, do banco de dados do NCBI. Em azul os sítios de clivagem por endonuclease de restrição, para adição do inserto no sítio múltiplo de clonagem do vetor pET28a(+). As demais sequências da construção estão indicadas na própria figura. Fonte: Elaborado pelo autor.

Figura 15 – Mapa do vetor pET28a(+)



Fonte: Adaptado do site https://www.merckmillipore.com/BR/pt/product/pET-28a-DNA-Novagen,EMD_BIO-69864#anchor_VMAP.

1.7.1.2 Transformação bacteriana para amplificação do vetor

O vetor contendo o inserto foi solubilizado em água ultrapurificada estéril e empregado na transformação da cepa de *Escherichia coli* Top10 por eletroporação. A cultura transformada foi submetida a plaquamento em meio Luria-Bertani (LB) ágar contendo 46anamicina (50 µg/mL) e incubada em estufa bacteriológica a 37°C por 18 h. Os clones positivos foram selecionados através do crescimento de colônias na placa. Uma colônia foi adicionada em 10 mL de meio LB líquido contendo 46anamicina (50 µg/mL) e incubada a 37°C e agitação de 200 rpm em incubadora tipo *shaker* de piso (*Ethik Biotechnology*). Posteriormente, foi realizada extração e purificação de DNA plasmidial utilizando o *kit Wizard Plus SV Minipreps DNA Purification System* (Promega®).

1.7.1.3 Transformação bacteriana para expressão da NQO1 recombinante

O plasmídeo purificado na seção 3.3.1.2 foi utilizado na transformação da cepa de *Escherichia coli* BL21 DE3 pRARE, com o uso de polietilenoglicol como carreador de DNA. A cultura transformada foi plaqueada em meio LB ágar contendo 47anamicina (50 µg/mL) e cloranfenicol (37 µg/mL) e incubada em estufa bacteriológica a 37°C por 18 h. Os clones positivos foram selecionados através do crescimento de colônias na placa.

1.7.1.4 Expressão de proteínas e lise de bactérias

Uma colônia de bactérias transformadas na seção 3.3.1.3 foi inoculada em meio TB (*Terrific Broth*) líquido contendo 47anamicina (50 µg/mL) e cloranfenicol (37 µg/mL) e deixada a 37°C e agitação de 200 rpm em incubadora tipo *shaker* de piso (*Ethik Biotechnology*) por 18 h. Em seguida, 5 mL da cultura foi transferida para Erlenmeyer de 2 L (litros) contendo 500 mL de meio TB líquido e os antibióticos 47anamicina (50 µg/mL) e cloranfenicol (37 µg/mL). A cultura foi agitada a 200 rpm e 37°C em incubadora tipo *shaker* de piso (*Ethik Biotechnology*). Foi monitorada a densidade óptica da cultura no comprimento de onda de 600 nm (DO₆₀₀) utilizando espectrofotômetro (Kasvi). A temperatura de incubação foi reduzida para 20°C no momento em que a DO₆₀₀ chegou ao valor de 0,6. Foi iniciada a indução da expressão adicionando 0,3 mM de isopropil β-d-1-tiogalactopiranosídeo (IPTG) quando a DO₆₀₀ atingiu o valor de 0,8. A cultura foi deixada sob agitação a 200 rpm e 20°C por 18 h. Posteriormente, o meio foi centrifugado a 4°C por 10 min. O sobrenadante foi destacado e o precipitado coletado foi ressuspensão em Tampão de Lise (Tris-HCl 50 mM pH 8,0; NaCl 500 mM; 0,05 % (v/v) Tween 20; MgCl₂ 1 mM; β-mercaptoetanol 1 mM; fluoreto de fenilmetilsulfonila 1 mM; Triton X-100 0,5 % (v/v); lisozima 0,25 mg/mL). Foi preparado 15 mL de tampão de lise para cada 100 mL de cultura. As células foram deixadas sob agitação a 4°C por 1 h, seguido de sonicação (pulso 20 segundos *on*, 40 segundos *off*, amplitude 60 %) em banho de gelo por 1 h. O extrato solúvel foi coletado após centrifugação na velocidade de 40000 g a 4°C durante 40 min.

1.7.1.5 Purificação da NQO1

A proteína foi purificada em duas etapas cromatográficas utilizando sistema *FPLC ÄKTA start*TM (*Cytiva Life Sciences*). Na primeira etapa o extrato solúvel foi purificado por

IMAC (*Imobilized Metal Affinity Chromatography*). Foram utilizadas as colunas *HisTrap HP FF* de 1 mL (*Cytiva Life Sciences*) para padronização das condições cromatográficas e a coluna *HisTrap HP* de 5 mL (*Cytiva Life Sciences*) para processamento de maior volume de extrato solúvel. A segunda etapa consistia de uma SEC (*Size Exclusion Chromatography*) em coluna *HiLoad 16/600 Superdex 75* (*Cytiva Life Sciences*) de 120 mL. Todos os tampões utilizados na purificação foram filtrados utilizando filtro de membrana *MF-Millipore*[®] (*Merck*) com tamanho de poro de 0,45 µm, e desaerados em banho ultrassom durante 10 min.

Na primeira etapa de purificação cromatográfica, o extrato solúvel foi aplicado em coluna *HisTrap HP* equilibrada com 5 CV (Volume de Coluna) de Tampão A (50 mM Tris-HCl pH 8.0, 500 mM NaCl, 5 mM Imidazol, 1 mM β-mercaptoetanol). Após aplicação da amostra, a coluna foi lavada com 20 CV de Tampão A e eluída com Tampão B (50 mM Tris-HCl pH 8.0, 500 mM NaCl, 500 mM Imidazol, 1 mM β-mercaptoetanol). A proteína foi eluída num gradiente de Tampão B e as frações foram submetidas a SDS-PAGE (*Sodium Dodecil Sulfate – Poliacrilamide Gel Electrophoresis*). As frações mais puras após IMAC foram unidas e concentradas em tubo *Amicon* (*Merck*) com *cutoff* de 10 kDa. A amostra concentrada foi centrifugada a 15000 g e 4°C por 15 min antes da SEC. A coluna *HiLoad 16/600 Superdex 75* (*Cytiva Life Sciences*) foi equilibrada com 50 mM de Tampão HEPES pH 7.4 contendo 150 mM NaCl e 1 mM DTT (ditiotreitól). A proteína concentrada foi aplicada e as frações eluídas na SEC foram submetidas a SDS-PAGE. As frações mais puras foram unidas para serem utilizadas nos estudos.

1.7.1.6 Identificação da proteína recombinante por SDS-PAGE

As amostras provenientes das cromatografias foram identificadas e diluídas em Tampão Laemmli 4X (250 mM Tris-HCl pH 6.8; 8 % (m/v) SDS; 4 % (m/v) β-mercaptoetanol; 0,4 % (m/v) azul de bromofenol; 40 % (v/v) glicerol) para uma concentração relativa final de 1X em 20 µL de volume total. Em seguida, as amostras foram aquecidas por cinco minutos a 100°C em aquecedor de microtubos a seco. Em seguida as amostras foram aplicadas em gel desnaturante para execução de corrida eletroforética SDS-PAGE (LAEMMLI, 1970). Foi utilizado padrão de massa molecular *Pierce*[™] *Unstained Protein MW Marker* (*Thermo Fisher*). As amostras e o padrão foram aplicados em mini-géis de 9 cm (centímetro) de altura, 10 cm de largura e 1,5 mm (milímetro) de profundidade. O gel foi constituído por uma fase de empacotamento na parte superior (~0,5 cm) e uma fase de resolução na parte inferior (~6,5 cm). A fase de empacotamento foi composta por uma solução

aquosa de 6 % acrilamida/bisacrilamida (29:1); 125 mM Tris pH 6.8; 0,1 % (m/v) SDS; 0,1 % (m/v) persulfato de amônio (APS); 0,1 % (v/v) 1,2-bis(dimetilamino)etano (TEMED). A fase de resolução foi composta por uma solução aquosa de 12 % acrilamida/bisacrilamida (29:1); 375 mM Tris pH 8.8; 0,1 % (m/v) SDS; 0,1 % (m/v) persulfato de amônio (APS); 0,1 % (v/v) 1,2-bis(dimetilamino)etano (TEMED). Os mini-géis foram montados em cubas de eletroforese com tampão de eletrodo (25 mM Tris pH 8.3; 192 mM glicina; 0.1 % (m/v) SDS). Foi aplicada voltagem constante de 80 V (volts) até entrada da amostra no gel de empacotamento e voltagem constante de 120 V até o final da corrida. Após separação eletroforética, os géis foram corados com solução corante (2% (m/v) *Coomassie Blue* R-250 em metanol e água (1:1)) e descorados em solução descorante (ácido acético 10 % (v/v) em metanol 50 % (v/v)). O sistema de preparo de mini-géis, a cuba de eletroforese e a fontes de voltagem foram da *BioRad*, modelo *mini-PROTEAN[®] Tetra Cell*.

1.7.1.7 *Quantificação da proteína NQO1 recombinante*

A proteína recombinante foi quantificada no espectrofotômetro *NanoDrop Lite Plus* (*Thermo Fisher*), com uso de coeficiente de absorvidade molar estimado pela ferramenta *ProtParam* (<https://web.expasy.org/protparam/>) a partir da sequência aminoacídica. Alternativamente, foi utilizado ensaio colorimétrico com *kit Pierce[™] BCA Protein Assay* (*Thermo Fisher*) de acordo com as instruções do fabricante, com emprego de curva-padrão de albumina sérica bovina (BSA) para obtenção da equação da reta e determinação da concentração de proteína por regressão linear simples.

1.7.2 *Ensaio bioquímicos e biofísicos para avaliação de interação entre RCDFC e NQO1*

1.7.2.1 *Ensaio enzimático de ponto final*

A atividade enzimática da proteína NQO1 foi avaliada através da reação repórter de redução de MTT a formazan (PROCHASKA; SANTAMARIA, 1988). A absorbância do formazan foi medida a 595 nm usando o leitor de microplacas *Spectramax Plus* (*Molecular Devices*). O meio de reação foi composto por NADH 200 μ M, menadiona 20 μ M (quinona substrato de NQO1), BSA 0,07 % (m/v), Tween-20 0,2 % (v/v) e MTT 0,2 mg/mL em Tampão Fosfato 10 mM pH 7.5. DIC foi utilizado como controle positivo de inibição da NQO1. As reações foram realizadas em triplicata em placa de 96 poços. O volume total de reação foi 200

μL . RCDFC e DIC foram testados a 200 nM. As medidas de absorvância foram realizadas 10 min após a adição de 25 ng (nanogramas) de NQO1 recombinante à reação.

1.7.2.2 Ensaio enzimático cinético de NQO1 por monitoramento do consumo de NADH

A atividade enzimática da NQO1 foi medida pelo monitoramento da diminuição da absorção de NADH a 340 nm (TSVETKOV; ASHER; REISS; SHAUL *et al.*, 2005). O ensaio foi realizado em leitor de microplacas *Spectramax Plus* (Molecular Devices). O meio reacional continha 25 ng de NQO1, NADH 200 μM , menadiona 20 μM , BSA 0,07 % (m/v), Tween 20 0,2 % (v/v) em Tampão Fosfato 10 mM pH 7.5. O volume total de reação foi de 200 μL . As reações ocorreram em triplicata, numa placa de 96 poços. As medições foram feitas durante 1 h com intervalos de 8 segundos entre cada leitura. Os compostos RCDFC e DIC foram testados a 200 nM.

1.7.2.3 Thermal Shift Assay

A fluorimetria diferencial de varredura (DSF), ou *Thermal Shift Assay*, é uma técnica biofísica acessível, rápida e econômica para o estudo da estabilidade e enovelamento das proteínas (GAO; OERLEMANS; GROVES, 2020). Esse método pode ser utilizado para a identificação de inibidores de proteínas-alvo a partir de bibliotecas de compostos (DESANTIS; REED; RAHHAL; REINKING, 2012). Um corante fluorescente monitora o desdobramento térmico da proteína, e assim, a afinidade de ligação ao ligante pode ser avaliada a partir do deslocamento da temperatura média de desnaturação (ΔT_m) obtida na presença de ligantes em relação à obtida na ausência de ligantes (LO; AULABAUGH; JIN; COWLING *et al.*, 2004). O ligante induz a criação de novas interações moleculares (por exemplo, ligações de hidrogênio e interações de Van der Waals) e/ou o ajuste conformacional na proteína alvo, causando redução da energia livre de *Gibbs* e aumento da estabilidade térmica, ou seja, ocorre aumento da temperatura média de desnaturação da proteína (ΔT_m) (SCOTT; SPRY; ABELL, 2016).

Foi comparado o deslocamento da temperatura média de desnaturação (T_m) da NQO1 na presença do ligante, em relação à desnaturação na ausência de ligante (controle negativo). Foram homogeneizados 10X do fluoróforo Sypro Orange, 10 μM NQO1, 150 mM NaCl e 100 μM de ligante (RCDFC ou DIC) em 50 mM de Tampão HEPES pH 7.4. Aliquotas de 50 μl da mistura foram adicionadas nos poços das placas de PCR (*BioRad*) e seladas com

fita seladora de qualidade óptica (*BioRad*). O ensaio foi realizado em três repetições independentes. A desnaturação térmica foi realizada utilizando o sistema de PCR em tempo real *CFX96* (*Bio-Rad*) com gradiente de temperatura variando de 25 °C a 90 °C e incrementos de 0,5 °C a cada ciclo. O tempo de equilíbrio foi de 10 s em cada temperatura. Os gráficos foram analisados utilizando o *software Graphpad Prism* versão 8.0 (*Dotmatics*). A *T_m* foi considerada como o ponto de mínimo valor no gráfico de temperatura versus derivada da fluorescência.

1.7.2.4 Ensaio de avaliação da fluorescência intrínseca

As medidas de emissão de fluorescência intrínseca do triptofano foram adquiridas no fluorímetro PTI Quanta-Master QM40 (*HORIBA Scientific*), utilizando-se 0,5 mm na abertura das fendas e cubeta de quartzo com caminho óptico de 1 cm. Concentrações crescentes de RCDFC (0 – 18 μM) foram adicionadas sucessivamente em 3 mL de Tampão Fosfato 20 mM pH 7.5 e 150 mM de NaCl contendo 4 μM de NQO1. A diluição da solução de proteína com a adição da RCDFC foi menor que 5 % do volume total. DIC foi utilizado como controle positivo de interação com a proteína NQO1. A excitação foi realizada com o comprimento de onda de 295 nm e a faixa de emissão foi de 305 nm a 420 nm. O valor da constante de dissociação (*K_d*) do DIC e da RCDFC foram determinados no *software Graphpad Prism* versão 8.0 (*Dotmatics*) utilizando a seguinte equação:

$$y = \frac{B_{max} * X}{(K_d + X) + NS * X + Background}$$

Em que *B_{max}* representa o número máximo de sítios de ligação. *NS* é o slope da ligação inespecífica em unidades *Y* divididas por unidades *X*. O *Background* é a quantidade de ligação inespecífica sem ligante adicionado. Fonte: https://www.graphpad.com/guides/prism/latest/curve-fitting/reg_one_site_total.htm

1.7.2.5 Avaliação da estrutura secundária da NQO1 por dicroísmo circular

O dicroísmo circular (CD) é um excelente método para o estudo das conformações adotadas por macromoléculas em solução (MARTIN; SCHILSTRA, 2008). Essa técnica baseia-se na absorção diferencial de radiação polarizada circularmente à esquerda e à direita por cromóforos intrinsecamente quirais ou que fazem parte de estruturas moleculares assimétricas. Como as proteínas possuem um certo número de cromóforos que podem dar origem a sinais de CD, o espectro gerado pode ser analisado para determinar o conteúdo de características estruturais, como o conteúdo de estrutura secundária α-hélice e folha-β (RODGER; MARRINGTON; ROPER; WINDSOR, 2005). Quando um ligante interage com

uma proteína as suas transições adquirem um espectro de dicroísmo circular induzido (ICD), que ocorre devido à perturbação da assimetria estrutural ou devido a rearranjos eletrônicos. Devido às suas exigências relativamente modestas em termos de recursos, o CD tem sido amplamente utilizado para fornecer informações úteis sobre a estrutura das proteínas, a extensão, a taxa de alterações estruturais e a ligação de ligantes (KELLY; PRICE, 2000).

Os espectros de dicroísmo circular foram adquiridos usando espectropolarímetro J-815 *Circular Dichroism* (Jasco®). Foram adquiridos espectros na faixa de comprimento de onda de 200 a 250 nm (*far-UV*) com cubeta de quartzo de caminho ótico de 0,1 cm. As análises foram realizadas com 5 µM de NQO1 e 10 µM de RCDFC em Tampão Fosfato 20 mM pH 7.5. As medidas foram obtidas nas seguintes condições experimentais: *data pitch* de 0,5 nm; D.I.T. de 1 seg; *bandwidth* de 1 nm; velocidade de varredura de 50 nm/min; 10 acumulações de espectros e temperatura de 20 °C. A estrutura secundária aparente da NQO1 na ausência e na presença da RCDFC foi determinada utilizando a ferramenta Bestsel (<https://bestsel.elte.hu/index.php>). Os dados de elipticidade fornecidos em miligraus pelo equipamento foram convertidos para elipticidade molar por resíduo utilizando a seguinte equação:

$$\theta(\text{deg. cm}^2 \cdot \text{dmol}^{-1}) = \frac{\text{Elipticidade}(\text{mdeg}) \cdot 10^6}{\text{Caminho óptico (mm)} \cdot [\text{Proteína}](\mu\text{M}) \cdot n}$$

Onde n representa o número de ligações peptídicas da proteína.

1.7.2.6 Teste de Cristalização

1.7.2.6.1 Remoção da cauda de histidina da NQO1

As frações contendo proteína NQO1 purificada após IMAC foram unidas e transferidas para um saco de diálise (*Spectrun*) com membrana de limite de exclusão molecular de 10 kDa. Em seguida foi adicionada no saco de diálise a protease TEV recombinante na proporção de 50 µg de substrato (his-tag-NQO1) a cada 1 µg de protease TEV. O saco foi adicionado em béquer contendo 5 L de tampão de atividade da protease TEV (50 mM Tampão Tris-HCl pH 8.0; 0,5 mM EDTA; 150 mM NaCl; 1 mM de DTT) e deixada em agitação branda por 16 h na temperatura de 4 a 8 °C. Em seguida, o tampão foi mudado para 50 mM Tampão Tris-HCl pH 8.0, 150 mM NaCl, 1 mM de β-mercaptoetanol a cada 2 h, por quatro vezes. Após, a solução de proteína foi removida do saco de diálise e submetida a IMAC e SEC de acordo com o item 3.3.1.5.

1.7.2.6.2 Avaliação da polidispersividade e do tamanho molecular

O índice de polidispersão e tamanho de partículas da proteína NQO1 sem cauda de histidina foram determinados utilizando a técnica de espalhamento dinâmico de luz (DLS – *Dynamic Light Scattering*) no equipamento *Zetasizer Nano ZS 90 (Malvern)*. A solução de proteína foi filtrada com filtro de *nylon* com tamanho de poro de 0,45 µm. Em seguida, a amostra foi transferida para cubeta de quartzo de caminho óptico de 10 mm. Os dados foram coletados e analisados através do *software Zetasizer versão 6.01 (Malvern)*.

1.7.2.6.3 Pesquisa de condições de cristalização

Os testes de cristalização da NQO1 foram realizados utilizando a técnica de difusão de vapor da gota suspensa (MCPHERSON, 1982). As gotas foram aplicadas na proporção de 1:1 (0,5 µL de solução de proteína e 0,5 µL de solução de cristalização) com a proteína NQO1 nas concentrações de 10 mg/mL, 25 mg/mL e 30 mg/mL. Os *kits* utilizados foram *Crystal Screen HT™ (Hampton Research)*, *SaltRx HT™ (Hampton Research)*, *JCSG+ Suite (NeXtal Biotechnologies)*, *PACT Suite (NeXtal Biotechnologies)*, *Wizard™ Precipitant Synergy (Rigaku)*, *JBScreen Wizard 1 & 2 (Jena Bioscience)*. As placas foram mantidas a 18 °C.

4 RESULTADOS

1.8 Estudo do efeito antineoplásico *in vitro*

1.8.1 Avaliação do efeito citotóxico em painel com linhagens tumorais e não-tumoral

A avaliação antineoplásica inicial da RCDFC mostrou que essa substância foi capaz de exercer efeito antineoplásico em muitas das linhagens celulares testadas (Tabela 1).

Tabela 3 – Efeito citotóxico da RCDFC em linhagens de tumores sólidos, tumores hematológicos e em linhagem não-tumoral após 72 h de incubação

Linhagem	CI ₅₀ (Intervalo de Confiança de 95 %)		
	RCDFC	DOX	
Tumores Sólidos	PC3	43,05 (38,20 - 48,41)	1,21 (1,00 - 1,47)
	SNB19	64,23 (58,20 - 70,79)	0,73 (0,52 - 0,95)
	HCT116	43,69 (40,68 - 46,89)	0,14 (0,08-0,19)
	A549	37,75 (34,03 - 41,85)	1,15 (1,11-2,06)
	B16	70,65 (66,59 - 75,30)	0,02 (0,02-0,03)
Tumores Hematológicos	HL60	36,45 (33,74 - 39,28)	0,14 (0,01-0,3)
	KG1	153,8 (128,40 - 190,70)	0,11 (0,7-0,15)
	RAJI	70,46 (61,16 - 81,65)	2,33 (2,02-2,71)
	K562	44,47 (38,62 - 51,21)	0,49 (0,48-0,5)
Não-tumoral	L929	35,07 (32,85 - 37,45)	1,72 (1,58-1,87)

Fonte: Elaborado pelo autor. DOX: doxorubicina (quimioterápico antraquinônico utilizado como controle positivo de citotoxicidade). Os valores de CI₅₀ estão apresentados em µM. Entre parênteses, os valores de intervalo de confiança de 95 %.

Em relação às linhagens provenientes de tumores sólidos, foram observados valores de CI_{50} menores que $50 \mu\text{M}$ para as linhagens PC3 (próstata), HCT116 (cólon) e A549 (pulmão). Entre essas três linhagens o menor valor de CI_{50} foi obtido quanto a RCDFC foi testada na linhagem de adenocarcinoma de pulmão A549 ($37,75 \mu\text{M}$). Nas linhagens oriundas de tumores hematológicos, foram observados valores de CI_{50} menores que $50 \mu\text{M}$ para as linhagens HL60 (leucemia pró-mielocítica) e K562 (leucemia mieloide crônica), cujo valores de CI_{50} foram $36,45 \mu\text{M}$ e $44,47 \mu\text{M}$, respectivamente.

Na avaliação do efeito citotóxico da RCDFC em linhagem não-tumoral L929 (fibroblasto murino) o valor de CI_{50} foi de $35,07 \mu\text{M}$. O índice de seletividade variou de 0,2 a 1,0, sendo observados maiores valores de IS foram nas linhagens HL60 (1,0) e A549 (0,9) e (Tabela 2).

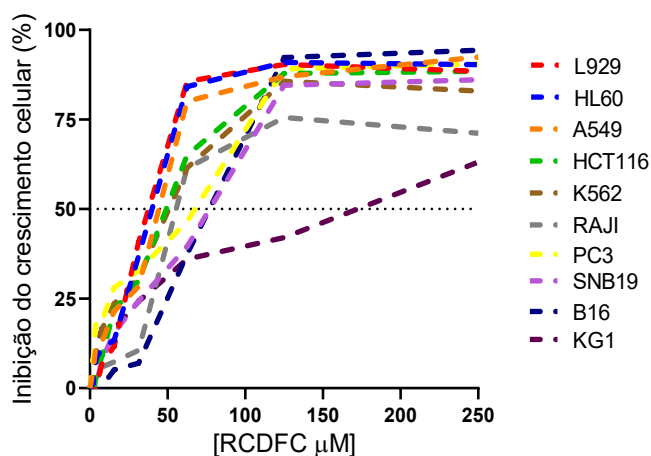
Tabela 4 – Valores de Índice de Seletividade da RCDFC em diferentes linhagens tumorais

Linhagem	IS		
	RCDFC	DOX	
Tumores Sólidos	PC3	0,8	1,4
	SNB19	0,5	2,4
	HCT116	0,8	12,3
	A549	0,9	1,5
	B16	0,5	86,0
Tumores Hematológicos	HL60	1,0	12,3
	KG1	0,2	15,6
	RAJI	0,5	0,7
	K562	0,8	3,5

Fonte: DOX: doxorubicina (quimioterápico antraquinônico utilizado como controle positivo de citotoxicidade). Elaborado pelo autor.

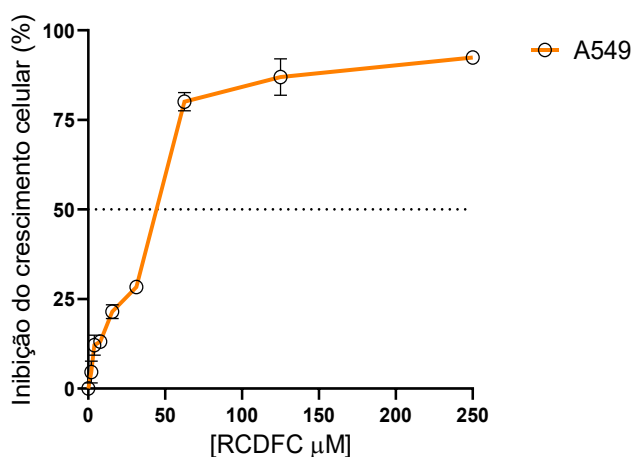
O perfil citotóxico da RCDFC após 72 h de incubação com todas as linhagens celulares, e em concentrações crescentes dessa substância, está representado na Figura 16. Devido ao perfil de seletividade da RCDFC quanto ao seu efeito citotóxico frente à linhagem de câncer de pulmão A549 (Figura 17), e considerando que este câncer possui alta mortalidade tanto entre homens como entre mulheres, esta linhagem foi selecionada para dar continuidade aos demais experimentos de investigação do efeito antineoplásico.

Figura 16 – Perfil citotóxico da RCDFC em linhagem não-tumoral e em diferentes linhagens tumorais após 72 h



Fonte: Elaborado pelo autor.

Figura 17 – Curva de inibição do crescimento celular da RCDFC na linhagem tumoral A549 após 72 h

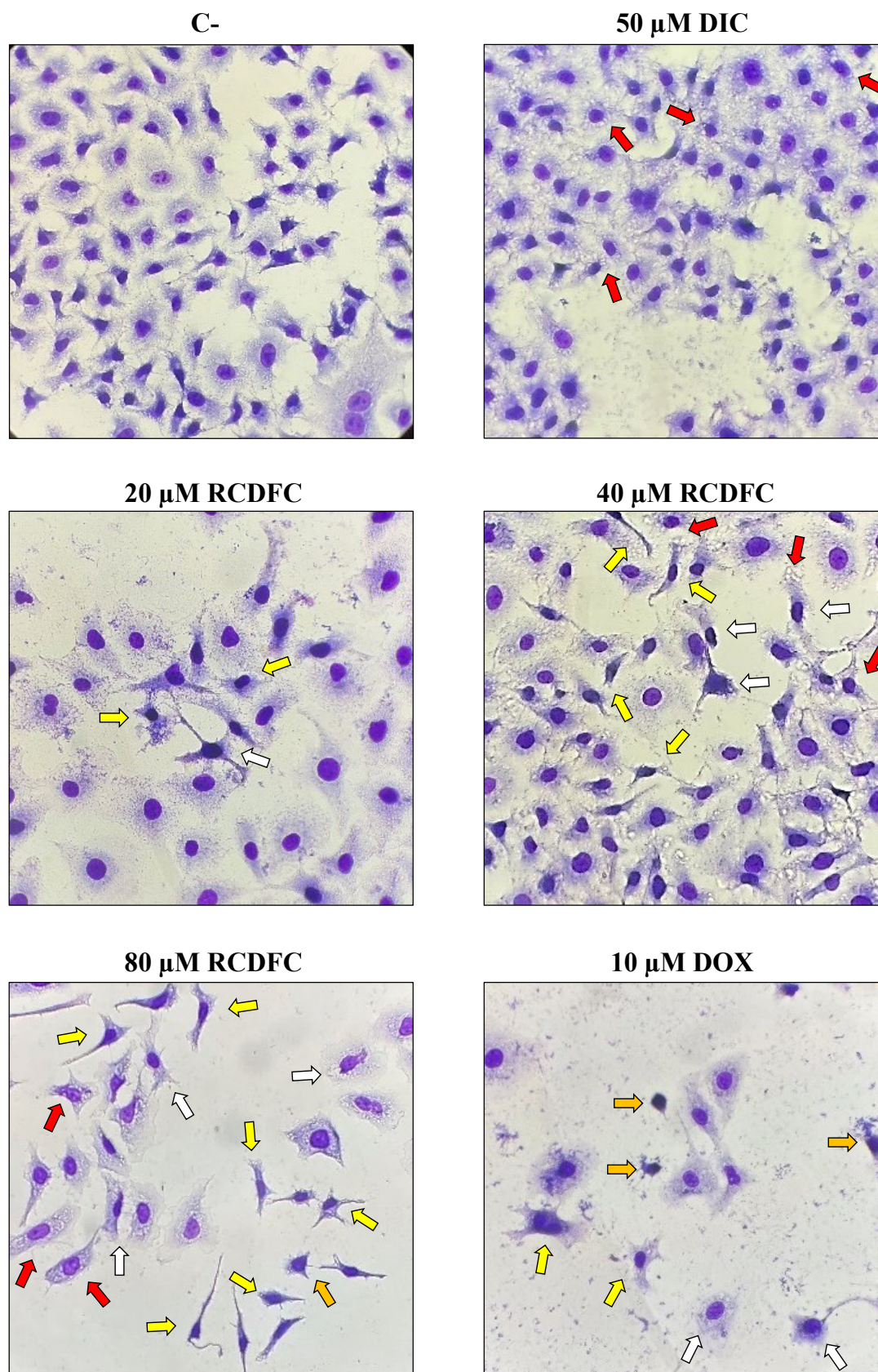


Fonte: Elaborado pelo autor.

1.8.2 Avaliação das alterações morfológicas

A análise microscópica das células A549 tratadas com RCDFC por 48 h revelou que essa substância induz as células a sofrerem condensação de cromatina, perda de conteúdo citoplasmático, retração do volume celular e vacuolização citoplasmática (Figura 18). Essas alterações foram mais evidenciadas quando as células foram expostas a maiores concentrações de RCDFC (40 μM e 80 μM), sugerindo um efeito dependente de concentração. Também foi possível identificar presença de restos celulares, assim como o tratamento com doxorubicina (controle positivo de morte celular).

