



UNIVERSIDADE FEDERAL DO CEARÁ
PRÓ-REITORIA DE PESQUISA E PÓS-GRADUAÇÃO
FACULDADE DE MEDICINA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS MÉDICAS

ADRYANN JULLYANNE DE SOUSA PORTILHO

**ESTUDO *IN SILICO* E *IN VITRO* DO EFEITO ANTITUMORAL DA 1,4-
NAFTOQUINONA (CNN1) EM MODELOS EXPERIMENTAIS DE LEUCEMIA
MIELOIDE CRÔNICA RESISTENTES À QUIMIOTERAPIA**

FORTALEZA
2022

ADRYANN JULLYANNE DE SOUSA PORTILHO

**ESTUDO *IN SILICO* E *IN VITRO* DO EFEITO ANTITUMORAL DA 1,4-
NAFTOQUINONA (CNN1) EM MODELOS EXPERIMENTAIS DE LEUCEMIA
MIELOIDE CRÔNICA RESISTENTES À QUIMIOTERAPIA**

Tese submetida à Coordenação do Programa de Doutorado em Ciências Médicas da Universidade Federal do Ceará, para obtenção do grau de Doutora em Ciências Médicas. Orientadora:

Orientadora: Prof^a. Dra. Raquel Carvalho Montenegro

Co-orientadora: Prof^a. Dra. Caroline de Fátima Aquino Moreira-Nunes

FORTALEZA

2022

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)

- P88e Portilho, Adrhyann Jullyanne de Sousa.
Estudo In Silico e In Vitro do Efeito Antitumoral da 1,4- Naftoquinona (CNN1) em Modelos Experimentais de Leucemia Mieloide Crônica Resistentes à Quimioterapia / Adrhyann Jullyanne de Sousa Portilho. – 2023.
145 f. : il. color.
- Tese (doutorado) – Universidade Federal do Ceará, Faculdade de Medicina, Programa de Pós-Graduação em Ciências Médicas, Fortaleza, 2023.
Orientação: Profa. Dra. Raquel Carvalho Montenegro.
Coorientação: Profa. Dra. Caroline de Fátima Aquino Moreira Nunes.
1. Leucemia Mielóide Crônica. 2. Naftoquinona. 3. Topoisomera I. 4. Apoptose. I. Título.
CDD 610
-

ADRYANN JULLYANNE DE SOUSA PORTILHO

**ESTUDO *IN SILICO* E *IN VITRO* DO EFEITO ANTITUMORAL DA 1,4-
NAFTOQUINONA (CNN1) EM MODELOS EXPERIMENTAIS DE LEUCEMIA
MIELOIDE CRÔNICA RESISTENTES À QUIMIOTERAPIA**

Tese submetida à Coordenação do Programa de Doutorado em Ciências Médicas da Universidade Federal do Ceará, para obtenção do grau de Doutora em Ciências Médicas.

Orientadora: Prof^ª. Dra. Raquel Carvalho Montenegro

Co-orientadora: Prof^ª. Dra. Caroline de Fátima Aquino Moreira-Nunes

Aprovada em: __/__/__

BANCA EXAMINADORA

Prof^ª. Dra. Raquel Carvalho Montenegro.
Universidade Federal do Ceará – UFC
Orientadora

Prof^ª. Dra. Caroline de Fátima Aquino Moreira-Nunes
Universidade Federal do Ceará – UFC
Coorientadora

Prof^ª. Dra. Marne Carvalho de Vasconcellos
Universidade Federal da Amazônia – UFAM
Membro

Prof. Dr. Edivaldo Herculano Correa de Oliveira
Universidade Federal do Pará – UFPA
Membro

Prof. Dr. Roberto César Pereira Lima Júnior
Universidade Federal do Ceará – UFC
Membro

Prof^ª. Dra. Roberta Jeanne Bezerra
Universidade Federal do Ceará – UFC
Membro

Prof^ª. Dra Laine Celestino Pinto
Centro Universitário Metropolitano da Amazônia – UNIFAMAZ
Suplente

FONTES FINANCIADORAS E INSTITUIÇÕES PARTICIPANTES

Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior - CAPES

Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico - CNPq

Universidade Federal do Ceará - UFC

Universidade Federal Fluminense - UFF

Núcleo de Pesquisa e Desenvolvimento de Medicamentos - NPDM

AGRADECIMENTOS

Agradeço, primeiramente a Deus, por me guiar e sempre iluminar meus caminhos, me dando força para concluir meus objetivos com louvor e nunca desanimar com as dificuldades.

Aos meus pais Maria Vanuza e João Portilho, vocês são minha razão de ser e viver. Muito obrigada por estarem sempre ao meu lado me apoiando em todas as minhas decisões, por todo amor incondicional, pela paciência, alegria e por me proporcionarem força e vontade de ser cada dia melhor, vocês são meus exemplos de humildade e honestidade.

À minha orientadora, professora Dra. Raquel Carvalho Montenegro, pela oportunidade de trabalhar em seu grupo que foi fundamental para minha formação. Muito obrigada pela orientação, confiança, pelos ensinamentos nesses anos, pelas lições e por ter me aceitado como aluna de doutorado.

À minha coorientadora, professora Dra. Caroline de Fátima Aquino Moreira-Nunes por todo os ensinamentos acadêmicos, disponibilidade, incentivo e sugestões sempre pertinentes. Além disso, agradeço por tudo que tem feito por mim, e sempre se preocupa em me orientar pra vida também.

Aos meus amigos Bruno Moreira e Tatianne Cristina Mota, por todos os ensinamentos adquiridos, pelo companheirismo, pela amizade e pela alegria. Muito obrigada por sempre estarem presente, apesar da distância. Sou grata eternamente.

Aos amigos do NPDM e Farmagen (Emerson, Aline, Caio, Emanuel, Junior, Danilo e Priscila) pelo apoio científico, pelas conversas, pelas brincadeiras, pela alegria e pelos momentos de descontração. Saibam que cada um de vocês teve um papel singular nesta minha trajetória.

À todos aqueles que contribuíram de forma direta ou indiretamente para realização deste trabalho. Agradeço cordialmente a cada um.

*Dedico este trabalho aos meus pais Maria Vanuza e João
Portilho pelo amor e apoio incondicional que me
proporcionaram nessa caminhada.*

RESUMO

A Leucemia Mielóide Crônica (LMC) é uma doença mieloproliferativa, na qual ocorre a expansão clonal de células tronco hematopoéticas (CTHs). Esta patologia é caracterizada pela formação do cromossomo *Philadelphia* (Ph⁺), responsável por causar a LMC. Atualmente, a resistência à quimioterapia tem sido um dos maiores obstáculos no tratamento de pacientes com LMC. Cerca de 30% a 40% dos pacientes desenvolvem resistência ou intolerância aos inibidores tirosina quinase (ITQs) durante o tratamento. Portanto, ainda ocorre a necessidade de desenvolvimento e busca por novos fármacos com maior potencial terapêutico e baixos efeitos tóxicos. Neste cenário, as naftoquinonas são bem promissoras, por serem objeto de diversos estudos devido às suas atividades de cunho antitumoral. Sendo assim, o presente estudo teve por finalidade investigar por meio de técnicas *in silico* e *in vitro* o efeito antitumoral da 1,4-naftoquinona (CNN1) em linhagens de Leucemia Mielóide Crônica resistentes à quimioterapia. Inicialmente, foi avaliado o efeito citotóxico da CNN1 contra um painel de diferentes linhagens tumorais, o mesilato de imatinibe e o metabólito ativo do irinotecano (SN-38) foram usados como controles positivos. Em seguida, foram feitas as análises de farmacocinética e farmacodinâmica da CNN1 por meio de abordagens *in silico*, bem como análise de docking molecular. Após, foi investigado o mecanismo de morte celular causado pela CNN1 através da análise de alterações morfológicas, fragmentação do DNA, ciclo celular, integridade de membrana, potencial de membrana mitocondrial e teste de morte celular pela marcação com anexina-Alexa Fluor® 488/iodeto de propídeo (Anexina/IP) por citometria de fluxo, além disso foi avaliado o efeito genotóxico da CNN1. O método de RT-qPCR foi usado para avaliação da expressão gênica dos genes *TOP1*, *ABCBI*, *BRC-ABLI* e *H2AFX*. Os resultados deste estudo, demonstraram excelente atividade antitumoral da CNN1 em linhagens de leucemia quimiossensível K-562 (CI₅₀ = 1,12 µM) e quimiorresistente FEPS (CI₅₀ = 0,60 µM) e menor atividade na linhagem não neoplásica MRC-5 (CI₅₀ = 15,45 µM). Nos estudos *in silico*, a molécula CNN1 mostrou boas propriedades de ADME/T, indicando boa biodisponibilidade oral e os resultados da farmacodinâmica demonstraram que CNN1 tem como alvo farmacológico a Topoisomerase I, em seguida as análise de docking molecular revelaram que CNN1 tem afinidade de ligação de -11,94 kcal/mol com a Topoisomerase I e também foi capaz de reduzir o nível de expressão gênica de *TOP1* (p<0,01). Quanto à investigação de morte celular, a CNN1 induziu nas linhagens K-562 e FEPS alterações morfológicas, ruptura na membrana (p<0,001) e despolarização mitocondrial (p<0,001). Sequencialmente, a CNN1 causou fragmentação no DNA (p<0,001), acúmulo de células na fase G2/M (p<0,001) e induziu dano genotóxico (p<0,001) semelhante ao SN-38, entretanto a CNN1 foi menos tóxica para células mononucleares de sangue periférico e MRC-5. A continuação dos resultados mostraram aumento na população de células em apoptose (p<0,001), confirmada pela marcação por anexina/IP. Além disso, o tratamento com a CNN1 induziu aumento na expressão gênica de *H2AFX* (p<0,001) em ambas as linhagens. Portanto, nossos resultados demonstram que a CNN1 tem atividade anticâncer promissora para o tratamento de pacientes refratários e/ou intolerantes aos ITQs com LMC, e também pode ser uma alternativa de tratamento para pacientes que desenvolvem efeitos adversos causados pelo irinotecano.

Palavras-chave: Leucemia Mielóide Crônica, Naftoquinona, Topoisomera I, Apoptose.

ABSTRACT

Chronic Myeloid Leukemia (CML) is myeloproliferative disease in which clonal expansion of hematopoietic stem cells (CTHs). It is characterized by the formation of the Philadelphia chromosome (Ph⁺), responsible for caused CML. Currently, chemotherapy resistance has been one the biggest obstacles in the treatment of patients with CML, around 30% - 40% of patients develop resistance or intolerance to tyrosine kinase inhibitors (TKIs) during treatment. Therefore, still is need developmente and search of new drugs with greater effective potency and low toxic effects. In this scenario, naphthoquinones are target of several studies due to their pharmacological activities, demonstrating excellent antitumor activity in different type of cancer. Therefore, the present study aimed to investigate, through in silico and in vitro techniques, the antitumor effect of 1,4-naphthoquinone (CNN1) in chemotherapy-resistant Chronic Myeloid Leukemia. Initially, the cytotoxic effect of CNN1 was evaluated against a panel of different tumor cell lines, imatinib mesylate, and the active metabolites of irinotecan (SN-38) were used as positive controls. Next, CNN1 pharmacokinetic and pharmacodynamic analyzes were performed using in silico approaches, as well as molecular docking analysis. Afterward, the mechanism of cell death caused by CNN1 was investigated through the analysis of morphological changes, DNA fragmentation, cell cycle, membrane integrity, mitochondrial membrane potential, and cell death test by marking with annexin-Alexa Fluor® 488/iodide of propidium (Annexin/IP) by flow cytometry, in addition, the genotoxic effect of CNN1 was evaluated. The RT-qPCR method was used to evaluate of gene expression of the *TOP1*, *ABCB1*, *BRC-ABL1* and *H2AFX* genes. The results of this study, demonstrated excellent antitumor activity of CNN1 in chemosensitive leukemia strains K-562 (IC₅₀ = 1.12 μM) and chemoresistant FEPS (IC₅₀ = 0.60 μM) and lower activity in the non-neoplastic cell line MRC-5 (IC₅₀ = 15.45 μM). In silico studies, the CNN1 molecule showed good ADME/T properties, indicating good oral bioavailability and the pharmacodynamic results showed that CNN1 has a pharmacological target to Topoisomerase I, then molecular docking analysis revealed that CNN1 has a binding affinity of -11.94 kcal/mol with Topoisomerase I and was also able to reduce the level of TOP1 gene expression (p<0.01). As for the investigation of cell death, CNN1 induced morphological changes, membrane rupture (p<0.001) and mitochondrial depolarization (p<0.001) in the K-562 and FEPS strains. Sequentially, CNN1 caused DNA fragmentation (p<0.001), accumulation of cells in the G2/M phase (p<0.001) and induced genotoxic damage (p<0.001) similar to SN-38, however, CNN1 was less toxic to cells in peripheral blood mononuclear cells and MRC-5. Further results showed an increase in the population of apoptotic cells (p<0.001), confirmed by annexin/IP labeling. Furthermore, treatment with CNN1 induced an increase in H2AFX gene expression (p<0.001) in both strains. Therefore, our results demonstrate that CNN1 has a promising anticancer activity for the treatment of ITQ-refractory and/or intolerant patients with CML, and may also be an alternative treatment for patients who develop adverse effects caused by irinotecan.

Keywords: Chronic Myeloid Leukemia, Naphthoquinone, Topoisomerase I, Apoptosis.

LISTA DE TABELAS E FIGURAS

Figura 1: Translocação entre os cromossomos 9 e 22 originando o cromossomo <i>Philadelphia</i>	14
Tabela 1 - Características das fases: crônica, acelerada e blástica da LMC.....	16
Figura 2 - Mecanismo de resistência na LMC	19
Figura 3 - Diferentes atividades biológicas das naftoquinonas	24
Figura 4 - Estrutura química da 1,4-naftoquinona	26
Tabela 2 - Especificações para utilização do programa Vina	30
Tabela 3 - Linhagens humanas utilizadas no presente trabalho.....	31
Tabela 4 - Sequência de oligonucleotídeos usados no RT-qPCR.....	39
Tabela 5 - Atividade citotóxica <i>in vitro</i> dos compostos 11a, IM e SN-38.....	40
Tabela 6 - Atividade citotóxica <i>in vitro</i> dos compostos nas linhagens leucêmicas.....	42
Table 7 - Predição dos parâmetros de farmacocinética da molécula CNN1, através do servidor online admetSAR.....	44
Tabela 8 - Predição dos alvos para a CNN1 pelo servidor <i>SwissTarget Prediction</i>	45
Tabela 9 - Resultados da energia livre de ligação (ΔG) e identificação de resíduos de aminoácidos realizando ligação de hidrogênio, foram estimadas com Autocock Vina.....	47
Figure 5 – Resultado de docagem molecular da CNN1, topotecan e SN-38 com a proteína TOP1.....	46

Figura 6 - Percentual de viabilidade celular das linhagens K-562 e FEPS após 24 horas de tratamento com a CNN1	48
Figura 7 - Análise da alteração de integridade de membrana acarretado pela molécula CNN1 após 24 h de tratamento nas linhagens K-562 e FEPS, devido a alta incorporação de iodeto de propídeo (IP) pelas células não viáveis	50
Figura 8 - CNN1 induz despolarização de membrana mitocondrial nas linhagens K-562 e FEPS após 24 h de tratamento, através da baixa marcação do fluorocromo catiônico rodamina 123 (Rho123) quantificado por citometria de fluxo.....	50
Figure 9 - Análise de fragmentação no DNA e bloqueio do ciclo celular ocasionado pela CNN1 após 24 h de tratamento nas linhagens K-562 e FEPS.....	52
Figura 10 - CNN1 induz dano genotóxico seletivo nas linhagens K-562 e FEPS após 3 h de tratamento, através do ensaio do cometa versão alcalina.....	53
Figura 11 - CNN1 promove apoptose nas linhagens K-562 e FEPS após 24 h de tratamento, através da utilização conjunta dos marcadores anexina V-Alexa Fluor® 488 e IP por citometria de fluxo.....	54
Figura 12 - A naftoquinona CNN1 induz modificações morfológicas nas linhagens K-562 e FEPS após o tratamento de 24 h, através da análise pelo Kit Panótico	59
Figura 13 - CNN1 causa modulação na expressão gênica de <i>TOP1</i> e <i>H2AFX</i> nas linhagens K-562 e FEPS, após 18 horas de exposição.....	54

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

ABCB1	<i>ATP binding cassette subfamily B member 1</i>
ABCC1	<i>ATP binding cassette subfamily C member 1</i>
ABC	<i>ATP-binding cassette</i>
AKT	<i>Serine/threonine kinase 1</i>
ATP	Adenosine trifosfato
ACTB	<i>Actin Beta</i>
BCR	<i>Breakpoint cluster region</i>
c-ABL	<i>Abelson murine leukemia</i>
c-KIT	<i>Stem cell factor receptor</i>
CTHs	Células-tronco hematopoiéticas
DNR	Daunorrubicina
FDA	<i>Food and Drugs Administration</i>
FISH	<i>Hibridização in situ fluorescente</i>
FC	Fase crônica
FA	Fase acelerada
H2AFX	<i>H2A.X variante histone</i>
ITQs	Inibidores tirosina quinase
IRIS	<i>International Randomized Study of Interferon and STI-571.</i>
IP	Iodeto de propídeo
LMC	Leucemia Mielóide Crônica
PDGF-R	<i>Platelet derived growth factor receptor</i>
PI3K	<i>Phosphatidylinositol-3-kinase</i>
Ph+	Cromossomo Philadelphia
Rho123	Rodamina 123
SRC	<i>Proto-oncogene, non-receptor tyrosine kinase</i>
VCT	Vincristina

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	14
1.1	Leucemia mielóide crônica (LMC)	14
1.2	Tratamento na LMC	18
1.3	Mecanismos relacionados à Resistência a Múltiplas Drogas	20
1.3.1	<i>Transportadores ABC</i>	20
1.3.2	<i>Morte celular</i>	22
1.4	Naftoquinonas	23
2	OBJETIVOS	27
2.1	Objetivo geral	27
2.2	Objetivos específicos	27
3	MATERIAIS E MÉTODOS	28
3.1	Quimioterápicos	28
3.2	Estudos <i>in silico</i>	28
3.2.1	<i>Desenho das estruturas e preparação do ligante</i>	28
3.2.2	<i>Farmacocinética in silico</i>	29
3.2.3	<i>Farmacodinâmica in silico</i>	29
3.2.4	<i>Preparação do alvo DNA topoisomerase I (TOP1)</i>	29
3.2.5	<i>Docagem molecular</i>	30
3.3	<i>Estudos in vitro</i>	30
3.3.1	<i>Linhagens celulares</i>	30
3.3.2	<i>Ensaio de citotoxicidade por Alamar Blue</i>	31
3.3.3	<i>Ensaio de viabilidade celular utilizando Azul de Tripán</i>	32
3.3.4	<i>Avaliação da integridade de membrana</i>	33
3.3.5	<i>Avaliação do potencial de membrana mitocondrial ($\Delta\Psi_m$) por citometria de fluxo</i>	33
3.3.6	<i>Avaliação de fragmentação no DNA por citometria de fluxo</i>	34
3.3.7	<i>Ensaio do cometa versão alcalina</i>	35
3.3.7.1	<i>Isolamento de células PBMC (Peripheral blood mononuclear cells)</i>	36
3.3.8	<i>Detecção de células apoptóticas e necróticas por marcação com Anexina V/iodeto de propídeo</i>	37
3.3.9	<i>Análise diferencial morfológica</i>	38

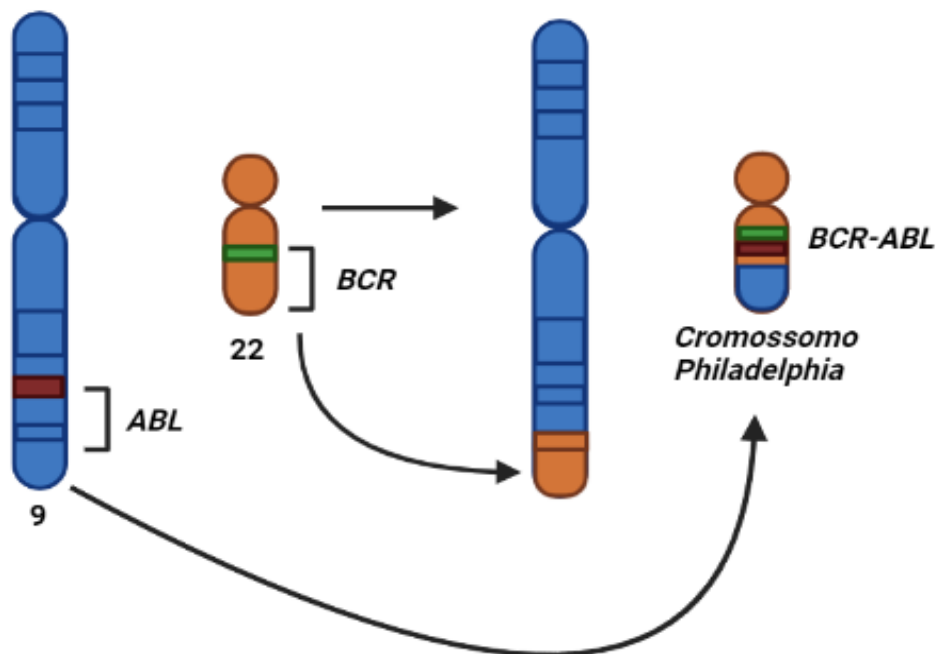
3.3.10	<i>Expressão dos genes TOP1, H2AFX, ABCB1 e BCR-ABL1 por RT-qPCR</i> <i>(Real-time reverse transcription Polymerase Chain Reaction)</i>	39
3.4	Análise estatística	39
4	RESULTADOS	40
5	DISCUSSÃO	58
6	CONCLUSÃO	65
	REFERÊNCIAS	66
	ANEXO 1	77
	<i>Synthesis, Molecular Docking, And Biological Activity Of Thioether Derived From Juglone In Preclinical Models Of Chronic Myeloid Leukemia</i>	
	ANEXO 2	113
	<i>1,4-Naphthoquinone (CNN1) Induces Apoptosis through DNA Damage and Promotes Upregulation of H2AFX in Leukemia Multidrug Resistant Cell Line</i>	
	Dados suplementares	144

1 INTRODUÇÃO

1.1 Leucemia mielóide crônica

A leucemia mielóide crônica (LMC) é uma neoplasia mieloproliferativa, caracterizada pela expansão clonal de células-tronco hematopoéticas (CTHs). Apresentando uma anormalidade citogenética específica, o cromossomo *Philadelphia* (Ph⁺). Nesse sentido, a formação do Ph⁺ provém da translocação recíproca entre os braços longos dos cromossomos 9 (9q34) e 22 (22q11), resultando na formação do cromossomo Ph⁺. Nesta translocação, ocorre a associação do gene *c-ABL* (*Abelson murine leukemia*) localizado no cromossomo 9 com uma parte do gene *BCR* (*breakpoint cluster region*) do cromossomo 22 (**Figura 1**). A consequência molecular desta translocação é a geração do oncogene *BCR-ABL*, cujo produto transducional é a oncoproteína quimérica BCR-ABL, apresentando atividade tirosina quinase constitutiva (ROWLER, 1973; DRUNKER; LYDON, 2000; BAVARO *et al.*, 2019; CHAUFFAILLE, 2015; ANTONENKO; TELEGEEV, 2020).

Figura 1 - Translocação entre os cromossomos 9 e 22 originando o cromossomo *Philadelphia*.



Fonte: Adaptado de Vuelta (2021).

A LMC representa de 15 a 20 % de todas as leucemias, com taxa de incidência mundial de 1 a 2 casos a cada 100 mil habitantes, ocorrendo em todas as faixas etárias,

entretanto, sendo a mediana de idade ao diagnóstico de 55 à 60 anos (JABBOUR *et al.*, 2020). Espera-se no Brasil para o triênio de 2020 - 2022, aproximadamente 5,920 casos novos de leucemias em homens e 4,890 em mulheres. Esses valores correspondem a um risco estimado de 5,67 casos novos a cada 100 mil homens e 4,56 para cada 100 mil mulheres. Adicionalmente, a LMC é considerada uma das 10 principais causas de morte entre homens e mulheres com câncer, levando mais de 5,550 pessoas a óbito em 2019, reforçando a magnitude deste problema de saúde pública no país (INCA, 2020).

Segundo dados do Instituto Nacional do Câncer, para o ano de 2022 as leucemias se apresentam em homens como a quinta neoplasia mais frequente na Região Nordeste, com um risco de 8,20/100 mil habitantes. Especificamente, para o caso das mulheres o risco na Região Nordeste é de 4,42/100 mil habitantes e ocupa a décima posição. Para o ano de 2019, de acordo com a coleta de dados, foi constatado uma taxa de 6,75 casos a cada 100 mil habitantes e em mulheres 4,19/100 mil habitantes. Portanto, esses dados demonstram o grande aumento de casos nestas regiões em relação aos anos anteriores, demonstrando um grave problema de saúde pública (INCA, 2018; 2019).

Um dos fatores de exposição ambiental e ocupacional que estão associados à progressão do câncer, são os agrotóxicos. Dessa forma, esses fatores externos podem ser considerados agentes iniciadores, podendo induzir a formação do tumor a partir de alterações no DNA; ou como agentes promotores, impulsionando a célula alterada a se dividir de forma exacerbada (MORAES *et al.*, 2017; INCA, 2020; TELEGEEV, 2020).

