



**UNIVERSIDADE FEDERAL DO CEARÁ
FACULDADE DE MEDICINA
DEPARTAMENTO DE FISIOLOGIA E FARMACOLOGIA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM FARMACOLOGIA**

DANIEL PASCOALINO PINHEIRO

**AVALIAÇÃO DO POTENCIAL CITOTÓXICO E MECANISMO
MOLECULAR DAS NAFTOQUINONAS SINTÉTICAS ENSJ39 E
ENSJ108: ESTUDOS *IN VITRO* E *IN SILICO***

FORTALEZA

2017

DANIEL PASCOALINO PINHEIRO

**AVALIAÇÃO DO POTENCIAL CITOTÓXICO E MECANISMO
MOLECULAR DAS NAFTOQUINONAS SINTÉTICAS ENSJ39 E
ENSJ108: ESTUDOS *IN VITRO* E *IN SILICO***

Tese submetida à Coordenação do Curso de Pós-Graduação em Farmacologia do Departamento de Fisiologia e Farmacologia da Universidade Federal do Ceará como requisito parcial para a obtenção do grau de Doutor em Farmacologia.

Orientador: Prof. Dr. Manoel Odorico de Moraes Filho

FORTALEZA

2017

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação
Universidade Federal do Ceará
Biblioteca Universitária
Gerada automaticamente pelo módulo Catalog, mediante os dados fornecidos pelo(a) autor(a)

P718a Pinheiro, Daniel Pascoalino.
Avaliação do potencial citotóxico e mecanismo molecular das naftoquinonas sintéticas ENSJ39 e
ENSJ108: estudos in vitro e in silico / Daniel Pascoalino Pinheiro. – 2017.
213 f. : il. color.

Tese (doutorado) – Universidade Federal do Ceará, Faculdade de Medicina, Programa de Pós-Graduação
em Farmacologia, Fortaleza, 2017.

Orientação: Prof. Dr. Manoel Odorico de Moraes Filho.

1. Naftoquinonas. 2. Anticâncer. 3. Estresse Oxidativo. 4. Topoisomerases. 5. Apoptose. I. Título.

CDD 615.1

DANIEL PASCOALINO PINHEIRO

**AVALIAÇÃO DO POTENCIAL CITOTÓXICO E MECANISMO
MOLECULAR DAS NAFTOQUINONAS SINTÉTICAS ENSJ39 E
ENSJ108: ESTUDOS *IN VITRO* E *IN SILICO***

Tese submetida à Coordenação do Curso de Pós-Graduação em Farmacologia do Departamento de Fisiologia e Farmacologia da Universidade Federal do Ceará como requisito parcial para a obtenção do grau de Doutor em Farmacologia.

Aprovada em 31/07/2017

BANCA EXAMINADORA

Prof. Dr. Manoel Odorico de Moraes Filho (Orientador)
Universidade Federal do Ceará

Profª. Dra. Claudia do Ó Pessoa
Universidade Federal do Ceará

Prof. Dr. José Delano Barreto Marinho Filho
Universidade Federal do Piauí

Profª. Dra. Marcília Pinheiro da Costa
Universidade Federal do Piauí

Profª. Dra. Ana Rosa Pinto Quidute
Universidade Federal do Ceará

“A persistência é o menor caminho do êxito”.

(Charles Chaplin)

*“Quanto mais aumenta nosso conhecimento,
mais evidente fica nossa ignorância”.*

(John F. Kennedy)

*Aos meus pais, Marilson e Fátima, que sempre
me apoiam em todos os momentos.*

*Aos meus irmãos, Jéssica e Rafael, pelo
companheirismo e carinho.*

AGRADECIMENTOS

Agradeço primeiramente a Deus, por sempre estar ao meu lado em todos os momentos, guiando meus passos e me conduzindo pelos melhores caminhos.

Aos meus pais, **Marilson e Fátima**, por todo o apoio, amor e dedicação, em todos os momentos da minha vida. Por todos os conselhos e palavras de sabedoria.

Aos meus irmãos, **Rafael e Jéssica**, pelo companheirismo, amizade e amor, presentes sempre ao meu lado, mesmo quando distantes fisicamente.

Ao meu orientador, **Prof. Dr. Manoel Odorico de Moraes Filho**, pelo apoio, sabedoria e pelo exemplo de empenho e determinação.

À **Profa. Dr. Claudia do Ó Pessoa**, pelo incentivo, apoio, sabedoria e amizade. E pela ajuda crucial em tornar possível realizar parte do meu doutorado fora do Brasil.

Ao **Prof. Dr. Yves Pommier**, meu orientador no exterior, por todo o conhecimento compartilhado, pelos desafios lançados e confiança atribuída.