Figura 18 – Micrografias de células A549 após 48 h de tratamento com RCDFC



C-: Controle negativo contendo 0,5 % de DMSO (veículo utilizado para diluição das substâncias). 10 μM de doxorubicina (DOX) foi utilizado como controle positivo de morte celular. 50 μM de dicumarol (DIC) foi utilizado como controle positivo de inibição de NQO1 e de estrutura semelhante

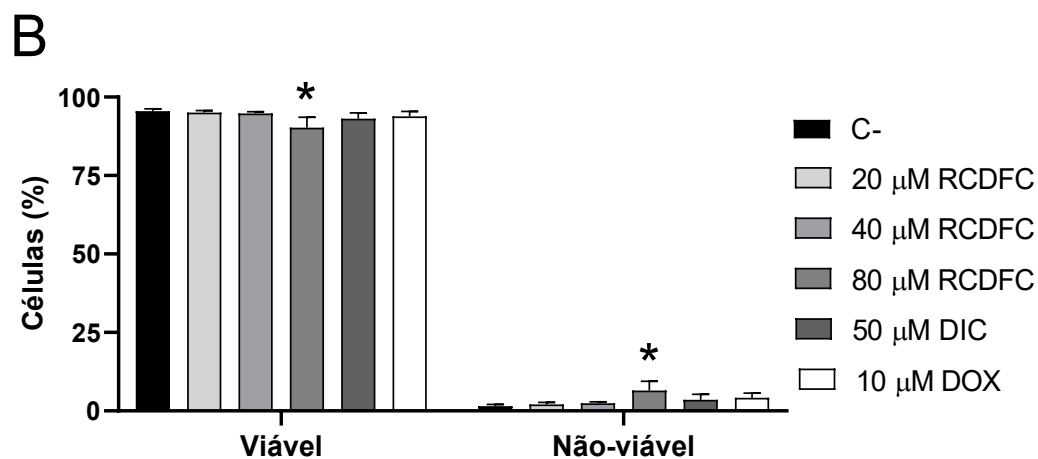
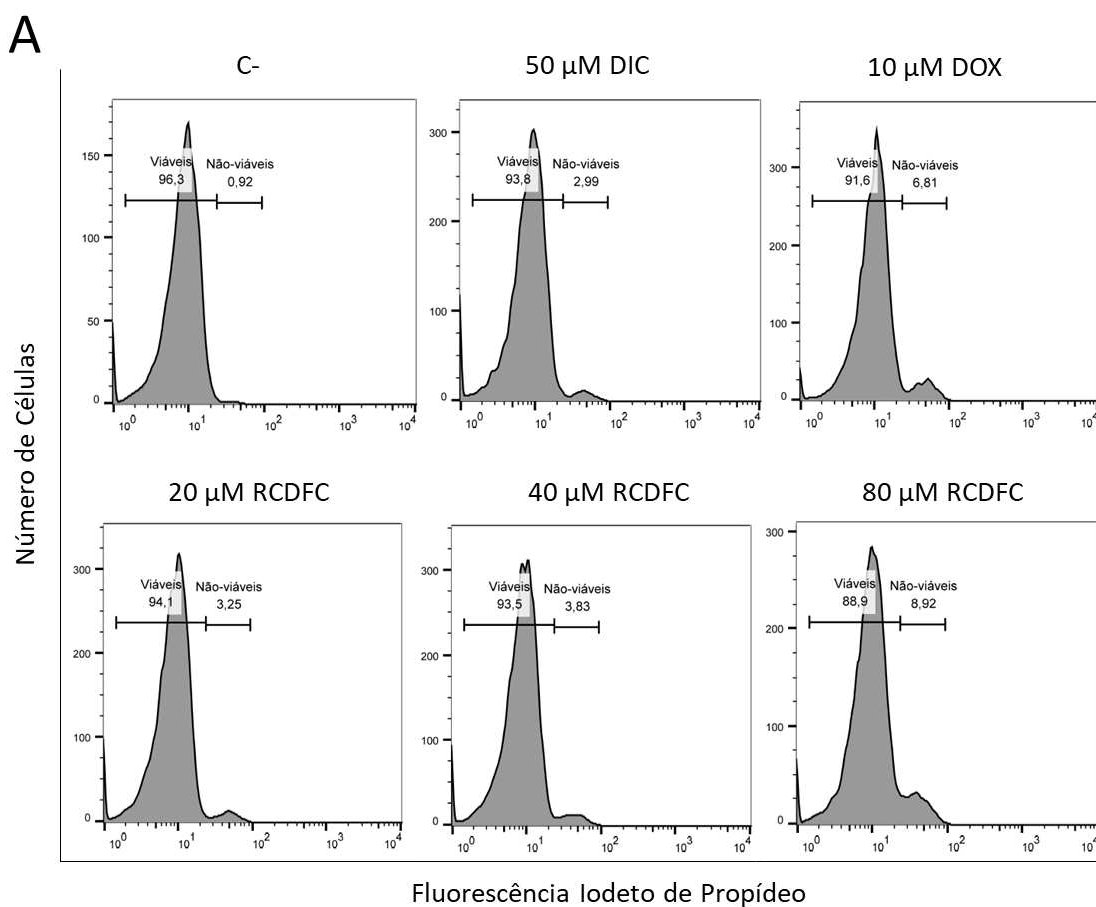
à RCDFC. Setas amarelas apontam processo de retração do volume celular e condensação de cromatina. Setas brancas apontam células em processo de morte. Setas laranjas apontam perda de conteúdo citoplasmático. Setas vermelhas indicam vacuolização citoplasmática. Imagens foram obtidas por microscopia óptica com aumento de 400X. Fonte: Elaborado pelo autor.

1.8.3 Avaliação do efeito da RCDFC sobre a viabilidade celular e número de células

A marcação das células A549 com iodeto de propídeo permitiu a determinação do percentual de células viáveis e não viáveis após tratamento com RCDFC durante 12 h (Figura 19), 24 h (Figura 20) e 48 h (Figura 21). O tratamento das células com 20 μM e 40 μM de RCDFC nos períodos de 12 h, 24 h e 48 h não causou redução na população de células viáveis e também não aumentou o percentual de células não-viáveis. No entanto, quando as células foram expostas à alta concentração de RCDFC (80 μM), houve redução de viabilidade celular e aumento de células não viáveis desde o menor período de incubação (12 h).

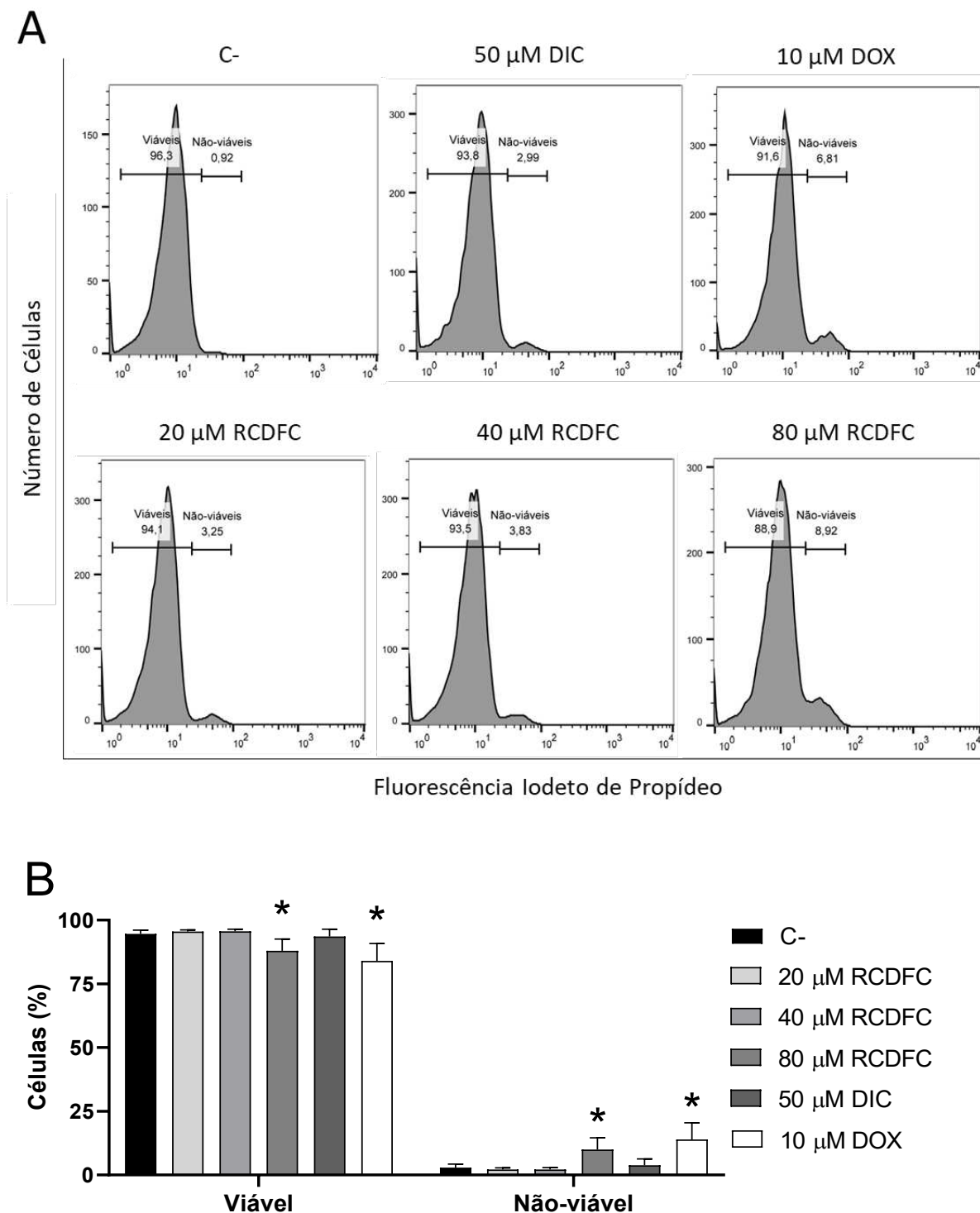
Durante a aquisição dos dados de citometria de fluxo foi possível verificar a contagem total do número células por microlitro de amostra injetada citômetro (Figura 22A). Foi observado que o tratamento da linhagem A549 com 20 μM , 40 μM e 80 μM de RCDFC durante 12 h e 24 h causa pouco efeito de decréscimo da população celular. No entanto, após 48 h, os tratamentos com 40 μM e 80 μM de RCDFC causaram redução da quantidade total de células quando comparado com o controle negativo (Figura 22B). Esses dados evidenciam que a redução da população de células causada pela RCDFC ocorre de forma dependente de tempo, uma vez que foi observada apenas no maior período de tratamento (48 h). Além disso, o decréscimo do número de células acontece de forma dependente de concentração, pois a menor concentração de substância (20 μM) não causou redução da população celular, enquanto que maiores concentrações (40 μM e 80 μM) foram suficientes para causar efeito em 48 h.

Figura 19 – Efeito da RCDFC sobre a viabilidade celular após 12 h



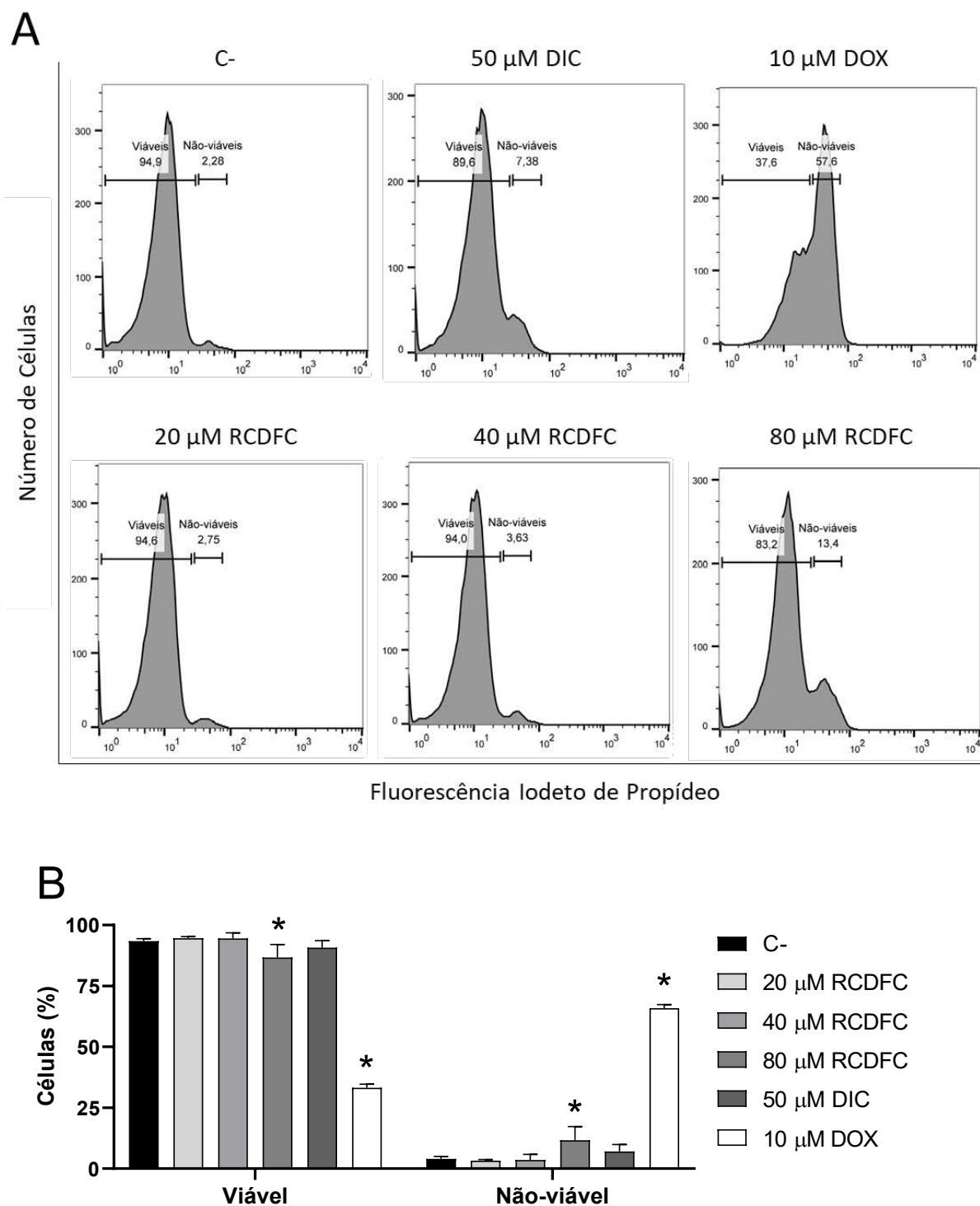
Avaliação do percentual do percentual de células viáveis e não viáveis utilizando citometria de fluxo após 12 h de tratamento com RCDFC. Os eventos foram adquiridos no citômetro *Guava Easycyte (Luminex Corporation)*. C-: Controle Negativo contendo 0,5 % de DMSO (veículo utilizado para diluição das substâncias). 10 μ M de doxorubicina (DOX) foi utilizado como controle positivo de morte celular, com grupo quinona na estrutura. 50 μ M de dicumarol (DIC) foi utilizado como controle positivo de inibição de NQO1 e de estrutura semelhante à RCDFC. Os dados estão apresentados como os valores da média \pm E.P.M., obtidos por três experimentos independentes realizados em triplicata. * $p < 0,05$ comparado com o controle negativo (C-) por ANOVA seguido de teste de Tukey's. Dez mil eventos foram adquiridos em cada experimento. Fonte: Elaborado pelo autor.

Figura 20 – Efeito da RCDFC sobre a viabilidade celular após 24 h



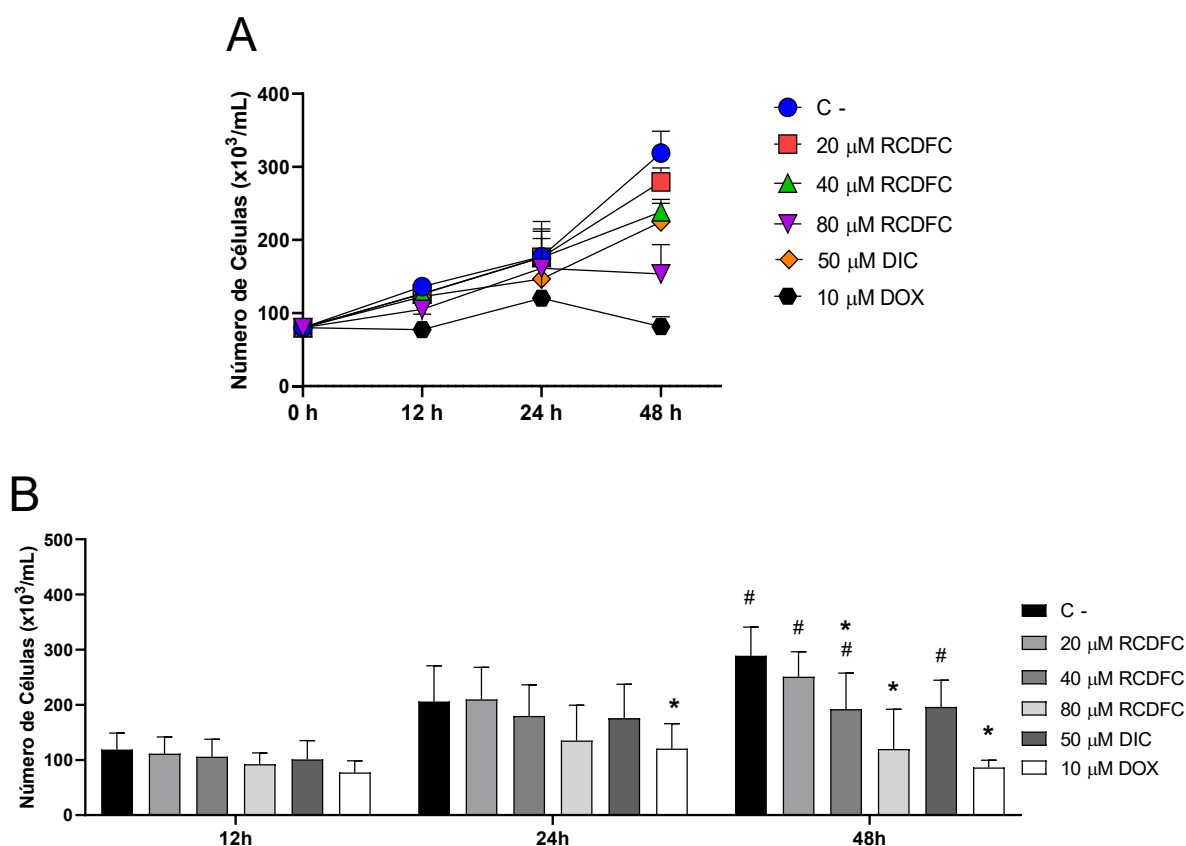
Avaliação do percentual do percentual de células viáveis e não viáveis utilizando citometria de fluxo após 24 h de tratamento com RCDFC. Os eventos foram adquiridos no citômetro *Guava Easycyte (Luminex Corporation)*. C-: Controle Negativo contendo 0,5 % de DMSO (veículo utilizado para diluição das substâncias). 10 μ M de doxorubicina (DOX) foi utilizado como controle positivo de morte celular, com grupo quinona na estrutura. 50 μ M de dicumarol (DIC) foi utilizado como controle positivo de inibição de NQO1 e de estrutura semelhante à RCDFC. Os dados estão apresentados como os valores da média \pm E.P.M., obtidos por três experimentos independentes realizados em triplicata. * $p < 0,05$ comparado com o controle negativo (C-) por ANOVA seguido de teste de Tukey's. Dez mil eventos foram adquiridos em cada experimento. Fonte: Elaborado pelo autor.

Figura 21 – Efeito da RCDFC sobre a viabilidade celular após 48 h



Avaliação do percentual do percentual de células viáveis e não viáveis utilizando citometria de fluxo após 48 h de tratamento com RCDFC. Os eventos foram adquiridos no citômetro *Guava EasyCite (Luminex Corporation)*. C-: Controle Negativo contendo 0,5 % de DMSO (veículo utilizado para diluição das substâncias). 10 µM de doxorubicina (DOX) foi utilizado como controle positivo de morte celular, com grupo quinona na estrutura. 50 µM de dicumarol (DIC) foi utilizado como controle positivo de inibição de NQO1 e de estrutura semelhante à RCDFC. Os dados estão apresentados como os valores da média \pm E.P.M., obtidos por três experimentos independentes realizados em triplicata. * $p < 0,05$ comparado com o controle negativo (C-) por ANOVA seguido de teste de Tukey's. Dez mil eventos foram adquiridos em cada experimento. Fonte: Elaborado pelo autor.

Figura 22 – Monitoramento do número total de células A549 após tratamento com RCDFC

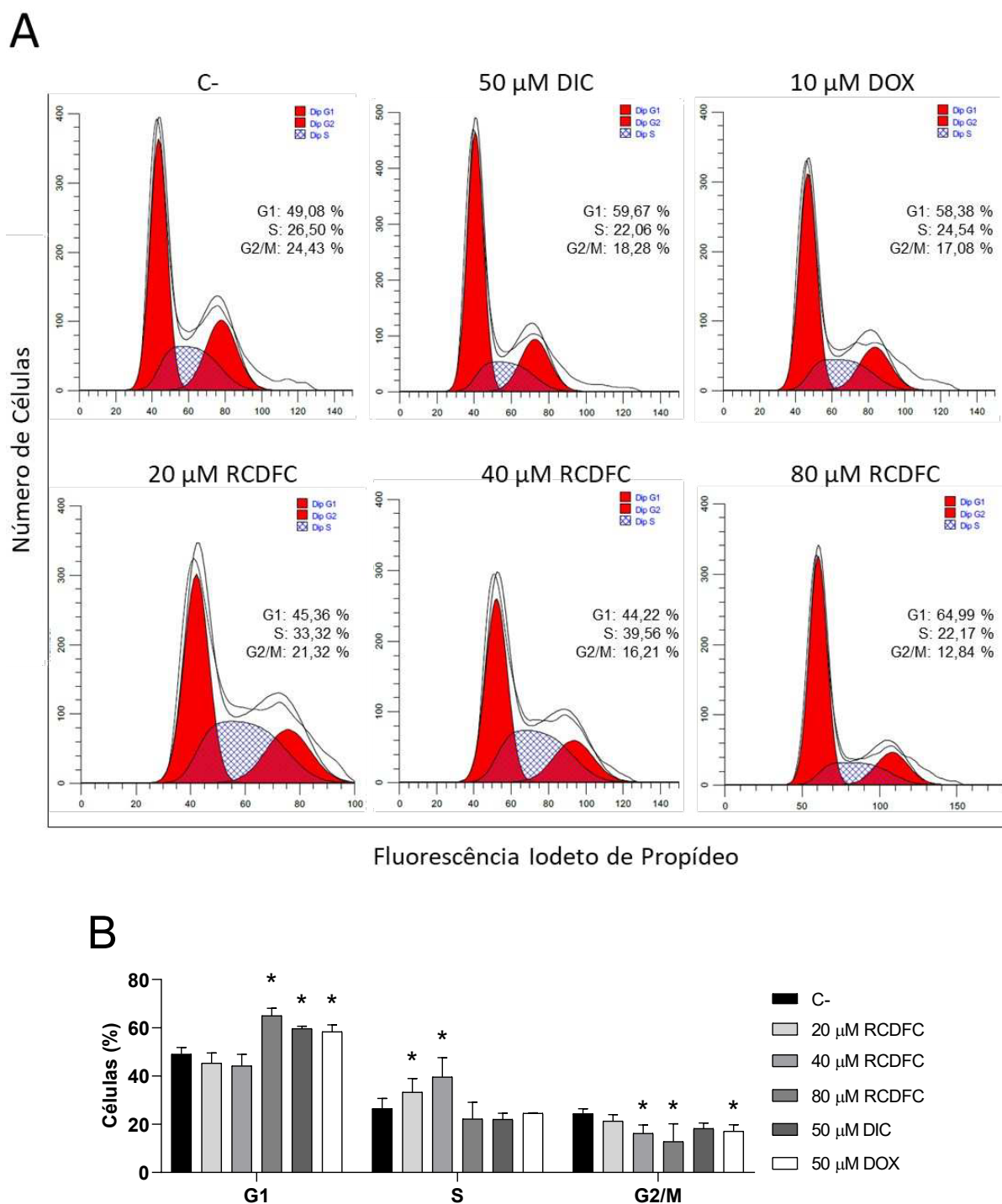


Média do número total de células determinado por citometria de fluxo em diferentes intervalos de tratamento (Figura A). Análise estatística da média \pm E.P.M do número total de células após 12 h, 24 h e 48 h de tratamento (Figura B). Os eventos foram adquiridos no citômetro *Guava Easycite (Luminex Corporation)* em três experimentos independentes realizados em triplicata. C-: Controle negativo contendo 0,5 % de DMSO (veículo utilizado para diluição das substâncias). 10 μ M de doxorrubicina (DOX) foi utilizado como controle positivo de redução do número de células. 50 μ M de dicumarol (DIC) foi utilizado como controle positivo de inibição de NQO1 e de estrutura semelhante à RCDFC. O símbolo * representa $p < 0,05$ quando comparado com C- avaliado por ANOVA seguido de teste de Tukey's. O símbolo # representa $p < 0,05$ quando comparado com DOX avaliado por ANOVA seguido de teste de Tukey's. Fonte: Elaborado pelo autor.

1.8.4 Avaliação do efeito da RCDFC sobre a progressão do ciclo celular

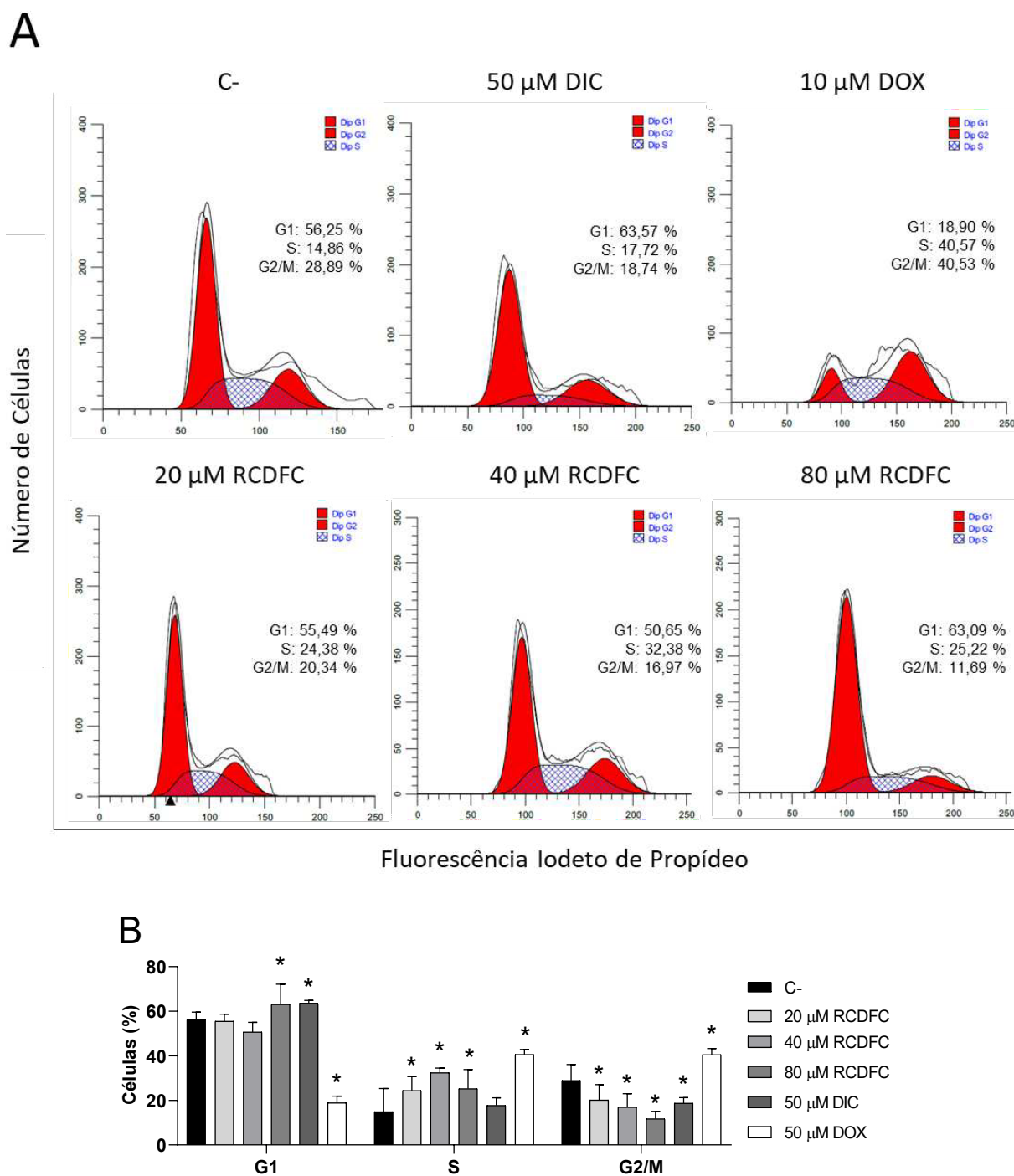
Nesse ensaio, a análise do conteúdo de DNA das células A549 tratadas com RCDFC mostrou que o efeito citotóxico dessa substância envolve aumento da população de células na fase G1 e na fase S e diminuição da população na fase G2/M (Figura 23). Os dados obtidos indicam aumento do percentual de células na fase G1 tanto após 24 h quanto após 48 h de tratamento com 80 μ M de RCDFC. Foi observado que todas as concentrações de RCDFC (20 μ M, 40 μ M e 80 μ M) causaram aumento de população na fase S e diminuição da fase G2/M após 48 h (Figura 24).

Figura 23 – Ciclo celular da linhagem A549 após 24 h de tratamento com RCDFC



Os eventos foram adquiridos no citômetro *Guava Easycyte (Luminex Corporation)*. Figura A: Histogramas com percentual das fases do ciclo celular gerados após análise dos dados no software *ModFit versão 5.0 (Verity Software House)*. No eixo Y está representado a contagem de eventos e no eixo X a emissão de fluorescência do iodeto de propídeo, que é proporcional ao conteúdo de DNA das células. C-: Controle negativo contendo 0,5 % de DMSO (veículo utilizado para diluição das substâncias). 10 μM de doxorubicina (DOX) foi utilizado como controle positivo de interferência no ciclo celular. 50 μM de dicumarol (DIC) foi utilizado como controle positivo de inibição de NQO1 e de estrutura semelhante à RCDFC. Figura B: Distribuição do percentual de células A549 nas fases G1, S e G2/M do ciclo celular após tratamento com RCDFC. Os dados estão apresentados como os valores da média ± E.P.M., obtidos por três experimentos independentes realizados em triplicata. * $p < 0,05$ comparado com o controle negativo (C-) por ANOVA seguido de teste de Tukey's. Dez mil eventos foram adquiridos em cada experimento. Fonte: Elaborado pelo autor.

Figura 24 – Ciclo celular da linhagem A549 após 48 h de tratamento com RCDFC

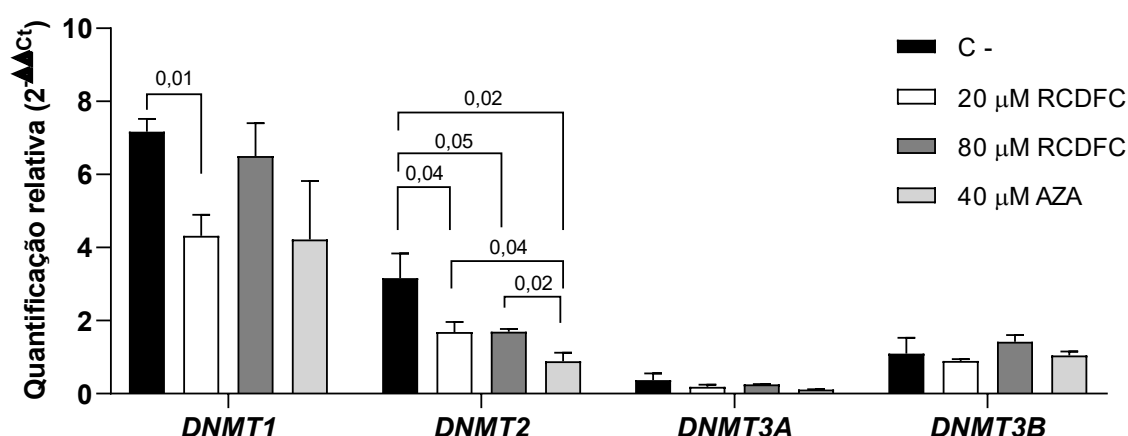


Os eventos foram adquiridos no citômetro *Guava Easycyte* (Luminex Corporation). Figura A: Histogramas com percentual das fases do ciclo celular gerados após análise dos dados no software *ModFit* versão 5.0 (Verity Software House). No eixo Y está representado a contagem de eventos e no eixo X a emissão de fluorescência do iodeto de propídeo, que é proporcional ao conteúdo de DNA das células. C-: Controle negativo contendo 0,5 % de DMSO (veículo utilizado para diluição das substâncias). 10 μM de doxorubicina (DOX) foi utilizado como controle positivo de interferência no ciclo celular. 50 μM de dicumarol (DIC) foi utilizado como controle positivo de inibição de NQO1 e de estrutura semelhante à RCDFC. Figura B: Distribuição do percentual de células A549 nas fases G1, S e G2/M do ciclo celular após tratamento com RCDFC. Os dados estão apresentados como os valores da média ± E.P.M., obtidos por três experimentos independentes realizados em triplicata. * $p < 0,05$ comparado com o controle negativo (C-) por ANOVA seguido de teste de Tukey's. Dez mil eventos foram adquiridos em cada experimento. Fonte: Elaborado pelo autor.