De acordo com os critérios estabelecidos pelo *European LeukemiaNet* (ELN), a LMC é uma doença categorizada em três fases: crônica (FC), apresentando duração média de 3 a 5 anos; seguida pela fase acelerada (FA) que tem duração de 1 a 2 anos e, por última, a crise blástica (CB), demonstrando duração de 3 a 6 meses (**Tabela 1**) (HOCHHAUS *et al.*, 2020; SANTOS *et al.*, 2020). Clinicamente, na fase crônica o paciente desenvolve expansão clonal nas células granulocíticas, nesta fase os sintomas são leves e os pacientes respondem ao tratamento padrão (HIDALGO-LOPEZ *et al.*, 2019; DESTERKE *et al.*, 2020).

A fase intermediária, chamada de fase acalorada, é caracterizada pelo início da perda da capacidade de diferenciação dos clones leucêmicos, sendo mais difícil controlar a doença. O paciente pode desenvolver esplenomegalia, trombocitose, trombocitopenia e evolução clonal em comparação ao cariótipo inicial, devido a presença de anormalidades como o cromossomo Ph⁺.(MELO, 2015; ISSA *et al.*, 2017; ZAKRZEWSKI *et al.*, 2020).

Os parâmetros para crise blástica, podem incluir aumento de blastos leucêmicos tanto na medula óssea quanto no sangue periférico. Em 50% dos casos essas células são: mieloblastos, linfoblastos em 25%, e no restante, correspondem a células indiferenciadas ou bifenotípicas. Ademais, os pacientes nessa fase apresentam refratariedade ao tratamento. (HOCHHAUS *et al.*, 2020; HIDALGO-LOPEZ *et al.*, 2019).

Tabela 1 - Características das fases: crônica, acelerada e blástica na LMC.

FASES CLÍNICAS DA DOENÇA		
FASES CRÔNICA (FC)	FASE ACELERADA (FA)	CRISE BLÁSTICA (CB)
Basofilia e eosinofilia; Anemia normocítica e normocrômica; Contagem de blastos (<10%).	Basofilia no sangue periférico igual ou superior a 20%; Contagem de blastos (10% - 19%) na medula óssea ou no sangue periférico.	Blasto leucêmico na MO e SP (>20%); Proliferação extramedular de blastos; Refratariedade ao tratamento.

Legenda: FC (fase crônica); SP (sangue periférico); FA (fase acelerada); CB (crise blástica); MO (medula óssea).

Fonte: Adaptado de Muselli *et al.*, 2019.

Entre os métodos de diagnóstico e monitoramento da LMC, encontram-se a avaliação do hemograma, mielograma, presença de hepatoesplenomegalia e biópsia de medula (OGASAWARA *et al.*, 2019). O diagnóstico também requer a identificação do cromossomo *Philadelphia*, resultante da translocação t(9,22) (q34; q11) em exame citogenético molecular por meio da metodologia FISH (*Hibridização in situ Fluorescente*). No entanto, o método considerado padrão ouro para diagnóstico da LMC é a técnica de RT-qPCR (*Real-time reverse transcription Polymerase Chain Reaction*) qualitativo e quantitativo, sendo o último responsável por detectar o aumento nos transcritos de *BCR-ABL* em células de sangue periférico e medula óssea. Sendo assim, com base nos resultados obtidos, é possível aferir a fase de evolução da doença (TOOFAN' *et al.*, 2018; INCA, 2021; SUTTORP *et al.*, 2021).

1.2 Tratamento na LMC

A quimioterapia convencional para o controle da LMC até pouco tempo era limitada, devido a utilização de agentes como hidroxiuréia, terapias medicamentosas com

interferon-alfa (INF- α), bussulfano ou citarabina em baixas doses. Porém, esses tratamentos exibem efeitos paliativos, sem atingir resultados eficazes na patogênese molecular da doença (FOURNIER *et al.*, 2017; EUSTACHI *et al.*, 2017).

Atualmente o tratamento na LMC, compreende o uso de inibidores de tirosina quinase (ITQs) de BCR-ABL, demonstrando resultados promissores para os pacientes com essa doença (WESTERWEEL *et al.*, 2019; GELATTI *et al.*, 2019; VENER *et al.*, 2020). Após o advento dos ITQs, o tratamento na LMC avançou consideravelmente através dos resultados eficazes, onde 80% dos pacientes com LMC na fase crônica da doença atingem a resposta molecular e remissão clínica. Contudo, a progressão para CB ainda ocorre em 5% a 7% dos pacientes e continua sendo um desafio clínico (LINDAUER; HOCHHAUS, 2018; LEONARD *et al.*, 2021).

O Mesilato de Imatinibe (MI) foi o primeiro ITQ aprovado para o tratamento na LMC pela FDA (*Food and Drugs Administration*), devido aos seus excelentes resultados. O mesilato de imatinibe foi desenvolvido para inibir a tirosina quinase ABL, especificamente sua ligação ocorre na trinca de aminoácidos Aspartato(D)-Fenilalanina(F)-Glicina(G) (DFG). Posteriormente, ao se ligar a esta trinca acontece o bloqueio da ligação de ATP ao domínio da tirosina quinase, inibindo assim, a fosforilação da tirosina de proteínas envolvidas na transdução de sinal mediada pelo BCR-ABL (ROSSARI *et al.*, 2018). Apesar do MI apresentar efeitos de seletividade ao BCR-ABL, esse composto também inibe a atividade da tirosina quinase c-KIT (*stem cell factor receptor*) e PDGF-R (*platelet derived growth factor receptor*) (KATHERINE *et al.*, 2017; ZHOU *et al.*, 2018).

Apesar dos benefícios do MI no tratamento de pacientes com LMC. Cerca de 30% a 40% dos pacientes que estão na FA e CB respondem inicialmente ao tratamento, mas depois desenvolvem resistência ou intolerância ao MI. Sendo assim, esses resultados levaram ao desenvolvimento de novos inibidores de tirosina quinase, como nilotinibe, dasatinibe e bosutinibe (O'BRIEN *et al.*, 2003; HOCHHAUS *et al.*, 2017, SAGLIO *et al.*, 2019).

O nilotinibe é uma aminopirimidina, análogo estrutural do imatinibe, logo, apresentando mecanismo de ação semelhante, inibindo a atividade quinase do *BCR-ABL* e a maioria das formas mutadas do *ABL*, exceto à mutação T3155I. O nilotinibe foi aprovado pela FDA para o tratamento de pacientes com LMC na FC e FA, apresentando o perfil de resistência ou intolerância ao tratamento com MI. Saglio e colaboradores (2019) descrevem que o nilotinibe tem afinidade pelo domínio quinase do *BRC-ABL* 30 vezes

mais potente em relação ao MI, conferindo a este, um potencial superior e seletivo à proteína. Esse ITQ de segunda geração também inibe outras tirosinas quinases, como por exemplo c-KIT (*KIT proto-oncogene*) e PDGF-R (*Platelet-Derived Growth Factor Receptor Alpha*), o que comprova eficácia do fármaco em termos de redução na progressão para outras fases da LMC, tendo em vista que esses alvos moleculares participam ativamente da resistência durante o tratamento (HUGHES *et al.*, 2009; SACHA e SAGLIO, 2019).

Posteriormente, foi desenvolvido o ITQ de segunda geração dasatinibe, sendo cerca de 350 vezes mais potente que MI (KEATING *et al.*, 2017; VULTUR *et al.*, 2018). O dasatinibe, é um inibidor duplo da família das tirosinas quinases SRC (*proto-oncogene, non-receptor tyrosine kinase*) e ABL, sendo ativo contra as mutações da oncoproteína BCR-ABL resistentes ao MI, com exceção da mutação T315I. O bosunitibe também é considerado um inibidor duplo da via SRC e da tirosina quinase ABL, apresentando um alto potencial inibitório sobre o ciclo celular de blasto leucêmicos (CORTES *et al.*, 2018). Estudos demonstram que o bosunitibe é eficaz em pacientes com diversas mutações que levam a falha à terapia de primeira linha com MI, porém, assim como os inibidores de segunda geração, não apresenta ação sobre a mutação T315I (CORTES *et al.*, 2016; VULTUR *et al.*, 2018; LEONARD *et al.*, 2021).

Apesar dos avanços terapêuticos com os ITQs no tratamento da LMC, ainda é observado o desenvolvimento de vários efeitos colaterais durante o tratamento, devida a potência dos ITQs de segunda geração, que podendo causar toxicidade hematológica e não hematológica. Os primeiros eventos de origem hematológica referem-se à neutropenia, trombocitopenia e anemia, tais efeitos são geralmente limitados ao primeiro período de tratamento, podendo exigir adaptação temporária da dose durante o tratamento com os ITQs. Quanto aos eventos não hematológicos, como insuficiência respiratória, derrame pleural, hipertensão, toxicidade vascular e hepatotoxicidade, esses podem afetar a tolerabilidade e a qualidade de vida, sendo essencial a mudança no tipo de tratamento em 15% dos pacientes (SHAH *et al.*, 2019, JABBOUR; KANTARJIAN, 2020; CIRMI *et al.*, 2020).

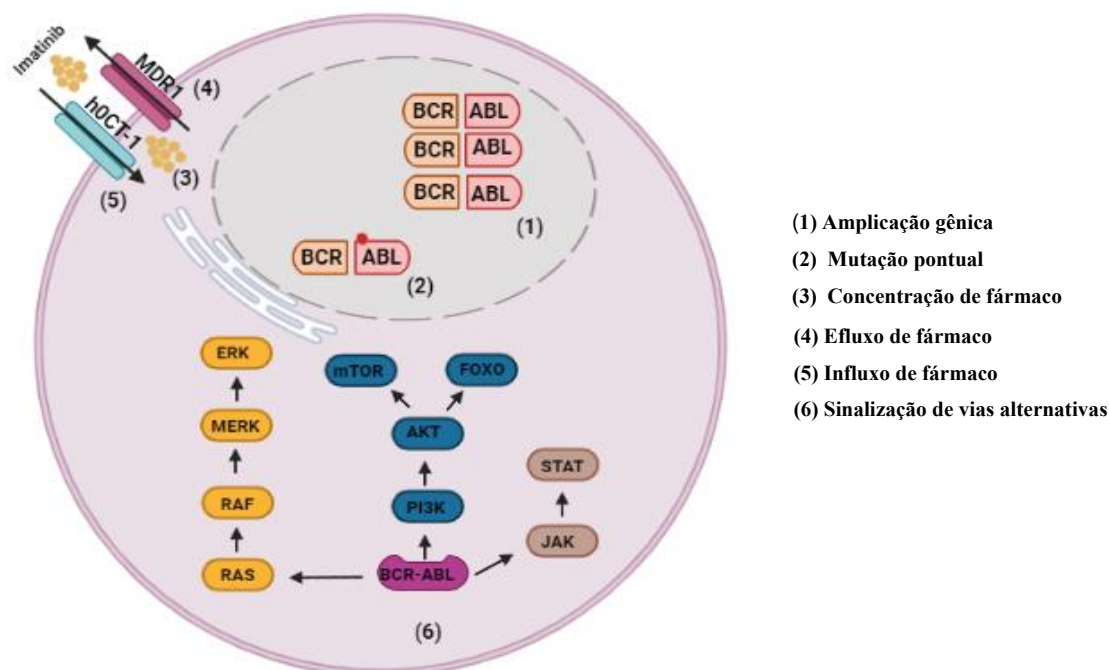
1.3 Mecanismos relacionados à Resistência a Múltiplas Drogas

A resistência a múltiplas drogas (MDR - *Multidrug Resistance*) tem sido um grande obstáculo no tratamento de pacientes com LMC. Cerca 30% - 40% dos pacientes

desenvolvem resistência aos inibidores tirosina quinase durante o tratamento, que consiste na ausência de resposta aos quimioterápicos (SANTOS *et al.*, 2011; BRAUN *et al.*, 2020). A MDR é um caso de resistência adquirida contribuinte para a limitação do tratamento, e pode ser observada em células tumorais *in vivo* e *in vitro* ((MORAES *et al.*, 2012; HOCHHAUS *et al.*, 2020).

Diversos mecanismos já foram identificados como contribuintes para o processo de resistência, que incluem a superexpressão bombas de efluxo (transportadores ABC), influxo de fármaco, evasão do processo de morte celular, amplificação gênica de *BCR-ABL*, mutações pontuais e ativação de vias alternativas (**Figura 2**) (ROSSARI *et al.*, 2018; LOSCOCCO, *et al.*, 2019; HOCHHAUS *et al.*, 2020).

Figura 2 - Diferentes mecanismos de resistência na LMC.



Legenda: Os mecanismos que são dependentes de BCR-ABL incluem: 1) amplificação gênica do oncogene BCR-ABL que pode elevar a atividade da tirosina quinase ABL e 2) mutação pontual em BCR-ABL que impedem a ligação apropriada dos ITQs. Mecanismos considerados independentes de BCR-ABL envolvem: 3) alteração na concentração intracelular do fármaco, 4) Superexpressão da glicoproteína-P (P-gp) que medeia o efluxo de fármacos, 5) Alteração na expressão do transportador cátions orgânicos o HCT-1 que induzem influxo de fármacos e 6) Ativação de vias de sinalização alternativas de BCR-ABL que estão envolvidas com a resistência aos ITQs.

Fonte: Adaptado de Loscocco, *et al.*, 2019.

1.3.1 Transportadores ABC

A superexpressão de bombas de efluxo de droga, envolvem o processo de resistência aos fármacos que é mediado pelas proteínas transportadoras da família ABC (*ATP-binding cassette*). As famílias de transportadores de fármacos predominantes são os transportadores de cassete de ligação do ATP e transportadores SLC (*Solute carrier*) que causa resistência a diversos agentes quimioterápicos durante o tratamento contra o câncer. Grande parte das proteínas ABC são formadas de transportadores ativos primários, que dependem da hidrólise do trifosfato de adenosina (ATP) para bombear seus substratos através das membranas, sendo determinantes na farmacocinética e eficácia dos fármacos (FENNER *et al.*, 2018; CACABELOS *et al.*, 2019; XIÃO *et al.*, 2020).

A análise de expressão desses transportadores e seus polimorfismos genéticos funcionais têm sido implicados na resposta e prognóstico na LMC (MOLLAZEDEH *et al.*, 2019; SZAKACS *et al.*, 2019). Portanto, é de grande importância superar a resistência aos fármacos, no intuito de modificar o panorama atual, através do aumento da eficácia e consequente redução na taxa de mortalidade observada para esses pacientes (CHEEN *et al.*, 2020; LYTLE *et al.*, 2021).

A glicoproteína-P (*MDR1/ABCB1*) é um transportador da família ABC que foi inicialmente identificada em células relacionadas com a resistência a múltiplos medicamentos (WAGHRAY *et al.*, 2018; MOHAMMAD *et al.*, 2018). Dentro deste contexto, quando essa proteína está expressa ela age como uma bomba de efluxo ATP-dependente que transporta fármacos e xenobióticos para a parte externa das células (NOMURA *et al.*, 2020). Lage (2019), em seu estudo de transfecção do gene *ABCB1*, já haviam mostrado que a superexpressão é o suficiente para provocar resistência aos fármacos.

A atividade da glicoproteína-P é responsável por mediar o efluxo de diversos quimioterápicos anticânceres utilizados no combate da doença, conferindo quimiorresistência ao tumor quando expressa em grandes quantidades nas células malignas. Dentre os agentes quimioterápicos estão a doxorubicina, cisplatina, erlotinibe e imatinibe (WANG *et al.*, 2019; RINALD *et al.*, 2019; AMMAR *et al.*, 2020).

Desta forma, logo após a introdução clínica do imatinibe, uma série de linhagens celulares resistentes ao imatinibe foram desenvolvidas, surgindo como uma

possível ferramenta oncológica experimental, para compreender os fenômenos de resistência. Diante da necessidade de estudos mais aprofundados para o entendimento fisiológico e patológico destes transportadores de membrana relacionados à quimiorresistência do câncer (SHI *et al.*, 2019; WILSON-ROBLES, 2019).

Rumjanek e colaboradores (2013) realizaram a caracterização do modelo de resistência a múltiplas drogas de leucemia mielóide crônica, a linhagem celular K562-lucena 1. Tal linhagem celular resistente foi produzida através da indução da expressão do gene *ABCB1* (*ATP binding cassette subfamily B member 1*) após o tratamento contínuo com vincristina (VCT). O estudo mostrou cinco cópias a mais do gene e que este gene está superexpresso na linhagem K562-lucena 1 comparado à linhagem parental K562 sensível (RUMJANEK *et al.*, 2013).

Adicionalmente a linhagem FEPS, também foi estabelecida após a exposição de concentrações crescentes do fármaco daunorrubicina (DNR), que superexpressa os genes *ABCB1* e *ABCC1* (*ATP Binding Cassette Subfamily C Member 1*). Nesse contexto, o estabelecimento de linhagens resistentes é considerada uma ferramenta de extrema importância para o desenvolvimento de terapias com habilidade de burlar o fenótipo MDR, além de ajudar a identificar alvos e estratégias capazes de afetar o desenvolvimento de novas drogas (SOARES *et al.*, 2019; SANTOS *et al.*, 2021, SALGADO *et al.*, 2021).

1.3.2 Morte celular

A morte celular programada é extremamente importante para todos os organismos multicelulares, uma vez que tem função durante a homeostase celular, bem como em uma variedade de doenças, no remodelamento tecidual, na supressão tumoral, e o tipo mais conhecido é apoptose (MENEZES *et al.*, 2018, XU *et al.* , 2019). De acordo com o Comitê de Nomenclatura sobre Morte Celular (NCCD), a morte celular pode ser classificada por meio de parâmetros bioquímicos, morfológicos e também aspectos funcionais (morte programada ou acidental, fisiológico ou patológico (ABOU-ZAHR e BORTHAKUR, 2017; MENEZES *et al.*, 2018; XU *et al.* , 2019).

Entre os marcadores clássico de apoptose, estão a condensação de cromatina, *blebbing* de membrana que culminam na liberação de pequenas partículas envoltas por membrana contendo componentes celulares conhecidos como corpos apoptóticos, que são removidos por fagócitos especializados, os macrófagos, sem que causem um processo inflamatório (WANG *et al.*, 2019; CHEN *et al.*, 2019).

Estudos realizados sobre o processo de morte celular por apoptose demonstram que este é um processo importante na eliminação de células tumorais, pois a indução seletiva de apoptose em células malignas pode ser uma excelente estratégia contra diferentes tipos tumorais (BELLACOSA *et al.*, 2005; HUANG *et al.*, 2018; SHAMAA, 2021).

As vias de sinalização que desencadeiam o processo apoptótico podem ocorrer por duas vias: a extrínseca, ou via mediada por receptores de membrana e a intrínseca ou via mitocondrial, sendo que ambas as vias usam a cascata enzimática das caspases. A via de apoptose extrínseca é induzida por sinais de estresse extracelulares, e mediada por receptores transmembranares específicos (TNF). A via apoptótica intrínseca é ativada em resposta ao acúmulo de estresse oxidativo, danos na molécula de DNA, aumento do influxo de cálcio citosólico, entre outros. Essas injúrias celulares induzem aumento na permeabilidade de membrana mitocondrial, seguido de extravasamento de proteínas pro-moléculas apoptogênicas no citosol, que por sua vez contribuem para ativação das caspases. As proteínas da família BCL-2 são reguladoras essenciais dessa via, sendo classificadas em anti-apoptóticas BCL-2 (*BCL-2 apoptosis regulator*) e BCL-XL (*BCL-2 like 1*) e pró-apoptóticas BAX (*BCL-2 Associated X-protein*) e BAK (*BCL2 Antagonist/Killer 1*). Especificamente, a ativação de proteínas pró-apoptóticas formam poros na membrana mitocondrial, que liberam as proteínas tóxicas do espaço intermembrana da mitocôndria para o citosol, tais como o citocromo c. Em seguida liberado no citosol, o citocromo c forma um complexo (apoptossoma) com a proteína adaptadora APAF-1 (*Apoptotic peptidase activating factor 1*) e caspase-9. No apoptossoma, a caspase-9 é clivada e ativada, levando a ativação de outras caspases, como a caspase-3 (BAEK *et al.*, 2018; VULTURA *et al.*, 2018; XU *et al.*, 2019).

A evasão da apoptose tem sido bem estabelecida como um dos principais hallmarks do câncer, ocasionando falha no tratamento quimioterápico (HANAHAN e WEINBERG, 2000; 2011). Nesse sentido, muitas células com fenótipo MDR expressam níveis aumentados de IAPs (*Inhibitors of Apoptosis Proteins*) (VULTURA *et al.*, 2018). Rathore e colaboradores (2017), descrevem que as proteínas envolvidas na via intrínseca da apoptose, incluindo membros da família BCL-2 e o supressor tumoral p53, encontram-se comumente desregulados em células com fenótipo MDR, enquanto que os IAPs, que regulam a ativação de caspases, são frequentemente superexpressos (LIANG *et al.*, 2020). Por isso, a reativação das vias apoptóticas nas células MDR consiste em uma estratégia

promissora de defesa capaz de promover a eliminação dessas células de uma maneira eficiente (GAO *et al.*, 2017).

Estudos recentes demonstram que o gene *H2AFX* (*H2A.X Variant Histone*), um marcador de quebras em fita dupla no DNA (DSB), desempenha um papel importante na regulação da apoptose em células tumorais (RAHMANIAN *et al.*, 2018). Zang e colaboradores (2012), revelam que a baixa expressão do gene *H2AFX* pode prejudicar a sinalização de resposta ao dano no DNA, gerando crescimento de células tumorais de forma descontrolada e inibindo o processo de apoptose. (MA *et al.*, 2017). Portanto, o desenvolvimento de compostos antitumorais com potencial terapêutico contra fenótipo MDR, pode beneficiar pacientes que são refratários ou intolerantes a terapia disponível para o tratamento de LMC.

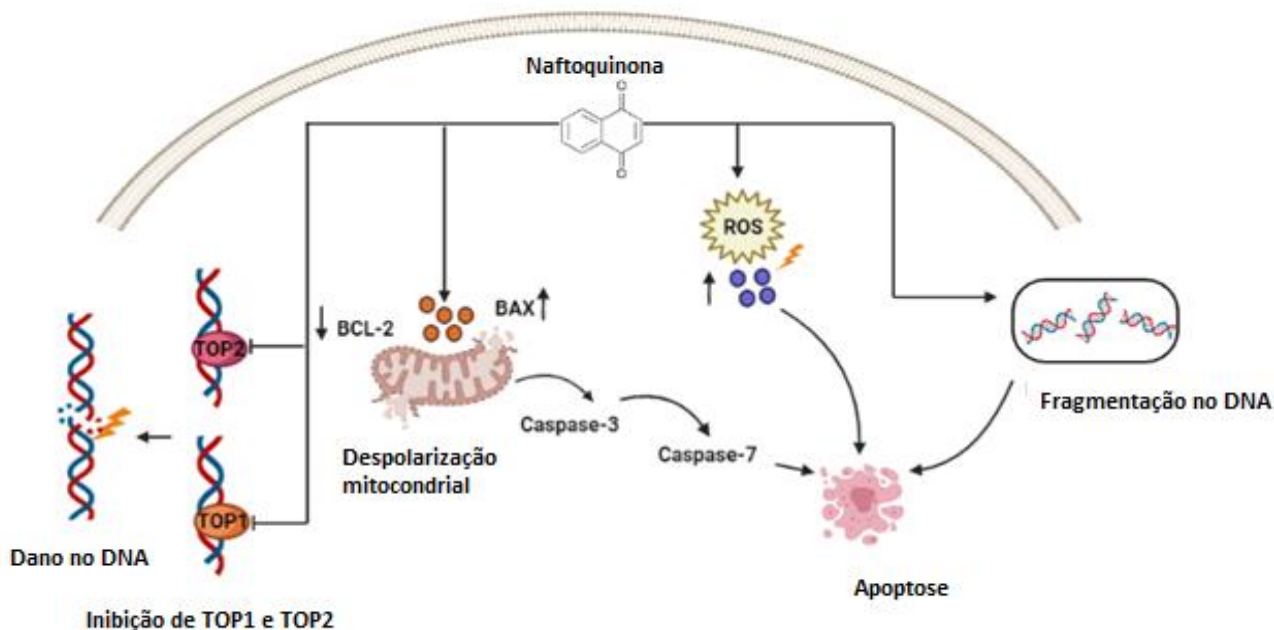
1.4 Naftoquinonas

As naftoquinonas fazem parte de uma classe importante de produtos naturais (PN) conhecidos como quinonas, que são encontradas em fungos, plantas e bactérias (MEYER *et al.*, 2021; SILVIA *et al.*, 2020; FUTURO *et al.*, 2018). Deste modo, as naftoquinonas são derivadas de juglonas naturais, considerada uma família de compostos que apresenta uma vasta aplicação no combate a doenças causadas por diversos agentes, tais como doença de chagas, infecções bacterianas, fungos, leishmaniose, além de sua pronunciada atividade antineoplásica (D'ANGELI *et al.*, 2021; HUA *et al.*, 2021; PACHECO *et al.*, 2020; SHANG *et al.*, 2018; LOUVIS *et al.*, 2016).