Ao **Prof. Dr. Eufrânio Nunes da Silva Jr.**, pela síntese dos compostos utilizados no estudo.

Aos pesquisadores e/ou professores, **Dr. Diego Veras Wilke, Dr. José Delano Barreto, Dr. Washington Araújo Barros, Dr. Bruno Cavalcanti, Dra. Ana Rosa Quidute e Dra. Marcília Pinheiro da Costa**, pelo apoio, sugestões e discussões científicas, e por aceitarem fazer parte das bancas de avaliação deste trabalho.

A todos os amigos do LOE/ UFC, pelas amizades construídas, pela paciência e por sempre estarem dispostos a ajudar. Em especial, **Andrea Felinto, Cássia de Oliveira, Claudia Santos, Francilene Silva, Augusto César, Sarah Sant'Anna, Renan Foca, Teiliane Rodrigues, Ana Jérsia Araújo, Kaio Moraes, Dayse Lima, Giovanna Riello, Cristiana Libardi, Carlos Paier, Maria Júlia Bezerra, Danilo Rocha**, e todos os demais que de alguma forma contribuíram direta ou indiretamente com este trabalho. Meu muito obrigado ao **Bruno Soares**, por todo apoio e companheirismo especialmente durante o período do doutorado no exterior.

Aos amigos do LMP/NCI, em especial, **Keli Agama, Muthana Nihon, Simone Bächler, Laetitia Marzi, Naomi Huang, Julie Terzic, Christophe Marchand, Junko Murai, Mamoru Tanaka**, pelo apoio e disponibilidade em ajudar e por todos os momentos compartilhados dentro e fora do laboratório. A amizade de vocês tornou mais fácil e prazeroso o tempo nos EUA.

Aos amigos próximos ou distantes (fisicamente), mas que de alguma forma compartilharam comigo essa caminhada, por todo o apoio e incentivo, em especial, **Luciana Morales, Thiago Barreto, João Pozzobon, Marcio Melo, Chris Coyne, Jon Willians, Glen McGugan, Nicola Magri**, e muitos outros.

À **Adelânia Roque Marinho**, pelo apoio e amizade, além da ajuda nos momentos burocráticos desta jornada. À **Silvana França**, pelo apoio, incentivo e amizade, além de toda a ajuda no laboratório. Aos funcionários da secretaria do Curso de Pós-Graduação em Farmacologia, **Célia Araújo e Laura Alves**, pelo apoio técnico.

A todos os profissionais, amigos e colegas, que de alguma forma contribuíram neste trabalho e que, por culpa da minha memória, não foram citados, meu sincero agradecimento. Muito obrigado!

Este trabalho foi realizado com o auxílio das seguintes instituições:

Universidade Federal do Ceará (UFC), National Cancer Institute/ USA (NCI/NIH – USA), Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq), Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES), Fundação Cearense de Amparo a Pesquisa (FUNCAP).

RESUMO

O câncer compreende um conjunto de doenças, que apresentam em comum a proliferação desordenada e a incapacidade de diferenciação celular normal. É uma doença de alta incidência e uma das principais causas de mortalidade em todo mundo, com estimativa para o Brasil, no biênio 2016-2017, apontando a ocorrência de cerca de 600 mil novos casos. Apesar do grande arsenal existente de quimioterápicos na clínica, vários estudos são realizados na busca por fármacos com maior potência terapêutica e, especialmente, mais seletivos para as células tumorais. As naftoquinonas são objeto de diversos estudos devido suas atividades farmacológicas, apresentando excelente atividade antitumoral, além de atividades antimicrobiana e anti-inflamatória, surgindo como bons candidatos para o tratamento do câncer. Dessa forma, o presente estudo teve por finalidade avaliar o efeito citotóxico *in vitro* de compostos naftoquinonas, bem como, estudar os mecanismos de ação envolvidos no processo de indução de morte celular destes compostos. Os compostos pertencentes ao grupo das naftoquinonas sintéticas foram inicialmente submetidos a um *screening* alvo-dirigido como inibidores de topoisomerasas e enzimas de reparo de DNA, além de avaliação da viabilidade celular em diversas linhagens celulares tumorais e não tumorais. Do grupo inicial de compostos, dois foram selecionados para prosseguimento da avaliação dos mecanismos de ação: a naftoquinona sintética ENSJ39, análogo da Nor- β -lapachona; e a ENSJ108, análogo da α -lapachona. Os resultados mostraram que, na linhagem tumoral HCT-116, a naftoquinona ENSJ39, bioativada pela enzima NQO1, induziu efeito antiproliferativo seguido de efeito citotóxico, de maneira concentração dependente, inibindo a progressão do ciclo celular com parada em G₂/M. Esses efeitos estão relacionados ao dano de DNA causado pelas espécies reativas de oxigênio geradas pela droga. O dano ao DNA ativa as vias de reparo por NHEJ e HR, estando também relacionado à inibição de topoisomerase II induzida pela droga, que leva ao aprisionamento de Top2cc; além de uma possível inibição catalítica da topoisomerase I. Estes efeitos podem induzir a morte por apoptose pela via mitocondrial (intrínseca) ou, de forma secundária, parece ativar a via extrínseca. Já a naftoquinona ENSJ108, em células tumorais HCT-116, induziu efeito antiproliferativo seguido de efeito citotóxico, de maneira concentração dependente, promovendo geração de espécies reativas de oxigênio (ROS). As ROS geradas causam dano ao DNA, levando a hiperativação de PARP1 que culmina com um tipo de morte celular por necrose regulada chamada *parthanatos*. A droga causou também inibição de topoisomerase II, pelo aprisionamento de topo2cc, resultando em quebras de dupla fita e ativação de TDP2 e HR. De forma secundária, a droga parece ativar apoptose pela via extrínseca. Podemos concluir que as naftoquinonas ENSJ39 e ENSJ108 mostraram potente atividade antitumoral *in vitro*, destacando a importância de futuros estudos em modelos animais para avaliação do potencial terapêutico destas moléculas.