1.8.5 Avaliação da expressão gênica de DNA metil transferases (DNMTs)

Este ensaio demonstrou que os efeitos celulares da RCDFC causam redução da expressão do RNAm dos genes *DNMT1* e *DNMT2* (Figura 25) após 48 h de tratamento. A expressão do gene *DNMT1* parece ser modulada a depender da concentração de RCDFC, uma vez que 20 μM de RCDFC foi capaz alterar o perfil de expressão, mas 80 μM de RCDFC não foi capaz de exercer o mesmo efeito quando comparado com o controle negativo. Todas as concentrações de RCDFC utilizadas nesse experimento (20 μM e 80 μM) foram capazes de diminuir a expressão do gene *DNMT2* em relação ao controle negativo, o mesmo efeito foi observado também no tratamento com o controle positivo de demetilação de DNA (40 μM de azacitidina).

Figura 25 – Expressão dos genes *DNMT1*, *DNMT2*, *DNMT3A* e *DNMT3B* em células A549 após 48 h de tratamento com RCDFC



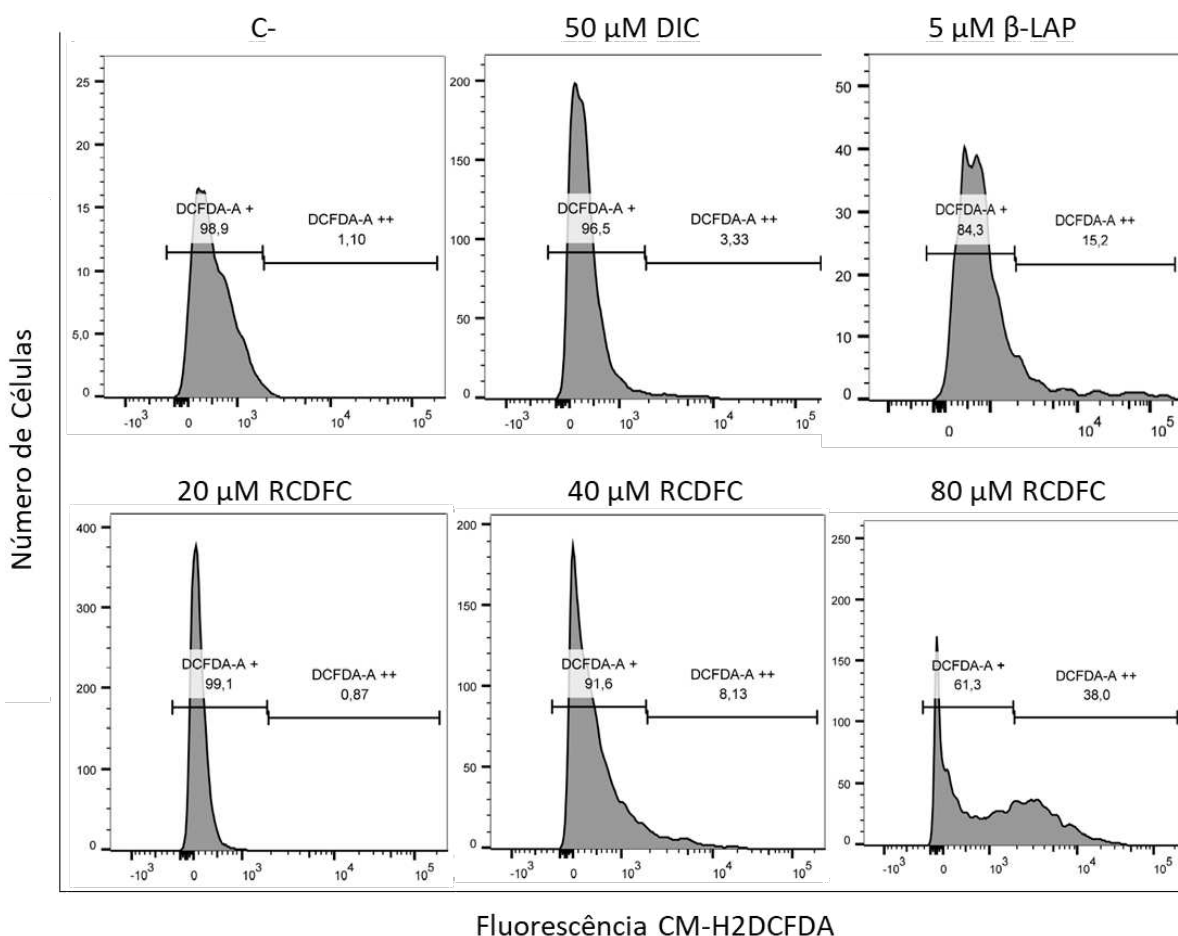
0,5 % de DMSO foi utilizado como controle negativo (C-) e 40 μM de azacitidina (AZA) foi utilizado como controle positivo de demetilação. Acima de cada colchete horizontal está destacado o valor de p após Teste t de Student. Fonte: Elaborado pelo autor.

1.8.6 Avaliação da formação de espécies reativas de oxigênio (ERO)

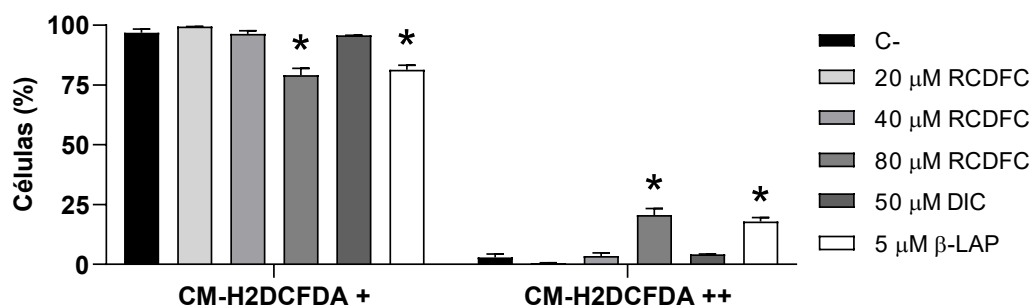
A Figura 26A mostra os histogramas obtidos após análise de citometria de fluxo com células A549 tratadas com RCDFC e a Figura 26B mostra a análise estatística dos resultados obtidos.

Figura 26 – Efeito da RCDFC na produção de ERO em células A549 após 3 h de incubação

A



B



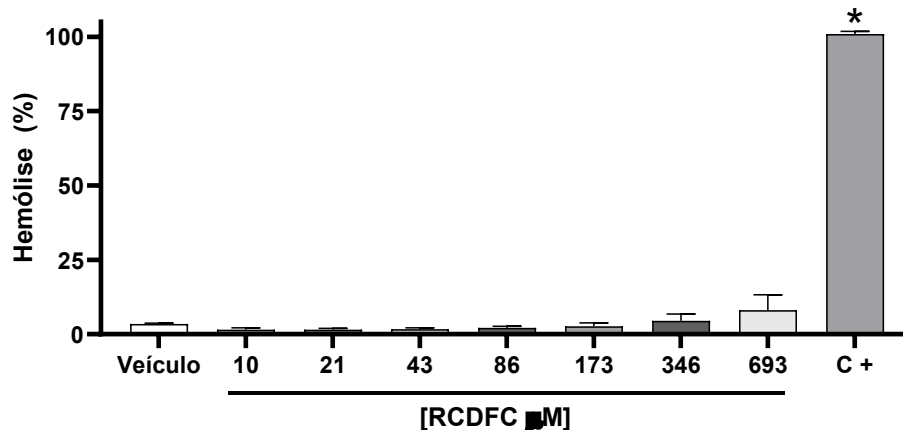
Dados foram obtidos por citometria de fluxo. Células com níveis basais de ERO foram consideradas DCFDA+. Células com níveis de ERO aumentados foram consideradas DCFDA++. C-: Controle negativo contendo 0,5 % de DMSO (veículo utilizado para diluição das substâncias). 50 μ M de dicumarol (DIC) foi utilizado como controle positivo de inibição de NQO1 e de estrutura semelhante à RCDFC. 5 μ M de β -lapachona (β -LAP) foi utilizado como controle positivo de geração de ERO. Os dados estão apresentados como os valores da média \pm E.P.M., obtidos em três experimentos independentes realizados em triplicata. O símbolo * representa $p < 0,05$ quando comparado com o controle negativo (C-) avaliado por ANOVA seguido de teste de Tukey's. Fonte: Elaborado pelo autor.

Nesse ensaio foi demonstrado que células A549 expostas a altas concentrações de RCDFC sofrem acúmulo de ERO intracelulares. A população de células com alta fluorescência foi de 20 % após tratamento com 80 μM de RCDFC, 17 % após tratamento com o controle positivo (5 μM de β -lapachona), 4 % após tratamento com 50 μM de DIC e 2 % no tratamento com o controle negativo (0,5 % DMSO). O aumento do percentual de ERO celulares causado pela RCDFC ocorre de forma dependente da concentração, uma vez que menores concentrações (20 μM e 40 μM) não foram suficientes para causar esse efeito.

1.8.7 Avaliação da atividade hemolítica

O ensaio de hemólise utilizando eritrócitos de camundongos *Mus musculus* mostrou que a RCDFC possui baixo potencial de causar dano à membrana de eritrócitos em concentrações menores ou iguais a 693 μM após 60 minutos de incubação (Figura 27). A ausência de atividade hemolítica significativa em eritrócitos de camundongos sugere que a RCDFC é inócua para o sangue.

Figura 27 – Atividade hemolítica da RCDFC em eritrócitos de camundongos (*Mus musculus*) após 60 minutos de incubação



5 % de DMSO foi utilizado como veículo. 0,1 % de TRITON X-100 foi utilizado como controle positivo. Os dados estão apresentados como os valores da média \pm E.P.M., obtidos por três experimentos independentes realizados em triplicata. * $p < 0,05$ comparado com o veículo por ANOVA seguido de teste de Tukey's. Fonte: Elaborado pelo autor.

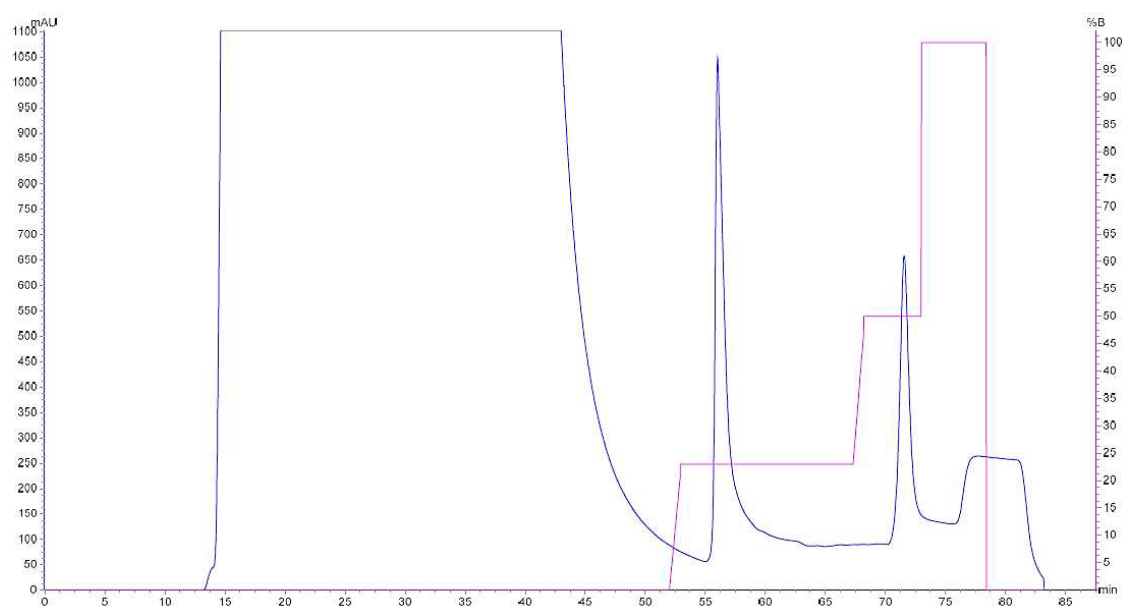
1.9 Avaliação da interação entre a proteína NQO1 e a naftoquinona RCDFC

1.9.1 Produção e purificação da proteína NQO1 recombinante

Nesse trabalho obteve-se a proteína NQO1 humana heteróloga utilizando *Escherichia coli* como sistema de expressão. Inicialmente foram definidas as condições básicas de expressão como meio de cultura, temperatura de expressão, temperatura de indução, concentração de agente indutor, densidade óptica de indução, tempo de indução e protocolo de lise. Em seguida, alíquotas do extrato solúvel foram submetidas a testes cromatográficos para estabelecimento de um protocolo de purificação por Cromatografia Líquida Rápida de Proteínas (FPLC). Após otimização do processo de purificação, este passou a ser realizado em duas etapas, sendo a primeira uma Cromatografia de Afinidade por Íon Metálico Imobilizado (IMAC) e a segunda uma Cromatografia de Exclusão por Tamanho Molecular (SEC).

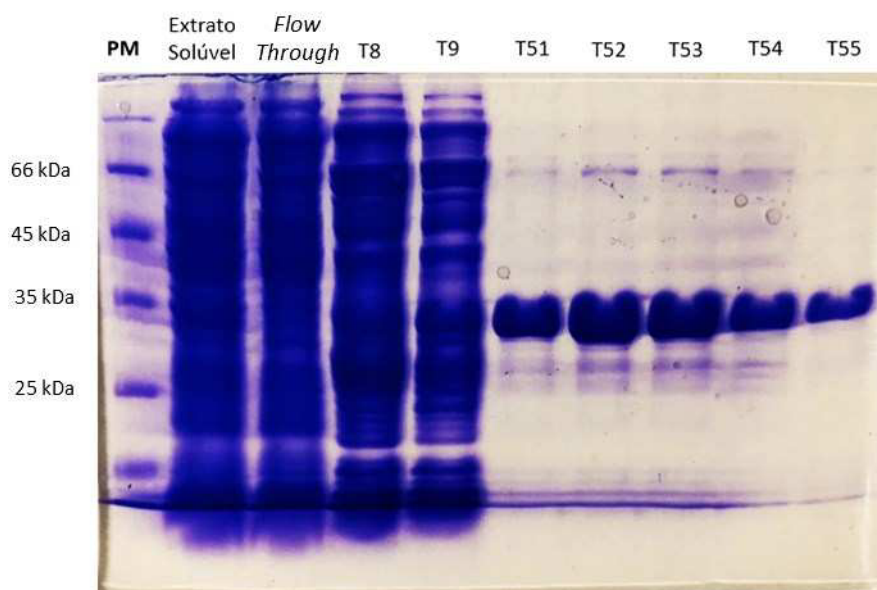
A Figura 28 mostra o cromatograma da purificação por IMAC. Foram observados dois picos, um obtido após adição de 140 mM de Imidazol (23% de Tampão de eluição ou Tampão B) e outro após adição de 255 mM de Imidazol (50 % de Tampão B). O gel na Figura 29 mostra o resultado da corrida eletroforética das frações obtidas na purificação por IMAC. Foi possível monitorar o processo de purificação da NQO1 nessa etapa, desde a amostra bruta, anterior à injeção (extrato solúvel), a remoção de contaminantes de baixa afinidade pela fase estacionária (*Flow-Through*) e remoção de contaminantes de alta afinidade (T8 e T9), até a eluição da proteína numa condição de maior pureza (T51 a T55), identificada pelas bandas em torno de 35 kDa.

Figura 28 – Cromatograma da purificação da proteína NQO1 recombinante por IMAC



Corrida cromatográfica no equipamento FPLC ÄKTA start™ (Cytiva Life Sciences) utilizando coluna His-Trap HP de 1 mL (Cytiva Life Sciences). O volume de injeção foi de 15 mL. A linha azul representa absorbância a 280 nm (mAU). A linha rosa representa o percentual da solução B (500mM Imidazol) utilizado nas eluições dos contaminantes e da proteína NQO1. Fonte: Elaborado pelo autor.

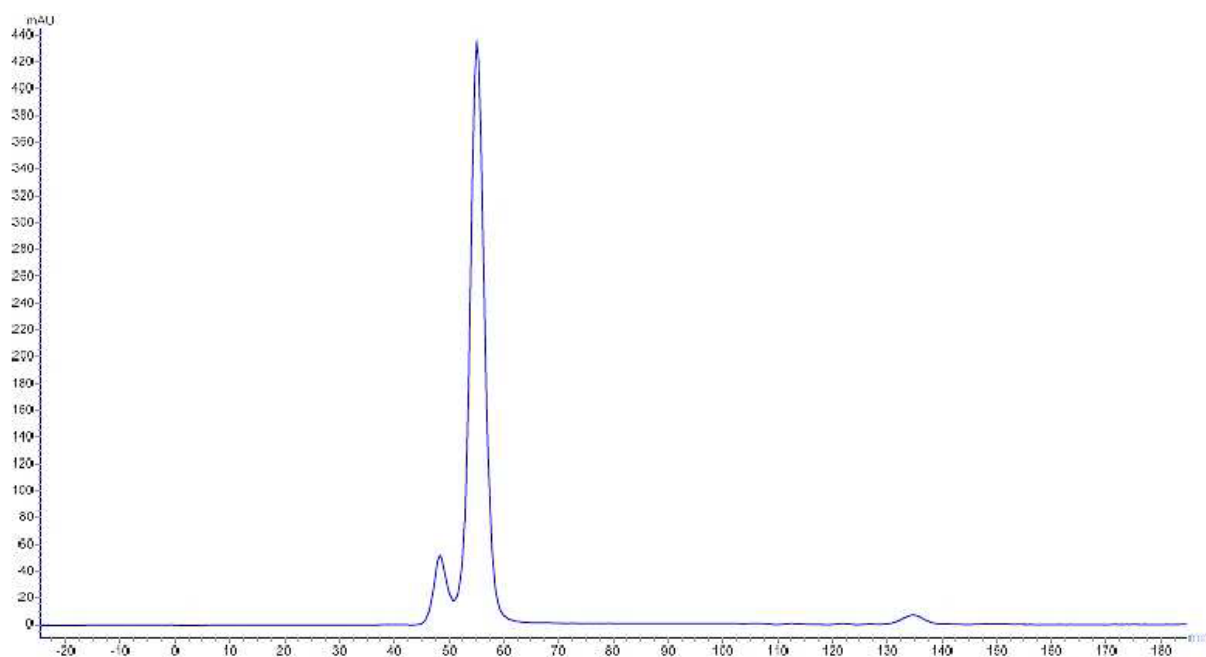
Figura 29 – Perfil eletroforético das frações obtidas durante a purificação da proteína NQO1 recombinante por IMAC



Gel de poliacrilamida 12 % corado com azul de Coomassie. PM: padrão de massa molecular *Pierce™ Unstained Protein MW Marker (Thermo Fisher)*. kDa: kiloDalton. *Flow Through*: contaminantes de baixa afinidade. T8 e T9: contaminantes de alta afinidade. T51 a T55: Eluição da proteína NQO1. Fonte: Elaborado pelo autor.

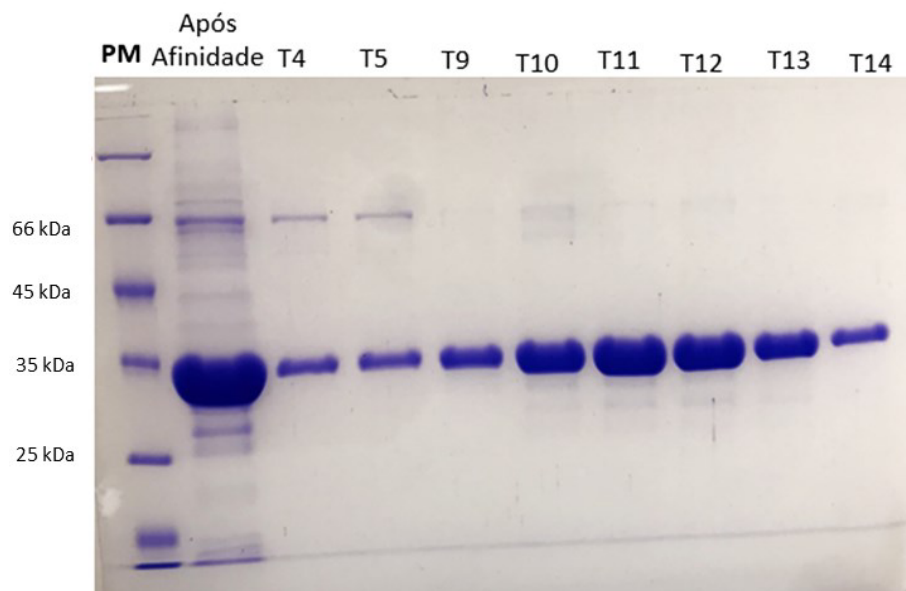
A Figura 30 mostra o cromatograma da purificação por SEC. Foram observados dois picos: um em 47 minutos e outro em 55 minutos de corrida. O gel na Figura 31 mostra o resultado da corrida eletroforética das frações obtidas na purificação por SEC. As frações T4 e T5 (referente ao pico em 47 minutos) apresentaram uma banda de proteína contaminante em torno de 66 kDa. As frações T9 a T14 (referente ao pico em 55 minutos) apresentaram a proteína NQO1 (33 kDa) obtida em sua forma mais pura. A banda de 66 kDa se deve a uma proteína eluída conjuntamente com NQO1, provavelmente uma chaperona molecular. Está amplamente descrito na literatura que proteínas recombinantes heterologamente expressas em *E. coli* podem se ligar e permanecer ligadas a chaperonas da bactéria, mesmo durante o refino da purificação cromatográfica (MORALES; PARCERISA; CECCARELLI, 2019; SHARMA; BORA; SAINI; ARYA, 2022). A realização da cromatografia de exclusão molecular foi importante para o refino da purificação da NQO1 após cromatografia de afinidade.

Figura 30 – Cromatograma da purificação da proteína NQO1 recombinante por SEC



Corrida cromatográfica no equipamento FPLC *ÅKTA start*TM (Cytiva Life Sciences) utilizando coluna *HiLoad 16/600 Superdex 75* de 120 mL (Cytiva Life Sciences). O volume de injeção foi de 0,5 mL. A linha azul representa absorbância a 280 nm (mAU). Fonte: Elaborado pelo autor.

Figura 31 – Perfil eletroforético das frações obtidas durante a purificação da proteína NQO1 recombinante por SEC

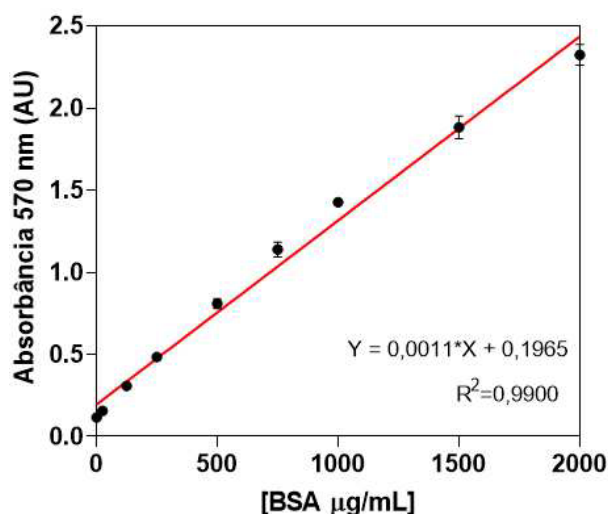


Gel de poliacrilamida 12% corado com azul de Coomassie. PM: padrão de massa molecular *Pierce*TM *Unstained Protein MW Marker* (Thermo Fisher). kDa: kiloDalton. T4 e T5: amostras referentes à eluição do primeiro pico. T9 a T14: amostras referentes à eluição do segundo pico. Fonte: Elaborado pelo autor.

1.9.2 Quantificação da proteína NQO1 recombinante e rendimento da expressão

Após SEC, as frações mais puras foram unidas, fornecendo um *pool* de aproximadamente 7 mL, normalmente obtido a partir de uma cultura líquida de *E. coli* de 3,5 L. Em seguida, a concentração de proteína no *pool* foi quantificada tanto por espectrofotometria no *NanoDrop Lite Plus* (*Thermo Fisher*), quanto por ensaio colorimétrico com *kit Pierce™ BCA Protein Assay* (*Thermo Fisher*). A concentração de *his-tag* NQO1 purificada foi estimada em 500 µg/mL, quando determinada por espectrofotometria a 280 nm (com uma massa molar estimada de 33582,58 g/mol e um coeficiente de absorvidade molar estimado de 51005 Mol⁻¹.cm⁻¹, e 527 µg/mL, quando determinada utilizando o kit colorimétrico. A curva-padrão do método BCA e equação da reta utilizada no cálculo da concentração de NQO1 estão descritas na Figura 32. O rendimento de purificação da proteína foi calculado como sendo aproximadamente 1 mg de proteína para cada litro de cultura.

Figura 32 – Curva de padrão de albumina sérica bovina



Médias de valores de absorvância *versus* concentração de padrão albumina sérica bovina (BSA). Em destaque a equação da reta e o coeficiente de determinação (R^2).
Fonte: Elaborado pelo autor.

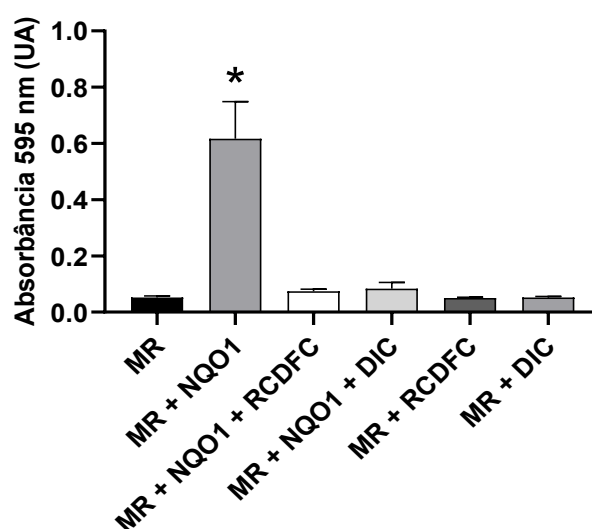
1.9.3 Ensaios bioquímicos e biofísicos para avaliação de interação entre RCDFC e NQO1

1.9.3.1 Ensaio enzimático de ponto final

O teste de inibição enzimática, monitorado por reação repórter de conversão de MTT em formazan, mostrou que a adição de 200 nM de RCDFC ao meio reacional resultou

em inibição da atividade enzimática da NQO1. Na Figura 33, o aumento do valor de absorbância a 595 nm está relacionado com a atividade da enzima, que reduz o substrato quinônico menadiona a menadiol, e então este reduz o MTT a formazan, que absorve a 395 nm. Foi observado que a RCDFC apresentou atividade inibitória na mesma magnitude que o DIC, utilizado como controle de inibição da NQO1.

Figura 33 – Efeito da RCDFC na atividade enzimática da NQO1

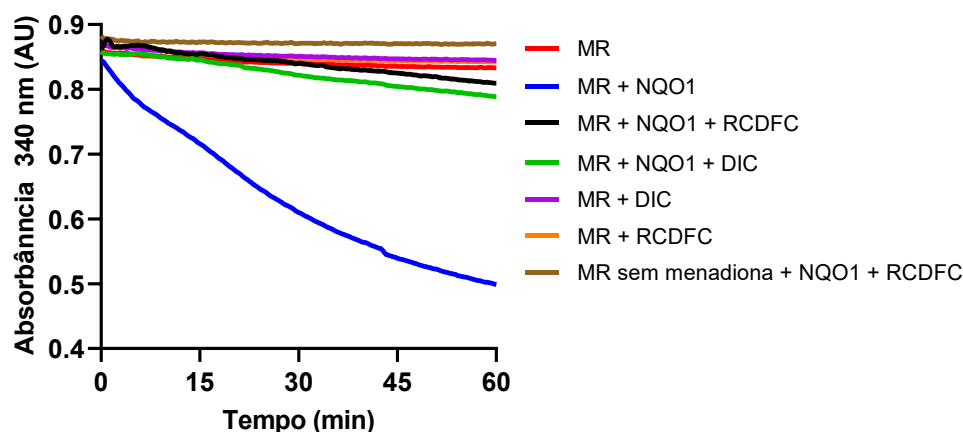


O meio reacional (MR) foi composto por 10 mM Tampão Fosfato pH 7.5, 200 μ M NADH, 20 μ M menadiona, 0,07 % BSA, 0,2 % Tween-20, 0,2 mg/mL MTT. Dicumarol (DIC) foi utilizado como controle positivo de inibição da NQO1. RCDFC e DIC foram testados a 200 nM. 25 ng de NQO1 recombinante foi utilizada na reação. O símbolo * representa $p < 0,001$ quando comparado com o MR avaliado por ANOVA seguido de teste de *Dunnet's*. Fonte: Elaborado pelo autor.

1.9.3.2 Ensaio enzimático cinético de NQO1 por monitoramento do consumo de NADH

Os resultados da avaliação atividade enzimática da NQO1 monitorando o consumo da coenzima NADH no comprimento de onda de 340 nm estão representados na Figura 34. No meio reacional com substrato, enzima e coenzima (NADH), os valores de absorbância a 340 nm decrescem ao longo de 1 h, revelando livre consumo de NADH. Já na presença de 200 nM de RCDFC ou do composto controle de inibição (DIC) o decréscimo da absorbância do NADH é retardado, comprovando efeito inibitório da atividade enzimática.

Figura 34 – Efeito da RCDFC no consumo de NADH pela NQO1 durante 1 h

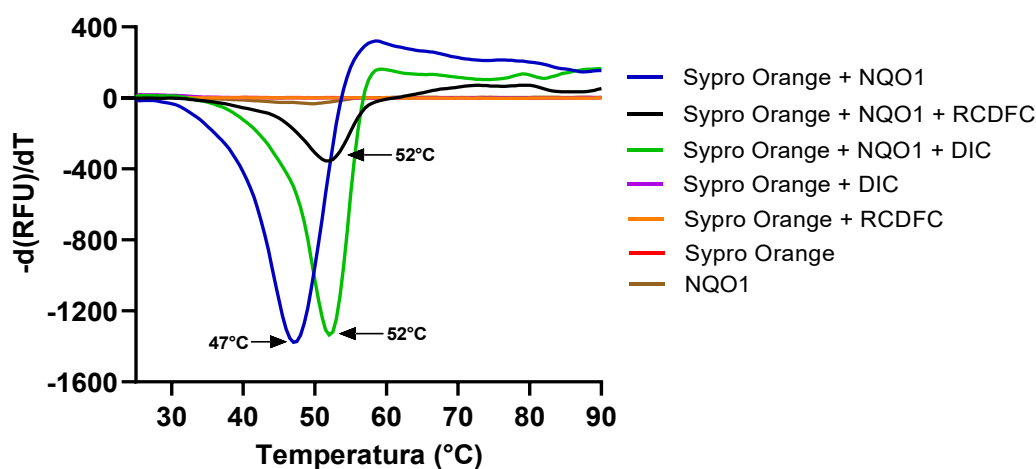


O meio reacional (MR) foi composto por 10 mM Tampão Fosfato pH 7.5, 200 μ M NADH, 20 μ M menadiona, 0,07 % BSA, 0,2 % Tween-20. Dicumarol (DIC) foi utilizado como controle positivo de inibição da NQO1. RCDFC e DIC foram testados a 200 nM. 25 ng de NQO1 recombinante foi utilizada na reação. Fonte: Elaborado pelo autor.