Em particular, os derivados 5-hidroxi-1,4-naftoquinona, apresentam uma estrutura composta por dicetônicos que provém do anel naftaleno, contendo dois grupamentos carbonila que quando estão nas posições 1,4 do anel naftaleno são chamadas *para*-naftoquinonas (MONE *et al.*, 2021; SÁNCHEZ-CALVO *et al.*, 2016;). Identificado como potente inibidor de células em crescimento, a presença de substituições de grupamentos na estrutura da naftoquinona gera novos derivados citotóxicos em diversos modelos *in vitro* de câncer. Dentre as substituições na estrutura da naftoquinona, podem ser feitas a adição de grupos funcionais no anel aromático, que tem demonstrado diferentes atividades biológicas, tais como: Inibição de DNA topoisomerase I (TOP1) e DNA topoisomerase II (TOP2), despolarização mitocondrial, fragmentação de DNA e apoptose

(Figura 3) (MONTENEGRO *et al.*, 2010; FOWLER *et al.*, 2019; WANG *et al.*, 2019; PAUL *et al.*, 2020).

Figura 3 - Diferentes atividades biológicas das naftoquinonas em linhagens tumorais.



Legenda: As naftoquinonas induzem fragmentação na molécula de DNA em linhagens tumorais. Outros mecanismos evidenciam a formação de espécies reativa de oxigênio (EROs), alteração no potencial de membrana mitocondrial e modulação na expressão dos genes *BAX* e *BCL-2*, que por sua vez levam à apoptose. Além disso, as naftoquinonas apresentam atividade inibitória das DNA topoisomerase I e DNA topoisomerase II.

Fonte: Adaptado de Loscocco *et al.*, 2019.

Wang (2019) chamam a atenção para a relevância da terapia antitumoral usando os derivados de naftoquinonas e a necessidade do desenvolvimento de novos compostos análogos, devido suas atividades antitumorais já bem descrita pela literatura. Dessa forma, os estudos de Reis e colaboradores (2013) demonstraram que atividade antileucêmica da naftoquinona (LQB-118) era mediada pelo aumento de espécies reativa de oxigênio (EROs) e inibição da atividade de TOP1 (*DNA topoisomerase I*), que consequentemente induziu danos na molécula de DNA e morte celular nas linhagens de leucemia mielóide aguda (KASUMI-1).

Várias naftoquinonas foram identificadas por inibir as topoisomerases I e II, demonstrando efeito direto no complexo DNA-topoisomerase, tal efeito é sinalizado e

ocorre a deflagração de apoptose (WANG *et al.*, 2019; PEREIRA *et al.*, 2019; LEE *et al.*, 2019). Em vista disso, as naftoquinonas como a shikonina exibiu em baixas concentrações (IC₅₀ de 2 µM) atividade de inibição de TOP1 em linhagens de glioma, demonstrando potente atividade antiproliferativa, e induzindo a célula à morte celular (BERETTA *et al.*, 2017).

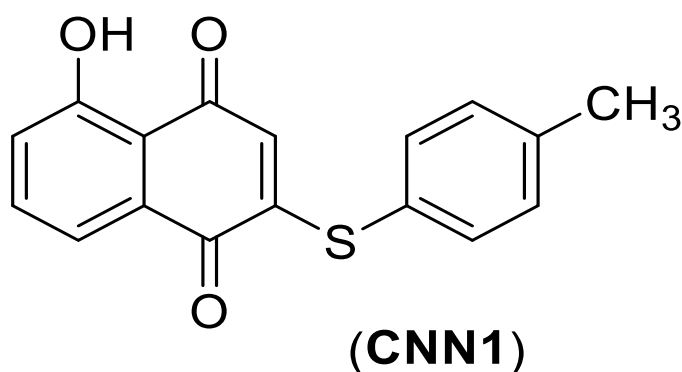
Almeida e colaboradores (2021), mostraram que a naftoquinona (CNFD) induziu despolarização mitocondrial em linhagens de câncer de mama (MCF-7), que por sua vez levou a ativação das caspase-9 e caspase-3, sugerindo que a despolarização mitocondrial causada pelo CNFD é dependente da via intrínseca de apoptose. Nesse sentido, os derivados de naftoquinonas reduzem o potencial de membrana mitocondrial (MMP), através da permeabilidade mitocondrial, resultando na ativação de caspase-3, sendo considerada característica principal da via intrínseca da apoptose (BERTHELOOT *et al.*, 2021; ALSHAMRANI *et al.*, 2021).

As naftoquinonas apresentam diversos mecanismos antitumorais que estão bem descritos na literatura. Wang e colaboradores (2018) demonstraram que as naftoquinonas (EPDMNQ e ENDMNQ) inibiram a proliferação das células de câncer de fígado (HepG-2, HUH-7 e HEP3B), e constataram aumento de células apoptóticas e também aumento significativo de espécies reativa de oxigênio (EROs), mediante a sinalização de STAT3 (*signal transducer and activator of transcription 3*) e MAPK (*mitogen-activated protein kinase*). Portanto, as naftoquinonas podem ser citotóxicas através do desequilíbrio entre a eliminação e redução de EROs, ocasionando aumento de estresse oxidativo. (MOLONEY *et al.*, 2018; SRINIVAS *et al.*, 2019).

Outras propriedades das naftoquinonas está associada a sua interação com a molécula de DNA, resultando em danos celulares, bloqueio da divisão celular, que levam até o processo de morte celular (CHANG *et al.*, 2020; CARUSILLO e MUSSOLINO, 2020). De acordo com os estudos de Crippa e colaboradores (2020), a naftoquinona (plumbagina) induziu efeitos citotóxicos e genotóxicos em linhagens de câncer de fígado (HepG-2 e C3A). Os resultados demonstraram que a plumbagina inibiu a proliferação celular e integridade de membrana. Além disso, a plumbagina foi capaz de causar acúmulo de células na fase G2/M, devido ao aumento nos níveis de dano genotóxico, sugerindo que este dano está associado com aumento de mRNA dos genes *H2AFX* (*Histone Family Member X*), *CDKN1A* (*Cyclin Dependent Kinase Inhibitor 1A*) e *GADD45A* (*Growth Arrest And DNA Damage Inducible Alpha*).

Tendo em vista o amplo espectro de atividades biológicas dos derivados das naftoquinonas, torna-se essencial a identificação de novas naftoquinonas para o tratamento da LMC. Para tanto, a naftoquinona inédita 5-hydroxy-2-(4-tolylthio)naphthalene-1,4-dione (CNN1) (**figura 4**), que apresenta depósito de patente no INPI (Instituto Nacional da Propriedade Industrial), foi submetida no NIT-UFC como patente de invenção, apresentando processo de número: BR 10 2018 007385-0, torna-se considerável como estratégia terapêutica para a doença.

Figura 4 - Estrutura química da naftoquinona 5-hydroxy-2-(4-tolylthio)naphthalene-1,4-dione (CNN1).



Fonte: elaborada pelo autora.

Dessa forma, o desenvolvimento e descoberta de novas moléculas com propriedades anticâncer, ainda se faz necessária, pois ainda ocorrem falhas no tratamento de primeira linha disponível na LMC. De posse desse conhecimento, o surgimento e caracterização de moléculas que tenham atividade antitumoral em células com fenótipo resistente ao tratamento na LMC, e também baixos efeitos tóxicos durante a terapia, são de grande valia para o âmbito clínico.

2 OBJETIVOS

2.1 Objetivo geral

Caracterizar através de estudos *in silico* e *in vitro* o efeito antitumoral da 1,4-naftoquinona (CNN1) em linhagens de Leucemia Mielóide Crônica resistente à quimioterapia.

2.2 Objetivos específicos

- Avaliar o potencial citotóxico das naftoquinonas em linhagens de leucemia mielóide crônica e tumores sólidos;
- Caracterizar *in silico* o perfil farmacocinético da molécula CNN1;
- Buscar e selecionar alvos biológicos relacionados com aplicabilidade terapêutica oncológica com o auxílio de ferramentas computacionais, e
- Verificar a interação do alvo biológico e ligante por docagem molecular;
- Avaliar o efeito da CNN1 no ciclo celular em K-562 e FEPS;
- Avaliar o efeito genotóxico da molécula CNN1 em K-562 e FEPS;
- Avaliar o mecanismo de morte celular (apoptose ou necrose) desencadeada pela CNN1 nas linhagens K-562 e FEPS;
- Verificar se a CNN1 modula a expressão dos genes *H2AFX*, *TOP1*, *ABCB1*, *BCR-ABL1*.

3 MATERIAL E MÉTODOS

3.1 Quimioterápicos

Os quimioterápicos Mesilato de Imatinibe (MI) e metabólito ativo do irinotecano (SN-38) foram adquiridos comercialmente através da Sigma Aldrich (St Louis, MO, EUA). As 16 naftoquinonas foram sintetizadas no Instituto de Química na Universidade Federal Fluminense. Cada molécula foi dissolvida em DMSO para obtenção de uma concentração de 1 mM.

3.2 Estudos *in silico*

- Princípio do teste

O desenvolvimento de novos fármacos é um processo laborioso, multiprofissional e que demanda anos de pesquisa. O sistema de descoberta passa por uma triagem inicial com muitos compostos ao longo de 10 anos a um custo médio que supera 350 milhões de dólares (TARI, 2012). Dessa forma, as metodologias atuais aliam conhecimentos teóricos e computacionais para a descoberta mais eficiente em termos de custos e de menor uso de recursos (THAFAR *et al.*, 2019).

3.2.1 Desenho das estruturas e preparação do ligante

Para os estudos *in silico*, a estrutura química da molécula CNN1 foi desenhada no programa MarvinSketch®, para obtenção de sua estrutura bidimensional (2D). Em seguida, foi gerado o *SMILES* da molécula CNN1 (*Simplified Molecular Input Line Entry Specification*), sendo um código referente da molécula. Com o uso do programa Avogadro, a estrutura 2D informada pelo *SMILES* foi convertida em um arquivo contendo as coordenadas x, y e z de cada átomo da molécula, representando o esqueleto tridimensional (3D). Logo após, a molécula CNN1 foi submetida a otimização geométrica do Avogadro e salva em “.mol2”. Posteriormente, o *Auto Dock Tools* foi utilizado para converter o arquivo da estrutura para o respectivo formato do *docking* no Vina 1.1.2 (“.pdbqt”).

3.2.2 Farmacocinética *in silico*

Para buscar informações sobre os parâmetros de absorção, distribuição, metabolização, excreção e toxicidade (ADME/T) da molécula CNN1, utilizamos o software admetSAR considerado uma ferramenta gratuita para a previsão de propriedades químicas. Estas informações são importantes para a condução de estudos que necessitam de uma avaliação de risco para humanos. O método da ferramenta é baseado em 27 QSARderivados de 210.000 informações ADME/T, que comporta aproximadamente mais de 96.000 compostos exclusivos. Para a realização deste estudo, o *SMILES* da molécula CNN1 foi submetido ao servidor online admetSAR (<http://lmmd.ecust.edu.cn/admetsar1>).

3.2.3 Farmacodinâmica *in silico*

Para a avaliação da farmacodinâmica *in silico* da naftoquinona CNN1 foi utilizado o programa *SwissTargetPrediction*, disponível no site <http://www.swisstargetprediction.ch/>, através desse programa é possível comparar a similaridade da CNN1 com uma biblioteca de 280.000 composto ativos, em mais de 2000 alvos farmacológico, em organismos diferentes (GFELLER *et al.*, 2016; SCHNEIDE; SCHNEIDER, 2017). Para tanto, o *SMILES* da CNN1 foi submetido ao servidor, e os alvos para a naftoquinona CNN1 foram classificados a partir de uma função de probabilidade própria do sistema.

3.2.4 Preparação do alvo DNA topoisomerase I (TOP1)

Após a escolha da proteína DNA topoisomerase I (TOP1) que apresenta o código 1K4T (2.10Å), foi realizada uma busca da estrutura cristalográfica completa da proteína para preparação da docagem molecular. O banco de dados PDB (<https://www.rcsb.org/>) foi utilizado como ferramenta de busca e download da estrutura da proteína no formato “pdb”. Posteriormente, para visualização molecular foi utilizado o software PyMol, e também para a manipulação dos arquivos em nível de imagens de qualidade 3D, com intuito de remover moléculas de água, outros reagentes e adicionar os átomos de hidrogênio.

3.2.5 Docagem molecular

Para o estudo das interações com a estrutura escolhida, o espaço delimitado para a metodologia de docagem, ou seja, o *grid box* para o programa Vina, foi construído com as especificações expostas na tabela 2. Para as configurações do Vina, o programa *AutoDock Tools* (ADT) foi utilizado para visualização do tamanho e centro do espaço tridimensional de busca (*grid box*). Além das coordenadas do centro do *grid box* nos eixos x, y e z, e do tamanho desses eixos, o parâmetro de *exhaustiveness* (exaustividade) também foi definido no arquivo de configuração. O valor padrão para a exaustividade é de 8, mas o valor escolhido para este estudo foi de 25, permitindo um maior tempo de busca da conformação e aumentando a probabilidade de encaixe.

Tabela 2 - Especificações para utilização do programa Vina.

Enzima	PDB	Coordenadas			Dimensões	Espaçamento
TOP1	1K4T	21.291	-3.698	27.952	13,5x13,5x11,25	1

Fonte: elaborada pela autora.

3.3 Estudos *in vitro*

3.3.1 Linhagens Celulares

Para o presente trabalho foram usadas linhagens hematológicas e de tumores sólidos (**Tabela 3**). As linhagens de Leucemia mielóide crônica K-562, K562-Lucena e FEPS foram cedidas gentilmente pela profa. Dra. Vivian M. Rumjanek da Universidade Federal do Rio de Janeiro (RUMJANEK *et al.*, 2013) foram mantidas em cultura em meio RPMI 1640 suplementado com 10% de Soro Fetal Bovino (SFB), estufa com atmosfera de 5% de CO₂ a 37°C. Diariamente, foi acompanhado o crescimento celular com a utilização do microscópio de inversão. O meio foi trocado sempre que o crescimento celular atingiu a confluência. Adicionalmente, as células K562-Lucena e FEPS, o meio foi suplementado com sulfato de Vincristina (VCR) na concentração final de 60 nM e Daunorrubicina (DNR) na concentração de 466 nM, respectivamente.

Tabela 3 - Linhagens humanas utilizadas no presente trabalho

Linhagem	Tipo de câncer	Origem	Referências
K-562	Leucemia mielóide crônica - quimiossensível	Humana	Morceau <i>et al.</i> 2008
K-562- Lucena-1	Leucemia mielóide crônica - quimioresistente - superexpressão (<i>ABCB1</i>)	Humana	Rumjanek <i>et al.</i> 2013
FEPS	Leucemia mielóide crônica - quimioresistente - superexpressão (<i>ABCB1</i> - <i>ABCCI</i>)	Humana	Rumjanek <i>et al.</i> 2013
HL-60	Leucemia promielocítica aguda	Humana	Kulyte <i>et al.</i> 2002
SK-MEL-19	Melanoma	Humana	Fecker <i>et al.</i> 2005
AGP-01	Ascite maligna gástrica	Humana	Leal <i>et al.</i> 2009
ACP-02	Adenocarcinoma gástrico	Humana	Leal <i>et al.</i> 2009
MRC-5	Fibroblasto de pulmão não maligna	Humana	Derouich <i>et al.</i> 2001

Fonte: elaborada pela autora.

3.3.2 Ensaio de citotoxicidade por Alamar Blue

- Princípio do teste

O teste de citotoxicidade por *Alamar blue* é um excelente indicador para avaliação de viabilidade celular. O *Alamar Blue* é um composto denominado de resazurina que sofre oxidação em resposta à redução metabólica celular, chegando até sua forma reduzida (resorufina), com características de intensa fluorescência na cor rosa, sendo assim, a intensidade da fluorescência produzida é proporcional ao número de células vivas (AHMED *et al.*, 1994).

- Delineamento experimental

As células foram semeadas em placas de 96 poços com 5×10^3 células/poço (100 μ L/poço) e mantidas na estufa com atmosfera de 5% de CO₂ a 37°C por 24 h. Os

compostos foram diluídos em DMSO (0,02%) para a obtenção da curva de concentração com oito pontos a partir de uma diluição seriada na razão de 1:5, adicionada na placa de 96 poços (100 µL/poço) para medir a atividade proliferativa por 72 horas. Todas as concentrações foram testadas em triplicata para cada linhagem. 3 h antes de finalizar o tratamento foi adicionado 20 µL do Alamar blue (0,2 mg/ml), posteriormente foi feita a leitura das placas em leitor de microplaca, nos comprimentos de onda de excitação de 530 nm e emissão de 590 nm. Após a obtenção dos resultados de citotoxicidade, foi escolhida a naftoquinona CNN1 nas linhagens K-562 e FEPS. O índice de seletividade das naftoquinonas foi calculado utilizando a fórmula abaixo (BERNING *et al.*, 2019).

$$IS = CC50 \text{ células não tumorais} / CI50 \text{ células tumorais}$$

3.3.3 Ensaio de proliferação celular utilizando Azul de Tripán

- Princípio do teste

O corante azul de tripan é um método bastante utilizado para determinar a viabilidade celular por meio da integridade da membrana plasmática. Este corante penetra nas células não viáveis deixando-as com coloração azulada e as células viáveis permanecem não coradas. (STROBER, 2015).

- Delineamento experimental

As células foram plaqueadas em placas de 12 poços na concentração de 5×10^3 células/poço e após 24 horas de plaqueamento. Para determinar o tempo de citotoxicidade as células foram tratadas com CNN1 nas concentrações de 0,1 µM; 0,2 µM e 2,0 µM em triplicata, por 18 h nas concentrações. Após o tempo determinado as células foram contadas utilizando o corante azul de tripan. Para tanto, foi utilizada a fórmula da curva de crescimento celular, seguindo o protocolo de Strober (2015).

3.3.4 Avaliação da Integridade de membrana

As células (K-562 e FEPS) foram cultivadas em placas de 12 poços na densidade de 5×10^3 células/poço e mantidas por 24 horas na estufa com atmosfera de 5% de CO₂ a 37°C. Após esse período, foi realizado o tratamento de 24 h com a molécula CNN1 (0,1 μ M) e os controles positivos MI (0,1 μ M e 10 μ M) e SN-38 (0,1 μ M). O controle negativo foi tratado apenas com o solvente DMSO (0,02%). Posteriormente, as células foram incubadas no escuro com 200 μ l de IP (iodeto de propídeo) na concentração de 1 μ g/ml em seguida as células foram centrifugadas a 2000 RPM por 5 minutos. Depois da incubação com IP as células foram ressuspensas em PBS. Dez mil eventos foram analisados por citometria de fluxo (BD FACS verse™) (AHMED *et al.*, 2009).

3.3.5 Avaliação do potencial de membrana mitocondrial ($\Delta\Psi_m$)

- Princípio do teste

Na ordem de analisar o efeito da molécula CNN1 sobre o potencial de membrana mitocondrial ($\Delta\Psi_m$), foi utilizado o fluorocromo Rodamina 123 (Rho123). Este ensaio consiste na marcação mitocondrial em células vivas por Rho123, pelo fato do corante ser considerado um fluorocromo catiônico (carregado positivamente), o mesmo é atraído pelo potencial elétrico negativo presente na membrana mitocondrial, incorporando-se no interior das organelas, emitindo fluorescência. Assim, uma diminuição da fluorescência desta sonda estaria apontando uma maior despolarização da membrana mitocondrial ou inatividade desta organela. O ensaio foi feito conforme está descrito em Pétriz e García-López (1997).

- Delineamento experimental

As células (K-562 e FEPS) foram cultivadas em placas de 6 poços numa densidade de 5×10^3 células/poço e mantidas por 24 horas na estufa com atmosfera de 5%

de CO₂ a 37°C. Posteriormente as células foram tratadas por 24 h com a molécula CNN1. Após esse período, foi realizado o tratamento de 24 h com a molécula CNN1 (0,1 µM) e os controles positivos MI (0,1 µM e 10 µM) e SN-38 (0,1 µM). O controle negativo foi tratado apenas com o solvente DMSO (0,02%). Ao final do tempo, foi adicionado 1µg/mL de corante Rodamina 123 (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, EUA). Após 1 hora de incubação, as células foram lavadas com PBS 1x. O efluxo celular da rodamina 123 foi monitorado pelo decréscimo da fluorescência da célula. Dez mil eventos foram lidos no citometro de fluxo (BD FACSVerser™), seguindo o protocolo de Pétriz e García-López (1997).

3.3.6 Avaliação de fragmentação no DNA e ciclo celular por citometria de fluxo

- Princípio do teste

O ciclo celular pode ser dividido pelas fases: G₁, S, G₂, M e G₀. Na fase G₀, as células encontram-se em repouso. Quando as células passam para a fase G₁, ocorre a preparação para a divisão celular, além de preparar o DNA para a síntese, que irá ocorrer na fase S. Na fase G₂ haverá a síntese de componentes para a mitose e após a divisão celular, com a formação de duas células filhas, as células voltam a entrar em G₀. Entretanto, células tumorais, após terminarem seu processo de replicação, não retornam para G₀ e assim que a fase M termina a fase G₁ é recomeçada (WENZEL *et al.*, 2018).

A citometria de fluxo aplicada no estudo de ciclo celular registra os parâmetros cinéticos da população celular, revelando o índice de DNA, aploidia, a fração de proliferação celular, e a porcentagem de células encontradas nas fases G₀/G₁, S e G₂/M. Deste modo, indicando parâmetros uni e multivariável para prognósticos e possíveis rumos terapêuticos (TÓKES *et al.*, 2020).

- Delineamento experimental

As células (K-562 e FEPS) foram cultivadas em placas de 6 poços na densidade de 5 x 10³ células/poço e mantidas por 24 horas na estufa com atmosfera de 5% de CO₂ a 37°C. Após esse período, foi realizado o tratamento de 24 h com a molécula CNN1 (0,1 µM) e os controles positivos MI (0,1 µM e 10 µM) e SN-38 (0,1 µM). O

controle negativo foi tratado apenas com o solvente DMSO (0,02%). Posteriormente ao término do tratamento, as células foram fixadas com álcool 80% a 4°C em tubos de 1,5 mL. Passados 30 minutos, as células foram centrifugadas a 2000 rpm por 5 minutos para retirada do sobrenadante. Em seguida, foram lavadas com PBS 1x e incubadas em solução de Triton-X (0,001%), após as células foram centrifugadas a 2000 rpm por 5 minutos. No final desse tempo, o iodeto de propídio foi adicionado diretamente na solução de modo que fique na concentração final de 50 µg/mL. Dez mil eventos foram analisados por citometria de fluxo (BD FACSverse™) (WENZEL *et al.*, 2018).

3.3.7 Ensaio do cometa versão alcalina

- Princípio do teste

Os estudos de genotoxicidade *in vitro* são ferramentas sensíveis para verificação de lesões no DNA e do potencial de carcinogenicidade de agentes químicos ou físicos. (LU *et al.*, 2017). Este ensaio vem sendo proposto para análises genotóxicas, devido a sua peculiaridade e vantagem quando comparado a outros testes para detectar substâncias com potencial genotóxico. Além disso, o ensaio do cometa alcançou o status de teste padrão em uma bateria de análises usadas para avaliar a segurança de novos fármacos (COLLINS, 2015).

Portanto, o teste do cometa consiste na migração das moléculas de DNA submetidos à eletroforese após lise das membranas celulares e da digestão de nucleoproteínas, incluindo as histonas. Caso existam quebras na molécula de DNA causado pela substância em estudo, os pequenos fragmentos migram mais rápido do que os grandes fragmentos, formando um halo ou cauda (FAUST *et al.*, 2018).

- Delineamento experimental

As células K-562, FEPS e PBMC (*peripheral blood mononuclear cell*) foram semeadas em placas de 6 poços a uma densidade de 50×10^3 células/poço e mantidas por 24 horas na estufa com atmosfera de 5% de CO₂ a 37°C. Após 24 h horas de cultivo, foi realizado o tratamento com a molécula CNN1 na concentração de 0,1 µM por 3 horas,

sendo o controle negativo tratado apenas com o solvente DMSO (0,02%) e o controle positivo com SN-38 (0,1 μ M) e mesisalo. Após o tratamento, as células foram centrifugadas por 10 minutos a 1500 rpm. O sobrenadante foi descartado e as células foram ressuspensas em aproximadamente 20 μ L, da qual será retirado 15 μ L de suspensão e misturados a 300 μ L de agarose de baixo ponto de fusão a 0,8%. Em seguida, a suspensão de células foi adicionada rapidamente sobre a primeira camada de agarose presente na lâmina, em seguida foi coberta com a lamínula (24x60mm) e mantida em baixa temperatura, até o processo de solidificação da agarose. Após, a lamínula foi retirada e a lâmina mergulhada na posição vertical em solução de lise (2,5M NaCl, 100 mM EDTA , 10 mM Tris, 1% Triton X-100, 10% DMSO e 1% N-Lauroyl sarcosine; pH 10) a 4°C e protegida da luz por um período de 48 horas. Em seguida, as lâminas foram submetidas a solução de eletroforese (1 mM EDTA, 300 mM NaOH; pH \geq 13).

Na próxima etapa, as lâminas foram mantidas em repouso no tampão de lise submersas na cuba de corrida por 20 minutos, antes de dar início à eletroforese, a fim de se permitir o desenovelamento do DNA. Após este processo, a eletroforese foi iniciada em luz baixa por 20 minutos, usando 34 V e uma corrente de 300 mA. Após a corrida eletroforética, as lâminas foram retiradas e mergulhadas rapidamente em H₂O destilada gelada (4°C) para a remoção da solução de eletroforese, sendo necessária duas lavagens. Após as lâminas foram fixadas mergulhadas em etanol absoluto por 3 minutos. As células foram contadas em microscópio de fluorescência e foi adicionada 20 μ L de iodeto de propídeo (20 μ g/ mL).