Palavras-chave: Naftoquinonas. Estresse Oxidativo. Topoisomerasas. Apoptose. *Parthanatos*. Anticâncer.

ABSTRACT

EVALUATION OF CYTOTOXIC POTENTIAL AND MOLECULAR MECHANISM OF THE SYNTHETIC NAFTOQUINONES ENSJ39 AND ENSJ108: *IN VITRO* AND *IN SILICO* STUDIES

Cancer consists in a set of diseases, which present in common the disordered proliferation and the inability of normal cellular differentiation. It is a disease of high incidence and one of the main causes of mortality worldwide, with an estimate for Brazil, in the biennium 2016-2017, indicating the occurrence of about 600 thousand new cases. Despite the large arsenal of chemotherapy in clinic, several studies are conducted in the search for drugs with higher therapeutic potency and, especially, more selective for tumor cells. Naphthoquinones are object of several studies due to their pharmacological activities, presenting excellent antitumor activity, besides microbicidal and anti-inflammatory activities, appearing as good candidates for the cancer treatment. Thus, the present study aimed to evaluate the *in vitro* cytotoxic effect of naphthoquinone compounds, as well as to study the mechanisms of action involved in the process of cell death induction by these compounds. Therefore, the compounds were initially subjected to a target-directed screening as inhibitors of topoisomerases and DNA repair enzymes, as well as evaluation of cell viability in several tumor and non-tumor cell lines. From the initial group of compounds, two were selected for further evaluation of the mechanisms of action: synthetic naphthoquinone ENSJ39, analogous to Nor- β -lapachone; and ENSJ108, analogous to α -lapachone. The results showed that, in the HCT-116 cancer cell line, the naphthoquinone ENSJ39, bioactivated by the NQO1 enzyme, induced an antiproliferative effect followed by a cytotoxic effect in a concentration-dependent manner, inhibiting cell cycle progression with G₂/M arrest. These effects are related to the DNA damage caused by the reactive oxygen species generated by the drug. DNA damage activates the NHEJ and HR repair pathways, and is also related to the drug-induced topoisomerase II inhibition, which leads to the trapping of Top2cc; besides of a possible catalytic inhibition of topoisomerase I. These effects may induce death by apoptosis via the mitochondrial (intrinsic) pathway or, secondarily, appear to activate the extrinsic pathway. The naftoquinone ENSJ108, in tumor cells HCT-116, induced an antiproliferative effect followed by a cytotoxic effect, in a concentration-dependent manner, promoting the generation of reactive oxygen species (ROS). It results in a ROS-dependent DNA damage, leading to hyperactivation of PARP1, culminating in a type of cell death due to regulated necrosis called *parthanatos*. The drug also causes topoisomerase II inhibition by top2cc trapping, resulting in double-strand breaks and activation of TDP2 and HR. Secondarily, the drug appears to activate apoptosis via the extrinsic pathway. In conclusion, the naphthoquinones ENSJ39 and ENSJ108 show potent *in vitro* antitumor activity, highlighting the importance of future studies in animal models to evaluate the therapeutic potential of these molecules.

Keywords: Naphthoquinones. Oxidative stress. Topoisomerases. Apoptosis. *Parthanatos*. Anticancer.