1.9.3.3 Fluorimetria Diferencial de Varredura (Thermal Shift Assay)

Os dados do ensaio de avaliação da estabilidade térmica da proteína NQO1 na presença e na ausência de ligantes estão representados na Figura 35. A temperatura média de desnaturação (T_m) da NQO1 na ausência de ligantes foi de 47°C. Na presença de RCDFC a T_m da NQO1 foi 52°C, mesmo valor determinado para o tratamento com o DIC. A interação da proteína NQO1 com a RCDFC possui força de ligação suficiente para estabilizar a estrutura da proteína, elevando a T_m em 5°C.

Figura 35 – Efeito da RCDFC sobre a estabilidade térmica da NQO1



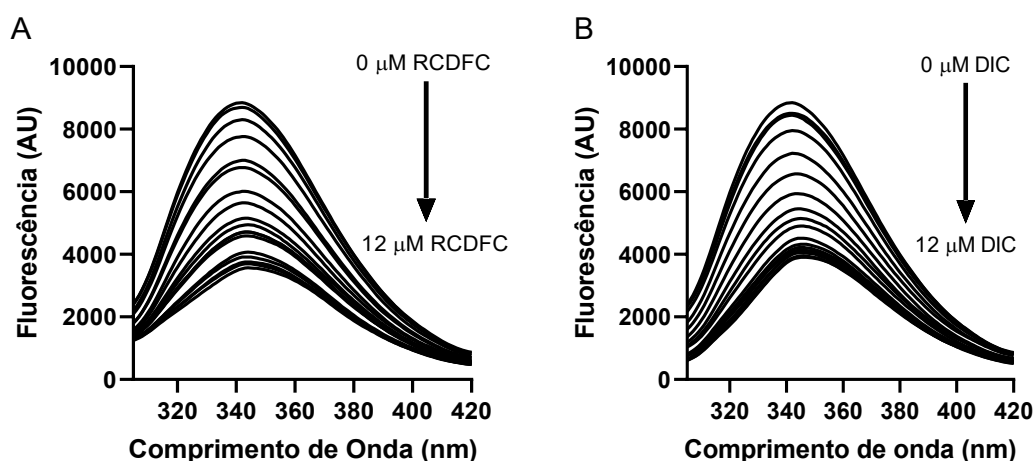
Derivadas da emissão de fluorescência do Sypro Orange em função do gradiente de temperatura ($dRFU/dT$). Em destaque a T_m , obtida pela temperatura do ponto mínimo do vale da curva. Foi utilizado no teste 10X de Sypro Orange, 10 μ M de NQO1 e/ou 100 μ M de ligantes (RCDFC ou dicumarol) em 50 mM de Tampão HEPES pH 7.4. Linha azul: NQO1 sem ligantes, linha preta:

NQO1 + RCDFC, linha verde: NQO1 + DIC (dicumarol), linha roxa: controle de emissão de fluorescência do DIC (dicumarol), linha laranja: controle de emissão de fluorescência da RCDFC, linha vermelha: controle de emissão de fluorescência do Sypro Orange na ausência de ligantes, linha marrom: controle de emissão de fluorescência da NQO1 na ausência de Sypro Orange. Fonte: Elaborado pelo autor.

1.9.3.4 Ensaio de avaliação da fluorescência intrínseca

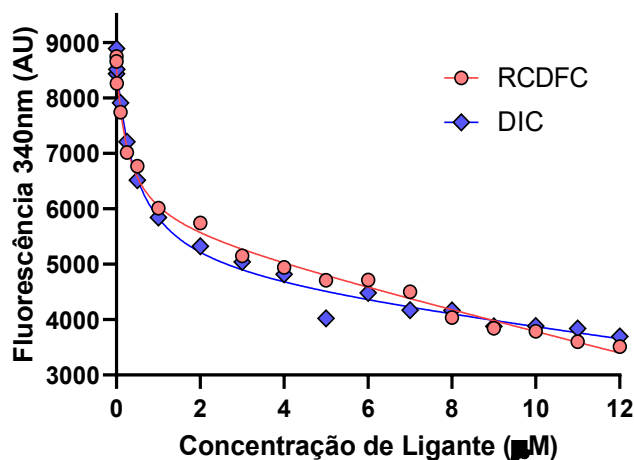
O monitoramento da emissão de fluorescência pelos resíduos de triptofano da NQO1 durante adição crescente de ligantes mostrou que tanto a RCDFC (Figura 36A) quanto o DIC (Figura 36B) causam efeito de supressão da emissão de fluorescência desses resíduos. Portanto, esses compostos se ligam à NQO1 e causam um ajuste conformacional induzido na enzima, o que altera o ambiente químico ao redor dos resíduos de triptofano, modificando a sua emissão de fluorescência. A redução da intensidade de fluorescência do triptofano é significativa, recorrente e proporcional ao aumento da concentração de ligante, o que sugere uma ligação específica e relativamente estável de RCDFC e DIC. Os valores da constante de dissociação do ligante (K_d), determinados utilizando o monitoramento da supressão de emissão da fluorescência em 340 nm (Figura 37), foram de 0,28 μM para a RCDFC e de 0,48 μM para o DIC, com intervalo de confiança 95 % variando de 0,17-0,44 μM e 0,30-0,75 μM , respectivamente.

Figura 36 – Efeito da RCDFC na emissão de fluorescência dos triptofanos presentes na NQO1



Varredura da emissão de fluorescência na região dos triptofanos da proteína NQO1 (4 μM) durante adição de concentrações crescentes (0-12 μM) dos ligantes RCDFC (Figura A) e DIC (Figura B). Excitação em 295 nm e emissão entre 305 e 420 nm. Fonte: Elaborado pelo autor.

Figura 37 – Fluorescência intrínseca da NQO1 após titulação com RCDFC e DIC



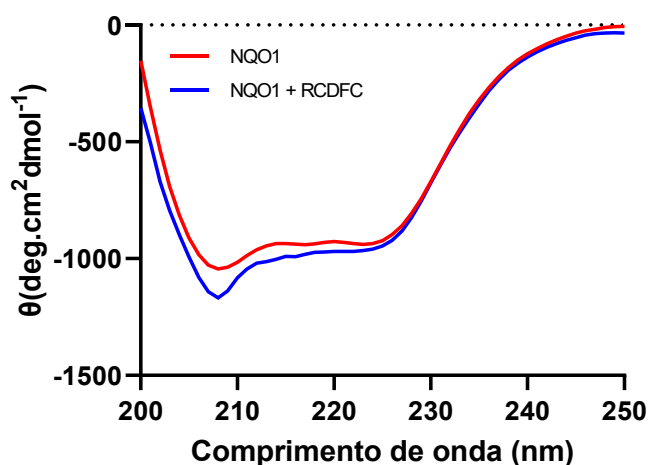
Emissão de fluorescência de 4 μM de NQO1 monitorada no comprimento de onda de 340 nm durante adição de concentrações crescentes (0-12 μM) dos ligantes RCDFC (pontos em rosa) e DIC (pontos em azul). Excitação em 295 nm e emissão entre 305 e 420 nm. Fonte: Elaborado pelo autor.

1.9.3.5 Avaliação da estrutura secundária da NQO1 por dicroísmo circular

Os espectros de dicroísmo circular da NQO1 na ausência e na presença do ligante RCDC foram adquiridos com o objetivo de obter informação relativa à estrutura secundária desta proteína. É possível observar na Figura 38 que a presença da RCDFC intensifica o sinal negativo da proteína em torno de 208 nm. Esse efeito ocorre possivelmente porque a presença do ligante leva a proteína a sofrer ajuste conformacional, afetando a composição de sua estrutura secundária. Ao comparar as estimativas do percentual de estrutura secundária na Tabela 5, fica evidenciado que a presença da RCDFC aumenta o percentual de estrutura secundária em forma de curva (*loops* ou alças do esqueleto polipeptídico) de 13,1 % para 16,8 %.

Foi monitorada também a alteração na estrutura secundária da NQO1 na presença e ausência da RCDFC em função de um gradiente de temperatura. O espectro contendo apenas a NQO1 (Figura 39A) apresentou menor intensidade na elipticidade a 50°C do que o espectro contendo a proteína e o ligante RCDFC, nessa mesma temperatura (Figura 39B). Possivelmente, a RCDFC levou à estabilização térmica da proteína NQO1 ao ponto de retardar a perda de estrutura secundária, recapitulando os resultados do *thermal shift assay*.

Figura 38 – Espectros de dicroísmo circular da NQO1 e RCDFC na região UV distante



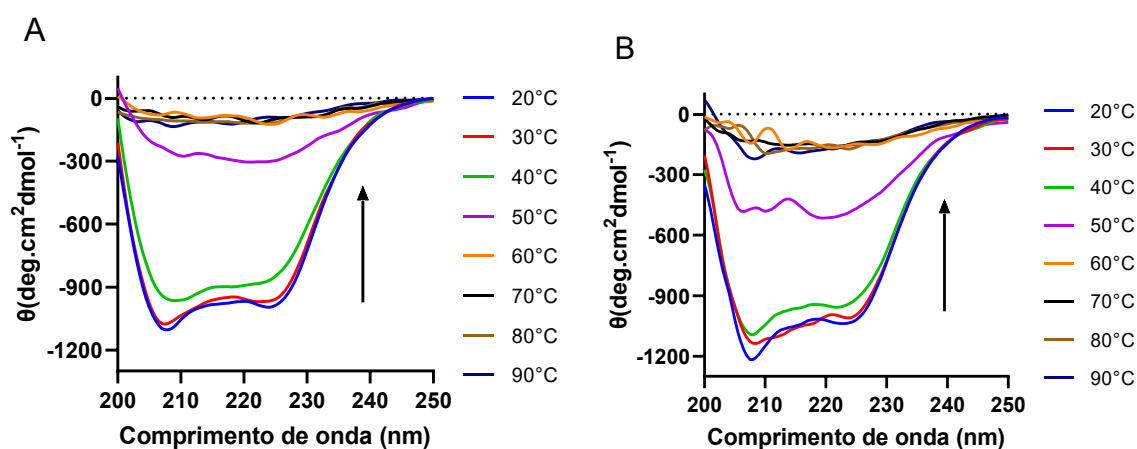
Dados em elipticidade molar por resíduo. 5 μM de NQO1 e 10 μM RCDFC foram dispersos em 20 mM de Tampão Fosfato pH 7.5 e 10 acumulações de espectros foram adquiridos a 20°C.

Tabela 5 – Percentual de estrutura secundária da NQO1 na ausência e presença de RCDFC

Estrutura Secundária	NQO1	NQO1 + RCDFC
Hélice	23,0	22,6
Antipararela	21,8	21,6
Paralela	3,7	2,6
Curva	13,1	16,8
Outros	38,4	36,4

Estimativas de estrutura secundária aparente calculada utilizando a ferramenta Bestsel (<https://bestsel.elte.hu/index.php>) a partir dos resultados dos dados experimentais. Dados em porcentagem. Fonte: Elaborado pelo autor.

Figura 39 – Estabilidade térmica da NQO1 na presença da RCDFC monitorada por difracto circular na região UV distante



Varição da elipticidade molar durante aumento da temperatura. Figura A: 5 μ M de NQO1. Figura B: 5 μ M de NQO1 + 10 μ M RCDFC. As amostras foram dispersas em 20 mM de Tampão Fosfato pH 7.5.

1.9.3.6 Teste de Cristalização para Determinação da Estrutura de Alta Resolução de NQO1 e do Complexo NQO1-RCDFC por Cristalografia Macromolecular de Raios-X

1.9.3.6.1 Remoção da cauda de histidina da NQO1 recombinante

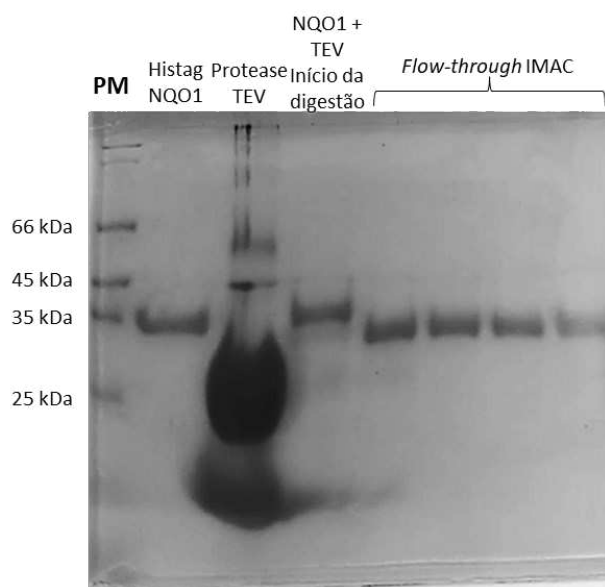
A proteína NQO1 produzida em *E. coli* continha um hexapeptídeo de resíduos de histidina em sua extremidade aminoterminal (cauda de polihistidina ou *his-tag*), necessário à purificação por IMAC, devido a sua interação específica com o íon níquel (Ni^{2+}) imobilizado na fase estacionária da cromatografia. Sabe-se que o hexapeptídeo de histidina não possui estrutura secundária e terciária definidas, em razão da proximidade e repulsão entre as cargas formais positivas do grupo lateral das histidinas. A alta flexibilidade da cauda de polihistidina dificulta a cristalização da proteína que a contém. Portanto, embora fosse necessária à purificação por IMAC, a cauda de polihistidina teve de ser retirada da proteína recombinante antes dos testes de cristalização. Para isso, durante o planejamento da construção recombinante, foi inserido um sítio de clivagem específico da protease TEV (ENLYFQG) entre a cauda de polihistidina e o resíduo de metionina inicial da NQO1 humana.

A NQO1 recombinante [*his tag*-(tev)-NQO1] foi purificada por IMAC e submetida à hidrólise pela protease TEV recombinante, durante diálise. Logo após o processo de digestão da proteína recombinante com a protease TEV foi realizada uma segunda purificação por IMAC, a fim de remover os contaminantes com afinidade pelo íon metálico imobilizado, entre eles, a própria cauda de polihistidina clivada. A Figura 40 mostra o

resultado da eletroforese (SDS-PAGE) das amostras durante o processo de remoção da cauda de histidina. Tanto antes quanto no início da digestão, a proteína NQO1 apresentou uma banda próxima a 35 kDa. A ausência da his-tag modificou levemente o perfil eletroforético da NQO1, fazendo com que a proteína recombinante, agora com menor tamanho, migrasse um pouco abaixo da NQO1 não tratada com a protease TEV, ao longo da rede de acrilamida/bisacrilamida. A proteína NQO1 sem cauda de histidina foi eluída no *flow-through* da segunda IMAC, uma vez que a ausência da his-tag leva à redução da afinidade pela fase estacionária.

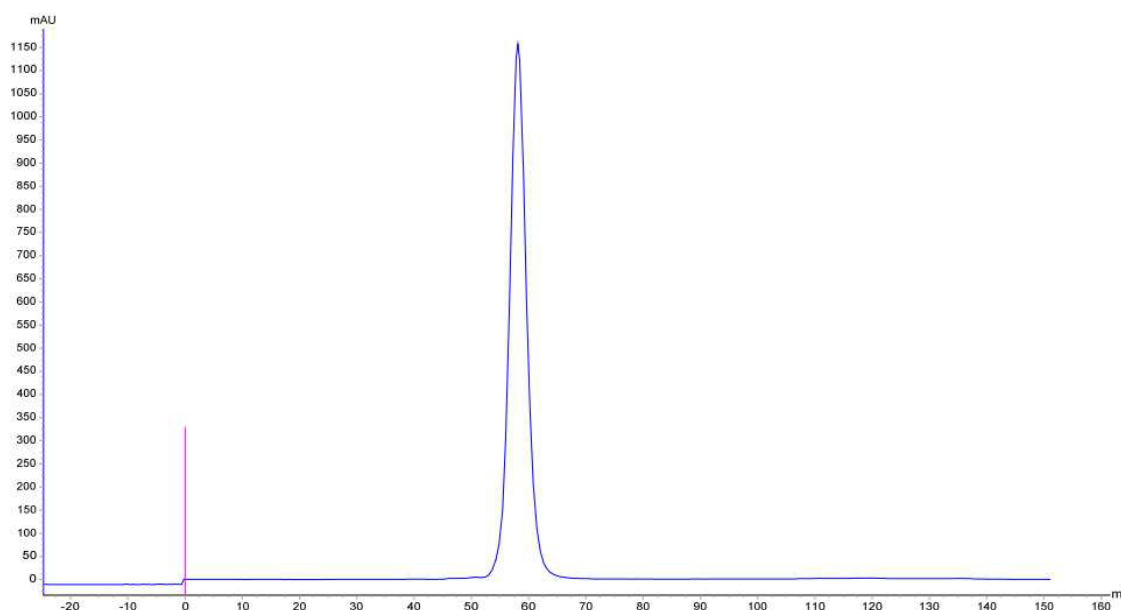
O *flow-through* da segunda IMAC foi concentrado e aplicado em coluna de SEC. A Figura 41 mostra o cromatograma da SEC realizada após a remoção da cauda de polihistidina. É possível visualizar a presença de um único pico, eluído em torno de 60 min após injeção da amostra. Considerando que a SEC separa macromoléculas por conta das diferenças entre seus tamanhos moleculares (raios hidrodinâmicos) e que a NQO1 foi eluída num único pico, sugere-se que a proteína pura esteja em um estado dominante de oligomerização e, conseqüentemente, monodispersa em solução. Essa característica também é pré-requisito para os ensaios de cristalização.

Figura 40 – Perfil eletroforético da NQO1 após a remoção da cauda de histidina



Gel de poliacrilamida 12 % corado com azul de Coomassie. PM: padrão de massa molecular *Pierce™ Unstained Protein MW Marker* (*Thermo Fisher*). kDa: kiloDalton. Fonte: Elaborado pelo autor.

Figura 41 – Cromatograma da purificação da proteína NQO1 recombinante por SEC após digestão com protease TEV

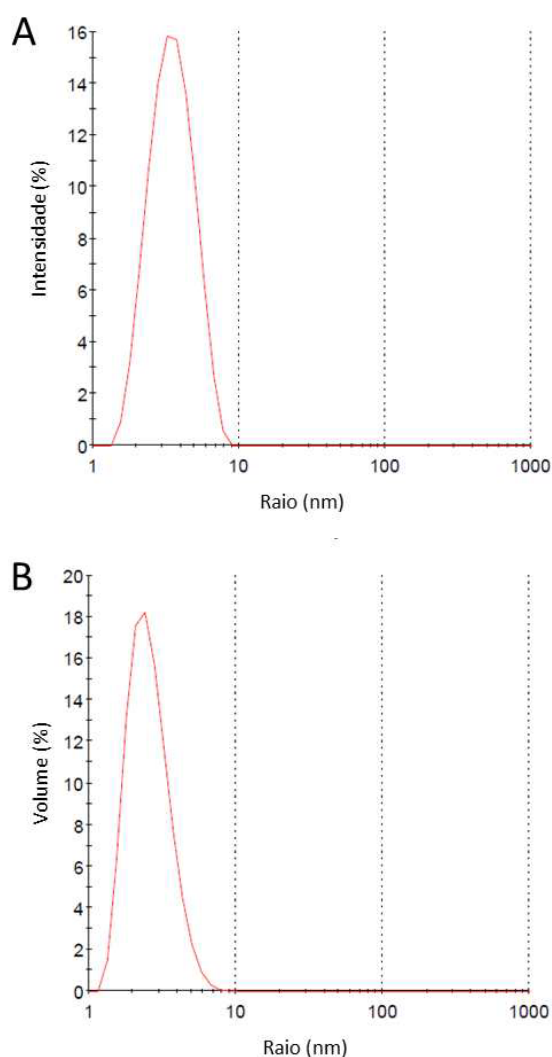


Corrida cromatográfica no equipamento FPLC *ÄKTA start*TM (Cytiva Life Sciences) utilizando coluna *HiLoad 16/600 Superdex 75* de 120 mL (Cytiva Life Sciences). O volume de injeção foi de 1 mL. A linha azul representa absorbância a 280 nm (mAU). A linha rosa representa a injeção da amostra. Fonte: Elaborado pelo autor.

1.9.3.6.2 Avaliação da polidispersividade e do tamanho molecular da NQO1 recombinante em solução

O ensaio de espalhamento dinâmico de luz (DLS) foi realizado com a proteína NQO1 sem cauda de histidina proveniente da SEC. A Figura 42 mostra o raio hidrodinâmico (Rh) da partícula solvatada, formada pela proteína NQO1, em função da intensidade de espalhamento de luz e do volume de amostra. A Tabela 6 mostra os parâmetros obtidos durante a análise de DLS. A partícula proteica em solução foi considerada monodispersa, pois apresentou percentual de polidispersão menor que 20% (índice de polidispersão menor que 0,2). As partículas em solução apresentaram diâmetro de 5,97 nm e raio hidrodinâmico de 3,25 nm, valores próximos aos descritos em literatura (MEDINA-CARMONA; NEIRA; SALIDO; FUCHS *et al.*, 2017). O peso molecular da partícula dominante foi estimado em torno de 69,6 kDa, indicando que os monômeros da NQO1 (≈ 30 kDa) estão associados em solução e formam estrutura quaternária dimérica.

Figura 42 – Distribuição de tamanho das partículas proteicas por intensidade (A) e volume (B)



Fonte: Elaborado pelo Autor.

Tabela 6 – Parâmetros obtidos durante o ensaio de DLS com a proteína NQO1 sem *his-tag*

Scattering Angle	PdI	Diâmetro (nm)	Rh (nm)	MM (kDa)	Intensidade (%)	Volume (%)
90°	0,19	5,97 ± 0,11	3,25 ± 1,23	69,6 ± 23,6	100	100

PdI: Índice de polidispersão, Rh: Raio hidrodinâmico, MM: massa molecular, kDa: kilodalton. O diâmetro é aproximadamente o dobro do Rh. Fonte: Elaborado pelo Autor.

1.9.3.6.3 Ensaio de cristalização

Para a descoberta de aspectos estruturais das interações entre os átomos de NQO1 e RCDFC, é necessário obter a estrutura tridimensional de alta resolução do complexo proteína-ligante. Uma das técnicas mais utilizadas para este fim é a cristalografia

macromolecular de raios-X, que demanda a prévia cristalização do complexo. Portanto, foi realizado um *screening* para otimização de condições de cristalização da proteína NQO1. A proteína foi incubada em soluções com diferentes tampões, pHs e agentes precipitantes. O ensaio foi realizado inicialmente com a proteína pura, sem adição de ligante. A Tabela 7 informa as condições nas quais foram detectadas a presença de cristais de proteína. Destaca-se que os cristais foram observados apenas nos tratamentos com concentrações de proteína a 10 mg/mL (concentrações de proteína de 25 mg/mL e 30 mg/mL não facilitaram a formação de cristais).

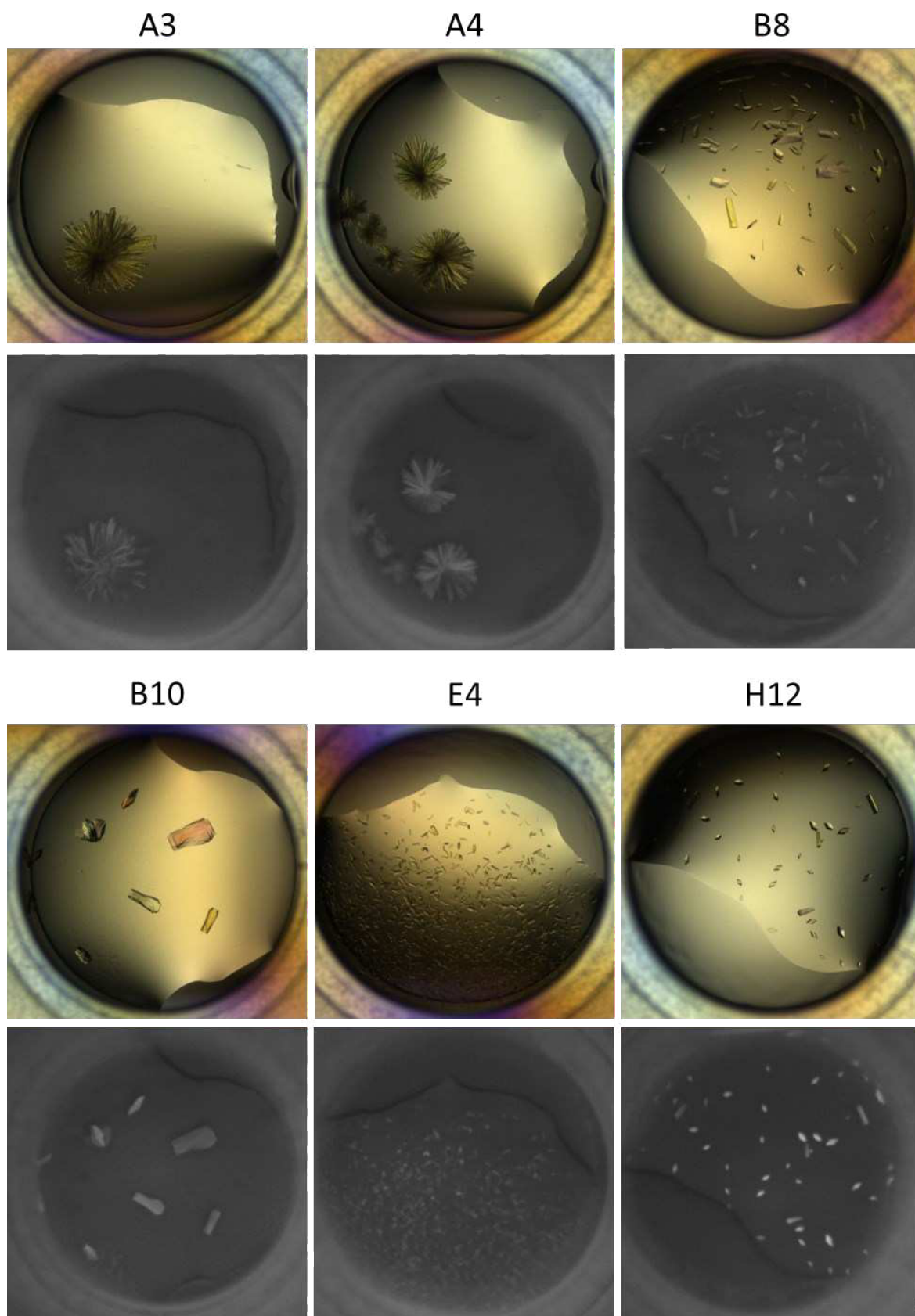
Os poços A3 e A4 do kit *PACT Suite (NeXtal Biotechnologies)* apresentaram microcristais. A diferença entre esses dois poços está no valor de pH do tampão. No poço A3 (pH 6,0) se visualiza apenas um cristal, enquanto que no poço A4 (pH 7,0) foram visualizados pelo menos 5 cristais (Figura 43). O poço B8 do kit *JBScreen Wizard I & 2 (Jena Bioscience)* apresentou muitos microcristais com alta variação de tamanho e de formato. O kit *SalTRx HT (Hampton Research)* permitiu que os microcristais se desenvolvessem com maior uniformidade de formato e de tamanho em relação aos outros kits, com destaque para os poços B10, E4 e H12.

Tabela 7 – Condições cristalizáveis para a proteína NQO1

Kit (Fabricante)	Posição	Composição	Concentração de NQO1
<i>PACT Suite (NeXtal Biotechnologies)</i>	A3	0,1 M SPG 6.0 pH (Tampão) 25 % m/v PEG 1500 (Agente precipitante)	10 mg/mL
	A4	0,1 M SPG 7.0 pH (Tampão) 25 % m/v PEG 1500 (Agente precipitante)	10 mg/mL
<i>JBScreen Wizard I & II (Jena Bioscience)</i>	B8	0,4 M NaH ₂ PO ₄ (Agente precipitante) 1,6 M K ₂ HPO ₄ (Agente precipitante) 0,1 M Imidazol pH 8.0 (Tampão) 0,2 M NaCl (Sal)	10 mg/mL
	B10	0,1 M Tris pH 8.5 (Tampão) 1,2 M Citrato de sódio tribásico dihidratado (Sal)	10 mg/mL
<i>SaltRx HT™ (Hampton Research)</i>	E4	2,4 M Fosfato de amônio dibásico (Sal) 0,1 M Tris pH 8.5 (Tampão)	10 mg/mL
	H12	0,1 M BIS-TRIS propano pH 7.0 (Tampão) 60 % v/v <i>Tacsimate™</i> (Sal)	10 mg/mL

Tampão SPG é composto por ácido succínico, fosfato monobásico de sódio e glicina em proporções molares de 2:7:7, respectivamente. PEG: Polietilenoglicol. *Tacsimate™* é um reagente de cristalização (*Hampton Research*) composto por 1,8305 M de ácido malônico, 0,25 M de citrato de amônio tribásico, 0,12 M de ácido succínico, 0,3 M de ácido DL-málico, 0,4 M de acetato de sódio trihidratado, 0,5 M de formato de sódio e 0,16 M de tartarato de amônio dibásico pH 7,0. Fonte: Elaborado pelo autor.

Figura 43 – Microcristais da proteína NQO1 obtidos em diferentes condições



Foram adquiridas micrografias na região visível (imagens coloridas) e no ultravioleta (imagens preto e branco) dos poços A3 e A4 do kit *PACT Suite* (NeXtal Biotechnologies), poço B8 do kit *JBScreen Wizard I & II* (Jena Bioscience), e poços B10, E4 e H12 do kit *SaltRx HT™* (Hampton Research). Fonte: Elaborado pelo autor.

5 DISCUSSÃO

1.10 A NQO1 como alvo da naftoquinona RCDFC

O reconhecimento molecular, que é o processo de interação de macromoléculas biológicas entre si ou com moléculas pequenas numa elevada especificidade e afinidade para formar um complexo específico, constitui a base de todos os processos nos organismos vivos (BARON; MCCAMMON, 2013; LANCET; HOROVITZ; KATCHALSKI-KATZIR, 1994). As proteínas, uma classe importante de macromoléculas biológicas, realizam as suas funções através da ligação a si próprias ou a outras moléculas. Uma compreensão detalhada das interações proteína-ligante é fundamental para compreender a biologia a nível molecular (BÖHM; KLEBE, 1996; DU; LI; XIA; AI *et al.*, 2016). Além disso, o conhecimento dos mecanismos responsáveis pelo reconhecimento e interação proteína-ligante é crucial para o descobrimento de fármacos (BABINE; BENDER, 1997; BÖHM; KLEBE, 1996).

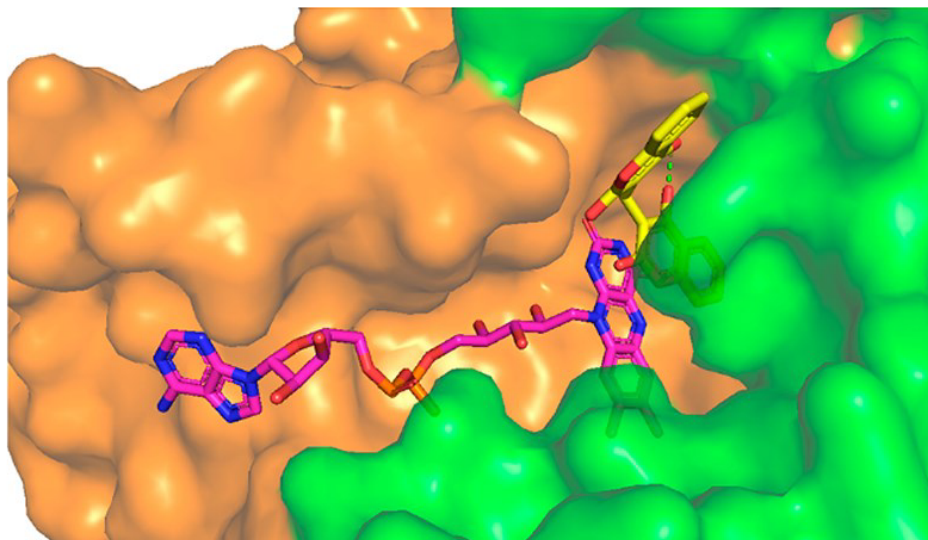
A importância da proteína NQO1 na prevenção ao dano oxidativo e na proteção celular através da redução de quinonas e da neutralização de espécies oxidantes é bem estabelecida e documentada, o que torna um alvo atrativo para o desenvolvimento de fármacos (ROSS; SIEGEL, 2021; SIEGEL; GUSTAFSON; DEHN; HAN *et al.*, 2004).