Em seguida, foi realizada a análise de acordo com o padrão de escores previamente determinados pelo tamanho e intensidade da cauda do cometa. (BURLINSON *et al.*, 2007). Foram contados 100 cometas/lâmina e assim foram classificados de acordo com a percentagem de DNA na cauda do cometa, indicando o grau de quebra na molécula de DNA. Onde, 0 = sem danos (<5%), 1 = baixo nível de danos (5-20%), 2 = médio nível de danos (20-40%), 3 = alto nível de danos (50%- 90%) e 4 = dano total (>90%).

Posteriormente, a contagem das células nucleadas e atribuição de escores nas lâminas de cada amostra foi estabelecido um índice de dano (ID). O cálculo do índice de dano foi realizado através da soma dos produtos do escore como número de danos respectivo de acordo com cada nível, a partir da seguinte fórmula (BURLINSON *et al.*, 2007).

$$ID: (0 \times n) + (1 \times n) + (2 \times n) + (3 \times n) + (4 \times n)$$

Onde, ID é o índice de dano, n é a quantidade de danos obtida por escore.

3.3.7.1 Isolamento de células PBMC (*Peripheral blood mononuclear cells*)

As células PBMC (*Peripheral blood mononuclear cells*) foram coletadas de doadores saudáveis, indivíduos não fumantes (duas mulheres e dois homens, com idades entre 20 e 30 anos), após assinatura do termo de consentimento para participação no estudo, que foi aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa (registro número 52352121.0.0000.5054). As amostras de sangue foram coletadas baseado no protocolo Fenech (2012). As células foram isolados usando o gradiente de densidade Histopaque-1077 (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, EUA) para o ensaio do cometa versão alcalina. Foram semeados 1×10^6 de células PBMC em placas de seis poços em meio (RPMI 1640, Gibco®, Nova York, NY, EUA), suplementado com 10% de soro fetal bovino (FBS, Gibco®), 100 U/mL de penicilina, 100 µg/mL de estreptomicina (Gibco®) e fitohemaglutinina A (PHA; Gibco-Invitrogen, Waltham, MA, EUA) por 20 h a 37 °C.

3.3.8 Detecção de células apoptóticas e necróticas por marcação com Anexina V/iodeto de propídeo

Este ensaio é utilizado para determinar a população de células em apoptose tanto *in vivo* quanto *in vitro*. Assim sendo, a partir destes marcadores é possível identificar a proporção de células vivas (anexina V- /PI-), células em estágio recente de apoptose (anexina V+ /PI-) células em estágio tardio de apoptose ou em necrose secundária (anexina V+ /PI+) e células em necrose (anexina V- /PI+). Portanto, através da marcação de anexina V, é possível detectar os estágios iniciais da apoptose, enquanto o iodeto de propídeo permite avaliar os momentos finais deste processo de morte celular por citometria de fluxo (FAUST *et al.*, 2018).

- Delineamento experimental

As células (K-562 e FEPS) foram cultivadas em placas de 6 poços na densidade de 5×10^3 células/poço e mantidas por 24 horas na estufa com atmosfera de 5% de CO₂ a 37°C. Após esse período, foi realizado o tratamento de 24 h com a molécula CNN1 (0,1 µM) e os controles positivos MI (0,1 µM e 10 µM) e SN-38 (0,1 µM). O controle negativo foi tratado apenas com o solvente DMSO (0,02%). Em seguida, as células foram ressuspendidas no 1X (*Binding Buffer*®) no volume de 400 µL e foi adicionado 5 µL de Anexina V e 5 µL o iodeto de propídio (1µg/mL) por 20 minutos de incubação. Posteriormente, as células foram ressuspendidas em PBS e dez mil eventos foram analisados por citometria de fluxo (BD FACSverse™) (WENZEL *et al.*, 2018).

3.3.9 Análise diferencial morfológica

- Princípio do teste

O método de coloração com kit Panótico (LaborClin® PR, Brasil), baseia-se na revelação diferencial das células, e permite diferenciar células viáveis daquelas em processo de morte por apoptose ou necrose (CHANG *et al.*, 2019).

- Delineamento experimental

As células (K-562 e FEPS) foram semeadas em placas de 12 poços com densidade de 50×10^3 células/poço e foram mantidas por 24 horas na estufa com atmosfera de 5% de CO₂. Após este período, foi realizado o tratamento com a CNN1 (0,1 µM) e controle positivo SN-38 (0,1 µM). O controle negativo recebeu o tratamento com apenas o solvente DMSO (0,02%) . Após a incubação, as células foram centrifugadas por 10 minutos a 1500 rpm. O sobrenadante foi descartado e as células foram submetidas a citocentrífuga, e foram coradas com kit Panótico (LaborClin® PR, Brasil). A análise foi realizada no aumento de 40x em microscópio de luz (Motic® BA310, Canadá) (CHANG *et al.*, 2019).

3.3.10 Expressão dos genes *TOP1*, *H2AFX*, *ABCBI* e *BCR-ABL1* por RT-qPCR (Real-time reverse transcription Polymerase Chain Reaction)

- Delineamento experimental

As células (K-562 e FEPS) foram cultivadas em placas de 6 poços numa densidade de 50×10^3 células/poço e mantidas por 24 horas na estufa com atmosfera de 5% de CO₂ a 37°C. Depois desse período, foi realizado o tratamento no tempo não citotóxico de 18 horas com CNN1 na concentração de 0,1 µM. O controle negativo foi tratado apenas com o solvente DMSO (0,02%). Ao final do tratamento, o RNA foi extraído usando TRIzol® (Life Technologies) de acordo com as instruções do fabricante, a partir de 20 ng de RNA foi realizada a transcrição reversa para obter o DNA complementar usando o kit *High Capacity cDNA Reverse Transcriptase* (Life Technologies). A concentração e a qualidade do RNA foram determinadas usando o espectrofotômetro NanoDrop (Kisker, Germany).

O gene alvo selecionado para a avaliação da expressão foi *TOP1* (*DNA Topoisomerase I*) Hs 01080056_m1, *ABCBI* (*ATP-binding cassette sub-family B member1*) Hs 01290056_m1, *BCR-ABL1* (*Breakpoint cluster region - Abelson oncogene*), Hs03024541_ft, e o gene endógeno controle foi *ABL* (Hs 999999002_mH). O qPCR em tempo real foi feito usando o equipamento *ABI 7500 Real-Time PCR system* (Applied Biosystems®) e o sistema de detecção TaqMan® Gene Expression Assay (Life technologies, EUA). Para o gene *H2AFX* (*H2A.X variante histone*) e o endógeno *ACBT* (*Actin Beta*) foi realizado o qPCR pelo kit *Fast SybrGreen* (Applied Biosystems, EUA), e as sequências de primers foram desenhados pelo programa *Oligo Perfect Designer* (Invitrogen) e estão listados na tabela 4.

Ressalta-se que ambos os métodos foram feitos no *QuantStudio5 Real-Time PCR system* (Applied Biosystems®). Todos os experimentos de PCR em tempo real seguiram as exigências feitas por *Minimum Information for Publication of Quantitative Real-Time PCR Experiments- MIQE Guidelines* (BUSTIN *et al.*, 2009). O nível de expressão foi calculado usando o método $\Delta\Delta C_t$, normalizando as amostras em relação ao gene endógeno utilizado (SCHMITTGEN; LIVAK, 2008).

Tabela 4 - Sequência de oligonucleotídeos usados no RT-qPCR.

Gene	Sequência (5' – 3')	Sequência de referência NCBI
<i>H2AFX</i>	F- ACCAGCACAAGTCGGTTA	NM_002105.3
	R - AAGGTTCTAGTCGTGGAAGG	
<i>ACTB</i> ¹	F- CTGGAACGGTGAAGGTGACA	NM_001101.5
	R- AAGGGACTTCCTGTAACAACGCA	

¹ o gene *ACTB* foi usado como gene referência.

Fonte: elaborada pela autora.

3.4 Análise estatística

A análise do ensaio de citotoxicidade por *Alamar blue* foi realizada através do log do inibidor *versus* log da resposta normalizada para determinar a CI50 a partir da regressão não-linear, utilizando o programa GraphPad Prism. Os dados dos demais ensaios foram analisados a partir da média e do desvio padrão de três experimentos independentes. Todos os grupos de amostras foram testados quanto à normalidade usando o teste Kolmogorov-Smirnov. Para verificar a ocorrência de diferença significativa os diferentes grupos e condições experimentais, os dados foram comparados por análise de variância (ANOVA) seguido do teste de Bonferroni ou Tukey, *t*-teste com nível de significância de 95% ($p < 0,05$).

4 RESULTADOS

4.1 A molécula CNN1 mostrou atividade citotóxica seletiva para as linhagens de leucemia

Para determinar se as naftoquinonas exibiam atividade antitumoral contra as linhagens de tumores sólidos e linhagens de leucemia, foi realizado um teste inicial de citotoxicidade por *Alamar Blue* após 72 h de tratamento para determinação da CI50 (**Tabela 5**). Todas as naftoquinonas estudadas demonstraram elevada citotoxicidade preferencialmente para as diferentes linhagens de leucemia, HL60, K-562 e K-562-Lucena 1. Interessantemente, algumas naftoquinonas tiveram maior atividade citotóxica para a linhagem quimiorresistente K-562-Lucena 1 (11a, 11b, 11c, 11d, 11e, 12a, 12b e 12f), com

CI₅₀ abaixo de 1 µM. Por outro lado, não foi observada citotoxicidade para as linhagens ACP-02, AGP-01 e SK-MEL-19. A naftoquinona CNN1 é representada pela “11a” na tabela a seguir.

Tabela 5 - Atividade citotóxica *in vitro* das naftoquinonas.

Compostos	CI ₅₀ µM						
	MRC-5	HL-60	IS	K-562	IS	K-562Lucenz	IS
11a	15,46 (8,88 – 17,90)	0,82 (0,62 – 1,09)	18,85	1,12 (0,90 – 1,38)	13,80	0,90 (0,42 – 1,56)	17,17
11b	8,12 (5,45 – 11,89)	0,88 (0,47 – 1,62)	10,36	0,88 (0,73 – 1,06)	10,36	0,31 (0,25 – 0,38)	24,60
11c	8,10 (5,57 – 12,94)	2,16 (1,80 – 2,59)	4,67	2,53 (2,15 – 2,97)	3,99	0,96 (0,68 – 1,36)	10,52
11d	9,98 (7,32 – 14,02)	0,77 (0,69 – 0,91)	12,96	1,28 (1,14 – 1,45)	9,89	0,41 (0,34 – 0,96)	24,34
11e	12,15 (6,52 – 30,67)	0,73 (0,58 – 0,93)	16,64	0,34 (0,26 – 0,42)	35,73	0,80 (0,67 – 0,94)	15,18
11f	14,05 (7,61 – 20,19)	0,72 (0,61 – 0,84)	19,51	0,35 (0,28 – 0,48)	40,14	1,04 (0,85 – 1,25)	13,50
11g	11,44 (5,72 – 15,29)	1,53 (1,36 – 1,73)	7,47	0,64 (0,49 – 0,84)	17,87	1,61 (1,26 – 2,04)	7,10
11h	10,15 (5,31 – 17,45)	2,20 (1,70 – 2,85)	4,61	0,89 (0,73 – 1,07)	11,40	2,06 (1,78 – 2,37)	4,92
12a	7,15 (5,32 – 14,87)	0,59 (0,48 – 0,72)	12,11	0,88 (0,76 – 1,02)	8,12	0,32 (0,34 – 0,60)	22,34
12b	10,16 (5,52 – 12,91)	1,56 (1,05 – 2,32)	6,51	1,13 (0,93 – 1,37)	8,99	0,48 (0,33 – 0,70)	21,14
12c	10,11 (7,31 – 11,30)	1,21 (1,02 – 1,45)	8,35	1,31 (1,14 – 1,51)	7,71	0,52 (0,68 – 1,36)	19,44
12d	13,75 (6,78 – 30,67)	0,81 (0,59 – 1,10)	16,97	0,44 (0,34 – 0,57)	31,25	1,21 (0,98 – 1,48)	11,36
12e	11,02 (5,10 – 14,21)	0,89 (0,73 – 1,08)	12,42	0,43 (0,32 – 0,55)	25,72	1,08 (0,95 – 1,22)	10,24
12f	9,34 (8,89 – 10,28)	1,00 (0,77 – 1,30)	9,34	0,34 (0,27 – 0,44)	27,47	0,96 (0,73 – 1,24)	9,72
12g	10,63 (9,31 – 13,12)	1,39 (0,86 – 2,24)	7,64	0,48 (0,40 – 0,56)	22,14	1,72 (1,48 – 2,0)	6,71
12h	10,71	2,14	5,00	0,96	11,15	2,18	4,91

	(7,76 – 16,56)	(1,69 – 2,75)		(0,74 – 1,23)		(1,90 – 2,51)	
Doxo ¹	0,24	0,05	4,8	0,14	1,71	0,21	1,14
	(0,16 – 0,25)	(0,02 – 0,12)		(0,10 – 0,19)		(0,13 – 0,32)	

Legenda: Valores de CI_{50} (μM), intervalo de confiança de 95% e índice de seletividade baseado no ensaio de citotoxicidade por *Alamar Blue* em linhagens de leucemia e linhagem não neoplásica após 72 horas de tratamento. Os dados são apresentados foram obtidos por regressão não linear, foram realizados três experimentos independentes. ¹ Doxorubicina (doxo) foi usada como controle positivo do experimento.

Fonte: elaborada pela autora.

Logo após, foi proposto a avaliação da atividade citotóxica das 16 naftoquinonas contra a linhagem não neoplásica humana de fibroplasto de pulmão (MRC-5), os dados revelaram que a naftoquinona CNN1 destacou-se com CI_{50} de 15,46 μM após 72 h de tratamento, demonstrando que essa molécula apresenta menor atividade citotóxica na linhagem não neoplásica quando comparado com as outras naftoquinonas. Baseado nestes resultados, apenas a molécula CNN1 foi selecionada para os testes subsequentes contra a linhagem quimiorresistente FEPS, onde foi demonstrado excelente atividade citotóxica com a CI_{50} de 0,60 μM (Tabela 6).

Tabela 6 - Atividade citotóxica *in vitro* das naftoquinonas nas linhagens de leucemia.

Compostos	CI_{50} μM^a			
	K-562	K-562-Lucena 1	FEPS	IS
CNN1	1,12 (0,90 – 1,38)	0,90 (0,34 – 1,27)	0,60 (0,48 – 0,80)	27,76
MI	0,03 (0,02 – 0,05)	4,97 (3,69 – 5,70)	9,66 (8,45 – 11,1)	-
SN-38	0,03 (0,01 – 0,08)	-	0,50 (0,12 – 0,78)	-

Legenda: Valores de CI_{50} (μM), intervalo de confiança de 95% e índice de seletividade baseado no ensaio de citotoxicidade por *Alamar Blue* em linhagens de leucemia após 72 horas de tratamento. Mesilato de imatinibe (MI).

Fonte: elaborada pela autora.

Em seguida, foi realizado o índice de seletividade (IS) da molécula CNN1 conforme a fórmula expressa no item 3.3.2. Dessa forma, levando em consideração a razão entre a CI_{50} na linhagem não neoplásica MRC-5 e na linhagem quimiorresistente FEPS que foram, respectivamente, 15,46 μM e 0,60 μM , tem se o IS de 25,76, sendo assim quanto

mais distante de 1,0 for a razão, maior é a seletividade da molécula avaliada para linhagem tumoral, mostrando redução de efeitos tóxicos.

Baseado nesses achados, a molécula CNN1 foi a mais promissora, sendo, portanto escolhida para os experimentos seguintes *in silico* e *in vitro*. Para os experimentos *in vitro* foram avaliados dois controles positivos: Mesilato de Imatinibe (inibidor tirosina quinase) e SN-38 (inibidor de DNA topoisomerase I). Os dados demonstraram nas linhagens K-562 e FEPS após o tratamento de 72 h com o mesilato de imatinibe (MI) a CI_{50} de 0,03 μ M e CI_{50} 9,66 μ M, respectivamente. Os resultados para o composto SN-38 nas linhagens K-562 e FEPS revelaram a CI_{50} de 0,03 μ M e CI_{50} 0,50 μ M, respectivamente.

4.2 Perfil farmacocinético da molécula CNN1

Diante dos resultados *in vitro* promissores da molécula CNN1, foram realizados estudos *in silico* para compreender os processos de absorção, distribuição, metabolismo, excreção e toxicidade (ADME/T) da molécula CNN1, através do servidor online admetSAR. Os resultados de ADME/T que apresentam uma função de probabilidade estão resumidos na tabela 7. Na seção de absorção, a molécula CNN1 foi considerada permeável para a linhagem de células epiteliais humanas (Caco-2) e também foi positiva para absorção intestinal humana (AIH), sugerindo que molécula CNN1 apresentam potência para permeabilidade intestinal e pode ser administrada por via oral. Outros resultados ainda sobre as características de absorção, foi que a molécula CNN1 não é inibidora da glicoproteína-P (P-gp), e não foi considerada substrato para P-gp. No perfil quanto a distribuição, a molécula CNN1 apresenta permeabilidade à barreira hematoencefálica (BHE).

No que diz respeito ao metabolismo, a molécula CNN1 foi considerada inibidora das enzimas CYP450 1A2, CYP450 2C9 e CYP450 2C19. Por outro lado, a CNN1 não inibe as enzimas CYP450 2D6 e CYP450 3A4, porém foi classificada como substrato para esta última enzima. Para as enzimas CYP450 2C9 e CYP450 2D6 a CNN1 demonstrou não ser substrato. Na predição para o parâmetro de excreção, a CNN1 mostrou tempo de meia vida ($t_{1/2}$) de > 30 minutos. E por fim para toxicidade, foi visto que a CNN1 não é inibidora do gene *Ether-a-go-go Related* (hERG), que está associado a um menor risco de induzir toxicidade.

Adicionalmente, para os resultados do teste mutagênico a molécula CNN1 foi determinado como mutagênico. De forma geral, a predição da farmacocinética da molécula

CNN1 foi classificada com resultados excelentes para administração oral, além de interagir com enzimas que tem relevância quantitativa quanto a metabolização de diferentes fármacos, demonstrando um perfil farmacocinético promissor.

Table 7 - Predição dos parâmetros de farmacocinética da CNN1, através do servidor online admetSAR.

Modelo	Resultados	Probabilidade
Absorção		
Permeabilidade em Caco-2	Positivo	76 %
Absorção humana intestinal (AHI)	Positivo	99 %
Inibidor de P-gp	Negativo	82 %
Substrato de P-gp	Negativo	87 %
Distribuição		
Barreira Hematoencefálica (BHE)	Positivo	89 %
Metabolismo		
CYP450 1A2 inibição	Positivo	91 %
CYP450 3A4 inibição	Negativo	58 %
CYP450 3A4 substrato	Positivo	51 %
CYP450 2C9 inibição	Positivo	84 %
CYP450 2C9 substrato	Negativo	100 %
CYP450 2C19 inibição	Positivo	62%
CYP450 2D6 inibição	Negativo	80%
CYP450 2D6 substrato	Negativo	86%
Excreção		
T1/2 (h)	> 30 min	-
Toxicidade		
Gene hERG	Não inibidor	38%
Teste mutagênico	Positivo	80%

Fonte: Dados da pesquisa.

4.3. Predição de alvos moleculares da CNN1

Os possíveis alvos terapêuticos da CNN1 foram avaliados pelo servidor online *SwissTarget Prediction* (*SwissInstitute of Bioinformatic*, Suíça), segunda a classificação do valor de porcentagem (%) no servidor, visto que ele representa a probabilidade da molécula avaliada ser um ligante de um alvo conhecido. Sendo assim, foram identificados 15 alvos de diferentes classes biológicas, dentre elas: 60% enzimas; 20% fosfatases e 20% outros, com destaque para as enzimas.

Baseando-se na função de probabilidade de cada alvo que se encontra expresso na tabela 8. Os principais alvos encontrados foram DNA topoisomerase I (TOP1), atirosil-DNA fosfodiesterase-1 (TDP1), topoisomerase-1 mitocondrial (TOP1mt), ciclo de divisão celular 25A (Cdc25A), fosfatase de dupla especificidade 6 (DUSP6) e monoamina oxidase b (MAOB).

Dentre os principais os alvos, a enzima TOP1 demonstrou probabilidade acima de 50% de ser um alvo da molécula estudada. Como essa enzima nuclear desempenha importante papel na topologia da molécula de DNA, foi escolhida para estudos de docking molecular. Além disso, vale ressaltar a importância de moléculas que possam inibir essa enzima, visto que esse alvo molecular se encontra alterado em vários tipos tumorais (HUANG *et al.*, 2017; GUERRA *et al.*, 2018).

Tabela 8 - Predição dos alvos para molécula CNN1 pelo servidor *SwissTarget Prediction*.

Alvo	Nome	Uniprot ID	Probabilidade	3D/2D comps.	Classe
DNA topoisomerase I	TOP1	P11387	***	0/9	Enzima
Atirosil-DNA fosfodiesterase-1	TDP1	Q9NUW8	***	0/7	Enzima
Topoisomerase-1 mitocondrial	TOP1mt	Q969P6	**	0/4	Enzima
Ciclo de divisão celular	CDC25A	P30307	**	0/2	Fosfatase
Fosfatase de dupla especificidade 6	DUSP6	P28562	*	0/2	Enzima
Monoamina oxidase b	MAOB	P28562	*	0/2	Enzima

Legenda: Probabilidade de alvo: * < 20%; ** > 20%; *** > 50%.

Fonte: Dados da pesquisa.

4.4 Docagem molecular da CNN1 com a DNA topoisomerase I

Para examinarmos mais a fundo a interação da CNN1 com a DNA topoisomerase I (TOP1), foram utilizados os algoritmos *Autodock Tools* e *AutoDock Vina* para prever a ligação da proteína e ligante.

Os resultados demonstraram que a energia de ligação (ΔG) da molécula CNN1 inibi fortemente a enzima TOP1, com afinidade de ligação de -11,94 kcal/mol, enquanto os inibidores de TOP1 conhecidos e usados na clínica, como topotecan e SN-38 exibiram energia livre de ligação de -13,66 Kcal/mol e -15,26 kcal/mol, respectivamente (**Tabela 9**).

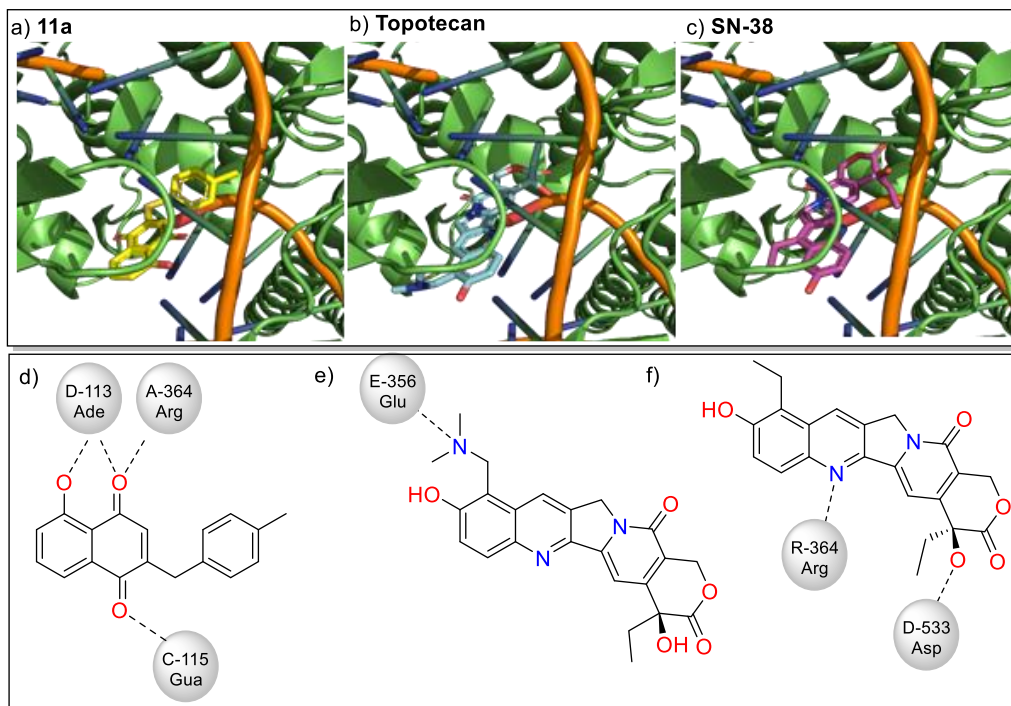
Os estudos de docagem molecular também revelaram que CNN1 interagi com os resíduos na cavidade catalítica da TOP1, como Arg-364 e as bases a-113 e g-115 usando três ligação de hidrogênio (**Figura 5**). Além disso, a interação de topotecan com a TOP1 formou uma ligação de hidrogênio com Glu-356. Já para o SN-38, foram formadas duas ligações de hidrogênio com Arg-364 e Asp-533. Foi interessante notar que o inibidor de TOP1 bem conhecido, como SN-38 formou ligações de hidrogênio com resíduos com Arg-364, como observado para a molécula CNN1. Portanto, sugerimos que CNN1 tem potencial para ser uma molécula candidata para a inibição do alvo TOP1.

Tabela 9. Resultados da energia livre de ligação (ΔG) e identificação de resíduos de aminoácidos realizando ligação de hidrogênio, foram estimadas com *Autocock Vina*.

Compostos	$\Delta G(\text{kcal/mol})$	Resíduos catalíticos
CNN1	-11.94 kcal/mol	Arg-364, A-113, G-115
Topotecan	-13.66 kcal/mol	Arg-364, Asp-533
SN-38	-15.26 kcal/mol	Glu-356

Fonte: Dados da pesquisa

Figure 5 - Resultados dos docking molecular da molécula CNN1, topotecan e SN-38 com a proteína TOP1.



Legenda: A estrutura de acoplamento 3D dos compostos na cavidade catalítica da proteína TOP1 em a) molécula CNN1 “11a”, b) topotecan, c) SN-38. Representação 2D das interações com resíduos de aminoácidos no sítio catalítico da enzima TOP1 d) CNN1, e) topotecan e f) SN-38.

Fonte: Dados da pesquisa, imagens obtidas pelo programa *Autodock*.

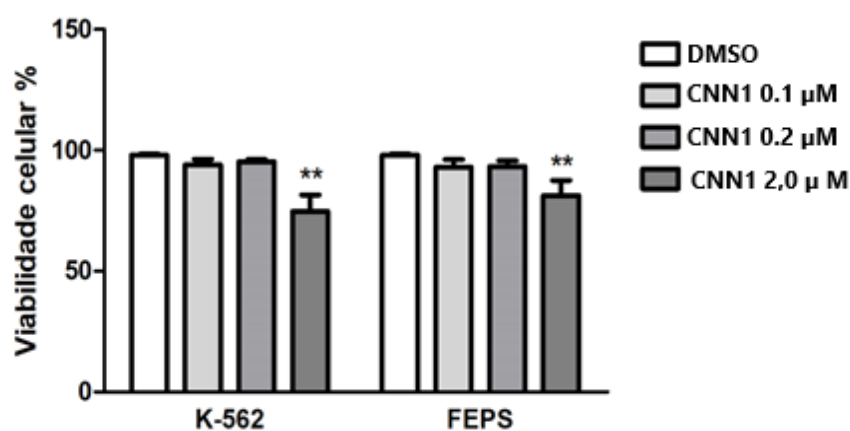
4.5 A molécula CNN1 causa alteração na viabilidade celular nas linhagens K-562 e FEPS

Com o propósito de avaliar se a molécula CNN1 não possui atividade citotóxica nas condições de estudo para os testes de avaliação molecular, foi realizado ensaio de viabilidade celular por Azul de tripan. As linhagens K-562 e FEPS foram tratadas nas concentrações de 0,1 μM , 0,2 μM e 2,0 μM da molécula CNN1 no período de 18 h (**Figura 6**). Os resultados de viabilidade celular no controle negativo foram de 96% de células com membrana íntegra, os mesmos resultados foram demonstrados para a linhagem K-562 tratada com a molécula CNN1 que apresentou o percentual de 95,66% na concentração de 0,1 μM e 94,33% na concentração de 0,2 μM , não ocorrendo diferença significativa quando comparado ao controle negativo. Por outro lado, ao avaliar a concentração de 2,0 μM houve diferença significativa em relação ao controle negativo ($p < 0,01$) demonstrando um valor de 74,66% de células íntegras.

Na linhagem FEPS foi observado no controle negativo um percentual de 98% de células com a membrana íntegra, e foi possível observar resultados similares na linhagem

FEPS que demonstrou um valor de 93,31% na concentração de 0,1 μM e 92% na concentração de 0,2 μM , não apresentando diferença significativa em relação ao controle negativo. Enquanto no tratamento com a concentração de 2,0 μM houve diferença significativa ($p < 0,01$), no percentual de células com a membrana íntegra que apresentou o valor de 81,33%, quando comparado ao controle negativo.

Figura 6 - Percentual de viabilidade celular nas linhagens K-562 e FEPS após 18 horas de tratamento com a molécula CNN1.



Legenda: As amostras tratadas foram comparadas com o controle negativo (DMSO), analisadas estatisticamente usando ANOVA seguido por teste de Bonferroni, foram realizados três experimentos independentes. Diferenças significativas: ** $p < 0,01$.

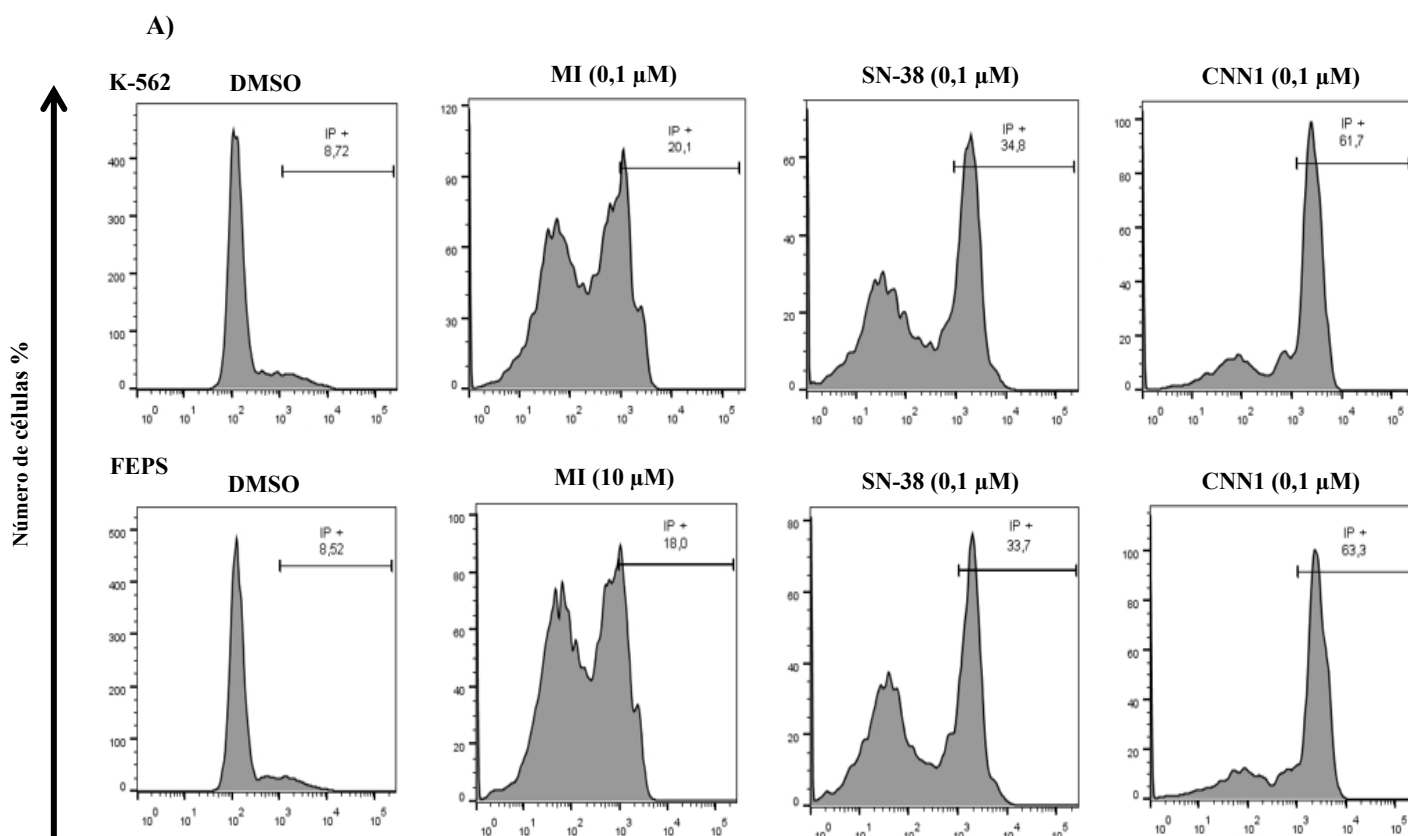
Fonte: Dados da pesquisa

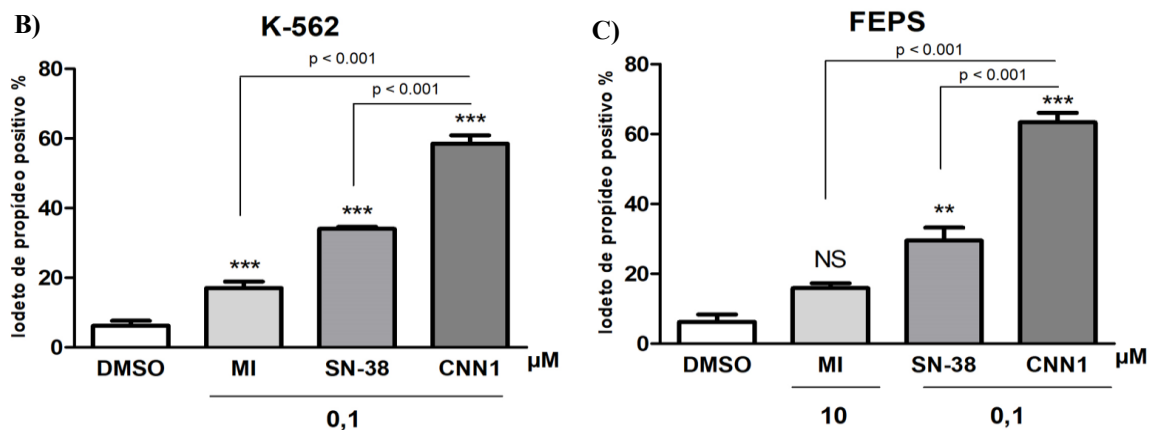
4.6 A molécula CNN1 induz alteração na integridade de membrana nas linhagens K-562 e FEPS

A viabilidade celular (integridade de membrana citoplasmática) foi analisada por citometria de fluxo através da marcação nuclear do iodeto de propídeo (IP), como agente fluorogênico (**Figura 7**). Através da análise da figura 7, observou-se a porcentagem de células não viáveis nas linhagens K-562 e FEPS de $8,53 \pm 1,58$ e $8,3 \pm 2$, respectivamente. Entretanto, após a incubação com a molécula CNN1 houve um aumento significativo na população de células não viáveis ($p < 0,001$) nas linhagens K-562 e FEPS, em relação ao controle negativo.

O controle positivo MI, induziu apenas na linhagem K-562 um aumento discreto na população de células não viáveis, ainda que significativo ($p < 0,01$). Já os resultados do SN-38 demonstraram aumento na população de células não viáveis de forma significativa ($p < 0,001$) em ambas as linhagens. Ademais, houve diferença estatística entre os tipos de tratamentos nas duas linhagens leucêmicas, na qual a molécula CNN1 exibiu um aumento no percentual de células com alteração na integridade de membrana quando comparada ao MI e SN-38 ($p < 0,001$). Sendo assim, esses achados mostram que a CNN1 induziu alteração na integridade de membrana nas linhagens K-562 e FEPS de forma mais evidente em relação ao MI e SN-38.

Figura 7 - Análise da alteração de integridade de membrana acarretado pela molécula CNN1 após 24 h de tratamento nas linhagens K-562 e FEPS, devido a alta incorporação de iodeto de propídeo (IP) pelas células não viáveis.





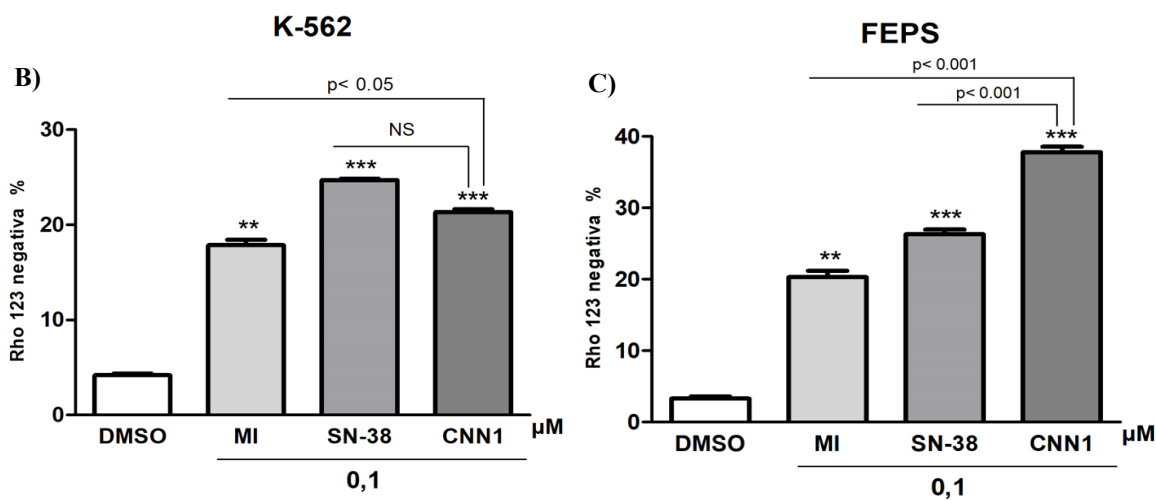
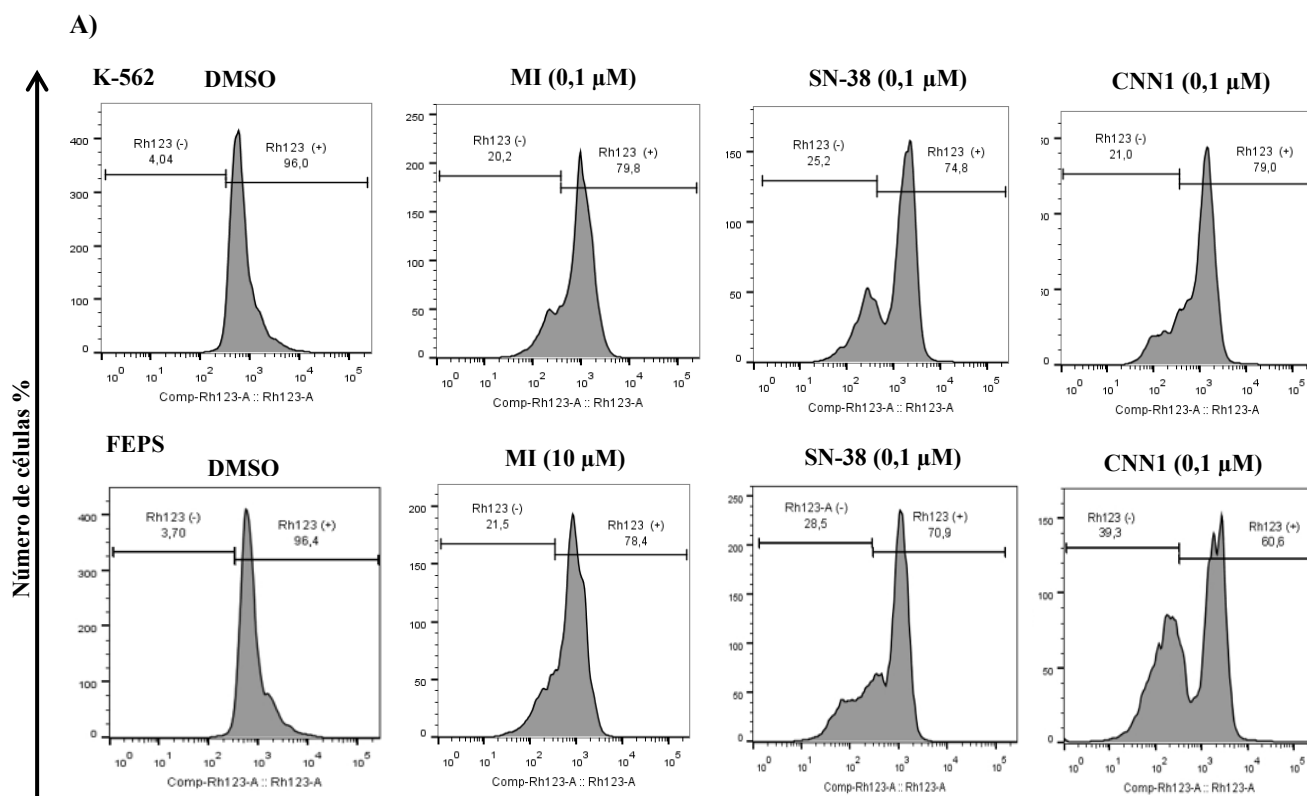
Legenda: As barras representam a média \pm desvio padrão da média de 3 experimentos independentes. As amostras tratadas foram comparadas com o controle negativo (DMSO), analisadas estatisticamente usando ANOVA seguido por teste de Bonferroni. Diferenças significativas: ** $p < 0,01$; *** $p < 0,001$. NS: não significativo.
Fonte: Dados da pesquisa.

4.7 Despolarização no potencial de membrana mitocondrial ($\Delta\psi_m$) nas células K-562 e FEPS induzida pela CNN1

Posteriormente, foi proposto a avaliação do efeito da CNN1 no potencial de membrana mitocondrial após 24 h de tratamento (**Figura 8**). De acordo com os resultados, a CNN1(0,1 μM) induz despolarização no potencial de membrana mitocondrial de forma significativa ($p < 0,001$) nas linhagens K-562 e FEPS, quando comparado ao controle negativo.

Além disso, o tratamento com MI (0,1 μM e 10 μM) causa despolarização no potencial de membrana mitocondrial significativamente ($p < 0,01$) em ambas as linhagens de leucemia. O SN-38 (0,1 μM) também causa dano mitocondrial significativo ($p < 0,001$) nas linhagens K-562 e FEPS. Adicionalmente, houve diferença estatística entre os tipos de tratamento em ambas as linhagens, na K-562 a molécula CNN1 mostrou maior despolarização mitocondrial quando comparada ao MI ($p < 0,001$). Para a linhagem FEPS, foi notado que molécula CNN1 induz dano mitocondrial de forma pronunciada em relação ao MI e SN-38 ($p < 0,001$).

Figura 8 - CNN1 induz despolarização de membrana mitocondrial nas linhagens K-562 e FEPS após 24 h de tratamento, através da baixa marcação do fluorocromo catiônico rodamina 123 (Rho123) quantificado por citometria de fluxo.



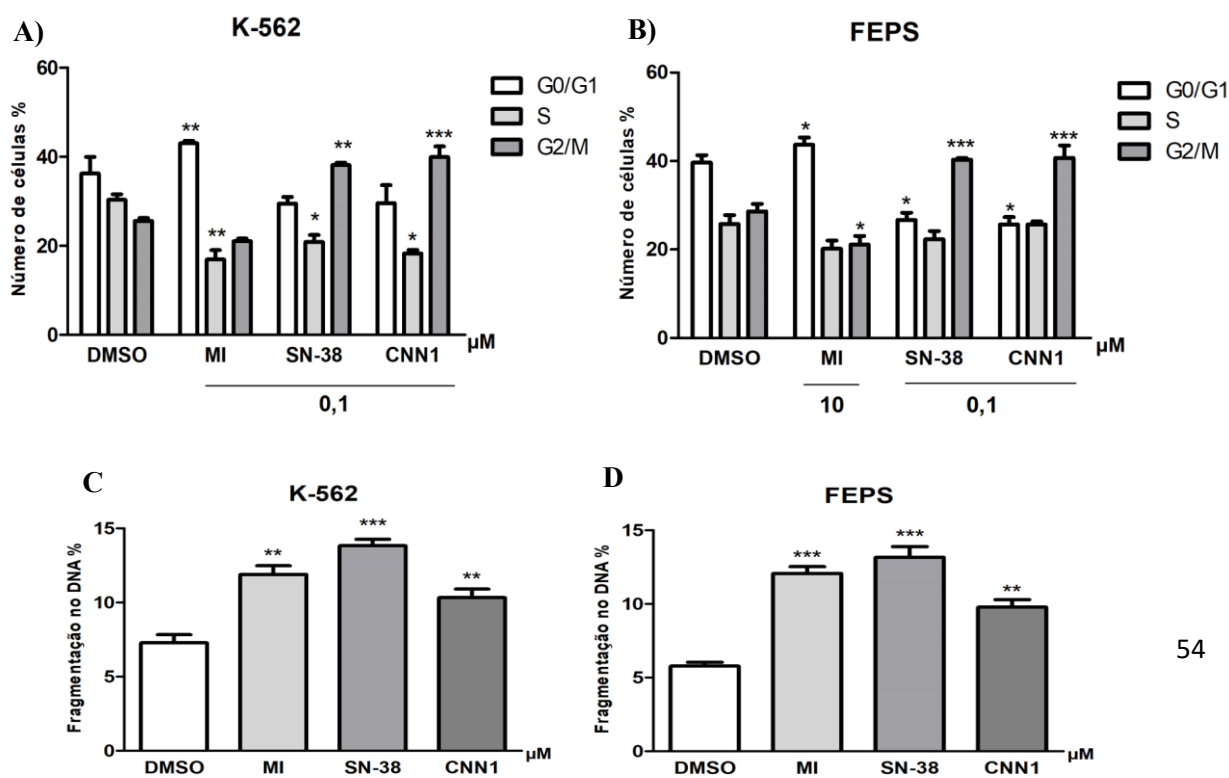
Legenda: As barras representam a média \pm desvio padrão da média de 3 experimentos independentes. As amostras tratadas foram comparadas com o controle negativo (DMSO), analisadas estatisticamente usando ANOVA seguido por teste de Bonferroni. Diferenças significativas: ** $p < 0,01$; *** $p < 0,001$. NS: não significativo. Fonte: Dados da pesquisa.

4.8 A CNN1 induz fragmentação no DNA e bloqueio no ciclo celular nas linhagens K-562 e FEPS

Em seguida, foi proposto a identificação do efeito da CNN1 no ciclo celular das células K-562 e FEPS, através da análise do conteúdo de DNA por citometria de fluxo (**Figura 9**). Os resultados de ciclo celular mostraram que o controle negativo nas linhagens K-562 e FEPS foi de 32,21 % e 39,63 % na fase G0/G1, 30,30 % e 25,76 %, na fase S, 25,67 % e 28,63 % na fase G2/M, respectivamente. Após o tratamento de 24 h com a CNN1 (0,1 μ M) a distribuição das células aumentaram significativamente ($p < 0,001$) na fase G2/M para 39,90 % e 40,70 % em K-562 e FEPS. O MI foi capaz de induzir acúmulo significativo ($p < 0,05$) de células na fase G0/G1 nas linhagens K-562 e FEPS, quando comparado ao controle negativo. O SN-38 induziu bloqueio na fase G2/M de forma significativa nas linhagens K-562 ($p < 0,01$) e FEPS ($p < 0,001$).

Além disso, através da análise do ciclo celular foi possível avaliar também a população de células com fragmentação no DNA (**Figura 9**). Os resultados de fragmentação no DNA no grupo sem tratamento nas linhagens K-562 e FEPS foi de 7,64 % e 5,84 %, respectivamente. Já o tratamento com a CNN1 (0,1 μ M) mostrou induzir aumento significativo ($p < 0,01$) na população de células com fragmentação no DNA para 10,85 % e 9,35 % nas linhagens K-562 e FEPS. O tratamento com o MI pode causar fragmentação no DNA significativamente nas linhagens K-562 ($p < 0,01$) e FEPS ($p < 0,001$). O quimioterápico SN-38 também foi capaz de induzir fragmentação no DNA em ambas as linhagens.

Figura 9 - Análise de fragmentação no DNA e bloqueio do ciclo celular ocasionado pela CNN1 após 24 h de tratamento nas linhagens K-562 e FEPS.



Legenda: As barras representam a média \pm desvio padrão da média de 3 experimentos independentes. As amostras tratadas foram comparadas com o controle negativo (DMSO), analisadas estatisticamente usando ANOVA seguido por teste de Bonferroni. Diferenças significativas: ** $p < 0,01$; *** $p < 0,001$.

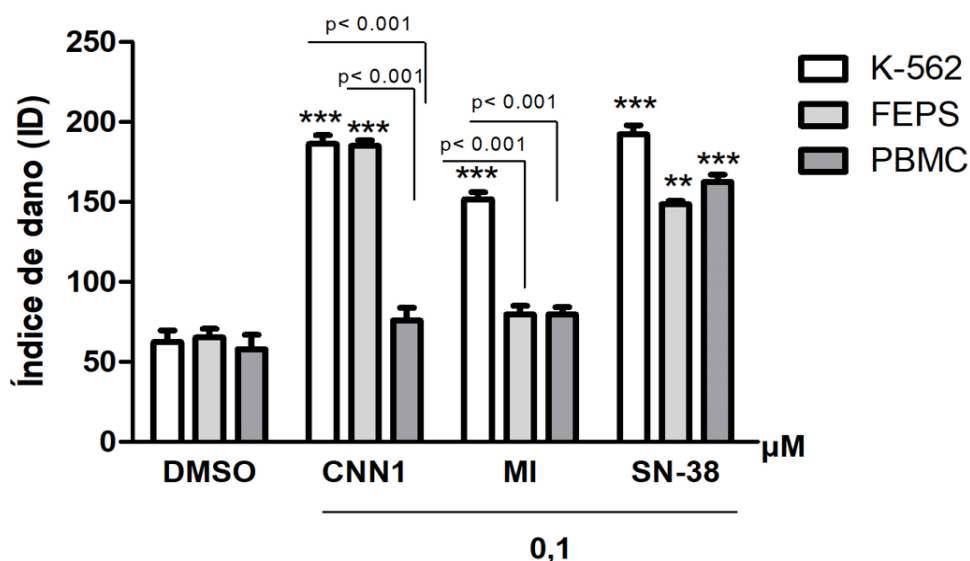
Fonte: Dados da pesquisa

4.7 Naftoquinona CNN1 induz efeito genotóxico seletivo nas linhagens K-562 e FEPS

Em ordem de confirmar o potencial genotóxico da CNN1 nas linhagens K-562 e FEPS foi realizado o ensaio do cometa versão alcalina, após 3 h de tratamento (**Figura 10**). O teste mostrou que a CNN1 ($0,1\mu\text{M}$) causa dano genotóxico significativo ($p < 0,001$) nas linhagens K-562 e FEPS. Além disso, a CNN1 não foi capaz de induzir dano significativo nas células PBMC (*peripheral blood mononuclear cell*). O MI demonstrou efeito genotóxico significativo ($p < 0,001$) apenas na linhagem K-562. O tratamento com SN-38 pode induzir genotoxicidade significativa nas linhagens K-562 ($p < 0,001$) e FEPS ($p < 0,01$), e também nas células PBMC ($p < 0,001$).