A utilização de substâncias que interagem com NQO1 tem sido proposta como uma abordagem alvo-dirigida estratégica para o tratamento do câncer de pulmão e outros tipos. Apesar dos avanços na pesquisa de moléculas que possam se ligar à proteína NQO1, nenhuma substância é utilizada como fármaco antineoplásico. Contribuindo para a pesquisa nessa temática, através dos resultados do ensaio enzimático de ponto final e do ensaio de monitoramento da cinética de consumo do NADH, esse trabalho demonstrou que a naftoquinona sintética RCDFC é capaz de interagir com a proteína NQO1 e inibi-la. Além disso, redução da atividade enzimática decorrente da interação NQO1:RCDFC ocorre com magnitude comparável à inibição por DIC. Assim como esse inibidor, a RCDFC também impede que a NQO1 consuma o NADH.

No mecanismo da reação pingue-pongue da reação catalisada pela NQO1 envolve uma dupla transferência de hidreto, isto é, um hidreto é transferido do NAD(P)H para o N5 do FAD, ocasionando a liberação de NAD(P)⁺ do sítio catalítico. O outro hidreto é transferido do N5 do FADH₂ para um substrato quinona, que é transformado em hidroquinona e liberado da bolsa catalítica (Figura 7) (FAIG; BIANCHET; TALALAY; CHEN *et al.*, 2000). A flavina do FAD forma o piso do sítio catalítico, enquanto os resíduos aminoácidos triptofano 105,

fenilalanina 106, glicina 149, glicina 150, tirosina 155, e histidina 161 de um monômero contribuem para formar paredes hidrofóbicas e tirosina 126, tirosina 128 e fenilalanina 178 do outro monômero constituem o teto (Figura 44). Não por acaso, a NQO1 somente é enzimaticamente ativa em sua forma dimérica (PIDUGU; MBIMBA; AHMAD; POZHARSKI *et al.*, 2016).

Figura 44 – Sítio catalítico da NQO1



Estrutura de co-cristal do sítio ativo da NQO1 com presença do dicumarol (PDB 2F1O). Um monômero é mostrado em verde e o outro em laranja. Os átomos de carbono do FAD estão representados em magenta e do dicumarol em amarelo. As ligações de hidrogênio são representadas por linhas tracejadas verdes. Fonte: Adaptado de (ZHANG; CHEN; MA; WU *et al.*, 2018)

Estruturalmente, o monômero de NQO1 possui dois domínios separados: os resíduos 1-220 constituem o domínio catalítico principal e os resíduos 221-273 constituem um pequeno domínio C-terminal (Figura 6B). O domínio catalítico consiste numa folha- β paralela central rodeada por α -hélices, enquanto o domínio C-terminal é composto por um motivo em forma de grampo (*hairpin*) antiparalelo, uma α -hélice e várias voltas (*loops*). Cada domínio catalítico possui uma molécula de FAD ligada através do anel de adenina e do anel isoaloxazina, que se direciona para a interface do dímero. O domínio catalítico possui três sítios de ligação: o sítio de ligação do FAD, um sítio hidrofílico para ligação da adenina-ribose do NAD(P)H e um sítio de ligação para o substrato (BIANCHET; ERDEMLI; AMZEL, 2008; FAIG; BIANCHET; TALALAY; CHEN *et al.*, 2000).

Nesse trabalho, o ensaio de *termal shift* ou fluorimetria diferencial de varredura (DSF) mostra que a RCDFC se liga à proteína NQO1. Além disso, o complexo proteína-ligante possui força de ligação suficiente para induzir estabilidade térmica significativamente

superior à estabilidade da proteína na ausência de ligante. Esse fenômeno é evidenciado pelo deslocamento térmico de 5°C na temperatura de desnaturação (T_m) do complexo em relação ao T_m da NQO1 sem ligante. A indução de estabilização térmica parece ser um efeito comum para inibidores de NQO1. Um estudo demonstrou que o DIC é capaz de induzir estabilidade térmica de forma dependente de concentração tanto para NQO1 nativa quanto para variantes relacionadas ao fenótipo tumoral (p.R139W e p.P187S). A nicotinamida, outro inibidor de NQO1, foi capaz de estabilizar a enzima nativa e a variante p.R139W de forma dependente da concentração, mas não teve efeito na variante p.P187S. Aparentemente, alguns inibidores possuem preferência para diferentes estados conformacionais da proteína. Nesse mesmo estudo, o resveratrol desestabilizou a NQO1 nativa e ambas as variantes associadas a neoplasias, apesar do efeito ser dependente da concentração (MEGARITY; TIMSON, 2019). Outro estudo demonstrou que uma substância, chamada de 15-047, foi capaz de reduzir a estabilidade térmica da NQO1 e que a sua temperatura de fusão (T_m) diminuiu em aproximadamente 4°C (WANG; DUAN; HUANG; XUE *et al.*, 2023). A desestabilização causada por um ligante pode indicar que o ligante se liga favoravelmente a moléculas parcialmente desdobradas e provavelmente inativas (COOPER, 1999; FREIRE, 1995).

Com o intuito de monitorar o efeito da ligação da RCDFC na estrutura secundária da NQO1 foram obtidos espectros de dicroísmo circular na presença e na ausência desse ligante na região do UV-distante (200 nm – 250 nm), em que ocorre absorção da radiação polarizada pelas ligações peptídicas. A presença da RCDFC intensificou o sinal negativo no espectro da NQO1 em torno de 207 nm. Esse resultado está de acordo com espectros característicos de proteínas com conteúdo de α -hélice, caracterizados por alta absorção em comprimento de onda próximo a 208 nm, devido às transições $\pi \rightarrow \pi^*$ no cromóforo amida da ligação peptídica (RODGER; MARRINGTON; ROPER; WINDSOR, 2005). Resultados semelhantes aos encontrados nesse trabalho foram reportados em um estudo em que a ligação do DIC foi capaz de alterar o conteúdo da estrutura secundária da NQO1, aumentando a elipticidade a 222 nm (outra característica de proteínas com alto conteúdo α -helicoidal) (MEDINA-CARMONA; NEIRA; SALIDO; FUCHS *et al.*, 2017). Apesar disso, quando o conteúdo de estrutura secundária foi estimado na plataforma *Bestsel*, pouca diferença foi encontrada no percentual de α -hélice da NQO1 na presença e ausência de RCDFC. A literatura reporta que estimativas razoáveis são encontradas para as proteínas de estrutura secundária mista, como é o caso da NQO1, onde os dados obtidos demonstram que o conteúdo de folhas- β (paralelas e antiparalelas) é ligeiramente maior que o conteúdo de α -hélices (RODGER; MARRINGTON; ROPER; WINDSOR, 2005).

Ainda em relação às alterações no nível de estrutura secundária, destaca-se o efeito que RCDFC exerce ao induzir a formação de estruturas em forma de curvas (*loops* ou alças do esqueleto polipeptídico). Foi observado um incremento de 3,7% no conteúdo de *loops* em relação à NQO1 sem ligante. Estudos destacam o movimento de estruturas em forma de alças com o objetivo a acomodar ligantes na NQO1. O grupo isoaloxazina do FAD interage com resíduos em *loop* da NQO1 numa das extremidades da molécula (L1 e L4 de um monômero e L3 e L5 do outro monômero) (LI; BIANCHET; TALALAY; AMZEL, 1995). O movimento da fenilalanina 232, presente na alça 230-236, é relatado para a estrutura da NQO1 em complexo com DIC (ASHER; DYM; TSVETKOV; ADLER *et al.*, 2006). No caso da molécula ES936, o anel 4,7-diona interage com as glicinas 150 e 151 do *loop* 6. Além disso, o *loop* 9 (resíduos 231-237) no domínio C-terminal desloca-se, abrindo o sítio da adenosina do NAD(P)H para acomodar um grupo nitro (WINSKI; FAIG; BIANCHET; SIEGEL *et al.*, 2001).

O monitoramento da elipticidade molar durante a aplicação de um gradiente de temperatura permitiu concluir que houve o aumento da estabilidade térmica da NQO1 em razão da ligação da RCDFC, efeito também observado no ensaio de *thermal shift*. Ou seja, o complexo NQO1:RCDFC resistiu mais a alterações no espectro de dicroísmo circular em função do aumento de temperatura, em comparação à proteína NQO1 sozinha. Portanto, o complexo sofreu menos alterações no conteúdo de estrutura secundária quando submetido a temperaturas mais altas, em comparação à enzima sozinha. Tomados em conjunto, os experimentos de *thermal shift*, dicroísmo circular, espectroscopia de fluorescência intrínseca de resíduos de triptofano e inibição enzimática confirmaram a hipótese de que a RCDFC é um ligante e um inibidor da atividade catalítica de NQO1.

Nesse trabalho, o monitoramento *label-free* da emissão de fluorescência no ambiente, envolvendo os resíduos de triptofano da proteína alvo, permitiu a determinação da constante de dissociação (K_d) da RCDFC na interação com a proteína NQO1. Nesse ensaio, o valor do K_d foi estimado como 0,28 μM para a RCDFC e 0,48 μM para o DIC. Resultados semelhantes foram reportados em um estudo que empregou a técnica de calorimetria de titulação isotérmica (ITC) e estimou um K_d de 0,122 μM para o DIC na ligação à NQO1 em sua forma apo (sem grupamento FAD) (MEDINA-CARMONA; PALOMINO-MORALES; FUCHS; PADÍN-GONZALEZ *et al.*, 2016). Outro trabalho, utilizando ressonância plasmônica de superfície, determinou K_d de 0,162 μM para o DIC e 0,873 μM para a oroxilina A, um flavonóide natural com atividade inibitória sobre NQO1 (DONG; CHEN; HE; SUN *et al.*, 2023). Quando a técnica de fluorimetria diferencial de varredura (*Thermal Shift Assay*) foi

utilizada, o valor da constante de dissociação aparente ($K_{d,app}$) do DIC na ligação à enzima NQO1 nativa foi de 54 nM (0,054 μ M) (MEGARITY; TIMSON, 2019).

Estudos destacam o envolvimento de resíduos de aminoácidos contendo grupos hidrofóbicos na interação de ligantes com a NQO1. A estrutura cristalográfica do DIC em ligação com a NQO1 mostra que essa substância se liga ao sítio ativo através de uma série de interações hidrofóbicas, além de ligações de hidrogênio com resíduos de aminoácidos da enzima e com o cofator FAD. Um anel cumarínico do DIC está paralelo ao anel isoaloxazina do FAD e o outro anel forma duas ligações de hidrogênio, (1) entre o oxigênio 5 do DIC e a tirosina 128 e (2) entre o oxigênio 17 do inibidor e a histidina 161 (Figura 45) (ASHER; DYM; TSVETKOV; ADLER *et al.*, 2006).

Figura 45 – Ligação do dicumarol com a NQO1

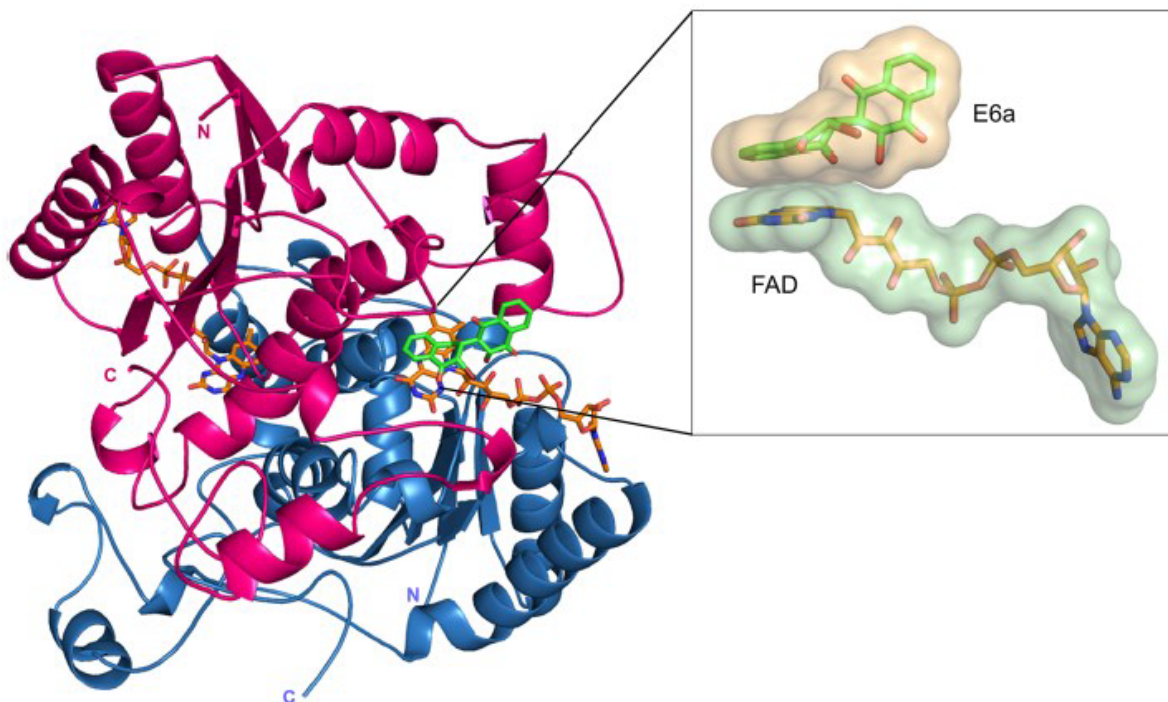


Detalhes da ligação entre NQO1 e dicumarol (PDB 2F1O). Um monômero é mostrado em verde e o outro em laranja. Os átomos de carbono do FAD estão representados em magenta e do dicumarol em amarelo. As ligações de hidrogênio são representadas por linhas tracejadas verdes.

Já a duroquinona (2,3,5,6-tetrametil-p-benzoquinona), um substrato da NQO1, se liga ao sítio ativo dessa enzima através de uma série de interações que envolvem o FAD e vários resíduos hidrofóbicos e hidrofílicos. Essa substância se posiciona de forma paralela ao anel de isoaloxazina do FAD e um de seus oxigênios forma ligações de hidrogênio com os grupos hidroxila da tirosina 126 e tirosina 128 do monômero de NQO1 (FAIG; BIANCHET; TALALAY; CHEN *et al.*, 2000). No caso de naftoquinonas, dados bioquímicos e de cristalografia de proteínas evidenciam que a naftoquinona dimérica E6a (3-bromo-3'-hidroxi-2,2'-binaftalenil-1,4,1',4'-tetraona) em interação com NQO1 é encontrada numa bolsa

hidrofóbica revestida pelo triptofano 105, fenilalanina 106, fenilalanina 178, tirosina 126 e tirosina 128 (Figura 46) (PIDUGU; MBIMBA; AHMAD; POZHARSKI *et al.*, 2016).

Figura 46 – Ligação da naftoquinona E6a com a NQO1



A NQO1 dimérica possui dois sítios ativos, um em cada extremidade da interface do dímero. Um monômero é mostrado na cor magenta e o outro monômero em azul. Duas moléculas de FAD estão presentes em cada sítio ativo e são mostrados em laranja. A naftoquinona E6a é mostrada a verde. Assim como acontece na interação com dicumarol e com duroquinona, a interação NQO1:E6a também envolve o posicionamento dessa substância de forma paralela ao anel de isoaloxazina do FAD. Fonte: Adaptado de (PIDUGU; MBIMBA; AHMAD; POZHARSKI *et al.*, 2016).

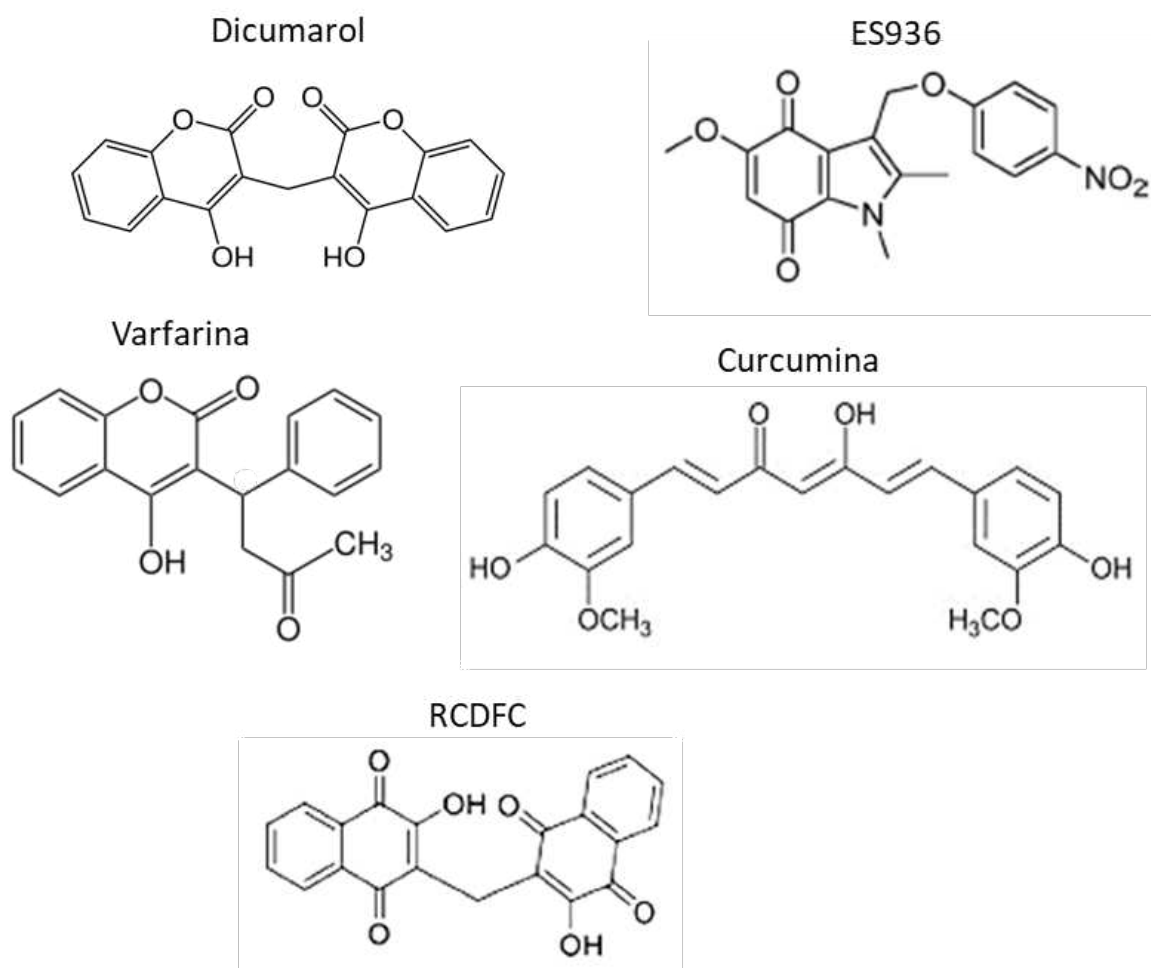
Com o objetivo de compreender a interface de interação do complexo NQO1:RCDFC em nível molecular, foram iniciados experimentos para obtenção da estrutura tridimensional de alta resolução do complexo, por meio da cristalografia de proteínas. Primeiramente, foi realizado *screening* de condições de cristalização com a NQO1 sem ligante por dois motivos: (1) para futuramente comparar (sobrepôr) as estruturas cristalográficas da proteína sozinha e do complexo; (2) para futura realização da técnica de *soaking*, que consiste em expor cristais de proteína a uma solução contendo o ligante para que ele seja incorporado na rede cristalina. Foram obtidas pelo menos seis condições favoráveis à cristalização da proteína NQO1. Os cristais foram obtidos em meios com valores de pH entre 6,0 a 8,5, tamponados com SPG, Imidazol, Tris e BIS-Tris propano. Foi observado também que a utilização de PEG1500 (25%), sais de fosfato (sódio, potássio, amônio), citrato de amônio e *tacsimate*TM (Hampton Research) favoreceram a cristalização da NQO1. Condições de

cristalização semelhantes foram reportadas na literatura, em que cristais de NQO1 foram obtidos em solução de 20% (p/v) de PEG3350 e 0,2 mol.L⁻¹ de citrato de amônio, ou em 20% de PEG3350 e 0,2 mol.L⁻¹ de tartarato de sódio e potássio (PIDUGU; MBIMBA; AHMAD; POZHARSKI *et al.*, 2016). Estudos relatam a obtenção de cristais de NQO1 contendo os ligantes duroquinona e ES936 em meios com pH 8,5 e 30% of PEG 3350, 200 mM acetato de sódio, 100 mM de tricina sódica, adição de 12–24 mM FAD e de 25 mM de NADH (FAIG; BIANCHET; TALALAY; CHEN *et al.*, 2000; WINSKI; FAIG; BIANCHET; SIEGEL *et al.*, 2001). Outro estudo relata a obtenção de cristais de NQO1 murina em 1,45 M de sulfato de amônio, 0,5% de PEG8000 e 150 mM de imidazol em pH 7,0 (LI; BIANCHET; TALALAY; AMZEL, 1995). Co-cristais de NQO1-dicumarol foram obtidos em 0,2 M de acetato de sódio, 190 mM de tricina sódica, pH 8,1 e 22% PEG 3350 (ASHER; DYM; TSVETKOV; ADLER *et al.*, 2006). A técnica de *soaking* foi aplicada para cristalização da NQO1 em complexo com E6a (PIDUGU; MBIMBA; AHMAD; POZHARSKI *et al.*, 2016) e duroquinona (LI; BIANCHET; TALALAY; AMZEL, 1995). O refino das condições cristalográficas, bem como a difração do cristal NQO1:RCDFC obtido a partir da técnica de *soaking* ou co-cristalografia ocorrerão em etapas posteriores do desenvolvimento dessa pesquisa.

As moléculas com ação inibitória sobre a enzima NQO1 podem ser classificadas em dois principais grupos, de acordo o mecanismo de ação: inibidores competitivos (reversíveis) e inibidores irreversíveis (não-competitivos) (ZHANG; CHEN; MA; WU *et al.*, 2018). A literatura científica descreve diversas substâncias que são capazes de interagir com a proteína NQO1, causando diminuição de sua atividade (Figura 47).

O DIC (3,3'-metilenobis(4-hidroxicumarina)), uma cumarina natural encontrada em espécies de plantas como a *Melilotus officinalis* (L.) Pall é o inibidor da proteína NQO1 melhor caracterizado (HROBOŇOVÁ; MACHYŇÁKOVÁ; ČIŽMÁRIK, 2018). Essa substância atua de forma competitiva se ligando aos sítios ativos da NQO1, impedindo especialmente a entrada do NAD(P)H (ASHER; DYM; TSVETKOV; ADLER *et al.*, 2006). Estudos descrevem que a constante de inibição (K_i) do DIC pode variar de 50 pM (de estudos de inibição enzimática) a 120 nM (calorimetria de titulação isotérmica) (HOSODA; NAKAMURA; HAYASHI, 1974; MEDINA-CARMONA; PALOMINO-MORALES; FUCHS; PADÍN-GONZALEZ *et al.*, 2016).

Figura 47 – Estrutura química de inibidores da proteína NQO1



Fonte: Elaborado pelo autor.

Apesar do DIC ser uma das primeiras substâncias a apresentar atividade antineoplásica com mecanismo de ação relacionado à inibição da NQO1, este não é um agente ideal porque sua estrutura central é semelhante à da vitamina K. Dessa forma, o DIC antagoniza competitivamente com essa vitamina pela subunidade 1 do complexo enzimático da enzima epóxido redutase (VKORC1) (TIMSON, 2017; WALLIN; WAJIH; HUTSON, 2008). A interação do DIC com a redutase da vitamina K resulta em inibição da síntese de fatores de coagulação no fígado, causando efeito anticoagulante, hemorragia interna e anemia durante o uso (SUN; ZHAO; WANG; SUN *et al.*, 2020). Foi demonstrado que o anticoagulante varfarina, cujo mecanismo de ação farmacológica é a inibição da VKOR, também é capaz de inibir a enzima NQO1, apresentado K_i de aproximadamente $8 \mu\text{M}$ (PREUSCH; SUTTIE, 1983). Uma substância natural encontrada no açafrão, a curcumina, também inibe NQO1 com IC_{50} de aproximadamente $5 \mu\text{M}$ (TSVETKOV; ASHER; REISS; SHAUL *et al.*, 2005).

Vários estudos foram realizados na tentativa de identificar novas moléculas, muitas vezes estruturalmente semelhantes ao DIC, que sejam inibidoras eficazes de NQO1 e não possuam a maioria dos efeitos adversos do DIC (NOLAN; DONCASTER; DUNSTAN; SCOTT *et al.*, 2009; SCOTT; BARNES; WHITEHEAD; STRATFORD *et al.*, 2011).

Inibidores irreversíveis (suicidas) como a indolequinona ES936 (5-metoxi-1,2-dimetil-3-[(4-nitrofenoxi)metil]indol-4,7-diona) e derivados têm sido propostos como alternativa aos inibidores competitivos (WINSKI; FAIG; BIANCHET; SIEGEL *et al.*, 2001). Dados de cristalografia de proteínas associados à espectrometria de massas mostraram que, após sofrer redução pela NQO1, a ES936 perde o grupo 4-nitrofenoxi e gera um intermediário reativo imínio, que alquila de forma irreversível os resíduos de tirosina 126 ou tirosina 128 do sítio ativo da NQO1 (COLUCCI; REIGAN; SIEGEL; CHILLOUX *et al.*, 2007).

O desenvolvimento de substratos que são biorreduzidos pela NQO1 é uma abordagem que visa desenvolver profármacos antineoplásicos. No entanto, a maior parte dos substratos desse tipo, como mitomicina C, apaziquona (E09) e diaziridinilbenzoquinona (AZQ e RH1), são agentes alquilantes de DNA, cuja eficácia clínica pode ser limitada devido aos mecanismos de reparo do DNA (ADIKESAVAN; BARRIOS; JAISWAL, 2007; DEHN; INAYAT-HUSSAIN; ROSS, 2005; PHILLIPS; HENDRIKS; PETERS; GROUP, 2013; SIEGEL; GIBSON; PREUSCH; ROSS, 1990). Outra desvantagem é que a bioativação dos substratos pode ocorrer em tecidos não-tumorais e por mecanismos independentes de NQO1, como a ativação via citocromo P450 e NQO2 (YAN; KEPA; SIEGEL; STRATFORD *et al.*, 2008).

Apenas duas classes de substratos comprovadamente induzem morte de células neoplásicas por meio de ativação pela NQO1: a β -lapachona e a desoxiniboquinona (DNQ). Foi demonstrado que a β -lapachona é capaz de induzir “*noptosis*”, um tipo de necrose celular dependente de NQO1 (YU; ZHONG; XIAO; DU *et al.*, 2020). Apesar do potencial antineoplásico *in vitro* da β -lapachona, essa substância possui baixa biodisponibilidade oral (15,54 %) e baixa solubilidade aquosa (0,038 mg/ml) (KIM; KIM; RO; JO *et al.*, 2015; NASONGKLA; WIEDMANN; BRUENING; BEMAN *et al.*, 2003). A DNQ e análogos são substratos de NQO1 de alta eficácia e seletivos para células neoplásicas, apresentando propriedades farmacocinéticas desejáveis em modelos *in vivo* (JIANG; LIU; TUMBATH; BOUDREAU *et al.*, 2024; LUNDBERG; FRANCIS; PAJAK; PARKINSON *et al.*, 2017). Além disso, atividade anticancerígena da DNQ depende estritamente da bioativação pela NQO1. Somadas, essas vantagens tornam a DNQ uma substância promissora para a terapia

antineoplásica (PARKINSON; BAIR; CISMESIA; HERGENROTHER, 2013; PARKINSON; HERGENROTHER, 2015).

1.11 A RCDFC como potencial antineoplásico no tratamento de tumores de pulmão

A pesquisa e desenvolvimento de medicamentos aplicados ao tratamento do câncer de pulmão é um desafio urgente, pois este é o tipo de câncer com maior mortalidade no mundo (SIEGEL; MILLER; FUCHS; JEMAL, 2021). Nesse contexto, novos medicamentos com mecanismo de ação inovadores e específicos para alvos moleculares importantes no câncer de pulmão poderiam aumentar a taxas de sobrevida dos pacientes e ajudar a mitigar o problema da resistência tumoral aos antineoplásicos tradicionais (LI; CORREIA; WANG; MANOCHAKIAN *et al.*, 2023; PATEL; DAS, 2023).

É sabido que muitos tecidos tumorais tendem a elevar a expressão da NQO1 em resposta ao estresse metabólico e oxidativo. A propósito, o aumento da expressão dessa enzima é mau prognóstico em alguns tipos de câncer, como o de pulmão (LI; ZHANG; JIN; MEN *et al.*, 2015). A exploração da NQO1 como alvo na terapia antineoplásica pode acontecer basicamente por duas estratégias. Em alguns casos, a inibição de NQO1, além de impedir o crescimento celular, também potencializa a ação de agentes quimioterápicos. Em outras situações, a proteína NQO1 pode ser utilizada para ativar quinonas citotóxicas por meio da atividade redox (ZEEKPUDSA; KUKONGVIRIYAPAN; SENGGUNPRAI; SRIPA *et al.*, 2014).

Nesse trabalho, decidiu-se investigar o efeito antineoplásico da naftoquinona RCDFC sobre um painel de linhagens tumorais originadas a partir de diferentes tecidos, com diferentes níveis de expressão de NQO1 (Tabela 8). Com exceção da linhagem K562, nas linhagens originadas de neoplasias hematológicas ocorrem baixos níveis de expressão da enzima, quando comparadas a linhagens oriundas de tumores sólidos (Tabela 8). Nas linhagens de cânceres hematológicos o efeito antineoplásico da RCDFC parece ser independente da expressão da NQO1, possivelmente pela existência de outros alvos para essa substância. Nas células originadas a partir de tumores sólidos o efeito antineoplásico da RCDFC foi preferencialmente direcionado para linhagens com maiores níveis de expressão de NQO1 (A549, PC3 e HCT116). Considerando a alta incidência do câncer de pulmão, alta expressão de NQO1 na linhagem A549 (adenocarcinoma de pulmão), e o fato do menor valor de CI_{50} da RCDFC ter sido obtido nessa linhagem, decidiu-se utilizar essas células para investigar o efeito antineoplásico *in vitro*.

Tabela 8 – Expressão gênica de NQO1 nas linhagens tumorais utilizadas nesse estudo

Linhagem	HCT116	SNB19	PC3	A549	B16	HL60	KG1	K562	RAJI	L929
nTPM	501,1	Nd	206,7	2554,0	nd	29,7	16,1	107,1	1,6	Nd

nTPM: número de transcritos por milhões; nd: não determinado. Fonte: Adaptado de *Human Protein Atlas* (<https://www.proteinatlas.org/>).

O potencial antineoplásico da naftoquinona RCDFC é relatado na literatura sobre linhagens de câncer de próstata metastático DU145 e PC3. A RCDFC apresentou seletividade para essas duas células tumorais quando comparada com a linhagem HUVEC (células endoteliais de veia umbilical humana), utilizada como controle não-tumoral (FREITAS; RIBEIRO; GUIMARÃES; MOREIRA *et al.*, 2021).

O ensaio do MTT foi escolhido no desenvolvimento desse trabalho porque é um dos principais métodos para avaliação do potencial citotóxico de substâncias. Geralmente, a redução do número de células viáveis observado durante o teste do MTT pode resultar de dois processos: (1) inibição do metabolismo e/ou da proliferação celular (efeito citostático) ou (2) morte celular efetiva (efeito citolítico) (SAZONOVA; CHESNOKOV; ZHIVOTOVSKY; KOPEINA, 2022). No entanto, o teste do MTT tem a limitação de não diferenciar qual desses dois processos é predominante.