Ademais, o efeito genotóxico da CNN1 foi significativamente maior nas linhagens K-562 e FEPS quando comparado com as células PBMC ($p < 0,001$). O MI demonstrou efeito genotóxico mais significativo ($p < 0,001$) na linhagem K-562 em relação as células FEPS e PBMC. Por outro lado, o quimioterápico SN-38 não apresentou diferença significativa entre as linhagens de leucemia e PBMC.

Figura 10 - CNN1 induz dano genotóxico seletivo nas linhagens K-562 e FEPS após 3 h de tratamento, através do ensaio do cometa versão alcalina.



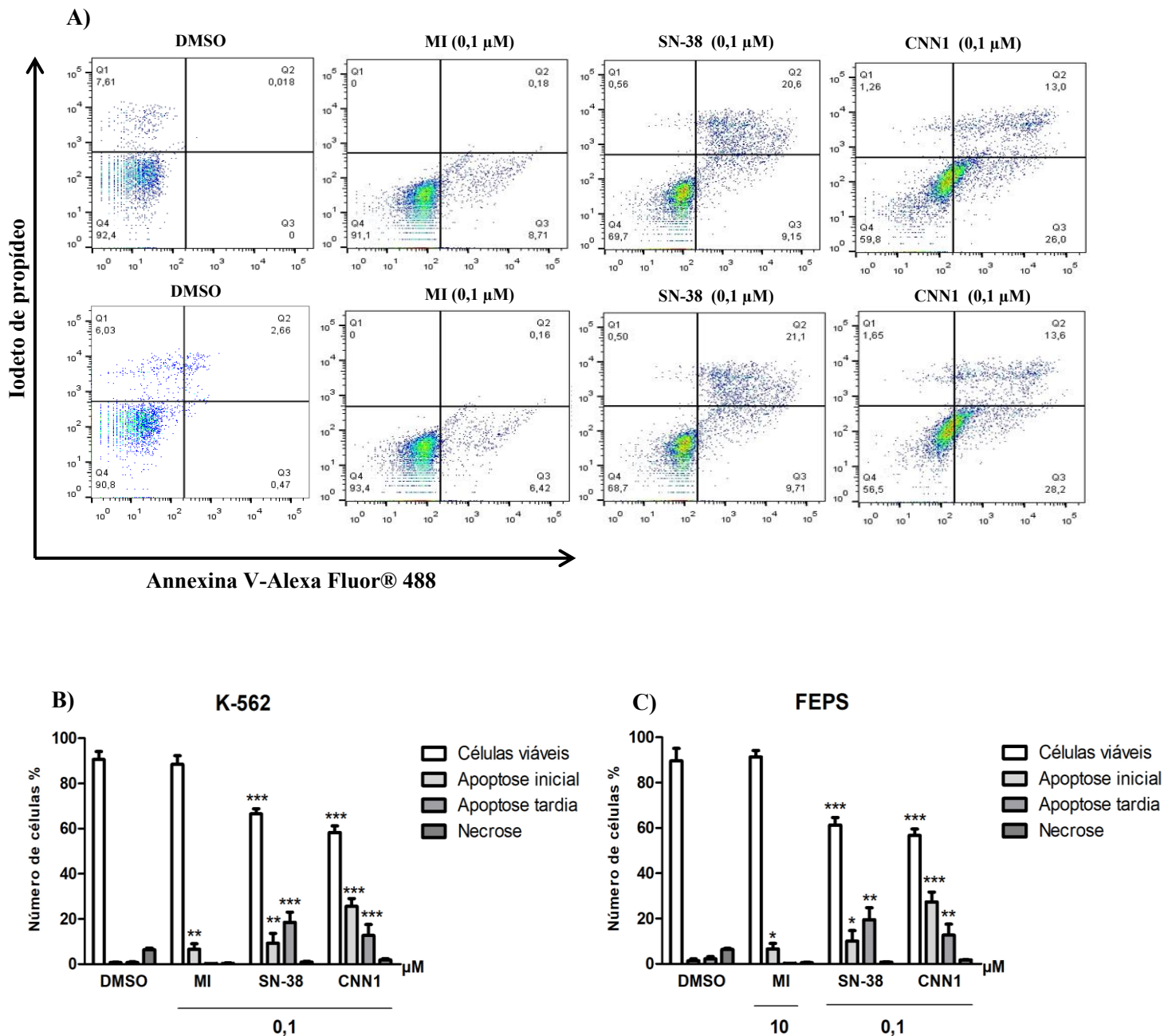
Legenda: As barras representam a média \pm desvio padrão da média de 3 experimentos independentes. As amostras tratadas foram comparadas com o controle negativo (DMSO), analisadas estatisticamente usando ANOVA seguido por teste de Bonferroni. Diferenças significativas: ** p < 0,01; ***p < 0,001. Também foi feita a análise estatística usando ANOVA para determinar a diferença entre as linhagens K-562, FEPS e PBMC. Diferença representada na parte superior das barras (p < 0,01).

Fonte: Dados da pesquisa

4.10 CNN1 promove apoptose nas linhagens K-562 e FEPS

Para investigar se a naftoquinona CNN1 promove apoptose foram utilizados os fluorocromos anexina V-Alexa Fluor[®] 488 e IP (iodeto de propídeo) por citometria de fluxo (**Figura 11**). Após o tratamento de 24 h com a CNN1 (0,1 μ M) verificou-se aumento significativo na população de células em apoptose inicial nas linhagens K-562 e FEPS (p < 0,001), e também foi possível identificar aumento na população de células em apoptose tardia nas linhagens K-562 (p < 0,001) e FEPS (p < 0,01). O controle positivo MI pode induzir de forma significativa (p < 0,01) apoptose inicial em ambas as linhagens. O tratamento com SN-38 foi capaz de causar apoptose inicial nas linhagens K-562 (p < 0,01) e FEPS (p < 0,05), o mesmo pode induzir apoptose tardia significativamente (p < 0,001) nas linhagens K-562 e FEPS.

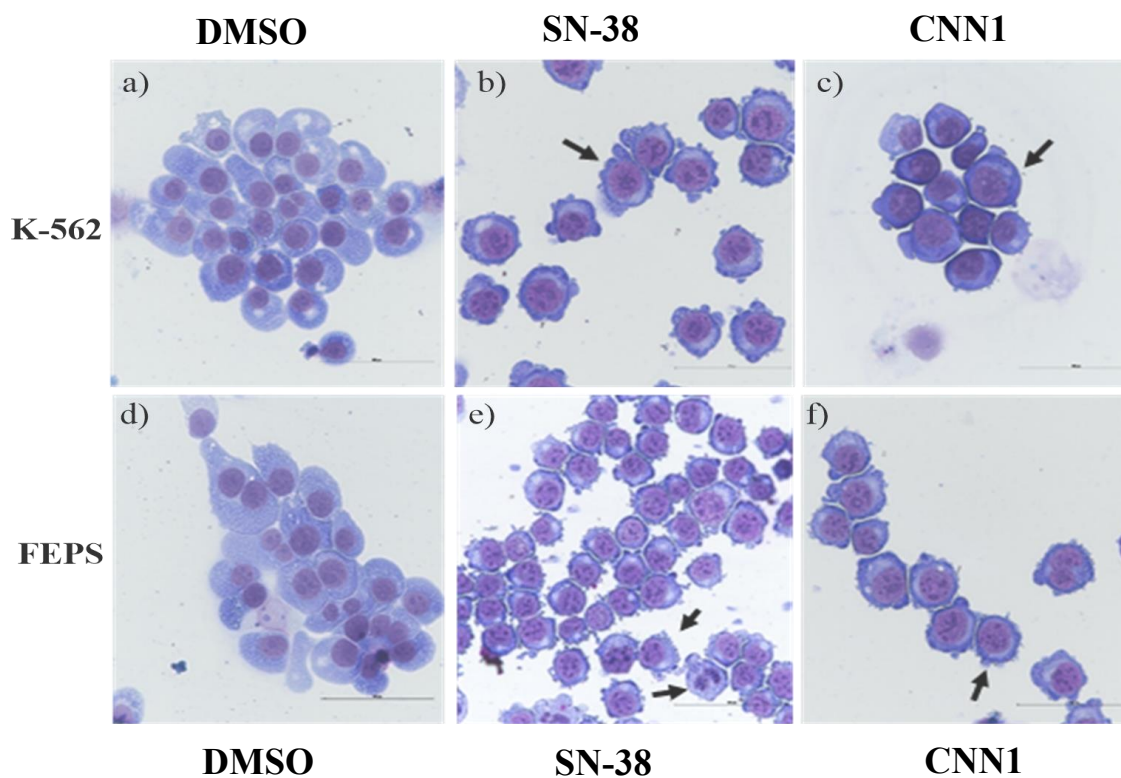
Figura 11 - CNN1 promove apoptose nas linhagens K-562 e FEPS após 24 h de tratamento, através da utilização conjunta dos marcadores anexina V-Alexa Fluor® 488 e IP por citometria de fluxo.



4.11 Características morfológicas e padrão de morte celular causado pela CNN1 nas linhagens K-562 e FEPS

Com o propósito de avaliar se a CNN1 pode induzir características morfológicas foi realizado a análise das células após 24 h de tratamento, através do Kit Panótico (**Figura 12**). No controle negativo as células K-562 e FEPS apresentaram perfil de células intactas com morfologia normal, respectivamente (**Figura 12a-d**). Os resultados mostraram que a CNN1 (0,1 μ M) pode alterar o volume celular e nuclear na linhagem K-562, essas características foram consideradas como células em apoptose (**Figura 12c**). Para a linhagem FEPS a naftoquinona CNN1 (0,1 μ M) causou a formação de protuberâncias citoplasmáticas, conhecidas como blebs (**Figura 12f**). Além disso, as células K-562 e FEPS expostas ao tratamento com SN-38 (0,1 μ M) também exibiram formação de blebs (**Figura 12b-e**).

Figura 12 - A naftoquinona CNN1 induz modificações morfológicas nas linhagens K-562 e FEPS após o tratamento de 24 h, através da análise pelo Kit Panótico.



Legenda: A) e D) são as linhagens K-562 e FEPS sem tratamento, respectivamente; b) K-562 após o tratamento com SN-38 na concentração de 0,1 μM ; c) K-562 exposta CNN1 na concentração de 0,1 μM , e) FEPS após o tratamento com SN-38 na concentração de 0,1 μM e; f) FEPS depois do tratamento com CNN1 na concentração de 0,1 μM .

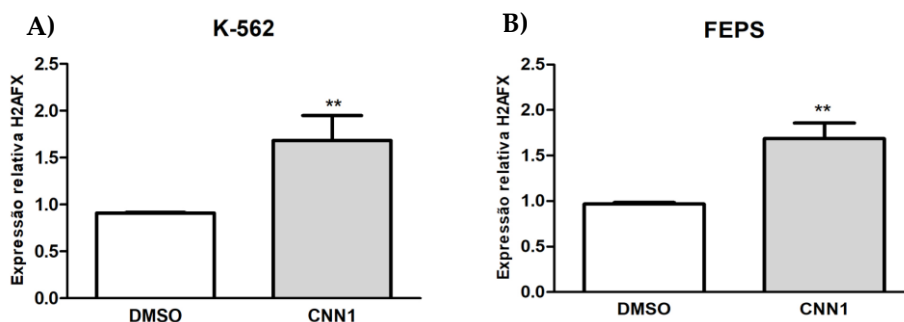
Fonte: Dados da pesquisa

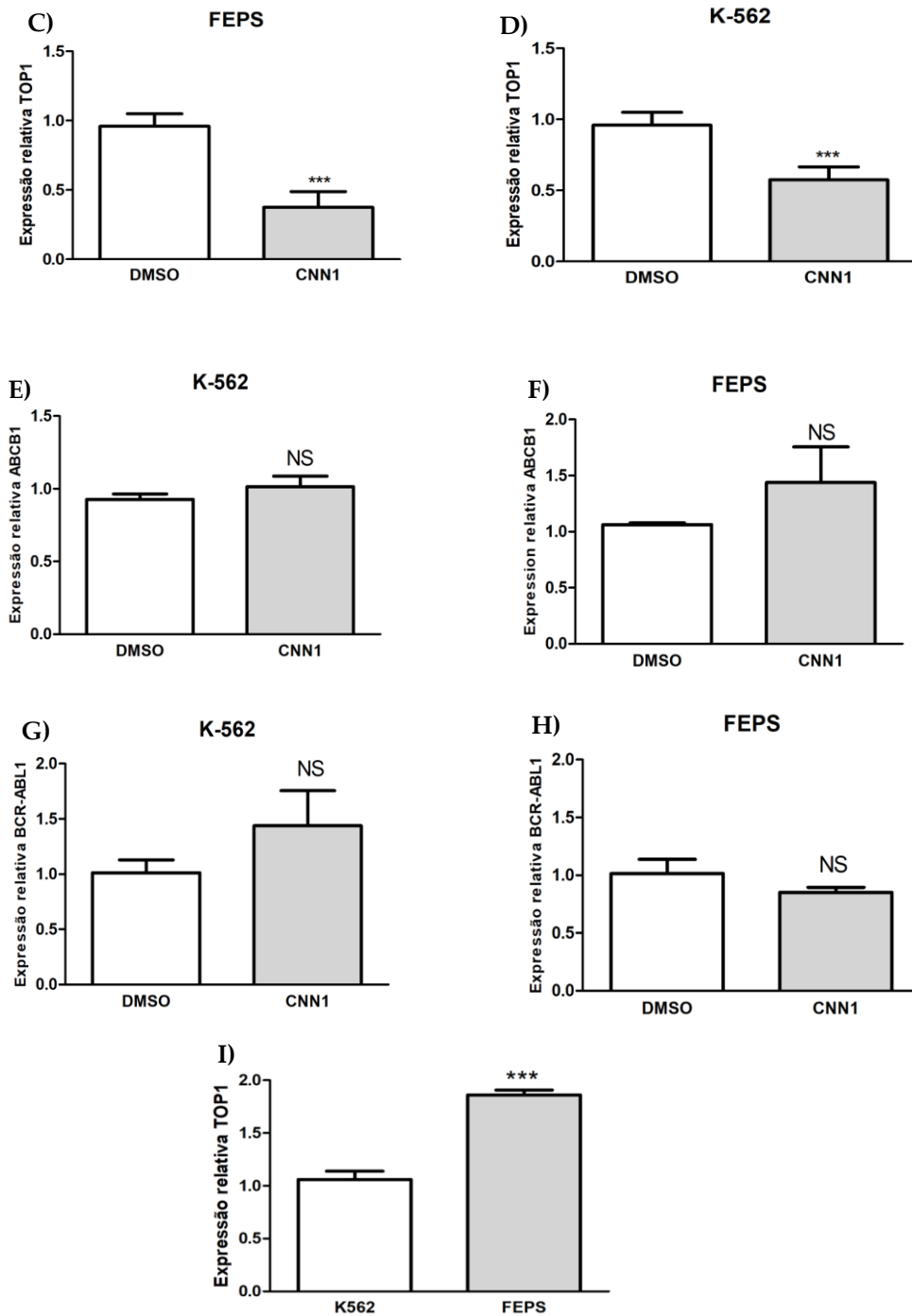
4.12 Modulação na expressão dos genes *TOP1* e *H2AFX* induzida pela CNN1 nas linhagens K-562 FEPS

Para aprofundar a sensibilidade genotóxica induzida pela CNN1, foi sugerida a capacidade de modulação na expressão dos genes *TOP1* (*DNA Topoisomerase I*) e *H2AFX* (*H2AFX Variant Histone*) após 18 h de tratamento (**Figura 13**). De forma surpreendente, a CNN1 (0,1 μM) diminuiu a expressão do gene *TOP1* de forma significativa ($p < 0,001$) nas linhagens K-562 e FEPS em comparação com o controle negativo. Na continuação da investigação, nossos resultados revelaram que a CNN1 aumentou significativamente ($p < 0,01$) a expressão do gene *H2AFX* nas linhagens K-562 e FEPS em relação ao controle negativo. Por outro lado, a CNN1 não causou diminuição significativa ($p > 0,06$) no gene *ABCB1* (*ATP Binding Cassette Subfamily B Member 1*) nas linhagens K-562 e FEPS, e também não foi capaz de modular a expressão do gene *BCR-ABL1* (*Breakpoint Cluster Region - Abelson Oncogene*) nas linhagens K-562 ($p > 0,27$) e FEPS ($p > 0,28$).

Ademais, foi feita a análise comparativa da expressão do gene *TOP1* em ambas as linhagens de leucemia (**Figura 13**). Os resultados demonstraram que expressão relativa do gene *TOP1* indicou na linhagem quimiorresistente FEPS maior nível de expressão gênica em comparação com a linhagem sensível K-562 ($p < 0,01$), demonstrando a importância desse alvo em modelo de célula resistente de LMC.

Figura 13 - CNN1 causa modulação na expressão gênica de *TOP1* e *H2AFX* nas linhagens K-562 e FEPS, após 18 horas de exposição.





Legenda: CNN1 (0.1 μ M) modula a expressão dos genes *TOP1* e *H2AFX* na K-562 e FEPS após 18 horas de exposição. Os dados estão apresentados como média \pm desvio padrão de três experimentos independentes. As amostras tratadas foram comparadas com o controle negativo (DMSO), analisadas estatisticamente usando teste de t de Student. Diferenças significativas: ** $p < 0,01$, *** $p < 0,001$. NS: não significativo.

Fonte : Dados da pesquisa

5 DISCUSSÃO

As naftoquinonas apresentam importantes efeitos farmacológicos (BITENCOURT *et al.*, 2020; BERETA *et al.*, 2021; CHAO *et al.*, 2021). Embora diversas naftoquinonas, principalmente análogos da juglona tenham sido estudadas na química medicinal por possuírem diversos mecanismos farmacológicos, essas moléculas têm chamado a atenção devido a sua acentuada citotoxicidade em diversas células tumorais (FARIAS *et al.*, 2019; CAYUELA *et al.*, 2021, CHANG 2021).

Nesse trabalho buscou-se avaliar o potencial citotóxico de 16 naftoquinonas sintéticas em linhagens de tumores sólidos e linhagens de leucemia. Baseado nos resultados de citotoxicidade por Alarma blue, as naftoquinonas estudadas demonstraram acentuada atividade citotóxica sobre as linhagens de leucemia, HL60, quimiossensível K-562 e quimiorresistente K-562-Lucena 1, apresentando a CI50 abaixo de 2 μM . Por outro lado, as naftoquinonas não foram citotóxicas para as linhagens de tumores sólidos ACP-02, AGP-01 e SK-MEL-19 e para linhagem não neoplásica humana MRC-5. A partir desses achados, a naftoquinona CNN1 foi escolhida, devido sua menor atividade citotóxica para a linhagem MRC-5 com a CI50 de 15,46 μM . Esses dados estão de acordo com outros trabalhos que destacaram o efeito citotóxico reduzido de naftoquinonas sobre células humanas normais como fibroblastos quando comparado com células de câncer, sugerindo que esse composto poderia constituir promissor agente terapêutico contra o câncer (HEGAZY *et al.*, 2019).

A continuação da investigação da citotoxicidade demonstrou que a CNN1 foi notavelmente seletiva para outra linhagem quimiorresistente (FEPS), revelando a CI50 de 0,60 μM e IS de 27,76 quando comparada ao IS de outras naftoquinonas avaliadas neste estudo. Assim, essa razão de seletividade é importante para determinar o perfil de segurança de novos compostos, sendo possível indicar se o composto inédito apresenta maior seletividade para as linhagens de câncer, evitando efeitos devastadores tóxicos como a grande maioria dos antineoplásicos, que podem causar lesões ao DNA e atacam indiscriminadamente células normais em proliferação, como por exemplo células sanguíneas, medula óssea e células da mucosa (MFOTIE *et al.*, 2020).

Em nosso estudo, a molécula CNN1 foi 27 vezes mais seletiva para a linhagem quimiorresistente FEPS em relação a linhagem não neoplásica MRC-5, sendo assim, esses resultados reforçam a seletividade e a efetividade dessa substância em modelos de células resistentes de LMC, demonstrando sua preferência citotóxica para as células leucêmicas e baixa atividade citotóxica para as células normais. Além disso, a CNN1 (CI50 = 0,60 μ M) apresentou atividade citotóxica semelhante para a linhagem FEPS quando comparado ao metabólito ativo do irinotecano (SN-38) (CI50 = 0,50 μ M), mostrando que a CNN1 pode ser um potencial candidato na quimioterapia à base de irinotecano. Tsuboya e colaboradores (2019) mencionam que toxicidade do irinotecano é grande problema, com a mielossupressão e a diarreia sendo os efeitos colaterais mais comumente observados. Várias estratégias foram desenvolvidas para melhorar a atividade clínica do irinotecano, como a modulação bioquímica (PAULIKI *et al.*, 2020), as modificações nas doses administradas (FUCHS *et al.*, 2006) e também o uso do irinotecano em combinação com outros quimioterápicos (MARTINO *et al.*, 2017). Esses resultados sugerem que a CNN1 pode ser uma estratégia para os pacientes que desenvolvem efeitos colaterais severos após a quimioterapia com irinotecano (MAKIYAMA *et al.*, 2020).

Nesse aspecto, para o prosseguimento do presente estudo a molécula CNN1 foi selecionada para os experimentos seguintes *in silico* e *in vitro* contra as linhagens quimiossensível K-562 e quimiorresistente FEPS, sendo esta última linhagem uma excelente ferramenta para a compreensão dos mecanismos moleculares envolvidos na resistência à terapia na LMC.

Diante da diversidade molecular de compostos químicos com atividade farmacológica, são necessários estudos de ADME/T, que se referem aos processos de absorção, distribuição, metabolismo, excreção e toxicidade (GUAN *et al.*, 2019). Bagchi colaboradores (2019) descrevem que um dos maiores obstáculos para o desenvolvimento de fármacos, é a capacidade de absorção em membranas de mucosas intestinais e barreira hematoencefálica. Os fármacos que permeiam essas barreiras biológicas apresentam promissoras propriedades físico-químicas, facilitando sua absorção pela via oral na circulação sistêmica, sendo assim, atingindo o tecido alvo.

Dessa forma, os modelos de farmacocinética *in silico* estão sendo utilizados nos estágios iniciais para a caracterização e seleção de moléculas inéditas com maior potencial terapêutico. Nossos resultados de farmacocinética *in silico*, demonstraram que a

molécula CNN1 revelou capacidade de sofrer absorção intestinal humana, e da barreira hematoencefálica, além de ser considerada permeável à linhagem celular Caco-2. Nossos resultados estão de acordo com Halick e colaboradores (2018), os quais demonstraram que um grupo de naftoquinonas apresentam excelentes propriedades para sofrerem absorção intestinal humana, e também da barreira hematoencefálica, por meio de análises de ADME/T *in silico*.

A maioria dos organismos vivos desenvolveram sistemas para evitar a absorção de xenobióticos e posteriormente eliminá-los. As enzimas do complexo citocromo 450 (CYP) participam do processo de metabolização para eliminar os xenobióticos, por meio de vias enzimáticas que produzem oxidação, redução e hidrólise. Estima-se que os humanos exibem 30 isoformas de enzimas CYP, que estão envolvidas no metabolismo de fármacos. No entanto, 90% do metabolismo oxidativo de fármacos ocorre através de seis enzimas principais: CYP 2D6, 2C9, 1A2, 2C19, 2E1 e 3A4. (HAKKOLA *et al.*, 2020). Nossos achados nos estudo *in silico*, a molécula CNN1 é substrato da enzima CYP3A4, que apresenta alta relevância quantitativa na metabolização de fármacos no fígado humano (HAKKOLA *et al.*, 2020; HIROTA *et al.*, 2020).

Muitas abordagens *in silico* são utilizadas também para análise de farmacodinâmica, que por sua vez, estuda inter-relação entre a concentrações plasmáticas do fármaco e seu receptor (MIRSADEGHI e LARIJANI, 2017; DINGEMANSE *et al.*, 2019). Em nosso estudo, foi realizada a predição dos principais alvos enzimáticos encontrados para a molécula CNN1, os resultados exibiram aproximadamente 15 alvos de diferentes classes, com destaque para as enzimas. Dentre as enzimas principais, a DNA topoisomerase I (TOP1) foi selecionada com maior probabilidade e por ser um alvo com alta potência terapêutica. (HOU *et al.*, 2020).

A TOP1 é uma enzima nuclear essencial que controla o estado topológico do DNA, em muitos processos metabólicos celulares, como a replicação do DNA, transcrição, condensação e descondensação cromossômica (POMMIER *et al.*, 2016; HOU *et al.*, 2020; ZAGNOLI-VIEIRA e CALDECOTT, 2020). Devido ao seu papel em diferentes processos celulares, a enzima TOP1 é considerada um alvo atraente para triagem de agentes anticâncer (CALDECOTT, 2020). Em nosso estudo, investigamos o potencial farmacológico de interação entre a molécula CNN1 e o alvo biológico TOP1, por meio de estudos de docagem molecular. Nossos resultados demonstraram forte inibição da enzima TOP1, baseado no

valor de energia livre de ligação (ΔG) (-11.94 kcal/mol) entre o ligante e proteína, pois quanto menor a energia livre de ligação, mais favorecida é afinidade do ligante pelo receptor (**Tabela 8**) (BAILY, 2019).

Ainda no intuito de elucidar as interações intermoleculares da molécula CNN1 com a enzima TOP1, foi revelado que a naftoquinona pode interagir com resíduos de aminoácidos que compõe a cavidade catalítica da enzima TOP1, como Arg-364 e as bases a-113 e g-115. Dessas três interações, uma delas foi similar nos resultados encontrados na interação entre a enzima TOP1 e o quimioterápico SN-38 (WONG *et al.*, 2019). De acordo com Lee e colaboradores (2019), os quais mostraram que a naftoquinona 5n interagiu com resíduos no complexo enzimático da TOP1, como Asn352, Glu356 e Arg364, exibindo alta inibição desse alvo. Os resultados destes autores corroboram com os encontrados no presente estudo, uma vez que a molécula CNN1 também tem interação com resíduos semelhantes encontrados na cavidade catalítica da TOP1, demonstrando potencial clínico da molécula CNN1 como candidata para a inibição da enzima TOP1.

Cristini e colaboradores (2019) já haviam mostrado que a modulação na expressão do gene TOP1, pode afetar a formação do complexo DNA-enzima, que por sua vez impede a função da TOP1 na clivagem da molécula de DNA. Segundo Kohorts e colaboradores (2018) com base em ensaios clínicos recentes, têm ocorrido o interesse renovado em inibidores de DNA topoisomeras I em neoplasias mieloproliferativas agressivas, como por exemplo na leucemia mielóide aguda. Neste mesmo estudo, foi observado que as linhagens de leucemia mielóide aguda (MOLM13, ML1 e ML2) apresentavam expressão elevada de TOP1. Estes resultados, de acordo com os autores, sugerem estratégias que possam bloquear a ativação do complexo de clivagem DNA-TOP1, bem como a atividade da enzima TOP1.

Em nosso estudo descobrimos que a linhagem quimiorresistente FEPS apresenta expressão mais elevada do gene *TOP1* quando comparada com a linhagem parental K-562, estes achados ampliam a importância desse alvo em modelos de resistência de leucemia mielóide crônica. Devido a essa evidência, foi proposto a avaliação do efeito da molécula CNN1 na expressão do gene *TOP1*. Nossos ensaios revelaram redução significativa da expressão gênica de *TOP1* nas linhagens K-562 ($p < 0,01$) e FEPS ($p < 0,01$). Wang e colaboradores (2019) descreveram que as naftoquinonas apresentam atividade

marcante como inibidores de TOP1, e a baixa expressão de *TOP1* pode prevenir a resistência em células tumorais durante a quimioterapia.

Dando seguimento ao estudo, investigamos se a CNN1 poderia causar apoptose nas linhagens K-562 e FEPS, como mecanismo de morte celular. Inicialmente, nossos resultados mostraram alteração significativa na integridade de membrana nas linhagens K-562 e FEPS ($p < 0,001$). Interessantemente, a CNN1 exibiu ruptura na integridade de membrana pronunciada nas linhagens leucêmicas em comparação com o Mesilato de Imatinibe (MI). Montenegro e colaboradores (2010) que descreveram a 1,4-naftoquinona induziu ruptura na membrana na linhagem leucêmica (HL-60), derivada de Leucemia mielóide aguda. Adicionalmente, outras pesquisas demonstraram que β -lapachone foi capaz de induzir causar alteração na membrana na linhagem HL-60 (CAVALCANTE *et al.*, 2010). Esses resultados reforçam que a naftoquinona CNN1 é um composto com importantes propriedades antitumorais.

A próxima análise foi determinar se a alteração na membrana plasmática poderia estar relacionada com a despolarização do potencial de membrana mitocondrial, característica marcante de apoptose (CHIOU *et al.*, 2020). A CNN1 causou despolarização no potencial de membrana mitocondrial em ambas as linhagens de leucemia ($p < 0,001$), e também seu efeito foi mais significativo em relação ao MI ($p < 0,001$). A desregulação na via da apoptose causa acúmulo de células leucêmicas e promove a formação de mais alterações genéticas, portanto, o dano mitocondrial induzido pela CNN1 pode ser uma excelente estratégia promissora na regulação da apoptose na LMC (BARMAN *et al.*, 2018; MI *et al.*, 2019).

Em um estudo de Marx *et al.* (2020), foi observado que o irinotecano (SN-38) pode induzir despolarização no potencial de membrana mitocondrial na linhagem de câncer colorretal (HCT-116). Outro estudo em modelos *in vivo*, o irinotecano foi capaz de induzir apoptose dependente da via intrínseca em camundongos (Papaevangelou *et al.*, 2015). Nossos resultados apoiam a hipótese que a CNN1 apresenta um potencial anticâncer, dado ao seu perfil de induzir morte celular de forma semelhante ao SN-38.

Além disso, a CNN1 induziu acúmulo de células na fase G2/M em ambas as linhagens de leucemia ($p < 0,001$). Assim como descrito em outros modelos de estudo para compostos da classe das naftoquinonas, por exemplo em linhagens de câncer pulmão

(MATTHAIOS *et al.*, 2013) e linhagens de câncer de mama (Brodniewicz *et al.*, 2021). Uma característica distintiva das células tumorais é a divisão celular exacerbada que requer a replicação do DNA. Esse fenômeno que ocorre em células malignas é muito explorado para o desenvolvimento de quimioterápicos, pois as células são sensíveis ao bloqueio da replicação do DNA (JI *et al.*, 2017) corroborando com nossos achados.

Nesse sentido, ainda no presente estudo a CNN1 mostrou-se genotóxica preferencialmente nas linhagens K-562 e FEPS ($p < 0,001$), sugerindo que a supressão da expressão de *TOP1* pode gerar danos no boxe de replicação do DNA e nas forquilhas de replicação que produzem quebras de fita dupla de DNA, como confirmado pelo ensaio do cometa alcalino (PORTILHO *et al.*, 2021). Adicionalmente, a CNN1 não causou dano ao DNA em células mononucleares de sangue periférico (do inglês - PBMC). Esses dados consolidam o efeito genotóxico seletivo da CNN1 pela linhagem FEPS com fenótipo MDR, e sugerem que a CNN1 pode beneficiar o tratamento antitumoral de pacientes refratários ao IM, com baixos efeitos mutagênicos.

Como a maioria dos quimioterápicos, o irinotecano tem uma estreita janela terapêutica, o que explica suas toxicidades hematológicas e gastrointestinais. Esses efeitos colaterais podem levar a redução de doses e descontinuação do tratamento, bem como limitar a atividade antitumoral desse agente quimioterápico (MARX *et al.*, 2020). Assim, a identificação de novos compostos com mínimos efeitos colaterais e sem alterar sua eficiência antitumoral, podem trazer melhoras significativas para pacientes em tratamento com irinotecano. Nesse sentido, SN-38 foi genotóxico para as células PBMC, por outro lado a CNN1 não exibiu dano significativo ao DNA nas células PBMC. Esses resultados sugerem que a CNN1 pode ser uma poderosa alternativa para o tratamento de pacientes submetidos ao irinotecano.

Ademais, nosso estudo demonstrou que a apoptose causada pela CNN1 foi confirmada pela externalização de fosfatidilserina nas linhas K-562 e FEPS ($p < 0,001$). Neste contexto, outras naftoquinonas também foram capazes de induzir apoptose em linhagens de câncer de pulmão (HEGAZY *et al.*, 2019), e linhagens de mama (). Dessa forma, nossos resultados mostraram que a citotoxicidade da CNN1 é baseada na capacidade de induzir apoptose através do aumento na população de células com fragmentação de DNA, despolarização do potencial de membrana mitocondrial e externalização de fosfatidilserina.

Para nosso conhecimento, pela primeira vez, investigou-se a capacidade da CNN1 em modular a expressão gênica do biomarcador *H2AFX* na linhagem FEPS (RAHMANIAN *et al.*, 2021), pelo fato da CNN1 induzir a apoptose através da via de dano ao DNA. Nossos resultados mostraram que a CNN1 induziu aumento na expressão gênica de *H2AFX* nas linhagens K-562 e FEPS de forma significativa ($p < 0,001$), sugerindo que a *upregulated* de *H2AFX* tem um importante papel no início da apoptose na linhagem com fenótipo MDR (FEPS), por meio da sinalização de dano ao DNA. Zangh e colaboradores (2019) mencionam que a baixa expressão é considerada um evento contribuinte na resistência ao MI, e demonstram a importância de *H2AFX* no processo de regulação de apoptose em células de LMC.

Adicionalmente, avaliamos se a CNN1 poderia modular a expressão gênica de *ABCB1* e *BCR-ABL1*. De acordo com os nossos resultados, a CNN1 não diminuiu a expressão gênica dos genes *ABCB1* e *BCR-ABL1*. No estudo *in silico* prévio pelo nosso grupo, Portilho *et al.* (2021) mostraram que a CNN1 não é considerada como substrato e nem como inibidora da P-glicoproteína (P-gp), corroborando com esses achados. Sales *et al.* (2019) demonstraram que as linhagens resistentes (K-562-Lucena-1 e FEPS) tem baixa expressão de *BCR-ABL1*. Ainda no mesmo estudo os autores, reforçam que o principal mecanismo de resistência da FEPS está intimamente ligada à superexpressão de P-gp. Portanto, nossos resultados sugerem que a naftoquinona CNN1 não é prejudicada pela ação da bomba de efluxo (P-gp) e seu efeito antitumoral é acumulado a nível intracelular (MITCHELL *et al.*, 2018; LOSCOCCO *et al.*, 2019).

6 CONCLUSÃO

Em conclusão, os resultados expostos neste estudo mostraram que a naftoquinona CNN1, possui excelente atividade antitumoral em linhagens de Leucemia Mieloide Crônica em modelo sensível (K-562) e resistente à quimioterapia (FEPS). Este composto revelou excelentes propriedades farmacocinéticas, e possivelmente tem alvo na via de sinalização da *TOPI*, um biomarcador importante em diferentes tipos de câncer. Baseado nesses achados, a continuação da investigação mostrou que CNN1 causou bloqueio no ciclo celular, precedido de dano ao DNA e apoptose mediada pelo aumento na expressão do mRNA de *H2AFX*, sugerindo que essa via tem um importante papel no início da morte celular em células com fenótipo MDR de leucemia. Portanto, destacamos a importância da

CNN1 como estratégia para o tratamento de pacientes refratários ou intolerantes à terapia atual na LMC.

Além disso, a CNN1 mostrou seletividade para as células tumorais através do teste do cometa alcalino, e exibindo baixos efeitos genotóxicos para células normais. Isto pode representar uma estratégia promissora de tratamento para pacientes que desenvolvem efeitos adversos após a exposição ao irinotecano.

REFERÊNCIAS

ABDULLAEV, A. et al. BCR-ABL exon 7 deletion and novel point mutation in patient with chronic myelogenous leukemia and TKI resistance. **Clin Case Rep**, v. 6, n. 11, p. 2057-2060, set 2019.

ABBASIFARID, E. et al. The Role of ATP-Binding Cassette Transporters in the Chemoresistance of Anaplastic Thyroid Cancer: A Systematic Review. **Endocrinology**. v. 160, n. 8, p. 2015-2023, ago 2019.

AHMED, S. A.; GOGAL, R. M. J.; WALSH, J. E. A new rapid and simple non-radioactive assay to monitor and determine the proliferation of lymphocytes: an alternative to [3H]thymidine incorporation assay. **J Immunol Methods**, v. 170, n. 2, p. 211, abr 1994.

ALSHAMRANI, A. A.; FRANKLIN, J. L. Membrane Depolarization Inhibits BIMEL Upregulation but Prevents Neuronal Apoptosis Primarily by Increasing Cellular GSH Levels. **Mol Neurobiol**, v. 58, n. 5, p. 2284-2296, mai 2021.

AMARAL, M. V. S. et al. Establishment of Drug-resistant Cell Lines as a Model in Experimental Oncology: A Review. **Anticancer Res**. v. 39, n. 12, p. 6443-6455, dez 2019.

ANTONENKO, S.V.; TELEGEEV, G. D. Inhibition of USP1, a new partner of Bcr-Abl, results in decrease of Bcr-Abl level in K562 cells. **Exp Oncol**, v. 42, n. 2, p. 109-114, jun 2020.

AUBERGER, P.; TAMBURINI-BONNEFOY, J.; PUISSANT, A. Drug Resistance in Hematological Malignancies. **Int J Mol Sci**. v. 21, n. 17, p. 60-91, aug 2021.

BACCARANI, M. et al. European LeukemiaNet recommendations for the management of chronic myeloid leukemia: 2013. **Blood**, v.122, n. 6, p. 872-84, aug 2013.

BAGCHI S, et al. In-vitro blood-brain barrier models for drug screening and permeation studies: an overview. **Drug Des Devel Ther**. v. 18, n. 13, p. 3591-3605, out 2019.

BAILLY, C. Irinotecan: 25 years of cancer treatment. **Pharmacol Res**. n. 148, p. 104-398, out 2019.

BARMAN, J. et al. Apoptosis: Mediator Molecules, Interplay with Other Cell Death Processes and Therapeutic Potentials. **Curr Pharm Biotechnol**. v. 19, 8, p. 644-663, 2018.

BAVARO, L. et al. Mechanisms of Disease Progression and Resistance n.to Tyrosine Kinase Inhibitor Therapy in Chronic Myeloid Leukemia. An Update, **Int J Mol Sci**, v. 20, n.24, p. 6141, dec 2019.

BERETTA, G. L. et al. Synthesis and Evaluation of New Naphthalene and Naphthoquinone Derivatives as Anticancer Agents. **Arch Pharm**, n. 350, v. 1, jan 2017.

BERTHELOOT, D.; LATZ, E.; FRANKLIN, B. S. Necroptosis, pyroptosis and apoptosis: an intricate game of cell death. **Cell Mol Immunol**. v. 18, n. 5, p. 1106-1121, mai 2021.

BITENCOURT, R.; ZALCBERG, I.; LOURO, I. D. Imatinib resistance: a review of alternative inhibitors in chronic myeloid leukemia. **Rev Bras Hematol Hemoter**, v. 33, n. 6, p.470-5, nov 2011.

BONIFACIO, M. Management of Chronic Myeloid Leukemia in Advanced Phase. **Front Oncol**. v. 25, n. 9, p. 1132, out 2019.

BRAUN, T. P. et al. Response and Resistance to BCR-ABL1-Targeted Therapies. **Cancer Cell**, v. 37, n. 4, p. 530-542, abr 2020.

BRODNIEWICZ, T.; GRYNKIEWICZ, G. Stem Cell Based Preclinical Drug Development and Toxicity Prediction. **Curr. Pharm**, v. 27, p. 2237–2251, dez 2021

BUCHDUNGER E. et al. Abl protein-tyrosine kinase inhibitor STI571 inhibits in vitro signal transduction mediated by c-kit and platelet-derived growth factor receptors. **J Pharmacol Exp Ther**, v. 295, n. 1, p. 139-45, out 2000.

BURLINSON, B. et al. Fourth international workgroup on genotoxicity testing: results of the vivo comet assay workgroup. **Mutation Research**, v. 627, p. 31-35, 2007.

BUSTIN, S. A. et al. The MIQE guidelines: minimum information for publication of quantitative real-time PCR experiments. **Clin. Chem**, v. 55, p. 611–622, abr 2009.

CAHILL, K. N. et al. KIT Inhibition by Imatinib in Patients with Severe Refractory Asthma. **N Engl J Med**. v. 376, n. 20, p. 1911-1920, mai 2017.

CAYUELA, J. M. [Recommendations from the French CML Study Group (Fi-LMC) for BCR-ABL1 kinase domain mutation analysis in chronic myeloid leukemia]. **Bull Cancer**, v. 107, n. 1, p. 113-128, jan 2020.

CARUSILLO A.; MUSSOLINO C. DNA Damage: From Threat to Treatment. **Cells**. v. 9, n. 7,p. 1665, jul 2020.

CAVALCANTI, B.C.; SILVA, E. N. S. Potent antileukemic action of naphthoquinoidal compounds: Evidence for an intrinsic death mechanism based on oxidative stress and inhibition of DNA repair. **J. Braz. Chem. Soc**, v. 24, p. 145–163, 2013

CHANG, Y. T. et al. Morris-Natschke SL, Lee KH, Hung CC. Danazol mediates collateral sensitivity via STAT3/Myc related pathway in multidrug-resistant cancer cells. **Sci Rep**. v. 9, n.1, p. 11-28, ago 2019.

CHANG, M. et al. Alkannin-Induced Oxidative DNA Damage Synergizes With PARP Inhibition to Cause Cancer-Specific Cytotoxicity. **Front Pharmacol**, v. 22, n. 11, p. 610-205, dez 2020.

CHANDRAN, K. R. et al. Impact of Additional Chromosomal Aberrations on the Disease Progression of Chronic Myelogenous Leukemia. **Front Oncol**, v. 5, n. 9, p.88. mar 2019.

CHANDRASEKHAR, C.; KUMAR, O. S.; SARMA, P. V. G. K. Novel mutations in the kinase domain of BCR-ABL gene causing imatinib resistance in chronic myeloid leukemia patients. **Sci Rep**, v. 9, n.1, p. 24-12. feb 2019.

CHAUFFAILLE, M. L. L. F. Leucemia mieloide crônica: tratamento baseado em evidências. **Clínica Médica Ou Diagnóstico Tratamento**, São Paulo, v. 14, n. 2, p. 62-65, mar 2009.

CHEN Y, et al. The Critical Role of PTEN/PI3K/AKT Signaling Pathway in Shikonin-Induced Apoptosis and Proliferation Inhibition of Chronic Myeloid Leukemia. *Cell Physiol Biochem* 2018;47:981–93.

CIRMI, S. et al. Cardiovascular Toxicity of Tyrosine Kinase Inhibitors Used in Chronic Myeloid Leukemia: An Analysis of the FDA Adverse Event Reporting System Database (FAERS). **Cancers (Basel)**, v.30, n.4, p. 826, mar 2020.

COLLINS, A. R.; AI-GUO, M.; DUTHIE, S. J. The kinetics of repair of oxidative DNA damage (strand breaks and oxidized pyrimidines) in human cells. **Mutation Research**, v. 336, p. 69-77, mar 2015.

CORTES, J. E. et al. Final 5-Year Study Results of DASISION: The Dasatinib Versus Imatinib Study in Treatment-Naïve Chronic Myeloid Leukemia Patients Trial. **Journal of Clinical Oncology**. n. 20, p. 2333-2340, mai 2016.

COSTA, et al. Mutations in the breakpoint cluster region-Abelson murine leukemia 1 gene in Brazilian patients with chronic myeloid leukemia. **Hematol Transfus Cell Ther**, n. 40, p. 293-4, dez 2018.

CORTES, J. E. Bosutinib versus imatinib for newly diagnosed chronic myeloid leukemia: results from the randomized BFORE trial. **J Clin Oncol**. v. 20, n. 36, p. 231–237, jan 2018.

CRIPPA, G. V. et al. Mantovani MS. Up and down-regulation of mRNA in the cytotoxicity and genotoxicity of Plumbagin in HepG2/C3A. **Environ Toxicol Pharmacol**. n.75, 103-328, 2020.

CRISTINI, A, et al. Dual Processing of R-Loops and Topoisomerase I Induces Transcription-Dependent DNA Double-Strand Breaks. *Cell Rep*. v. 28, n. 12, p. 3167-3181, sep 2019.

D'ANGELI, F. et al. Antimicrobial, Antioxidant, and Cytotoxic Activities of Juglans regia L. Pellicle Extract. **Antibiotics**, v.10, n. 2, p.159. fev 2021

DESTERKE C, et al. Embryonic Program Activated during Blast Crisis of Chronic Myelogenous Leukemia (CML) Implicates a TCF7L2 and MYC Cooperative Chromatin Binding. *Int J Mol Sci*. v. 21, n. 11, p. 4057. Jun 2020.

DENG, J, et al. A Review of Food-Drug Interactions on Oral Drug Absorption. **Drugs**. v. 77, n. 17 :1833-1855, nov 2017.

DINGEMANSE, J. e KRAUSE, A. Impact of pharmacokinetic-pharmacodynamic modelling in early clinical drug development. **Eur J Pharm Sci**. v. 15, n. 109S, S53-S58, nov 2017.

DEROUICH-GUERGOUR, D. et al. Evidence for tumor necrosis factor receptors (TNFRs) in human MRC5 fibroblast cells. **Eur Cytokine Netw**. v. 12, n. 1,p. 147-53, mar 2001.

DRUKER B. J. et al. IRIS Investigators. Five-year follow-up of patients receiving imatinib for chronic myeloid leukemia. **N Engl J Med.** n. 355, p. 2408-2417, abr 2006

DRUKER, B. J.; LYDON, N. B. Lessons learned from the development of an abl tyrosine kinase inhibitor for chronic myelogenous leukemia. **The Journal of Clinical Investigation.** v. 105, n. 1, p. 3-7, feb 2000.

EUSTACHI A.; MELCHART D. Complementary and Alternative Medicine in Oncology - What Makes Sense?. **Dtsch Med Wochenschr.** v. 142, n. 12, p. 882-888, jun 2017.

FAUST, F. et al. The use of the alkaline comet assay with lymphocytes in human biomonitoring studies. **Mutation Research,** v. 566, p. 209-229, 2018.

FECKER LF. et al. Selective induction of apoptosis in melanoma cells by tyrosinase promoter-controlled CD95 ligand overexpression. **J Invest Dermatol.** v. 124, n. 1, p. 221-8, jan 2005.

FOURNIER, C. et al. Apetoh L Immunotherapeutic properties of chemotherapy. **Curr Opin Pharmacol,** n. 35, p. 83-88, mai 2017.

FOWLER, P. et al. A review of the genotoxic potential of 1,4-naphthoquinone. **Mutat Res Genet Toxicol Environ Mutagen.** n. 834, p. 6-17, out 2018.

FUTURO, O. et al. The Antifungal Activity of Naphthoquinones: An Integrative Review. **Anais da Academia Brasileira de Ciências,** v. 90, n. 01, jul 2018.

MOLLER, P. The comet assay: ready for 30 more years. **Mutagenesis,** v, 33, n. 1, p. 1, feb 2018.

MORAES, E. S. et al. Análise de indivíduos com leucemia: limitações do sistema de vigilância de câncer. **Ciência & Saúde Coletiva,** v. 22, p. 3321-3332, out 2017.

GAO, M. Depression of oncogenecity by dephosphorylating and degrading BCR-ABL. **Oncotarget,** v. 8 n. 2, p. 3304-3314, jan 2017.

GELATTI, A. C. Z.; DRILON A, SANTINI, F. C. Optimizing the sequencing of tyrosine kinase inhibitors (TKIs) in epidermal growth factor receptor (EGFR) mutation-positive non-small cell lung cancer (NSCLC). **Lung Cancer,** v. 137, p. 113-122, nov 2019.

GUAN, L, et al. ADMET-score - a comprehensive scoring function for evaluation of chemical drug-likeness. **Medchemcomm.** v.10, n. 1 :148-157, jan 2019

GUERRA, B. et al. CM363, a novel naphthoquinone derivative which acts as multikinase modulator and overcomes imatinib resistance in chronic myelogenous leukemia. **Oncotarget,** v.9, p. 63, p. 32272, ago 2018.

HEHLMANN, R. et al. High-risk additional chromosomal abnormalities in CML herald death by blast crisis already at low blast levels. **Blood,** v. 134, p. 666, nov 2019.

HEINRICH, M. C. et al. Inhibition of c-kit receptor tyrosine kinase activity by STI 571, a selective tyrosine kinase inhibitor. **Blood.** v. 96, n. 3, p. 925-932, ago 2000.

HEGAZY, M. F. et al. Vitamin K₃ thio-derivative: a novel specific apoptotic inducer in the doxorubicin-sensitive and -resistant cancer cells. **Invest New Drugs.** v. 38, n. 3, p. 650-661, jun 2020.

HIDALGO-LOPEZ, J. E. et al. Bone marrow core biopsy in 508 consecutive patients with chronic myeloid leukemia: assessment of potential value. **Cancer**, v. 124, p. 3849-55, oct 2018.

HOCHHAUS, A.; BACCARANI, M.; SILVER, R.T. European LeukemiaNet 2020 recommendations for treating chronic myeloid leukemia. **Leukemia**, v. 34, p. 966-984 feb 2020.

HOCHHAUS, A. et al. IRIS Investigators. Long-Term Outcomes of Imatinib Treatment for Chronic Myeloid Leukemia. **N Engl J Med**. v. 376, n. 10, 917-927, mar 2017.