Com o objetivo de diferenciar se o efeito da RCDFC é preferencialmente citostático e/ou citotóxico, foi estimado o número de global de células e o percentual de células mortas (não viáveis) por citometria de fluxo, após marcação com o iodeto de propídeo. Nesse experimento, considerando que a população inicial de células foi 80 mil e após 24 h a média do número de células foi 177 mil, o tempo de duplicação médio foi calculado como 21,7 h. Segundo a literatura, o tempo de duplicação médio da A549 é de aproximadamente 22 h (<https://bcrj.org.br/celula/a549/>). O tempo de 93ieloide93o observado nesse estudo foi próximo ao tempo de duplicação descrito em literatura, confirmando que a linhagem utilizada cresce na velocidade esperada. A contagem global de células mostra que na maior concentração de RCDFC (80 µM) não houve duplicação do número de células durante as 48 h de tratamento. Esse efeito indica que a RCDFC causa diminuição no ritmo de crescimento celular, quando comparada com o controle positivo. Os dados de citometria apontam que o aumento de células mortas é proeminente somente nas maiores concentrações de RCDFC e nos maiores períodos de tratamento. Somados, esses dados permitem inferir que a ação

antineoplásica da RCDFC sobre a linhagem A549 é preferencialmente citostática, ao invés de citolítica.

No caso de naftoquinonas (estrutura química presente na RCDFC), o efeito citostático foi relatado em um estudo com 1,4-naftoquinonas-2,3-bis-sulfuretos. Nesse trabalho algumas naftoquinonas apresentaram efeito citostático maior do que o do etoposídeo (interferente ou “veneno” de topoisomerase) sobre linhagens de câncer de próstata (PC3) e de fígado (HepG2) (WELLINGTON; KOLESNIKOVA; HLATSHWAYO; SAHA *et al.*, 2020).

Classicamente, a quimioterapia do câncer se baseia na utilização de doses suficientemente altas de um agente citolítico, para causar morte das células tumorais em divisão ativa, resultando em regressão tumoral (PAYNE; MILES, 2008). No entanto, os agentes citolíticos nem sempre são específicos para células neoplásicas, causando frequentemente efeitos secundários graves, e podem facilmente induzir multirresistência a fármacos (MDR) (ANTTILA; SHUBIN; CAIRNS; BORSE *et al.*, 2019; VAIDYA; SUFIYAN CHHIPA; MISHRA; GUPTA *et al.*, 2022).

Agentes citostáticos interferem na sinalização e na replicação celular, mas não conduzem a uma diminuição da massa tumoral de forma imediata. A associação de um agente citostático com um citolítico pode promover a redução de dose de ambos, diminuindo efeitos colaterais e potencializando a ação antineoplásica. Para isso, obviamente, os mecanismos de ação dos fármacos associados não podem resultar em uma interação farmacológica desfavorável. Se forem bem combinados, os fármacos citolítico e citostático podem aumentar a sobrevivência dos pacientes em comparação à monoterapia com fármacos citolíticos (ANTTILA; SHUBIN; CAIRNS; BORSE *et al.*, 2019).

Em alguns casos, os agentes citostáticos em monoterapia são suficientes para controlar a evolução do câncer, com significativo ganho de qualidade de vida pelo paciente em relação aos agentes citolíticos. Como o imatinibe, eles requerem uma exposição contínua para manter o controle da doença. Esse inibidor da tirosina quinase BCR-ABL é tomado diariamente por via oral e normaliza as contagens de células sanguíneas com excelente controle da leucemia mielóide crônica (LMC) a longo prazo (KANNAIYAN; MAHADEVAN, 2018). Agentes citostáticos como o imatinibe têm a promessa de transformar os cânceres atualmente incuráveis em uma doença crônica, como diabetes ou hipertensão (WESTIN, 2022).

Sabendo do efeito citoprotetor da NQO1 e que a RCDFC inibe sua atividade enzimática, considerou-se avaliar o conteúdo de espécies reativas de oxigênio (EROs) nas

células A549 tratadas com RCDFC. Os resultados mostraram que uma concentração de 80 μM de RCDFC induz significativamente a formação de EROs intracelulares após 3h de tratamento.

O potencial de quinonas em induzir a geração de espécies reativas de oxigênio é bem conhecido. Um estudo demonstrou que a timoquinona, a plumbagina e a juglona (quinonas de origem natural) aumentaram drasticamente o nível de ERO intracelulares em células PANC-1 (derivadas de câncer de pâncreas) marcadas com diacetato de 2,7-diclorofluoresceína (DCFDA), com consequente indução de apoptose (NARAYANAN; FARGHADANI; NYAMATHULLA; RAJARAJESWARAN *et al.*, 2022).

A perda de atividade de NQO1 é diretamente relacionada com o aumento de espécies reativas de oxigênio, e conseqüentemente, indução de estresse e morte celular. A queda da expressão de NQO1 em células de adenocarcinoma do pulmão A549 e H292, além de causar aumento da formação de EROs, também sensibiliza as células para a *anoikis*, um tipo de morte celular programada que ocorre quando a célula se desprende da matriz extracelular. Dessa forma, a queda da expressão de NQO1 diminui a invasividade em esferóides tumorais. Também foi verificado que a regulação negativa de NQO1 em células de NSCLC inibiu o crescimento tumoral *in vivo*. Além disso, foi observada a diminuição do percentual de células com alto conteúdo de aldeído desidrogenase (ALDH, um marcador de células-tronco cancerígenas). O estudo sugeriu que a depleção de NQO1 possibilita a redução da tumorigenicidade, por meio da diminuição da população de células-tronco tumorais (MADAJEWSKI; BOATMAN; CHAKRABARTI; BOOTHMAN *et al.*, 2016). Por outro lado, a inibição de NQO1 pode resultar em efeitos sistêmicos indesejáveis. Por exemplo, um estudo mostrou que ratos NQO1^{-/-} foram mais sensíveis aos efeitos nefrotóxicos causados pela cisplatina, apresentando níveis aumentados de ácido úrico e creatinina, com presença de danos tubulares, estresse oxidativo e apoptose (GANG; KIM; NOH; KIM *et al.*, 2013).

A maioria dos medicamentos antineoplásicos interfere no ciclo de proliferação de células tumorais, interferindo com os eventos do ciclo celular, levando à ativação de pontos de controle e à apoptose (BAI; LI; ZHANG, 2017; MATTHEWS; BERTOLI; DE BRUIN, 2022). Considerando esse fato, decidiu-se avaliar os efeitos da RCDFC sobre a progressão do ciclo celular da linhagem A549. Os resultados demonstram que o composto investigado causa aumento das subpopulações de células nas fases G1 e S do ciclo celular da linhagem A549 e diminuição das células na fase G2/M. Esse mesmo fenômeno é relatado após exposição da RCDFC às linhagens PC3 e DU145 (FREITAS; RIBEIRO; GUIMARÃES; MOREIRA *et al.*, 2021). Um estudo demonstrou que a redução da expressão de NQO1 mediada por siRNA (RNA

de interferência) induziu parada do ciclo celular na fase G1, prejudicou a formação de colônias e a capacidade migratória de células KKKU-100 (colangiocarcinoma, um tipo raro de câncer de fígado). Além disso, a supressão dos transcritos de NQO1 com siRNA aumentou a expressão da proteína p21 e diminuiu os níveis de expressão da ciclina D1, duas importantes proteínas reguladoras do ciclo celular nas fases G1 e S (BUTSRI; KUKONGVIRIYAPAN; SENGGUNPRAI; KONGPETCH *et al.*, 2017).

Na fase G1 do ciclo celular as células comprometem-se em entrar na fase S ou entrar na fase G0 através do ponto de restrição (LENNARZ; LANE, 2013). O ponto de restrição G1/S atua para evitar que as células entrem na fase S na presença de danos no DNA e funciona para inibir o início da replicação (LI; BARBASH; DIEHL, 2015). A parada na fase G1 do ciclo celular pode ser mediada pelo supressor tumoral p53 (SCORAH; MCGOWAN, 2010). A proteína p53 é um fator de transcrição que atua como sensor e suprime o desenvolvimento tumoral ao controlar a transcrição de vários genes que desempenham funções na parada do ciclo celular, na senescência celular, no sistema de reparo do DNA e na apoptose (FEROZ; SHEIKH, 2020; SCORAH; MCGOWAN, 2010). Além disso, a proteína p53 também pode ativar autofagia, mecanismo importante na supressão de tumores (CHEN, 2016).

É sabido que a proteína NQO1 desempenha função protetora ao se ligar a proteínas importantes no câncer, protegendo-as da degradação pelo proteassomo (DINKOVA-KOSTOVA; TALALAY, 2010). Entre essas proteínas encontram-se a p53, mediadora do reparo de DNA e apoptose, HIF1 α , promotora da adaptação tumoral à hipóxia, e PGC1 α , necessária à reprogramação metabólica, são protegidas dessa forma pela NQO1 (ADAMOVICH; SHLOMAI; TSVETKOV; UMANSKY *et al.*, 2013; ASHER; LOTEM; KAMA; SACHS *et al.*, 2002; OH; KIM; KIM; KIM *et al.*, 2016).

A degradação proteassômica de p53 é mediada por duas vias alternativas que são dependentes ou independentes da proteína Mdm2 e ubiquitina. A via independente da ubiquitina é regulada pela NQO1, que estabiliza a p53. O tratamento das células com DIC induz a degradação da p53 e p73 independente da ubiquitina (ASHER; LOTEM; SACHS; KAHANA *et al.*, 2002; ASHER; TSVETKOV; KAHANA; SHAUL, 2005). A inibição de NQO1 causada pelo DIC levou à redução tanto do nível de p53 endógeno quanto do p53 induzido por radiação gama em células de carcinoma do cólon humano HCT-116. A redução de p53 não foi observada quando foram utilizados os inibidores de proteassoma MG132 e lactacistina (ASHER; LOTEM; COHEN; SACHS *et al.*, 2001). Análogos de DIC, além de inibir a NQO1 *in vitro*, reduziram a quantidade de p53 celular na presença e ausência de

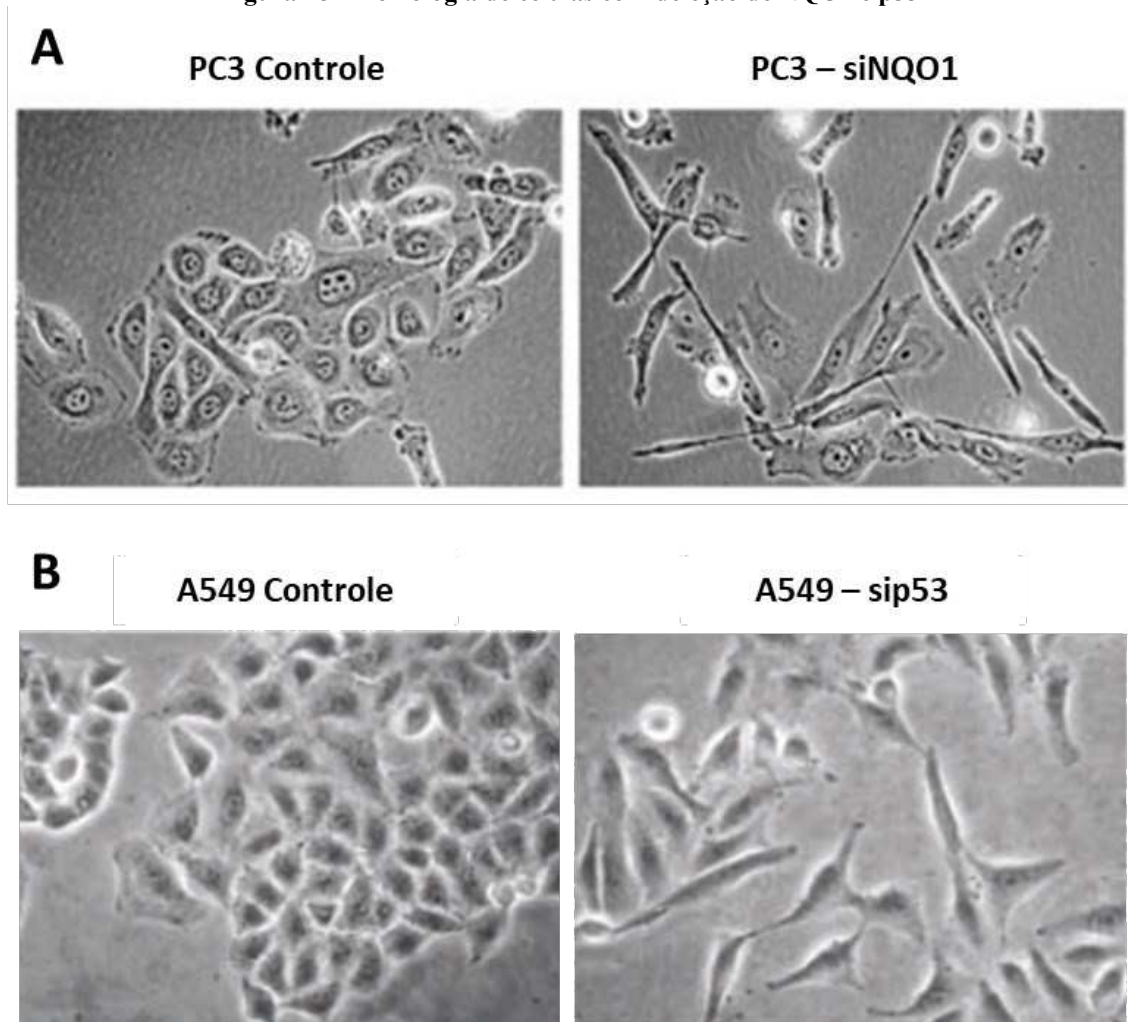
etoposídeo (um indutor de p53) em concentrações suficientes para a inibição da enzima e inferiores às concentrações que causam toxicidade nas linhagens neoplásicas utilizadas (NOLAN; SCOTT; BARNES; DONCASTER *et al.*, 2010; SCOTT; BARNES; WHITEHEAD; STRATFORD *et al.*, 2011). Um estudo demonstrou que uma conformação específica da tirosina 128 e fenilalanina 232 é importante para a interação de NQO1 com p53 e o movimento destes resíduos após a ligação ao DIC altera as propriedades de superfície da NQO1, tornando-a incapaz de se ligar a p53 e a p73 β (ASHER; DYM; TSVETKOV; ADLER *et al.*, 2006). A curcumina, um composto fenólico natural inibidor de NQO1, induz a degradação da p53 nativa independentemente da ubiquitina e inibe a apoptose induzida pela p53 em timócitos normais e células de leucemia mieloide (TSVETKOV; ASHER; REISS; SHAUL *et al.*, 2005).

A perda da função do p53 causa instabilidade cromossômica, uma vez que essa proteína geralmente desempenha um papel crítico na manutenção da integridade genômica através da sua função nas respostas aos danos no DNA. Supõe-se que o efeito antineoplásico da RCDFC é relacionado com a redução da abundância de p53, visto que o composto em estudo é um inibidor da proteína NQO1 comparável ao DIC. A perda de p53 pode somar-se à indução de espécies reativas de oxigênio por RCDFC para aumentar a instabilidade genômica a níveis críticos na célula tumoral. Nesse contexto, levanta-se a hipótese de que a inibição de NQO1 por RCDFC provoca um ajuste conformacional induzido que interrompe a interação entre NQO1 e p53. Como resultado, a proteína p53 passaria a ser degradada com maior intensidade pelo proteassomo. A perda de p53 geraria acúmulo de danos no genoma, fazendo a célula tumoral reduzir sua taxa de proliferação, como observado após tratamento das células A549 com RCDFC.

Efeitos como a retração do volume celular, condensação de cromatina e vacuolização citoplasmática, encontrados durante a análise microscópica das células A549 tratadas com RCDFC, vão ao encontro das alterações morfológicas observadas em células com deficiência de p53. Um estudo mostrou que células A549 e MCF-7 com depleção de p53 causada por siRNA apresentaram diminuição de adesões célula-célula, corpo celular mais alongado e morfologia fusiforme (Figura 48B) (PHAN; LIN; CHOU; WU *et al.*, 2022). Outro estudo relata que a supressão da NQO1 em células PC-3 provocou alterações morfológicas distintas, incluindo o alongamento celular e rompimento de junções entre as células (Figura 48^a) (THAPA; HUANG; MUÑOZ; YANG *et al.*, 2020). De forma oposta, a superexpressão de NQO1 leva células de neuroblastoma humano a serem mais resistentes à morte por toxinas

mitocondriais e à indução de alterações morfológicas, como o encolhimento celular e a condensação de cromatina (KIM; KIM; KIM; MATTSON *et al.*, 2013).

Figura 48 –Morfologia de células com deleção de NQO1 e p53



Em A estão representadas micrografias de células PC3 controle e células PC3 com deleção de NQO1. Fonte: Adaptado de (THAPA; HUANG; MUÑOZ; YANG *et al.*, 2020). Em B estão representadas micrografias de células A549 controle e células PC3 com deleção de p53. Fonte Adaptado de (PHAN; LIN; CHOU; WU *et al.*, 2022).

O HIF-1 é um fator de transcrição dependente de oxigênio, cujos genes-alvo estão relacionados com a angiogênese, a proliferação e sobrevivência celular, o metabolismo da glicose e o metabolismo do ferro (KE; COSTA, 2006; LEE; BAE; JEONG; KIM *et al.*, 2004). Um estudo demonstrou que a proteína NQO1 se liga diretamente ao domínio dependente de oxigênio do HIF-1 α e inibe sua degradação proteossômica, impedindo que prolil hidroxilases se liguem a esse domínio para realizar hidroxilação para a degradação dependente de oxigênio. A supressão de NQO1 mediada por siRNA impede a função celular da HIF-1 α e o crescimento tumoral em células de câncer colorretal e da mama (OH; KIM; KIM; KIM *et al.*, 2016). Dada

sua importância no metabolismo celular e adaptação à hipóxia, o HIF-1 α é um alvo promissor no combate ao câncer, visto que as células do núcleo de tumores sólidos se encontram em hipóxia (ELZAKRA; KIM, 2021). A redução da estabilidade e/ou função de HIF-1 α mediada pela redução/inibição da atividade protetora de NQO1 pode resultar no descobrimento de novas terapias antineoplásicas (SALIDO; TIMSON; BETANCOR-FERNÁNDEZ; PALOMINO-MORALES *et al.*, 2022).

Em relação à toxicidade hematológica, o ensaio de atividade hemolítica com eritrócitos de camundongos demonstrou que o tratamento com concentrações de RCDFC $\leq 637\mu\text{M}$ por 1 hora tem baixo potencial em induzir a lise dessas células. Esse achado torna a RCDFC vantajosa em relação ao DIC. Um trabalho demonstrou que a exposição dos eritrócitos a 10 μM de DIC durante 48 horas resultou em aumento da concentração de cálcio, aumento da atividade de canais catiônicos, desencadeamento de ligação à anexina-V (indicando processo de morte celular) e provocou hemólise dessas células (QADRI; KUCHERENKO; ZELENAK; JILANI *et al.*, 2011).

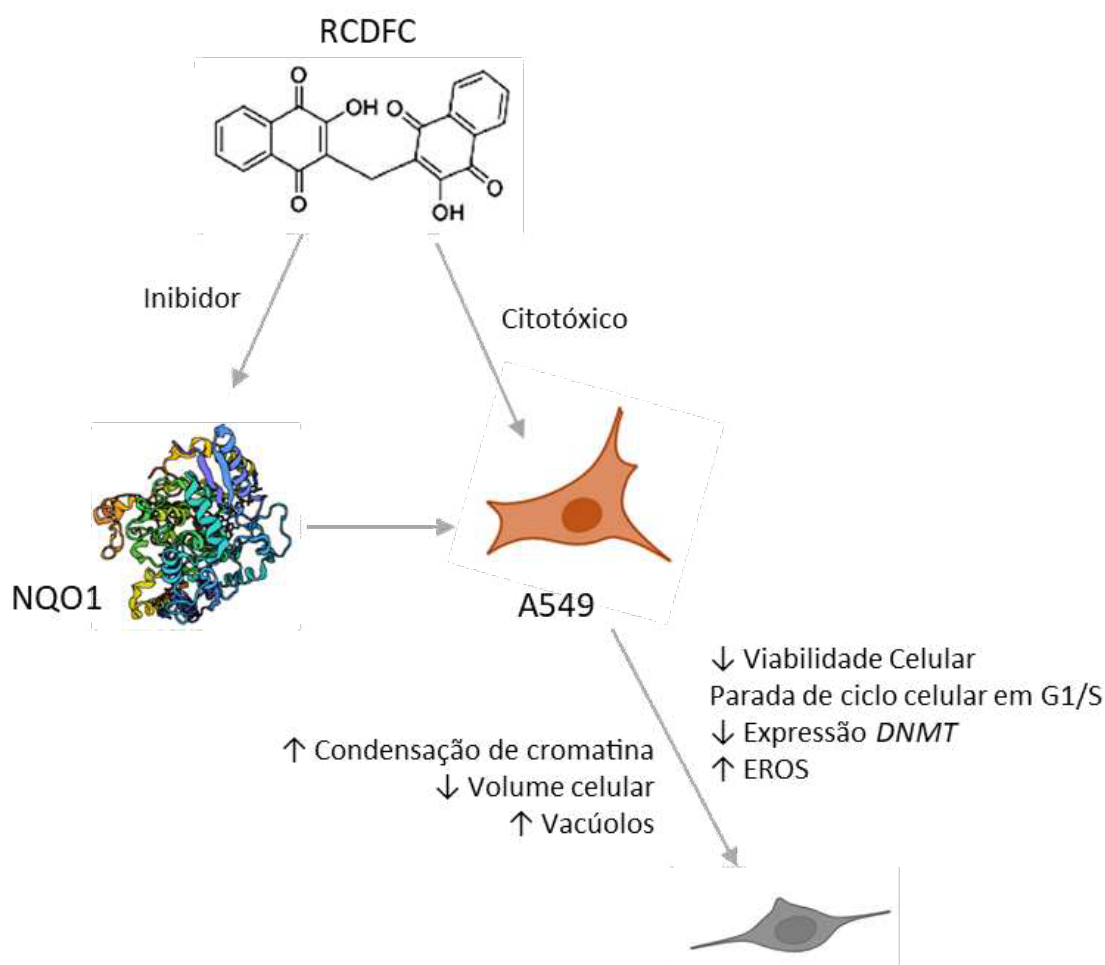
Nesse trabalho também foi avaliado o efeito da RCDFC em causar redução da expressão do RNAm das enzimas reguladoras do processo de metilação de DNA. A metilação do DNA mediada por DNA metiltransferases é um processo epigenético importante, que regula a expressão de genes em mamíferos e desempenha um papel no silenciamento de certos genes, como os genes supressores de tumores. Assim, essas proteínas são alvos terapêuticos promissores para o tratamento de neoplasias (FURTADO; LUCIANO; SANTOS; FURTADO *et al.*, 2019; ZHANG; WANG; LI; LEI *et al.*, 2022). Foi observado que o tratamento de células A549 com RCDFC durante 48 h foi capaz de causar redução da expressão dos genes *DNMT1* e *DNMT2*. A DNA metiltransferase 1 (DNMT1) é uma enzima funcional para a manutenção e propagação do padrão de metilação do DNA em células em proliferação. Está implicada no silenciamento de genes supressores tumorais, não só através da metilação dos sítios CpG, mas também na formação de complexos repressivos da transcrição (ROBERT; MORIN; BEAULIEU; GAUTHIER *et al.*, 2003; ZHANG; XU, 2017). A inibição da DNMT1 reduz os níveis de metilação do DNA e reativa os genes supressores de tumores, por exemplo, *CDKN2A* e *CDKN2B* (HOSSAIN; HEALEY; LEE; POH *et al.*, 2013). Níveis reduzidos de *DNMT2* sensibilizam fibroblastos humanos para o estresse oxidativo e para danos de DNA, além de causar alterações na expressão de micro RNAs (miRNAs) relacionados com a proliferação celular (LEWINSKA; ADAMCZYK-GROCHALA; KWASNIEWICZ; DEREKOWSKA *et al.*, 2018).

A literatura tem indicado o potencial de quinonas na modulação do epigenoma. O ácido lacaico A, uma antraquinona natural altamente substituída, possui atividade inibitória sobre a DNMT1 ($K_i = 310$ nM), atuando de forma competitiva com o DNA (FAGAN; CRYDERMAN; KOPELOVICH; WALLRATH *et al.*, 2013). Um estudo demonstrou que a naftoquinona *shikonin* inibe a migração e a invasão das células de câncer de tireoide TPC-1 como concomitante redução da expressão proteica de DNMT1 (ZHANG; SUN; HUANG; ZHAO *et al.*, 2018).

6 CONCLUSÃO

Nesse trabalho a proteína NQO1 recombinante foi expressa em sistema procarioto e obtida com grau de pureza adequado para utilização em ensaios de interação proteína-ligante. Foi estabelecido que a enzima NQO1 é um alvo molecular da naftoquinona RCDFC, sendo essa interação comprovada através de ensaios de inibição enzimática, espectroscopia de fluorescência intrínseca do triptofano, fluorescência diferencial de varredura e dicroísmo circular. Além disso, foi verificado que a RCDFC é uma substância potencial para o desenvolvimento de fármacos para o tratamento do câncer de pulmão, dado seus efeitos citostáticos com parada de ciclo celular, indução de espécies reativas de oxigênio, modificação da morfologia celular e redução da expressão de genes de DNA metil transferases

Figura 49 – Principais achados durante a realização desse trabalho



7 PERSPECTIVAS FUTURAS

Considerando o potencial inibitório da RCDFC sobre a proteína NQO1, pretende-se aprofundar o estudo bioquímico dessa interação para avaliar o modo de inibição enzimática (competitiva, não-competitiva, alostérica) e determinar a constante de inibição (K_i).

Será dada continuidade aos ensaios de cristalização, com o refino das condições obtidas nesse trabalho para obtenção de cristais NQO1:RCDFC.

Considerando que inibidores de NQO1 aumentam a degradação de proteínas importantes no câncer, planeja-se realizar estudo proteômico para obtenção do perfil de proteínas diferencialmente expressas na presença de RCDFC (incluindo p53 e HIF1 α).

Sabendo que a RCDFC causa redução da expressão gênica de *DNMT1* e *DNMT2* projeta-se investigar a existência de efeito demetilante ao verificar o perfil de metilação e hidroximetilação global por citometria de fluxo e microscopia confocal.

Almeja-se aprofundar o estudo mecanístico do efeito antineoplásico da RCDFC por (1) avaliação da expressão de marcadores de dano de DNA e de reguladores do ciclo celular, (2) investigação da capacidade da RCDFC em alterar o potencial transmembrânico mitocondrial, e (3) pesquisa do tipo de morte celular.

Também é importante realizar estudo antitumoral da RCDFC em modelo *in vivo*, bem como obter o perfil de distribuição dessa substância e determinar parâmetros farmacocinéticos.

Uma outra vertente na pesquisa com a RCDFC é a investigação de sua associação com agentes antineoplásicos utilizados na terapia farmacológica do câncer de pulmão, com o objetivo de reduzir doses e reduzir efeitos colaterais graves de quimioterápicos.

REFERÊNCIAS

ADAMOVICH, Y.; SHLOMAI, A.; TSVETKOV, P.; UMANSKY, K. B. *et al.* The protein level of PGC-1 α , a key metabolic regulator, is controlled by NADH-NQO1. **Molecular and Cellular Biology**, London, v. 33, n. 13, p. 2603-2613, 2013.

ADIKESAVAN, A. K.; BARRIOS, R.; JAISWAL, A. K. In vivo role of NAD (P) H: quinone oxidoreductase 1 in metabolic activation of mitomycin C and bone marrow cytotoxicity. **Cancer Research**, Philadelphia, v. 67, n. 17, p. 7966-7971, 2007.

ALARD, A.; FABRE, B.; ANESIA, R.; MARBOEUF, C. *et al.* NAD (P) H quinone-oxidoreductase 1 protects eukaryotic translation initiation factor 4GI from degradation by the proteasome. **Molecular and Cellular Biology**, London, v. 30, n. 4, p. 1097-1105, 2010.

ALBERTS, B.; JOHNSON, A.; LEWIS, J.; MORGAN, D. *et al.* **Biologia Molecular da Célula**. 6. ed. Porto Alegre: Artmed, 2017.

AMININ, D.; POLONIK, S. 1, 4-Naphthoquinones: Some biological properties and application. **Chemical and Pharmaceutical bulletin**, Tokyo, v. 68, n. 1, p. 46-57, 2020.

ANOZ-CARBONELL, E.; TIMSON, D. J.; PEY, A. L.; MEDINA, M. The catalytic cycle of the antioxidant and cancer-associated human NQO1 enzyme: hydride transfer, conformational dynamics and functional cooperativity. **Antioxidants**, Basel, v. 9, n. 9, p. 772, 2020.

ANTTILA, J. V.; SHUBIN, M.; CAIRNS, J.; BORSE, F. *et al.* Contrasting the impact of cytotoxic and cytostatic drug therapies on tumour progression. **PLoS Computational Biology**, San Francisco, v. 15, n. 11, p. e1007493, 2019.

ARAÚJO, M. V.; DAVID, C. C.; NETO, J. C.; OLIVEIRA, L. A. *et al.* Evaluation on the leishmanicidal activity of 2-N, N'-dialkylamino-1, 4-naphthoquinone derivatives. **Experimental Parasitology**, Orlando, v. 176, p. 46-51, 2017.

ARZUL, G.; GENTIEN, P.; CRASSOUS, M.-P. A haemolytic test to assay toxins excreted by the marine dinoflagellate *Gyrodinium cf. aureolum*. **Water Research**, Amsterdam, v. 28, n. 4, p. 961-965, 1994.

ASHER, G.; BERCOVICH, Z.; TSVETKOV, P.; SHAUL, Y. *et al.* 20S proteasomal degradation of ornithine decarboxylase is regulated by NQO1. **Molecular Cell**, Cambridge, v. 17, n. 5, p. 645-655, 2005.

ASHER, G.; DYM, O.; TSVETKOV, P.; ADLER, J. *et al.* The crystal structure of NAD (P) H quinone oxidoreductase 1 in complex with its potent inhibitor dicoumarol. **Biochemistry**, Washington, v. 45, n. 20, p. 6372-6378, 2006.

ASHER, G.; LOTEM, J.; COHEN, B.; SACHS, L. *et al.* Regulation of p53 stability and p53-dependent apoptosis by NADH quinone oxidoreductase 1. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, Washington, v. 98, n. 3, p. 1188-1193, 2001.

ASHER, G.; LOTEM, J.; KAMA, R.; SACHS, L. *et al.* NQO1 stabilizes p53 through a distinct pathway. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, Washington, v. 99, n. 5, p. 3099-3104, 2002.

ASHER, G.; LOTEM, J.; SACHS, L.; KAHANA, C. *et al.* Mdm-2 and ubiquitin-independent p53 proteasomal degradation regulated by NQO1. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, Washington, v. 99, n. 20, p. 13125-13130, 2002.

ASHER, G.; TSVETKOV, P.; KAHANA, C.; SHAUL, Y. A mechanism of ubiquitin-independent proteasomal degradation of the tumor suppressors p53 and p73. **Genes & Development**, Woodbury, v. 19, n. 3, p. 316-321, 2005.

AWADALLAH, N. S.; DEHN, D.; SHAH, R. J.; NASH, S. R. *et al.* NQO1 expression in pancreatic cancer and its potential use as a biomarker. **Applied Immunohistochemistry & Molecular Morphology**, Philadelphia, v. 16, n. 1, p. 24-31, 2008.

BABINE, R. E.; BENDER, S. L. Molecular recognition of protein–ligand complexes: Applications to drug design. **Chemical Reviews**, Washington, v. 97, n. 5, p. 1359-1472, 1997.

BAI, J.; LI, Y.; ZHANG, G. Cell cycle regulation and anticancer drug discovery. **Cancer Biology & Medicine**, Tianjin, v. 14, n. 4, p. 348, 2017.

BARON, R.; MCCAMMON, J. A. Molecular recognition and ligand association. **Annual Review of Physical Chemistry**, San Mateo, v. 64, p. 151-175, 2013.

BAWAZEER, S.; RAUF, A. In vivo anti-inflammatory, analgesic, and sedative studies of the extract and naphthoquinone isolated from *Diospyros kaki* (persimmon). **ACS Omega**, Washington, v. 6, n. 14, p. 9852-9856, 2021.

BEALL, H. D.; MURPHY, A. M.; SIEGEL, D.; HARGREAVES, R. *et al.* Nicotinamide adenine dinucleotide (phosphate): quinone oxidoreductase (DT-diaphorase) as a target for bioreductive antitumor quinones: quinone cytotoxicity and selectivity in human lung and breast cancer cell lines. **Molecular Pharmacology**, Rockville, v. 48, n. 3, p. 499-504, 1995.

BELINSKY, M.; JAISWAL, A. K. NAD (P) H: quinone oxidoreductase 1 (DT-diaphorase) expression in normal and tumor tissues. **Cancer and Metastasis Reviews**, London, v. 12, p. 103-117, 1993.

BIANCHET, M. A.; ERDEMLI, S. B.; AMZEL, L. M. Structure, function, and mechanism of cytosolic quinone reductases. **Vitamins & Hormones**, Amsterdam, v. 78, p. 63-84, 2008.

BOGLIOLO, L.; BRASILEIRO FILHO, G.; BARBOSA, A. J. A. **Bogliolo patologia geral**. 5. ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2013.

BUTSRI, S.; KUKONGVIRIYAPAN, V.; SENGGUNPRAI, L.; KONGPETCH, S. *et al.* Downregulation of NAD (P) H: quinone oxidoreductase 1 inhibits proliferation, cell cycle and migration of cholangiocarcinoma cells. **Oncology Letters**, Athens, v. 13, n. 6, p. 4540-4548, 2017.

BÖHM, H. J.; KLEBE, G. What can we learn from molecular recognition in protein–ligand complexes for the design of new drugs? **Angewandte Chemie International Edition**, Hoboken, v. 35, n. 22, p. 2588-2614, 1996.

CHEN, J. The cell-cycle arrest and apoptotic functions of p53 in tumor initiation and progression. **Cold Spring Harbor perspectives in medicine**, Woodbury, v. 6, n. 3, 2016.

CHEN, L.; ZENG, Y.; ZHOU, S. Role of apoptosis in cancer resistance to chemotherapy. *In*: TUTAR, Y.; TUTAR, L. (org). **Current understanding of apoptosis-programmed cell death**. Rijeka: Intechopen, 2018. cap. 7.

CHEN, S.; DENG, P. S.; BAILEY, J. M.; SWIDEREK, K. M. A two-domain structure for the two subunits of NAD (P) H: quinone acceptor oxidoreductase. **Protein Science**, Hoboken, v. 3, n. 1, p. 51-57, 1994.

CHENG, S.-T.; HU, J.-L.; REN, J.-H.; YU, H.-B. *et al.* Dicoumarol, an NQO1 inhibitor, blocks cccDNA transcription by promoting degradation of HBx. **Journal of Hepatology**, New York, v. 74, n. 3, p. 522-534, 2021.

CHU, Q.; VINCENT, M.; LOGAN, D.; MACKAY, J. A. *et al.* Taxanes as first-line therapy for advanced non-small cell lung cancer: a systematic review and practice guideline. **Lung Cancer**, Philadelphia, v. 50, n. 3, p. 355-374, 2005.

COLUCCI, M. A.; REIGAN, P.; SIEGEL, D.; CHILLOUX, A. *et al.* Synthesis and evaluation of 3-aryloxymethyl-1, 2-dimethylindole-4, 7-diones as mechanism-based inhibitors of NAD (P) H: quinone oxidoreductase 1 (NQO1) activity. **Journal of Medicinal Chemistry**, Washington, v. 50, n. 23, p. 5780-5789, 2007.

CONDE, E.; ROJO, F.; GÓMEZ, J.; ENGUITA, A. B. *et al.* Molecular diagnosis in non-small-cell lung cancer: expert opinion on ALK and ROS1 testing. **Journal of Clinical Pathology**, London, v. 75, n. 3, p. 145-153, 2022.

COOPER, A. Thermodynamics of protein folding and stability. *In*: ALLEN, G. (org.). **Protein: A Comprehensive Treatise**. Stamford: JAI Press Inc, 1999. p. 217-270.

COSAERT, J.; QUOIX, E. Platinum drugs in the treatment of non-small-cell lung cancer. **British Journal of Cancer**, Jersey City, v. 87, n. 8, p. 825-833, 2002.

COSTA, P. M. D. S.; SALES, S. L. A.; PINHEIRO, D. P.; PONTES, L. Q. *et al.* Epigenetic reprogramming in cancer: From diagnosis to treatment. **Frontiers in Cell and Developmental Biology**, Lausanne, v. 11, p. 1116805, 2023.

DEHN, D. L.; INAYAT-HUSSAIN, S. H.; ROSS, D. RH1 induces cellular damage in an NAD (P) H: quinone oxidoreductase 1-dependent manner: relationship between DNA cross-linking, cell cycle perturbations, and apoptosis. **Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics**, Rockville, v. 313, n. 2, p. 771-779, 2005.

DENAXA, N.-K.; TSAFOUROS, A.; ROUSSOS, P. A. Role of phenolic compounds in adventitious root formation. *In*: HUSEN, A. (org). **Environmental, Physiological and**

Chemical Controls of Adventitious Rooting in Cuttings. 1. ed. Amsterdam: Elsevier, 2022. p. 251-288.

DESANTIS, K.; REED, A.; RAHHAL, R.; REINKING, J. Use of differential scanning fluorimetry as a high-throughput assay to identify nuclear receptor ligands. **Nuclear Receptor Signaling**, Washington, v. 10, n. 1, p. 1-5, 2012. DOI 10.1621/nrs.10002
Disponível em: <https://journals.sagepub.com/doi/pdf/10.1621/nrs.10002>. Acesso em: 11 jan. 2024.

DINKOVA-KOSTOVA, A. T.; TALALAY, P. NAD (P) H: quinone acceptor oxidoreductase 1 (NQO1), a multifunctional antioxidant enzyme and exceptionally versatile cytoprotector. **Archives of Biochemistry and Biophysics**, Amsterdam, v. 501, n. 1, p. 116-123, 2010.

DONG, M.; LIU, D.; LI, Y.-H.; CHEN, X.-Q. *et al.* Naphthoquinones from *Onosma paniculatum* with potential anti-inflammatory activity. **Planta Medica**, Berlin, v. 83, n. 07, p. 631-635, 2017.

DONG, Y. P.; CHEN, S.-Z.; HE, H.-S.; SUN, Z.-R. *et al.* Skullcapflavone II, a novel NQO1 inhibitor, alleviates aristolochic acid I-induced liver and kidney injury in mice. **Acta Pharmacologica Sinica**, Basingstoke, p. 1-13, 2023.

DU, X.; LI, Y.; XIA, Y.-L.; AI, S.-M. *et al.* Insights into protein–ligand interactions: mechanisms, models, and methods. **International Journal of Molecular Sciences**, Basel, v. 17, n. 2, p. 144, 2016.

DULO, B.; PHAN, K.; GITHAIGA, J.; RAES, K. *et al.* Natural quinone dyes: a review on structure, extraction techniques, analysis and application potential. **Waste and Biomass Valorization**, New York, v. 12, n. 12, p. 6339-6374, 2021.

ELZAKRA, N.; KIM, Y. HIF-1 α metabolic pathways in human cancer. *In*: HU, S. **Cancer Metabolomics: Methods and Applications**. Heidelberg: Springer Nature, 2021. p. 243-260.

ERIN, N.; GRAHOVAC, J.; BROZOVIC, A.; EFFERTH, T. Tumor microenvironment and epithelial mesenchymal transition as targets to overcome tumor multidrug resistance. **Drug Resistance Updates**, Amsterdam, v. 53, p. 100715, 2020.

FAGAN, R. L.; CRYDERMAN, D. E.; KOPELOVICH, L.; WALLRATH, L. L. *et al.* Laccaic acid A is a direct, DNA-competitive inhibitor of DNA methyltransferase 1. **Journal of Biological Chemistry**, Philadelphia, v. 288, n. 33, p. 23858-23867, 2013.

FAIG, M.; BIANCHET, M. A.; TALALAY, P.; CHEN, S. *et al.* Structures of recombinant human and mouse NAD (P) H: quinone oxidoreductases: species comparison and structural changes with substrate binding and release. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, Washington, v. 97, n. 7, p. 3177-3182, 2000.

FANG, Q.; ANDREWS, J.; SHARMA, N.; WILK, A. *et al.* Stability and sub-cellular localization of DNA polymerase β is regulated by interactions with NQO1 and XRCC1 in

response to oxidative stress. **Nucleic Acids Research**, Kettering, v. 47, n. 12, p. 6269-6286, 2019.

FENG, Y. L.; CHEN, D. Q.; VAZIRI, N. D.; GUO, Y. *et al.* Small molecule inhibitors of epithelial-mesenchymal transition for the treatment of cancer and fibrosis. **Medicinal Research Reviews**, Hoboken, v. 40, n. 1, p. 54-78, 2020.

FERLAY, J.; COLOMBET, M.; SOERJOMATARAM, I.; PARKIN, D. M. *et al.* Cancer statistics for the year 2020: An overview. **International Journal of Cancer**, Heidelberg, v. 149, n. 4, p. 778-789, 2021.

FEROZ, W.; SHEIKH, A. M. A. Exploring the multiple roles of guardian of the genome: P53. **Egyptian Journal of Medical Human Genetics**, Cairo, v. 21, n. 1, p. 1-23, 2020.

FERREIRA, P. G.; NICOLETTI, C. D.; BORBA-SANTOS, L. P.; SILVA, F. C. *et al.* The antifungal activity of naphthoquinones: An integrative review. **Anais da Academia Brasileira de Ciências**, Rio de Janeiro, v. 90, p. 1187-1214, 2018.

FREIRE, E. Differential scanning calorimetry. *In*: SHIRLEY, B. A. (org). **Protein stability and folding: Theory and Practice**. New York: Springer Nature, 1995. p. 191-218.

FREITAS, P. P.; RIBEIRO, R. C. B.; GUIMARÃES, I. S.; MOREIRA, C. S. *et al.* (3, 3'-Methylene) bis-2-hydroxy-1, 4-naphthoquinones induce cytotoxicity against DU145 and PC3 cancer cells by inhibiting cell viability and promoting cell cycle arrest. **Molecular Biology Reports**, Dordrecht, v. 48, n. 4, p. 3253-3263, 2021.

FULD, A. D.; DRAGNEV, K. H.; RIGAS, J. R. Pemetrexed in advanced non-small-cell lung cancer. **Expert Opinion on Pharmacotherapy**, London, v. 11, n. 8, p. 1387-1402, 2010.

FURTADO, C. L.; LUCIANO, M. C. S.; SANTOS, R. D. S.; FURTADO, G. P. *et al.* Epidrugs: targeting epigenetic marks in cancer treatment. **Epigenetics**, Philadelphia, v. 14, n. 12, p. 1164-1176, 2019.

GANG, G.-T.; KIM, Y.-H.; NOH, J.-R.; KIM, K.-S. *et al.* Protective role of NAD (P) H: quinone oxidoreductase 1 (NQO1) in cisplatin-induced nephrotoxicity. **Toxicology Letters**, Amsterdam, v. 221, n. 3, p. 165-175, 2013.

GAO, J.; LI, H.-R.; JIN, C.; JIANG, J.-H. *et al.* Strategies to overcome acquired resistance to EGFR TKI in the treatment of non-small cell lung cancer. **Clinical and Translational Oncology**, 21, p. 1287-1301, 2019.

GAO, K.; OERLEMANS, R.; GROVES, M. R. Theory and applications of differential scanning fluorimetry in early-stage drug discovery. **Biophysical Reviews**, New York, v. 12, n. 1, p. 85-104, 2020.

GARATE, M.; WONG, R. P.; CAMPOS, E. I.; WANG, Y. *et al.* NAD (P) H quinone oxidoreductase 1 inhibits the proteasomal degradation of the tumour suppressor p33ING1b. **EMBO Reports**, London, v. 9, n. 6, p. 576-581, 2008.

GOKTURK, F.; ERKOC-KAYA, D.; ARIKOGLU, H. Juglone can inhibit angiogenesis and metastasis in pancreatic cancer cells by targeting Wnt/ β -catenin signaling. **Bratislava Medical Journal/Bratislavske Lekarske Listy**, Bratislava, v. 122, n. 2, 2021.

GRANDIS, R. A.; SANTOS, P. W. D. S.; OLIVEIRA, K. M.; MACHADO, A. R. T. *et al.* Novel lawsone-containing ruthenium (II) complexes: Synthesis, characterization and anticancer activity on 2D and 3D spheroid models of prostate cancer cells. **Bioorganic Chemistry**, Amsterdam, v. 85, p. 455-468, 2019.

HAIT, W. N. Anticancer drug development: the grand challenges. **Nature Reviews Drug Discovery**, New York, v. 9, n. 4, p. 253-254, 2010.

HALL, J. E.; HALL, M. E. **Guyton and Hall textbook of Medical Physiology**. Philadelphia: Elsevier, 2020.

HANAHAHAN, D. Hallmarks of cancer: new dimensions. **Cancer Discovery**, Philadelphia, v. 12, n. 1, p. 31-46, 2022.

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

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

HART, L.; OGBONNAYA, A.; BOYKIN, K.; DEYOUNG, K. *et al.* Burden of chemotherapy-induced myelosuppression among patients with extensive-stage small cell lung cancer: A retrospective study from community oncology practices. **Cancer Medicine**, Hoboken, 2023.

HE, F.; RU, X.; WEN, T. NRF2, a transcription factor for stress response and beyond. **International Journal of Molecular Sciences**, Basel, v. 21, n. 13, p. 4777, 2020.

HOOK, I.; MILLS, C.; SHERIDAN, H. Bioactive naphthoquinones from higher plants. *In*: ATTA-UR-RAHMAN, F. R. S. **Studies in Natural Products Chemistry**. Amsterdam: Elsevier, 2014. p. 119-160.

HOSODA, S.; NAKAMURA, W.; HAYASHI, K. Properties and reaction mechanism of DT diaphorase from rat liver. **Journal of Biological Chemistry**, Philadelphia, v. 249, n. 20, p. 6416-6423, 1974.

HOSSAIN, M. Z.; HEALEY, M. A.; LEE, C.; POH, W. *et al.* DNA-intercalators causing rapid re-expression of methylated and silenced genes in cancer cells. **Oncotarget**, New York, v. 4, n. 2, p. 298, 2013.

HROBOŇOVÁ, K.; MACHYŇÁKOVÁ, A.; ČIŽMÁRIK, J. Determination of dicoumarol in *Melilotus officinalis* L. by using molecularly imprinted polymer solid-phase extraction coupled with high performance liquid chromatography. **Journal of Chromatography A**, Amsterdam, v. 1539, p. 93-102, 2018.

HUANG, R.; JING, X.; HUANG, X.; PAN, Y. *et al.* Bifunctional naphthoquinone aromatic amide-oxime derivatives exert combined immunotherapeutic and antitumor effects through simultaneous targeting of indoleamine-2, 3-dioxygenase and signal transducer and activator of transcription 3. **Journal of Medicinal Chemistry**, Washington, v. 63, n. 4, p. 1544-1563, 2020.

ITO, K.; CHIBA, T.; TAKAHASHI, S.; ISHII, T. *et al.* An Nrf2/small Maf heterodimer mediates the induction of phase II detoxifying enzyme genes through antioxidant response elements. **Biochemical and Biophysical Research Communications**, San Diego, v. 236, n. 2, p. 313-322, 1997.

JAISWAL, A. K. Human NAD (P) H: quinone oxidoreductase (NQO1) gene structure and induction by dioxin. **Biochemistry**, Washington, v. 30, n. 44, p. 10647-10653, 1991.

JARDIM, G. A.; GUIMARAES, T. T.; MARIA DO CARMO, F.; CAVALCANTI, B. C. *et al.* Naphthoquinone-based chalcone hybrids and derivatives: synthesis and potent activity against cancer cell lines. **MedChemComm**, London, v. 6, n. 1, p. 120-130, 2015.

JAYAN, A. P.; ANANDU, K.; MADHU, K.; SAIPRABHA, V. A pharmacological exploration of targeted drug therapy in non-small cell lung cancer. **Medical Oncology**, Berlin, v. 39, n. 10, p. 147, 2022.

JIANG, L.; LIU, Y.; TUMBATH, S.; BOUDREAU, M. W. *et al.* Isopentyl-Deoxybenzoquinone Induces Mitochondrial Dysfunction and G2/M Phase Cell Cycle Arrest to Selectively Kill NQO1-Positive Pancreatic Cancer Cells. **Antioxidants & Redox Signaling**, New Rochelle, 2024.

JIANG, Z.-N.; AHMED, S. M. U.; WANG, Q.-C.; SHI, H.-F. *et al.* Quinone oxidoreductase 1 is overexpressed in gastric cancer and associated with outcome of adjuvant chemotherapy and survival. **World Journal of Gastroenterology**, Santa Rosa, v. 27, n. 22, p. 3085, 2021.

KANNAIYAN, R.; MAHADEVAN, D. A comprehensive review of protein kinase inhibitors for cancer therapy. **Expert Review of Anticancer Therapy**, Abingdon, v. 18, n. 12, p. 1249-1270, 2018.

KARAMI FATH, M.; AZARGOONJAHROMI, A.; KIANI, A.; JALALIFAR, F. *et al.* The role of epigenetic modifications in drug resistance and treatment of breast cancer. **Cellular & Molecular Biology Letters**, New York, v. 27, n. 1, p. 1-25, 2022.

KE, Q.; COSTA, M. Hypoxia-inducible factor-1 (HIF-1). **Molecular Pharmacology**, Rockville, v. 70, n. 5, p. 1469-1480, 2006.

KELLY, S. M.; PRICE, N. C. The use of circular dichroism in the investigation of protein structure and function. **Current Protein and Peptide Science**, Sharjah, v. 1, n. 4, p. 349-384, 2000.

KIM, I.; KIM, H.; RO, J.; JO, K. *et al.* Preclinical pharmacokinetic evaluation of β -lapachone: Characteristics of oral bioavailability and first-pass metabolism in rats. **Biomolecules & Therapeutics**, Seoul, v. 23, n. 3, p. 296, 2015.

- KIM, J.; KIM, S.-K.; KIM, H.-K.; MATTSON, M. P. *et al.* Mitochondrial function in human neuroblastoma cells is up-regulated and protected by NQO1, a plasma membrane redox enzyme. **PloS One**, San Francisco, v. 8, n. 7, p. e69030, 2013.
- KOBAYASHI, A.; OHTA, T.; YAMAMOTO, M. Unique function of the Nrf2–Keap1 pathway in the inducible expression of antioxidant and detoxifying enzymes. *In: Methods in Enzymology*. v. 378. Amsterdam: Elsevier, 2004. p. 273-286
- KOLAROVA, H.; BAJGAR, R.; TOMANKOVA, K.; KRESTYN, E. *et al.* In vitro study of reactive oxygen species production during photodynamic therapy in ultrasound-pretreated cancer cells. **Physiological Research**, Prague, v. 56, n. 1, p. S27, 2007.
- KUMAR, B. S.; RAVI, K.; VERMA, A. K.; FATIMA, K. *et al.* Synthesis of pharmacologically important naphthoquinones and anticancer activity of 2-benzyllawsone through DNA topoisomerase-II inhibition. **Bioorganic & Medicinal Chemistry**, Amsterdam, v. 25, n. 4, p. 1364-1373, 2017.
- KUMAR, V.; ABBAS, A.; ASTER, J. C.; DEYRUP, A. T. **Robbins & Kumar Basic Pathology**. 11. ed. Amsterdam: Elsevier, 2022.
- KUSUNOKI, J.; SAITO, T. Neuropathy induced by antineoplastic drugs. **Brain and Nerve= Shinkei Kenkyu no Shinpo**, Tokyo, v. 60, n. 2, p. 131-136, 2008.
- LAEMMLI, U. K. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. **Nature**, London, v. 227, n. 5259, p. 680-685, 1970.
- LANCET, D.; HOROVITZ, A.; KATCHALSKI-KATZIR, E. Molecular Recognition in Biology: Models for Analysis of Protein—Ligand Interactions. *In: BERH, J. Perspectives in Supramolecular Chemistry: The Lock-and-Key Principle*. Hoboken: John Wiley & Sons, 1994. p. 25-71.
- LATA, S.; ALI, A.; SOOD, V.; RAJA, R. *et al.* HIV-1 Rev downregulates Tat expression and viral replication via modulation of NAD (P) H: quinone oxidoreductase 1 (NQO1). **Nature Communications**, London, v. 6, n. 1, p. 7244, 2015.
- LEE, J.-W.; BAE, S.-H.; JEONG, J.-W.; KIM, S.-H. *et al.* Hypoxia-inducible factor (HIF-1) α : its protein stability and biological functions. **Experimental & Molecular Medicine**, Seoul, v. 36, n. 1, p. 1-12, 2004.
- LENNARZ, W. J.; LANE, M. D. **Encyclopedia of Biological Chemistry**. New York: Academic Press, 2013.
- LEWINSKA, A.; ADAMCZYK-GROCHALA, J.; KWASNIEWICZ, E.; DEREGOWSKA, A. *et al.* Reduced levels of methyltransferase DNMT2 sensitize human fibroblasts to oxidative stress and DNA damage that is accompanied by changes in proliferation-related miRNA expression. **Redox Biology**, Amsterdam, v. 14, p. 20-34, 2018.
- LI, R.; BIANCHET, M. A.; TALALAY, P.; AMZEL, L. M. The three-dimensional structure of NAD (P) H: quinone reductase, a flavoprotein involved in cancer chemoprotection and

chemotherapy: mechanism of the two-electron reduction. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, Washington, v. 92, n. 19, p. 8846-8850, 1995.

LI, S.; CORREIA, G. S. C.; WANG, J.; MANOCHAKIAN, R. *et al.* Emerging Targeted Therapies in Advanced Non-Small-Cell Lung Cancer. **Cancers**, Basel, v. 15, n. 11, p. 2899, 2023.

LI, Y.; BARBASH, O.; DIEHL, J. A. Regulation of the cell cycle. *In*: MENDELSON, J.; HOWLEY, P. M.; ISRAEL, M.A.; LIOTTA, L. A.; THOMPSON, C. B. **The Molecular Basis of Cancer**. Amsterdam: Elsevier, 2015. p. 165-178.

LI, Z.; ZHANG, Y.; JIN, T.; MEN, J. *et al.* NQO1 protein expression predicts poor prognosis of non-small cell lung cancers. **BMC Cancer**, London, v. 15, n. 1, p. 1-9, 2015.

LIN, J.; XIA, L.; LIANG, J.; HAN, Y. *et al.* The roles of glucose metabolic reprogramming in chemo-and radio-resistance. **Journal of Experimental & Clinical Cancer Research**, London, v. 38, n. 1, p. 1-13, 2019.

LIOU, G.-Y.; STORZ, P. Reactive oxygen species in cancer. **Free Radical Research**, Philadelphia, v. 44, n. 5, p. 479-496, 2010.

LIVAK, K. J.; SCHMITTGEN, T. D. Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2⁻ΔΔCT method. **Methods**, Amsterdam, v. 25, n. 4, p. 402-408, 2001.

LO, M.-C.; AULABAUGH, A.; JIN, G.; COWLING, R. *et al.* Evaluation of fluorescence-based thermal shift assays for hit identification in drug discovery. **Analytical Biochemistry**, Amsterdam, v. 332, n. 1, p. 153-159, 2004.

LUNDBERG, A. P.; FRANCIS, J. M.; PAJAK, M.; PARKINSON, E. I. *et al.* Pharmacokinetics and derivation of an anticancer dosing regimen for the novel anti-cancer agent isobutyl-deoxynyboquinone (IB-DNQ), a NQO1 bioactivatable molecule, in the domestic felid species. **Investigational New Drugs**, New York, v. 35, p. 134-144, 2017.

LUNDHOLM, L.; HÅÅG, P.; ZONG, D.; JUNTTI, T. *et al.* Resistance to DNA-damaging treatment in non-small cell lung cancer tumor-initiating cells involves reduced DNA-PK/ATM activation and diminished cell cycle arrest. **Cell Death & Disease**, New York, v. 4, n. 1, p. e478-e478, 2013.

MA, Q.; WANG, R.; YANG, C. S.; LU, A. Y. Expression of mammalian DT-diaphorase in *Escherichia coli*: purification and characterization of the expressed protein. **Archives of Biochemistry and Biophysics**, Amsterdam, v. 283, n. 2, p. 311-317, 1990.

MADAJEWSKI, B.; BOATMAN, M. A.; CHAKRABARTI, G.; BOOTHMAN, D. A. *et al.* Depleting tumor-NQO1 potentiates anoikis and inhibits growth of NSCLC. **Molecular Cancer Research**, Philadelphia, v. 14, n. 1, p. 14-25, 2016.

MAEDA, T.; TANABE-FUJIMURA, C.; FUJITA, Y.; ABE, C. *et al.* NAD (P) H quinone oxidoreductase 1 inhibits the proteasomal degradation of homocysteine-induced

endoplasmic reticulum protein. **Biochemical and Biophysical Research Communications**, Amsterdam, v. 473, n. 4, p. 1276-1280, 2016.

MAJEED, U.; MANOCHAKIAN, R.; ZHAO, Y.; LOU, Y. Targeted therapy in advanced non-small cell lung cancer: current advances and future trends. **Journal of Hematology & Oncology**, Heidelberg, v. 14, n. 1, p. 1-20, 2021.

MANCINI, I.; VIGNA, J.; SIGHEL, D.; DEFANT, A. Hybrid molecules containing naphthoquinone and quinolinedione scaffolds as antineoplastic agents. **Molecules**, Basel, v. 27, n. 15, p. 4948, 2022.

MANEGOLD, C. Gemcitabine (Gemzar®) in non-small cell lung cancer. **Expert Review of Anticancer Therapy**, London, v. 4, n. 3, p. 345-360, 2004.

MARTIN, S. R.; SCHILSTRA, M. J. Circular dichroism and its application to the study of biomolecules. **Methods in Cell Biology**, Amsterdam, v. 84, p. 263-293, 2008.

MASCAUX, C.; PAESMANS, M.; BERGHMANS, T.; BRANLE, F. *et al.* A systematic review of the role of etoposide and cisplatin in the chemotherapy of small cell lung cancer with methodology assessment and meta-analysis. **Lung Cancer**, Philadelphia, v. 30, n. 1, p. 23-36, 2000.

MATTHEWS, H. K.; BERTOLI, C.; DE BRUIN, R. A. Cell cycle control in cancer. **Nature Reviews Molecular Cell Biology**, New York, v. 23, n. 1, p. 74-88, 2022.

MCCUBREY, J. A.; STEELMAN, L. S.; CHAPPELL, W. H.; ABRAMS, S. L. *et al.* Roles of the Raf/MEK/ERK pathway in cell growth, malignant transformation and drug resistance. **Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Molecular Cell Research**, Amsterdam, v. 1773, n. 8, p. 1263-1284, 2007.

MCPHERSON, A. The nature of crystals. *In*: MCPHERSON, A. **Preparation and Analysis of Protein Crystals**. Malabar: Krieger Publishing, 1982.

MEDINA-CARMONA, E.; NEIRA, J. L.; SALIDO, E.; FUCHS, J. E. *et al.* Site-to-site interdomain communication may mediate different loss-of-function mechanisms in a cancer-associated NQO1 polymorphism. **Scientific Reports**, London, v. 7, n. 1, p. 44532, 2017.

MEDINA-CARMONA, E.; PALOMINO-MORALES, R. J.; FUCHS, J. E.; PADÍN-GONZALEZ, E. *et al.* Conformational dynamics is key to understanding loss-of-function of NQO1 cancer-associated polymorphisms and its correction by pharmacological ligands. **Scientific Reports**, London, v. 6, n. 1, p. 20331, 2016.

MEGARITY, C. F.; TIMSON, D. J. Cancer-associated variants of human NQO1: Impacts on inhibitor binding and cooperativity. **Bioscience Reports**, London, v. 39, n. 9, 2019.

MELLO, M. S. D. C.; OTERO, U. B. Ambiente, trabalho e câncer: Aspectos epidemiológicos, toxicológicos e regulatórios. **Instituto Nacional de Câncer**. Rio de Janeiro: Ministério da Saúde, 2021.

MIRZAEI, S.; ZARRABI, A.; ASNAF, S. E.; HASHEMI, F. *et al.* The role of microRNA-338-3p in cancer: growth, invasion, chemoresistance, and mediators. **Life Sciences**, Amsterdam, v. 268, p. 119005, 2021.

MISRI, S.; KAUL, K.; MISHRA, S.; CHARAN, M. *et al.* Cannabidiol inhibits tumorigenesis in cisplatin-resistant non-small cell lung cancer via TRPV2. **Cancers**, Basel, v. 14, n. 5, p. 1181, 2022.

MORALES, E. S.; PARCERISA, I. L.; CECCARELLI, E. A. A novel method for removing contaminant Hsp70 molecular chaperones from recombinant proteins. **Protein Science**, Hoboken, v. 28, n. 4, p. 800-807, 2019.

MOSCOVITZ, O.; TSVETKOV, P.; HAZAN, N.; MICHAELVSKI, I. *et al.* A mutually inhibitory feedback loop between the 20S proteasome and its regulator, NQO1. **Molecular Cell**, Cambridge, v. 47, n. 1, p. 76-86, 2012.

MOSMANN, T. Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: application to proliferation and cytotoxicity assays. **Journal of Immunological Methods**, Amsterdam, v. 65, n. 1-2, p. 55-63, 1983.

NARANG, A. S.; DESAI, D. S. Anticancer drug development: Unique aspects of pharmaceutical development. *In*: LU, Y.; MAHATO, R. I. **Pharmaceutical Perspectives of Cancer Therapeutics**, Amsterdam: Elsevier, 2009. p. 49-92.

NARAYANAN, P.; FARGHADANI, R.; NYAMATHULLA, S.; RAJARAJESWARAN, J. *et al.* Natural quinones induce ROS-mediated apoptosis and inhibit cell migration in PANC-1 human pancreatic cancer cell line. **Journal of Biochemical and Molecular Toxicology**, Hoboken, v. 36, n. 5, p. e23008, 2022.

NASONGKLA, N.; WIEDMANN, A. F.; BRUENING, A.; BEMAN, M. *et al.* Enhancement of solubility and bioavailability of β -lapachone using cyclodextrin inclusion complexes. **Pharmaceutical Research**, Heidelberg, v. 20, p. 1626-1633, 2003.

NICHOLSON, A. G.; TSAO, M. S.; BEASLEY, M. B.; BORCZUK, A. C. *et al.* The 2021 WHO classification of lung tumors: impact of advances since 2015. **Journal of Thoracic Oncology**, Philadelphia, v. 17, n. 3, p. 362-387, 2022.

NICOLETTI, I.; MIGLIORATI, G.; PAGLIACCI, M.; GRIGNANI, F. *et al.* A rapid and simple method for measuring thymocyte apoptosis by propidium iodide staining and flow cytometry. **Journal of Immunological Methods**, Amsterdam, v. 139, n. 2, p. 271-279, 1991.

NIOI, P.; MCMAHON, M.; ITOH, K.; YAMAMOTO, M. *et al.* Identification of a novel Nrf2-regulated antioxidant response element (ARE) in the mouse NAD (P) H: quinone oxidoreductase 1 gene: reassessment of the ARE consensus sequence. **Biochemical Journal**, London, v. 374, n. 2, p. 337-348, 2003.

NOLAN, K. A.; DONCASTER, J. R.; DUNSTAN, M. S.; SCOTT, K. A. *et al.* Synthesis and biological evaluation of coumarin-based inhibitors of NAD (P) H: quinone

oxidoreductase-1 (NQO1). **Journal of Medicinal Chemistry**, Washington, v. 52, n. 22, p. 7142-7156, 2009.

NOLAN, K. A.; SCOTT, K. A.; BARNES, J.; DONCASTER, J. *et al.* Pharmacological inhibitors of NAD (P) H quinone oxidoreductase, NQO1: structure/activity relationships and functional activity in tumour cells. **Biochemical Pharmacology**, Philadelphia, v. 80, n. 7, p. 977-981, 2010.

NOLAN, K. A.; TIMSON, D. J.; STRATFORD, I. J.; BRYCE, R. A. In silico identification and biochemical characterization of novel inhibitors of NQO1. **Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters**, Philadelphia, v. 16, n. 24, p. 6246-6254, 2006.

NOLAN, K. A.; ZHAO, H.; FAULDER, P. F.; FRENKEL, A. D. *et al.* Coumarin-based inhibitors of human NAD (P) H: quinone oxidoreductase-1. Identification, structure-activity, off-target effects and in vitro human pancreatic cancer toxicity. **Journal of Medicinal Chemistry**, Washington, v. 50, n. 25, p. 6316-6325, 2007.

NUSSINOV, R.; TSAI, C.-J.; JANG, H. Anticancer drug resistance: An update and perspective. **Drug Resistance Updates**, Amsterdam, v. 59, p. 100796, 2021.

OH, E.-T.; KIM, J.-W.; KIM, J. M.; KIM, S. J. *et al.* NQO1 inhibits proteasome-mediated degradation of HIF-1 α . **Nature Communications**, London, v. 7, n. 1, p. 13593, 2016.

OUELLETTE, R. J.; RAWN, J. D. Aryl Halides, Phenols, and Anilines. *In*: OUELLETTE, R. J.; RAWN, J. D. **Organic Chemistry: Structure, Mechanism, Synthesis**. 2. ed. Cambridge: Academic Press, 2018.

PACHECO, P. A.; GONZAGA, D. T.; CIRNE-SANTOS, C. C.; BARROS, C. S. *et al.* Synthesis and Anti-Chikungunya Virus (CHIKV) Activity of Novel 1, 4-Naphthoquinone Sulfonamide and Sulfonate Ester Derivatives. **Journal of the Brazilian Chemical Society**, Campinas, v. 33, p. 556-569, 2022.

PAN, N.; SUN, G. **Functional textiles for improved performance, protection and health**. Cambridge: Woodhead Publishing, 2011.

PARKINSON, E. I.; BAIR, J. S.; CISMESIA, M.; HERGENROTHER, P. J. Efficient NQO1 substrates are potent and selective anticancer agents. **ACS Chemical Biology**, Washington, v. 8, n. 10, p. 2173-2183, 2013.

PARKINSON, E. I.; HERGENROTHER, P. J. Deoxyxyboquinones as NQO1-activated cancer therapeutics. **Accounts of Chemical Research**, Washington, v. 48, n. 10, p. 2715-2723, 2015.

PASHA, M. A.; ANEBOUSELVY, K.; RAMACHARY, D. B. Lawsone as synthon in the catalytic asymmetric reactions. **Tetrahedron**, Amsterdam, v. 117, p. 132793, 2022.

PATEL, S. R.; DAS, M. Small Cell Lung Cancer: Emerging Targets and Strategies for Precision Therapy. **Cancers**, Basel, v. 15, n. 16, p. 4016, 2023.

- PAYNE, S.; MILES, D. Mechanisms of anticancer drugs. **Scott-Brown's Otorhinolaryngology: Head and Neck Surgery**. 8. ed. Florida: CRC Press, 2008. p. 134.
- PEREYRA, C. E.; DANTAS, R. F.; FERREIRA, S. B.; GOMES, L. P. *et al.* The diverse mechanisms and anticancer potential of naphthoquinones. **Cancer Cell International**, London, v. 19, n. 1, p. 1-20, 2019.
- PERILLO, B.; DI DONATO, M.; PEZONE, A.; DI ZAZZO, E. *et al.* ROS in cancer therapy: The bright side of the moon. **Experimental & Molecular Medicine**, Seoul, v. 52, n. 2, p. 192-203, 2020.
- PHAN, T. T.; LIN, Y.-C.; CHOU, Y.-T.; WU, C.-W. *et al.* Tumor suppressor p53 restrains cancer cell dissemination by modulating mitochondrial dynamics. **Oncogenesis**, London, v. 11, n. 1, p. 26, 2022.
- PHI, L. T. H.; SARI, I. N.; YANG, Y.-G.; LEE, S.-H. *et al.* Cancer stem cells (CSCs) in drug resistance and their therapeutic implications in cancer treatment. **Stem Cells International**, Hoboken, 2018.
- PHILLIPS, R. M.; HENDRIKS, H. R.; PETERS, G. J.; GROUP, E. P. A. M. M. EO9 (Apaziquone): from the clinic to the laboratory and back again. **British Journal of Pharmacology**, Hoboken, v. 168, n. 1, p. 11-18, 2013.
- PIDUGU, L. S. M.; MBIMBA, J. E.; AHMAD, M.; POZHARSKI, E. *et al.* A direct interaction between NQO1 and a chemotherapeutic dimeric naphthoquinone. **BMC Structural Biology**, London, v. 16, p. 1-10, 2016.
- PISCO, A. O.; JACKSON, D. A.; HUANG, S. Reduced intracellular drug accumulation in drug-resistant leukemia cells is not only solely due to MDR-mediated efflux but also to decreased uptake. **Frontiers in Oncology**, Lausanne, v. 4, p. 306, 2014.
- PREETHI, S.; ARTHIGA, K.; PATIL, A. B.; SPANDANA, A. *et al.* Review on NAD (P) H dehydrogenase quinone 1 (NQO1) pathway. **Molecular Biology Reports**, New York, v. 49, n. 9, p. 8907-8924, 2022.
- PREUSCH, P. C.; SIEGEL, D.; GIBSON, N. W.; ROSS, D. A note on the inhibition of DT-diaphorase by dicoumarol. **Free Radical Biology and Medicine**, Amsterdam, v. 11, n. 1, p. 77-80, 1991.
- PREUSCH, P. C.; SUTTIE, J. W. Mechanism of ticrynafen potentiation of coumarin anticoagulant action. **Biochemical Pharmacology**, Philadelphia, v. 32, n. 16, p. 2393-2398, 1983.
- PROCHASKA, H. J.; SANTAMARIA, A. B. Direct measurement of NAD (P) H: quinone reductase from cells cultured in microtiter wells: a screening assay for anticarcinogenic enzyme inducers. **Analytical Biochemistry**, Amsterdam, v. 169, n. 2, p. 328-336, 1988.
- QADRI, S. M.; KUCHERENKO, Y.; ZELENAK, C.; JILANI, K. *et al.* Dicoumarol activates Ca²⁺-permeable cation channels triggering erythrocyte cell membrane scrambling. **Cellular Physiology and Biochemistry**, Düsseldorf, v. 28, n. 5, p. 857-864, 2011.

QIU, H. Y.; WANG, P. F.; LIN, H. Y.; TANG, C. Y. *et al.* Naphthoquinones: A continuing source for discovery of therapeutic antineoplastic agents. **Chemical Biology & Drug Design**, Hoboken, v. 91, n. 3, p. 681-690, 2018.

RICCIARDI, S.; TOMAO, S.; DE MARINIS, F. Toxicity of targeted therapy in non-small-cell lung cancer management. **Clinical Lung Cancer**, New York, v. 10, n. 1, p. 28-35, 2009.

ROBERT, M.-F.; MORIN, S.; BEAULIEU, N.; GAUTHIER, F. *et al.* DNMT1 is required to maintain CpG methylation and aberrant gene silencing in human cancer cells. **Nature Genetics**, New York, v. 33, n. 1, p. 61-65, 2003.

RODGER, A.; MARRINGTON, R.; ROPER, D.; WINDSOR, S. Circular dichroism spectroscopy for the study of protein-ligand interactions. *In*: DAVITER, T.; JOHNSON, C. M.; MCLAUGHLIN, S. H.; WILLIAMS, M. A. **Protein-ligand Interactions: Methods and Applications**. Clifton: Humana Press, 2005. p. 343-363.

ROKAH, O. H.; SHPILBERG, O.; GRANOT, G. NAD (P) H quinone oxidoreductase protects TAp63 γ from proteasomal degradation and regulates TAp63 γ -dependent growth arrest. **PLoS One**, San Francisco, v. 5, n. 6, p. e11401, 2010.

ROSS, D.; KEPA, J. K.; WINSKI, S. L.; BEALL, H. D. *et al.* NAD (P) H: quinone oxidoreductase 1 (NQO1): chemoprotection, bioactivation, gene regulation and genetic polymorphisms. **Chemico-Biological Interactions**, Amsterdam, v. 129, n. 1-2, p. 77-97, 2000.

ROSS, D.; SIEGEL, D. The diverse functionality of NQO1 and its roles in redox control. **Redox Biology**, Amsterdam, v. 41, p. 101950, 2021.

RUSHMORE, T. H.; MORTON, M. R.; PICKETT, C. B. The antioxidant responsive element. Activation by oxidative stress and identification of the DNA consensus sequence required for functional activity. **Journal of Biological Chemistry**, Philadelphia, v. 266, n. 18, p. 11632-11639, 1991.

SÁ JUNIOR, P. L.; CÂMARA, D. A. D.; PORCACCHIA, A. S.; FONSECA, P. M. M. *et al.* The roles of ROS in cancer heterogeneity and therapy. **Oxidative Medicine and Cellular Longevity**, New York, 2017.

SALIDO, E.; TIMSON, D. J.; BETANCOR-FERNÁNDEZ, I.; PALOMINO-MORALES, R. *et al.* Targeting HIF-1 α function in cancer through the chaperone action of NQO1: Implications of genetic diversity of NQO1. **Journal of Personalized Medicine**, Basel, v. 12, n. 5, p. 747, 2022.

SANTOS, M. O.; LIMA, F. C. D. S.; MARTINS, L. F. L.; OLIVEIRA, J. F. P. *et al.* Estimativa de incidência de câncer no Brasil, 2023-2025. **Revista Brasileira de Cancerologia**, Rio de Janeiro, v. 69, n. 1, 2023.

SAZONOVA, E. V.; CHESNOKOV, M. S.; ZHIVOTOVSKY, B.; KOPEINA, G. S. Drug toxicity assessment: Cell proliferation versus cell death. **Cell Death Discovery**, London, v. 8, n. 1, p. 417, 2022.

SCHUMACKER, P. T. Reactive oxygen species in cancer cells: live by the sword, die by the sword. **Cancer Cell**, Maryland Heights, v. 10, n. 3, p. 175-176, 2006.

SCORAH, J.; MCGOWAN, C. H. Regulation of cell cycle progression. *In*: BRADSHAW, R. A.; DENNIS, E. A. **Handbook of Cell Signaling**. London: Academic Press, 2010. p. 2545-2553.

SCOTT, D. E.; SPRY, C.; ABELL, C. Differential scanning fluorimetry as part of a biophysical screening cascade. *In*: ERLANSON, D. A.; JAHNKE, W. **Fragment-based Drug Discovery Lessons and Outlook**. Hoboken, 2016. p. 139-172.

SCOTT, K. A.; BARNES, J.; WHITEHEAD, R. C.; STRATFORD, I. J. *et al.* Inhibitors of NQO1: identification of compounds more potent than dicoumarol without associated off-target effects. **Biochemical Pharmacology**, Philadelphia, v. 81, n. 3, p. 355-363, 2011.

SESHADRI, P.; RAJARAM, A.; RAJARAM, R. Plumbagin and juglone induce caspase-3-dependent apoptosis involving the mitochondria through ROS generation in human peripheral blood lymphocytes. **Free Radical Biology and Medicine**, Amsterdam, 51, n. 11, p. 2090-2107, 2011.

SHARMA, S.; BORA, R. S.; SAINI, K. S.; ARYA, R. Optimizing Chaperone Removal Strategy from Overexpressed Recombinant Proteins: GNE, a Case Study. *In*: GARCÍA-FRUITÓS, E. **Insoluble Proteins: Methods and Protocols**. London: Springer, 2022. p. 339-358.

SHIM, H. S.; CHOI, Y.-L.; KIM, L.; CHANG, S. *et al.* Molecular testing of lung cancers. **Journal of Pathology and Translational Medicine**, Seoul, v. 51, n. 3, p. 242-254, 2017.

SIEGEL, D.; GIBSON, N. W.; PREUSCH, P. C.; ROSS, D. Metabolism of diaziquone by NAD (P) H:(quinone acceptor) oxidoreductase (DT-diaphorase): role in diaziquone-induced DNA damage and cytotoxicity in human colon carcinoma cells. **Cancer Research**, Philadelphia, v. 50, n. 22, p. 7293-7300, 1990.

SIEGEL, D.; GUSTAFSON, D. L.; DEHN, D. L.; HAN, J. Y. *et al.* NAD (P) H: quinone oxidoreductase 1: role as a superoxide scavenger. **Molecular Pharmacology**, Rockville, v. 65, n. 5, p. 1238-1247, 2004.

SIEGEL, R. L.; MILLER, K. D.; FUCHS, H. E.; JEMAL, A. Cancer statistics, 2021. **CA: A Cancer Journal for Clinicians**, Atlanta, v. 71, n. 1, p. 7-33, 2021.

SILVA, N. B. N. C.; OLIVEIRA, F. B. M.; SANTOS, J. F. C.; RIBEIRO, R. *et al.* Tabagismo como fator de risco para o desenvolvimento de câncer de pulmão. **Revista Eletrônica Acervo Saúde**, Ouro Fino, n. 19, p. 313, 2019.

SILVA, M. J. S. D. **ABC do câncer: abordagens básicas para o controle do câncer**. Lyon. 6. ed. Rio de Janeiro: INCA, 2020.

SRIJIWANGSA, P.; NA-BANGCHANG, K. Roles of NAD (P) H-quinone oxidoreductase 1 (NQO1) on cancer progression and chemoresistance. **Journal of Clinical & Experimental Oncology**, London, v. 6, n. 4, p. 1-6, 2017.

SU, C.; WANG, H.; LIU, Y.; GUO, Q. *et al.* Adverse effects of anti-PD-1/PD-L1 therapy in non-small cell lung cancer. **Frontiers in Oncology**, Lausanne, v. 10, p. 1821, 2020.

SUN, C.; ZHAO, W.; WANG, X.; SUN, Y. *et al.* A pharmacological review of dicoumarol: An old natural anticoagulant agent. **Pharmacological Research**, Amsterdam, v. 160, p. 105193, 2020.

SUNG, H.; FERLAY, J.; SIEGEL, R. L.; LAVERSANNE, M. *et al.* Global cancer statistics 2020: GLOBOCAN estimates of incidence and mortality worldwide for 36 cancers in 185 countries. **CA: A Cancer Journal for Clinicians**, Atlanta, v. 71, n. 3, p. 209-249, 2021.

TAN, A. C.; TAN, D. S. Targeted therapies for lung cancer patients with oncogenic driver molecular alterations. **Journal of Clinical Oncology**, Alexandria, v. 40, n. 6, p. 611-625, 2022.

TANG, Y. T.; LI, Y.; CHU, P.; MA, X. D. *et al.* Molecular biological mechanism of action in cancer therapies: Juglone and its derivatives, the future of development. **Biomedicine & Pharmacotherapy**, Amsterdam, v. 148, p. 112785, 2022.

TATTAR, T. A. **Diseases of shade trees**. Amsterdam: Elsevier, 2012.

THAPA, D.; HUANG, S.-B.; MUÑOZ, A. R.; YANG, X. *et al.* Attenuation of NAD [P] H: quinone oxidoreductase 1 aggravates prostate cancer and tumor cell plasticity through enhanced TGF β signaling. **Communications Biology**, London, v. 3, n. 1, p. 12, 2020.

TIMSON, D. J. Dicoumarol: a drug which hits at least two very different targets in vitamin K metabolism. **Current Drug Targets**, Sharjah, v. 18, n. 5, p. 500-510, 2017.

TOSSETTA, G.; FANTONE, S.; GOTERI, G.; GIANNUBILO, S. R. *et al.* The Role of NQO1 in Ovarian Cancer. **International Journal of Molecular Sciences**, Basel, v. 24, n. 9, p. 7839, 2023.

TSVETKOV, P.; ASHER, G.; REISS, V.; SHAUL, Y. *et al.* Inhibition of NAD (P) H: quinone oxidoreductase 1 activity and induction of p53 degradation by the natural phenolic compound curcumin. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, Washington, v. 102, n. 15, p. 5535-5540, 2005.

VAIDYA, F. U.; SUFIYAN CHHIPA, A.; MISHRA, V.; GUPTA, V. K. *et al.* Molecular and cellular paradigms of multidrug resistance in cancer. **Cancer Reports**, Hoboken, v. 5, n. 12, p. e1291, 2022.

VANKOVA, P.; SALIDO, E.; TIMSON, D. J.; MAN, P. *et al.* A dynamic core in human NQO1 controls the functional and stability effects of ligand binding and their communication across the enzyme dimer. **Biomolecules**, Basel, v. 9, n. 11, p. 728, 2019.

WALLIN, R.; WAJIH, N.; HUTSON, S. M. VKORC1: a warfarin-sensitive enzyme in vitamin K metabolism and biosynthesis of vitamin K-dependent blood coagulation factors. **Vitamins & Hormones**, Amsterdam, v. 78, p. 227-246, 2008.

WANG, P.; GAO, C.; WANG, W.; YAO, L.-P. *et al.* Juglone induces apoptosis and autophagy via modulation of mitogen-activated protein kinase pathways in human hepatocellular carcinoma cells. **Food and Chemical Toxicology**, Amsterdam, v. 116, p. 40-50, 2018.

WANG, T.-X.; DUAN, K.-L.; HUANG, Z.-X.; XUE, Z.-A. *et al.* Tanshinone functions as a coenzyme that confers gain of function of NQO1 to suppress ferroptosis. **Life Science Alliance**, Heidelberg, v. 6, n. 1, 2023.

WANG, W.; CHANG, C. W. T.; ZHANG, Q. 1, 4-Naphthoquinone Analogs and Their Application as Antibacterial Agents. **ChemistrySelect**, Weinheim, v. 7, n. 43, p. e202203330, 2022.

WEIDERPASS, E.; STEWART, B. W. **World cancer report/The Int. Agency for Res. on Cancer**. Lyon: IARC, 2020.

WELLINGTON, K. W.; KOLESNIKOVA, N. I.; HLATSHWAYO, V.; SAHA, S. T. *et al.* Anticancer activity, apoptosis and a structure–activity analysis of a series of 1, 4-naphthoquinone-2, 3-bis-sulfides. **Investigational New Drugs**, New York, 38, p. 274-286, 2020.

WESTIN, J. R. A Multidisciplinary Approach to Cancer: A Medical Oncologist's View. *In*: SILVERMAN, P. M. **Oncologic Imaging: A Multidisciplinary Approach**. Amsterdam: Elsevier, 2022. p. 14-18.

WINSKI, S. L.; FAIG, M.; BIANCHET, M. A.; SIEGEL, D. *et al.* Characterization of a mechanism-based inhibitor of NAD (P) H: quinone oxidoreductase 1 by biochemical, X-ray crystallographic, and mass spectrometric approaches. **Biochemistry**, Washington, v. 40, n. 50, p. 15135-15142, 2001.

WU, L.; LENG, D.; CUN, D.; FOGED, C. *et al.* Advances in combination therapy of lung cancer: Rationales, delivery technologies and dosage regimens. **Journal of Controlled Release**, Amsterdam, v. 260, p. 78-91, 2017.

WU, P.; GAO, W.; SU, M.; NICE, E. C. *et al.* Adaptive mechanisms of tumor therapy resistance driven by tumor microenvironment. **Frontiers in Cell and Developmental Biology**, Lausanne, v. 9, p. 641469, 2021.

XIAO, Y.; MING, X.; XU, J. Inhibition of human leukemia cells growth by juglone is mediated via autophagy induction, endogenous ROS production, and inhibition of cell migration and invasion. **Journal of the Balkan Union of Oncology**, Piraeus, v. 25, p. 1600-1606, 2020.

XU, Z.; ZHANG, Y.; DAI, H.; HAN, B. Epithelial–Mesenchymal Transition-Mediated Tumor Therapeutic Resistance. **Molecules**, Basel, v. 27, n. 15, p. 4750, 2022.

YAEGER, R.; CORCORAN, R. B. Targeting alterations in the RAF–MEK pathway. **Cancer Discovery**, Philadelphia, v. 9, n. 3, p. 329-341, 2019.

YAN, C.; KEPA, J. K.; SIEGEL, D.; STRATFORD, I. J. *et al.* Dissecting the role of multiple reductases in bioactivation and cytotoxicity of the antitumor agent 2, 5-diaziridinyl-3-(hydroxymethyl)-6-methyl-1, 4-benzoquinone (RH1). **Molecular Pharmacology**, Rockville, v. 74, n. 6, p. 1657-1665, 2008.

YANG, Y.; ZHANG, Y.; WU, Q.; CUI, X. *et al.* Clinical implications of high NQO1 expression in breast cancers. **Journal of Experimental & Clinical Cancer Research**, London, v. 33, n. 1, p. 1-9, 2014.

YU, J.; ZHONG, B.; XIAO, Q.; DU, L. *et al.* Induction of programmed necrosis: a novel anti-cancer strategy for natural compounds. **Pharmacology & Therapeutics**, Amsterdam, v. 214, p. 107593, 2020.

YUAN, M.; HUANG, L.-L.; CHEN, J.-H.; WU, J. *et al.* The emerging treatment landscape of targeted therapy in non-small-cell lung cancer. **Signal Transduction and Targeted Therapy**, London, v. 4, n. 1, p. 61, 2019.

ZEEKPUDSA, P.; KUKONGVIRIYAPAN, V.; SENGGUNPRAI, L.; SRIPA, B. *et al.* Suppression of NAD (P) H-quinone oxidoreductase 1 enhanced the susceptibility of cholangiocarcinoma cells to chemotherapeutic agents. **Journal of Experimental & Clinical Cancer Research**, London, v. 33, n. 1, p. 1-13, 2014.

ZHANG, K.; CHEN, D.; MA, K.; WU, X. *et al.* NAD (P) H: quinone oxidoreductase 1 (NQO1) as a therapeutic and diagnostic target in cancer. **Journal of Medicinal Chemistry**, Washington, v. 61, n. 16, p. 6983-7003, 2018.

ZHANG, W.; XU, J. DNA methyltransferases and their roles in tumorigenesis. **Biomarker Research**, London, v. 5, n. 1, p. 1-8, 2017.

ZHANG, Y.; SUN, B.; HUANG, Z.; ZHAO, D.-W. *et al.* Shikonin inhibites migration and invasion of thyroid cancer cells by downregulating DNMT1. **Medical Science Monitor: International Medical Journal of Experimental and Clinical Research**, Melville, v. 24, p. 661, 2018.

ZHANG, Y.-Y.; ZHANG, F.; ZHANG, Y.-S.; THAKUR, K. *et al.* Mechanism of juglone-induced cell cycle arrest and apoptosis in Ishikawa human endometrial cancer cells. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, Washington, v. 67, n. 26, p. 7378-7389, 2019.

ZHANG, Z.; WANG, G.; LI, Y.; LEI, D. *et al.* Recent progress in DNA methyltransferase inhibitors as anticancer agents. **Frontiers in Pharmacology**, Lausanne, v. 13, p. 1072651, 2022.

ZHENG, M. Classification and pathology of lung cancer. **Surgical Oncology Clinics of North America**, Amsterdam, v. 25, n. 3, p. 447-468, 2016.

ZHONG, L.; LI, Y.; XIONG, L.; WANG, W. *et al.* Small molecules in targeted cancer therapy: Advances, challenges, and future perspectives. **Signal Transduction and Targeted Therapy**, London, v. 6, n. 1, p. 201, 2021.

ZHOU, H.-Z.; ZENG, H.-Q.; YUAN, D.; REN, J.-H. *et al.* NQO1 potentiates apoptosis evasion and upregulates XIAP via inhibiting proteasome-mediated degradation SIRT6 in hepatocellular carcinoma. **Cell Communication and Signaling**, London, v. 17, n. 1, p. 1-13, 2019.

ZHU, H.; JIA, Z.; MAHANEY, J. E.; ROSS, D. *et al.* The highly expressed and inducible endogenous NAD (P) H: quinone oxidoreductase 1 in cardiovascular cells acts as a potential superoxide scavenger. **Cardiovascular Toxicology**, London, v. 7, p. 202-211, 2007.

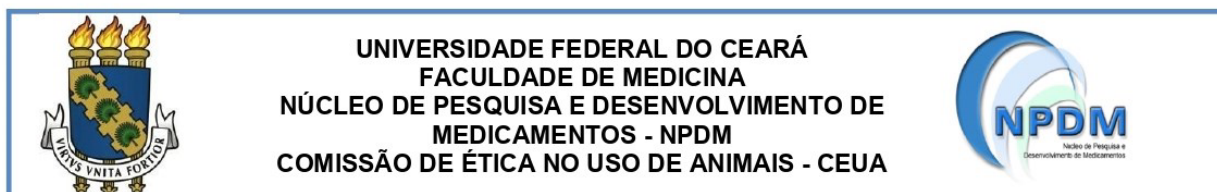
APÊNDICE A - LINHAGENS CELULARES UTILIZADAS NESSE TRABALHO

Linhagem celular	Origem	Meio de Cultivo	Concentração de plaqueamen- (cels/mL)
HCT-116	Carcinoma colorretal	RPMI 1640 + 10% SFB + 100 U/mL penicilina + 100 µg/mL estreptomicina	7 x 10 ⁴
SNB-19	Astrocitoma	RPMI 1640 + 10% SFB + 100 U/mL penicilina + 100 µg/mL estreptomicina	10 x 10 ⁴
PC3	Carcinoma de próstata	RPMI 1640 + 10% SFB + 100 U/mL penicilina + 100 µg/mL estreptomicina	10 x 10 ⁴
A549	Adenocarcinoma de pulmão	RPMI 1640 + 10% SFB + 100 U/mL penicilina + 100 µg/mL estreptomicina	7 x 10 ⁴
B16	Melanoma Murino	DMEM + 10% SFB + 100 U/mL penicilina + 100 µg/mL estreptomicina	3 x 10 ⁴
HL-60	Leucemia promielocítica aguda	RPMI 1640 + 10% SFB + 100 U/mL penicilina + 100 µg/mL estreptomicina	30 x 10 ⁴
KG1	Leucemia mielóide aguda	IMDM + 20% SFB + 100 U/mL penicilina + 100 µg/mL estreptomicina	30 x 10 ⁴
K-562	Leucemia mieloide crônica	RPMI 1640 + 10% SFB + 100 U/mL penicilina + 100 µg/mL estreptomicina	30 x 10 ⁴
RAJI	Linfoma de Burkitt	RPMI 1640 + 10% SFB + 100 U/mL penicilina + 100 µg/mL estreptomicina + 0,4% glicose	30 x 10 ⁴
L929	Fibroblasto não-tumoral murino	DMEM + 10% SFB + 100 U/mL penicilina + 100 µg/mL estreptomicina	7 x 10 ⁴

APÊNCIDE B – PRIMERS UTILIZADOS NA ANÁLISE DE EXPRESSÃO GÊNICA

Gene	Primer	Sequência	Temperatura de Anelamento
<i>DNMT1</i>	<i>Forward</i>	GCGCTCATTGGCTTTTCTAC	60°C
	<i>Reverse</i>	CTGCAAGAACTCGACCACAA	
<i>TRDMT1</i> (<i>DNMT2</i>)	<i>Forward</i>	ATCTCCAACCTCTCTTGGCA	60°C
	<i>Reverse</i>	AGGGTAATGGCTCTGACTGA	
<i>DNMT3A</i>	<i>Forward</i>	GCTGGAAAAGGGAGGCTGAG	60°C
	<i>Reverse</i>	TCCACCTTCTGAGACTCCCC	
<i>DNMT3B</i>	<i>Forward</i>	CACACAGGACTTGACAGGCG	60°C
	<i>Reverse</i>	TTCCCGAAGAGCTTTGGC	
<i>GAPDH</i>	<i>Forward</i>	TGCCACTCAGAAGACTGTGG	60°C
	<i>Reverse</i>	TTCAGCTCTGGGATGACCTT	

ANEXO A – CERTIFICADO DA COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS



UNIVERSIDADE FEDERAL DO CEARÁ
FACULDADE DE MEDICINA
NÚCLEO DE PESQUISA E DESENVOLVIMENTO DE
MEDICAMENTOS - NPDM
COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS - CEUA

CERTIFICADO

Certificamos que a proposta intitulada “**AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE HEMOLÍTICA DOS DERIVADOS QUINOLÓNICOS: ENSJ5, ENSJ32 E RCDFC; DOS DERIVADOS DE ALCALOIDES TROPANOS EB-PA E EB-PB, DA LASSBIO1920, PTEROCARPANO E LQB 507, EM MODELO EX VIVO DE ERITRÓCITOS DE CAMUNDONGOS SWISS (MUS MUSCULUS)**” registrada com o protocolo **41111022-0**, sob a responsabilidade **Manoel Odorico de Moraes Filho e Eleicy Nathaly Mendoza Hernandez** que envolve a produção, manutenção ou utilização de animais pertencentes ao filo *Chordata*, subfilo *Vertebrata* (exceto humanos), para fins de pesquisa científica, encontra-se de acordo com os preceitos da Lei nº 11.794 de 8 de outubro de 2008, do Decreto nº 6.899 de 15 de julho de 2009, e com as normas editadas pelo Conselho Nacional de Controle de Experimentação Animal (CONCEA), foi **APROVADA** pela Comissão de Ética no Uso de Animais (CEUA) do Núcleo de Pesquisa e Desenvolvimento de Medicamentos (NPDM) da Universidade Federal do Ceará, na reunião de 20 / 10 / 2022.

We hereby certify that the project entitled “**EVALUATION OF THE HEMOLYTIC ACTIVITY OF QUINOLONE DERIVATIVES: ENSJ5, ENSJ32 AND RCDFC; OF TROPANE ALKALOID DERIVATIVES EB-PA AND EB-PB, LASSBIO1920, PTEROCARPANE AND LQB 507, IN A SWISS MOUSE ERYTHROCYTE MODEL EX VIVO (MUS MUSCULUS)**” identified by the protocol number **41111022-0**, and conducted **Manoel Odorico de Moraes Filho e Eleicy Nathaly Mendoza Hernandez** which involves the production, maintenance or use of animals belonging to the filo *Chordata*, sub-vertebrate *Vertebrata* (except humans), for the purpose of scientific research - is in accordance with the provisions of the Law number 11,794, from October 8th, 2008, of Decree number 6,899, from July 15th, 2009, and with the regulations issued by the National Council for the Control of Animal Experimentation (CONCEA), was **APPROVED** by the Ethics Committee on Animal Use (CEUA) from the Center for Research and Development of Medicines (NPDM) of the Federal University of Ceará, in the meeting of 10 / 20 / 2022.

Finalidade	() Ensino (X) Pesquisa Científica
Vigência da autorização	Início: OUTUBRO/2022 Fim: ABRIL/2023
Espécie	Camundongo heterogêneo
Linhagem	Swiss
Nº de animais autorizados	9
Peso	25 a 30 gramas
Idade	63 dias
Sexo	Macho
Origem (fornecedor)	Biotério do NPDM
Local do experimento	Biotério do NPDM

Fortaleza, Ceará, 11 de novembro de 2022

Documento assinado digitalmente
gov.br LAIS LACERDA BRASIL DE OLIVEIRA
Data: 11/11/2022 07:49:21-0300
Verifique em <https://verificador.iti.br>

Coordenação da Comissão de Ética e Uso de Animais
Núcleo de Pesquisas e Desenvolvimento de Medicamentos
Universidade Federal do Ceará

Rua Coronel Nunes de Melo, 1000, Rodolfo Teófilo - Fortaleza/CE - CEP 60430-275 - Tel: 55 (85) 3366-8338
Horário de atendimento: Segunda a Sexta, das 9h às 12h e das 13h30 às 18h. E-mail: ceua-npdm@ufc.br