HOU, G. Topoisomerase isoforms in gastric cancer. **Gene**, n. 5, p. 754:144-859, sep 2020.

HUA, Y. et al. Juglone regulates gut microbiota and Th17/Treg balance in DSS-induced ulcerative colitis. **Int Immunopharmacol**. v. 26, n. 97, p. 107-683. Abr 2021.

HUANG, R. EPS8 regulates proliferation, apoptosis and chemosensitivity in BCR-ABL positive cells via the BCR-ABL/PI3K/AKT/mTOR pathway. **Oncol Rep**. v. 39, n.1, p. 119-128, jan 2018.

HUGHES, T. et al. Impacto of baseline BCR-ABL mutations on response to nilotinib in patients with chronic myeloid leukemia in chronic phase. **J. Clin. Oncol**. v. 27, n. 25, p. 4204-4210, sep 2009.

Instituto Nacional De Câncer José Alencar Gomes Da Silva (INCA). Coordenação Geral de Ações Estratégicas. Coordenação de Prevenção e Vigilância. Estimativa 2018: incidência de câncer no Brasil/Instituto Nacional de Câncer José Alencar Gomes da Silva, **Coordenação Geral de Ações Estratégicas, Coordenação de Prevenção e Vigilância**. – Rio de Janeiro: Inca, 2018.

Instituto Nacional de Câncer José Alencar Gomes da Silva (INCA). Coordenação Geral de Ações Estratégicas. Coordenação de Prevenção e Vigilância. **Leucemias**. Rio de Janeiro: Inca, 2019.

Instituto Nacional de Câncer José Alencar Gomes da Silva (INCA). Coordenação Geral de Ações Estratégicas. Coordenação de Prevenção e Vigilância. Estimativa 2020/2022: incidência de câncer no Brasil/Instituto Nacional de Câncer José Alencar Gomes da Silva, **Coordenação Geral de Ações Estratégicas, Coordenação de Prevenção e Vigilância**. – Rio de Janeiro: Inca, 2020.

ISSA, G.C. et al. Clonal chromosomal abnormalities appearing in Philadelphia chromosome-negative metaphases during CML treatment. **Blood**, n.130, v. 19, p. 2084-2091, nov 2017.

JABBOUR.; KANTARJIAN H. Chronic myeloid leukemia: 2020 update on diagnosis, therapy and monitoring. **Annu Clin Hematol Malign**. v. 95, n.6, p. 691-709, jun 2020.

JABBARZADEH, K. P. et al. Akt-targeted therapy as a promising strategy to overcome drug resistance in breast cancer - A comprehensive review from chemotherapy to immunotherapy. **Pharmacol Res**. n. 156, p. 104-806, jun 2020.

Ji, J. et al. Phosphorylated fraction of H2AX as a measurement for DNA damage in cancer cells and potential applications of a novel assay. **PLoS One**, v. 12, n. 2, p. 0171582, fev 2017.

KAUR, U. et al. Delayed resistance to imatinib after 16 years of therapy in a patient with chronic myeloid leukaemia. **Br J Haematol**, n.190, v.1, p. e51-e53, jul 2020.

KHAZAAL, M. S.; HAMDAN, F. B.; AL-MAYAH, Q. S. Association of BCR/ABL transcript variants with different blood parameters and demographic features in Iraqi chronic myeloid leukemia patients. **Mol Genet Genomic Med**, v. 7, n. 8, p. 809, ago 2019.

KEATING, G. M. Dasatinib: A Review in Chronic Myeloid Leukaemia and Ph⁺ Acute Lymphoblastic. **Drugs**. n. 77, v. 1, p. 85-96, jan 2017.

KODAN, A, et al. ABCB1/MDR1/P-gp employs an ATP-dependent twist-and-squeeze mechanism to export hydrophobic drugs. **FEBS Lett.** v. 595, p. 6, p. 707-716, mar 2021.

Kulyte A, Characterization of human alpha-dystrobrevin isoforms in HL-60 human promyelocytic leukemia cells undergoing granulocytic differentiation. **Mol Biol Cell**. v.13, n. 82, p. 4195-205, dez 2002.

LEAL, M.F, et al. Establishment and conventional cytogenetic characterization of three gastric cancer cell lines. **Cancer Genetics and Cytogenetics.**, v. 195, p. 85-91, nov 2009.

LEONARD, J. T. et al. Lamble A, Hayes-Lattin B, Byrd K, Druker BJ, Tyner JW, Chang BH, Lind E. Concomitant use of a dual Src/ABL kinase inhibitor eliminates the in vitro efficacy of blinatumomab against Ph⁺ ALL. **Blood**. v.18, n.137, p. 939-944, fev 2021.

LEE, M. H. Analysis of the Mechanisms of Action of Naphthoquinone-Based Anti-Acute Myeloid Leukemia Chemotherapeutics. **Molecules**. v.4, n.17, p. 3121, ago 2019.

LI, T. T. Establishment of Drug-resistant Acute Lymphoblastic Leukemic Cell Lines and Their Resistance Mechanism. v.26, n. 3, p. 698-704, jun 2018.

LINDAUER, M.; HOCHHAUS, A. Dasatinib. **Recent Results Cancer Res**. n. 212, p.29-68, ago 2018.

LIU, J.; PEI, J.; LAI, L. A combined computational and experimental strategy identifies mutations conferring resistance to drugs targeting the BCR-ABL fusion protein. **Commun Biol**. v. 3, n. 1, p. 18, jan 2020.

LOSCOCO, F. et al. BCR-ABL Independent Mechanisms of Resistance in Chronic Myeloid Leukemia. **Front Oncol**. v. 24, n.9, p. 939, sep 2019.

LOUVIS, A. R. Synthesis, characterization and biological activities of 3-aryl-1,4-naphthoquinones – green palladium-catalysed Suzuki cross coupling. **New J. Chem**. 40, 7643-7656, jul 2016.

LÓPEZ-FERNÁNDEZ, L. A. ATP-Binding Cassette Transporters in the Clinical Implementation of Pharmacogenetics. **J Pers Med**. v. 5, n. 8, p. 4, 40, dez 2018.

LYTLE, N.K.; BARBER, A. G.; REYA, T. Stem cell fate in cancer growth, progression and therapy resistance. **Nat Rev Cancer**. v. 18, n.11, p. 669-680, nov 2018.

LU, Y. et al. Evaluating In Vitro DNA Damage Using Comet Assay. **J Vis Exp**. v. 11, n. 128, p. 56-50, out 2017.

LU Y.; LIU, Y.; YANG, C. Evaluating In Vitro DNA Damage Using Comet Assay. **J Vis Exp**. v. 11, n. 128, p. 56450, out 2017.

MATTHAIOS, D. et al. H2AX a Promising Biomarker for Lung Cancer: A Review. **Cancer Investig**, v. 31, p. 582–599, dez 2013.

MELO, M. A. W.; SILVEIRA, C. M. **Laboratório de hematologia: teorias, técnicas e atlas**. 1. ed. Rio de Janeiro: Rubio, oct 2015.

MEYER, G. W. et al. Convergent evolution of plant specialized 1,4-naphthoquinones: metabolism, trafficking, and resistance to their allelopathic effects. **Journal of Experimental Botany**, v. 72, n. 2, p. 167 -176, feb 2021.

MITCHELL, R. et al. Targeting BCR-ABL-Independent TKI Resistance in Chronic Myeloid Leukemia by mTOR and Autophagy Inhibition. **J Natl Cancer Inst**. v.110, n. 5, p. 467-478, mai 2018.

MIRSADEGHI S, LARIJANI B. Personalized Medicine: Pharmacogenomics and Drug Development. **Acta Med Iran**. v. 55, n. 3, p. 150-165, mar 2017.

MFOTIE, N. et al. Selective cytotoxic activity of isolated compounds from *Globimetula dinklagei* and *Phragmanthera capitata* (Loranthaceae). *Z Naturforsch C J Biosci*. v. 75, n. 5-6, p. 135-144, mai 2020.

MORAES, G. N. et al. The Interface between BCR-ABL-Dependent and -Independent Resistance Signaling Pathways in Chronic Myeloid Leukemia. **Leuk Res Treatment**, v. 2 n. 6, p. 671-702, jun 2012.

MOHAMMAD, I. S.; HE, W.; YIN, L. Understanding of human ATP binding cassette superfamily and novel multidrug resistance modulators to overcome MDR. **Biomed Pharmacother**, n. 100, p. 335-348, abr 2018.

MONE, N.S. et al. Naphthoquinones and Their Derivatives: Emerging Trends in Combating Microbial Pathogens. **Coatings**, v.11, n. 2, p. 434. mar 2021.

MOLONEY, J. N.; COTTER, T. G. ROS signalling in the biology of cancer. **Semin Cell Dev Biol**. n. 80, p. 50-64, ago 2018.

MONTENEGRO, R. C. et al. Cytotoxic activity of naphthoquinones with special emphasis on juglone and its 5-O-methyl derivative. **Chemico-Biological Interactions**, v. 184, n. 3, p. 439-448, mar 2010.

NIAULT, T. S.; BACCARINI, M. Targets of Raf in Carcinogenesis. **Tumorigenesis**. v. 31, n. 7, p. 1165-74, jul 2010.

O'BRIEN, S. G. IRIS Investigators. Imatinib compared with interferon and low-dose cytarabine for newly diagnosed chronic-phase chronic myeloid leukemia. **N Engl J Med**. v. 348, n. 11, 994-1004, 2003.

OH, S. S. Cordycepin Resensitizes T24R2 Cisplatin-Resistant Human Bladder Cancer Cells to Cisplatin by Inactivating Ets-1 Dependent MDR1 Transcription. **Int J Mol Sci**. v. 21, n. 5, p. 1710, mar 2020.

OGASAWARA, A. A simple screening method for the diagnosis of chronic myeloid leukemia using the parameters of a complete blood count and differentials. **Clin Chim Acta**. v. 489, p. 249-253, feb 2019.

OKABE, A, et al. Short-term detection of gastric genotoxicity using the DNA double-strand break marker γ -H2AX. **J Toxicol Pathol.** v. 32, n. 2, p. 91-99, mar 2019.

PACHECO, P.A. F. et al. Synthesis of new N,S-acetal analogs derived from juglone with cytotoxic activity against *Trypanosoma cruzi*. **J Bioenerg Biomembr**, v. 52, n. 3, p. 199 – 213, jun 2020.

PAUL, A. et al. Naphthoquinone-Dopamine Hybrids Inhibit α -Synuclein Aggregation, Disrupt Preformed Fibrils, and Attenuate Aggregate-Induced Toxicity. **Chemistry.** v. 26, n. 69, p. 16486-16496, dez 2020.

PEREYRA, C. E. The diverse mechanisms and anticancer potential of naphthoquinones. **Cancer Cell Int.** v.19, p.207. dez 2019.

PÉTRIZ J.; GARCÍA-LÓPEZ J. Is rhodamine 123 an appropriate fluorescent probe to assess P-glycoprotein mediated multidrug resistance in vinblastine-resistant CHO cells? **Anal Cell Pathol.** v. 14, n.3, p. 129-40. jan 1997.

PIĄTEK, K. et al . The role of ABC transporters' gene polymorphism in the etiology of intrahepatic cholestasis of pregnancy. **Ginekol Pol.** v. 89, n. 7, p. 393-397, nov 2018.

PICCOLI, C. et al. Occupational exposure to pesticides and hematological alterations: A survey of farm residents in the South of Brazil. **Ciência & Saúde Coletiva [online]**. v. 24, n. 6, jul 2019.

RABIAN, F.; LENGLINE E.; REA D. Towards a Personalized Treatment of Patients with Chronic Myeloid Leukemia. **Curr Hematol Malig Rep.** v. 14, n. 6, p. 492-500, nov 2019.

RAHMANIAN, N. et al. Recent advances in γ H2AX biomarker-based genotoxicity assays: A marker of DNA damage and repair. **DNA Repair**, v. 108, p. 103243, set 2021.

RAZI, B. et al. Multidrug resistance 1 (MDR1/ABCB1) gene polymorphism (rs1045642 C > T) and susceptibility to multiple myeloma: a systematic review and meta-analysis. **Hematology.** v. 23, n. 8, p. 456.-462, set 2018.

Rathore R, et al. Overcoming chemotherapy drug resistance by targeting inhibitors of apoptosis proteins (IAPs). **Apoptosis.** v.22 ,n.7, p.898-919, jul 2017.

REIS F. R. et al. The therapeutical potential of a novel pterocarpanquinone LQB-118 to target inhibitor of apoptosis proteins in acute myeloid leukemia cells. **Anticancer Agents Med Chem**, v. 13, n. 2, 341-51, fev 2013.

ROBEY, R. W.; PLUCHINO, K. M.; Hall, M. D. Fojo AT, Bates SE, Gottesman MM. Revisiting the role of ABC transporters in multidrug-resistant cancer. **Nat Rev Cancer.** v. 18, n.7, p. 452-464, jul 2018.

ROCK, B. M E FOTI, R. S. Pharmacokinetic and Drug Metabolism Properties of Novel Therapeutic Modalities. **Drug Metab Dispos**, v. 47, n. 10, p. 1097-1099, oct 2019.

ROWLEY, J. A. New Consistent Chromosomal Abnormality in Chronic Myelogenous Leukaemia identified by Quinacrine Fluorescence and Giemsa Staining. **Nature.** n. 243, p. 290–293, fev 1973.

ROSSARI, F. et al. Past, present, and future of Bcr-Abl inhibitors: from chemical development to clinical efficacy. *J Hematol Oncol.* n. **11**, p. 84, mar 2018.

ROSENZWEIG, S. A. Acquired Resistance to Drugs Targeting Tyrosine Kinases. *Adv Cancer Res.* n. 138, p. 71 - 98, mar 2018.

SACHA, T.; SAGLIO G. Nilotinib in the treatment of chronic myeloid leukemia. *Future Oncol.* v.15, n. 9, p. 953-965, mar 2019.

SANTOS, F. P. S. et al. Guidelines for therapy of patients with chronic myeloproliferative neoplasms during the novel coronavirus SARS-CoV2 pandemic. *Hematol Transfus Cell Ther.* v.42, n. 3, p. 195-199, jul 2020.

Sales, L.D.O. et al. Comparison of BCR–ABL Transcript Variants Between Patients With Chronic Myeloid Leukaemia and Leukaemia Cell Lines. *Vivo*, n. 33, p. 1119–1124, set 2021.

SALGADO, M. T. S. F. et al. Relation between ABCB1 overexpression and COX2 and ALOX5 genes in human erythroleukemia cell lines. *Prostaglandins Other Lipid Mediat.* n. 155 p. 106-553, mai 2021.

SAUBELE, S.; NITSCHMANN S. Therapie der chronischen myeloischen Leukämie mit Imatinib : IRIS-Studie [Treatment of chronic myeloid leukemia with imatinib : IRIS study]. *Internist Berl.* v. 58, n. 11, p. 1220-1221, nov 2017.

SAMARGHANDIAN, S. e SHABESTARI, M. M . DNA fragmentation and apoptosis induced by safranal in human prostate cancer cell line. *Indian journal urol*, v.29, n.3, p.177- 183, fev 2013.

SCHNEIDER G, SCHNEIDER P. Macromolecular target prediction by self-organizing feature maps. *Expert Opin Drug Discov*, v. 12, n. 3, p. 271-277, mar 2017.

SCHMITTGEN, T. D.; LIVAK, K. J. Analyzing real-time PCR data by the comparative CT method. *Nat. Prot*, v. 3, p. 1101-1108, mar 2008.

SHAH, N.P .Long-term outcome with dasatinib after imatinib failure in chronic-phase chronic myeloid leukemia: follow-up of a phase 3 study. *Blood*, v.123, n. 15, p. 2317-2324, abr 2014.

SHAH, N. P. NCCN Guidelines Updates: Discontinuing TKI Therapy in the Treatment of Chronic Myeloid Leukemia. *J Natl Compr Canc Netw.* v.17, n. 5.5, p. 611-613, mai 2019.

SHAMAA, M. M. Sulfasalazine synergistically enhances the inhibitory effects of imatinib against hepatocellular carcinoma (HCC) cells by targeting NFκB, BCR/ABL, and PI3K/AKT signaling pathway-related proteins. *Open Bio.* v.11 n. 3, p. 588-597, mar 2021.

SHANG, X. F. *et al.* Application of Sustainable Natural Resources in Agriculture: Acaricidal and Enzyme Inhibitory Activities of Naphthoquinones and Their Analogs against *Psoroptes cuniculi*. *Sci Rep*, v. 8, n. 1, p. 1609, jan 2018.

SILVA, C. C. et al. Antibacterial Activity of 2-Amino-1,4-naphthoquinone Derivatives against Gram-Positive and Gram-Negative Bacterial Strains and Their Interaction with Human Serum Albumin. *Journal of the Brazilian Chemical Society.* v. 31, n. 9, sep 2020.

SOARES, F. S. et al. Multidrug resistance phenotype: Relation between phenotype induction and its characteristics in erythroleukemia cells. **Cell Biol Int.** v. 43, n. 2, p. 214-219. feb 2019.

SOKOLOV, A. et al. Characterizing ABC-Transporter Substrate-Likeness Using a Clean-Slate Genetic Background. **Front Pharmacol.** v. 25, n. 10, p. 448, abr 2019.

SRINIVAS, U. S et al. ROS and the DNA damage response in cancer. **Redox Biol.** n. 25, p. 101-084, jul 2019.

STROBER, W. Trypan Blue Exclusion Test of Cell Viability. **Curr Protoc Immunol.** n.2, p. 111. nov 2015.

SUTTORP, M. et al. Definition, Epidemiology, Pathophysiology, and Essential Criteria for Diagnosis of Pediatric Chronic Myeloid Leukemia. **Cancers (Basel).** n. 13, v. 4, p. 798, feb 2021.

THAFAR, M. et al. Comparison Study of Computational Prediction Tools for Drug-Target Binding Affinities. **Front Chem.** n. 20, v. 7, p. 782. nov 2019.

TOOFAN. P. et al. Chronic myeloid leukaemia cells require the bone morphogenic protein pathway for cell cycle progression and self-renewal. **Cell Death Dis.** n. 9, v. 9, p. 927, sep 2018.

TÓKÉS, T. et al. Prognostic and Clinicopathological Correlations of Cell Cycle Marker Expressions before and after the Primary Systemic Therapy of Breast Cancer. **Pathol Oncol Res.** v. 26, n.3, p. 1499-1510, jul 2020.

TRAXL, A, et al. Inhibition of ABCB1 and ABCG2 at the Mouse Blood-Brain Barrier with Marketed Drugs To Improve Brain Delivery of the Model ABCB1/ABCG2 Substrate erlotinib. **Mol Pharm.** v. 4, n. 3, p. 1282-1293, mar 2019.

VENER, C. et al. First-line imatinib vs second- and third-generation TKIs for chronic-phase CML: a systematic review and meta-analysis. **Blood Adv.** v. 23; n.4, p. 2723-273, jun 2020.

VUELTA, E. et al. Future Approaches for Treating Chronic Myeloid Leukemia: CRISPR Therapy. *Biology (Basel).* 2021 Feb 4;10(2):118

VULTUR, A. et al. SKI-606 (bosutinib), a novel Src kinase inhibitor, suppresses migration and invasion of human breast cancer cells. **Mol Cancer Ther.** v. 7 n. 5, p. 1185–1194, mai 2018.

WANG, Y. et al. Novel 1,4-naphthoquinone derivatives induce reactive oxygen species-mediated apoptosis in liver cancer cells. **Mol Med Rep,** v. 19, n. 3, p. 1654-1664, mar 2019.

WANG, H. et al. Two novel 1,4-naphthoquinone derivatives induce human gastric cancer cell apoptosis and cell cycle arrest by regulating reactive oxygen species-mediated MAPK/Akt/STAT3 signaling pathways. **Mol Med Rep.** v. 20, n. 3, p. 2571-2582, jul 2019.

WENZEL, E. S.; SINGH, A. T. K. Cell-cycle Checkpoints and Aneuploidy on the Path to Cancer. **In Vivo.** v. 32, n.1, p. 1-5, jan 2018.

WESTERWEEL, P. New Approaches and Treatment Combinations for the Management of Chronic Myeloid Leukemia. **Front Oncol.** v. 9, p. 665, ago 2019.

WILSON-ROBLES, H. Characterization of five newly derived canine osteosarcoma cell lines. **BMC Vet Res.** v.15, n.1, p. 357. out 2019.

WU, Z. X, et al. Establishment and Characterization of an Irinotecan-Resistant Human Colon Cancer Cell Line. **Front Oncol.** n.10, p. 624-954, fev 2021.

XU, Y e HER, C. Inhibition of Topoisomerase (DNA) I (TOP1): DNA Damage Repair and Anticancer Therapy. **Biomolecules.** v.5, n. 3, 1652-1670, jul 2015.

YAEGER, R. e CORCORAN, R. B. Targeting Alterations in the RAF-MEK Pathway. **Cancer Discov.** v. 9, n. 3, p. 329-341, mar 2019.

ZAKRZEWSKI, W. et al. Stem cells: past, present, and future. **Stem Cell Res Ther.** n. 10, p. 68, feb 2019.

ZHANG, J.; JIN, Y.; PAN, J. Inhibitory effect of the anthelmintic drug pyrvinium pamoate on T315I BCR-ABL-positive CML cells. **Mol Med Rep.** v. 16, n. 6, p. 9217-9223, dez 2017.

ZHANG, Y.J, et al. Imatinib induces H2AX phosphorylation and apoptosis in chronic myelogenous leukemia cells in vitro via caspase-3/Mst1 pathway. **Acta Pharmacol. Sin.** **2012**, 33, 551–557.

ZHAO, H. e DEININGER, M. W. Declaration of Bcr-Abl1 independence. **Leukemia.** v. 34, n. 11, p. 2827-2836, nov 2020.

ZHOU, T, et al. Chronic Myeloid Leukemia: Beyond BCR-ABL1. **Curr Hematol Malig Rep.** v. 13, n. 6, p. 435-445. dec 2018.

ZHOU, L, et al. Imatinib Ameliorated Retinal Neovascularization by Suppressing PDGFR- α and PDGFR- β . **Cell Physiol Biochem.** v. 48, n.1, p. 263-273. jul 2018.

ANEXO 1

Artigo aceito na Revista *Computational Toxicology*

Computational Toxicology xxx (xxxx) 100197



Contents lists available at ScienceDirect

Computational Toxicology

journal homepage: www.sciencedirect.com/journal/computational-toxicologyJournal
Cover
Image

Synthesis, molecular docking, and biological activity of thioether derived from juglone in preclinical models of chronic myeloid leukemia

Adryhann J. de S. Portilho^{a,1}, Carinne B. S. M. R. Gomes^{b,1}, Caroline S. Moreira^b, Luana da S. M. Forezi^b, Pâmella S. Cordeiro^b, Vanessa do Nascimento^b, Julio P. Daniel^a, Mame C. Vasconcellos^c, Maria E. A. de Moraes^a, Caroline de F. A. Moreira-Nunes^a, Vitor F. Ferreira^d, Raquel C. Montenegro^{a,*}, David R. da Rocha^{b,*}

^a Pharmacogenetics Laboratory, Drug Research and Development Center (NPDM), Federal University of Ceará, Fortaleza, Brazil

^b Institute of Chemistry, Federal University Fluminense, Niterói, Rio de Janeiro, Brazil

^c School of Pharmacy, Federal University of Amazonas, Manaus, Amazonas, Brazil

^d Faculty of Pharmacy, Federal University Fluminense, Niterói, Rio de Janeiro, Brazil

ARTICLE INFO

Keywords:
Myeloid leukemia
Naphthoquinone
Cytotoxic activity
TOP1

ABSTRACT

In this work, 16 new thio-1,4-naphthoquinones were synthesized, and their antiproliferative effects against tumor cell lines SK-MEL-19, ACP-01, ACP-02, HL-60, K-562, K-562-Lucena-1, FEPS, and non-neoplastic human fibroblast MRC-5, were examined. The compounds were selective active against leukemia cell lines. Based on the screening results for cytotoxic activity, naphthoquinone **11a** showed higher cytotoxicity on the chemoresistant leukemia (FEPS) cell line when compared to the chemosensitive (K-562) cell line. Moreover, naphthoquinone **11a** presented excellent ADME/T and did not violate Lipinski's rule of five, indicating good oral absorption. Target prediction revealed DNA topoisomerase I (TOP1) as a possible target of **11a**. The molecular docking prediction showed an -11.94 kcal/mol binding affinity interaction of **11a** with TOP1, involving three hydrogen bonds to ARG364, A113, and G11 from the active site of the enzyme. In addition, naphthoquinone **11a** significantly suppressed the expression of the TOP1 gene in K-562 and FEPS leukemia cell lines. The naphthoquinone **11a** induced significant changes in cell morphology, demonstrating cell and nuclear shrinkage, blebbing formation as well and fragmentation of the cell into apoptotic bodies. Thus, **11a** could be a drug that leads to a new set of TOP1 major inhibitors. In summary, the present study showed a cytotoxic effect of **11a** against chemoresistant and chemosensitive leukemia cell lines with TOP1 as a possible target.

1. Introduction

Among all the different types of cancer, chronic myeloid leukemia (CML) is a myeloproliferative neoplasm with a worldwide annual incidence rate of 1–2 cases per 100,000 men and women [1]. In Brazil, it is estimated that there are 5,920 new cases of leukemia in men and 4,890 in women each year (2020/2022 biennium), with these values corresponding to a risk of 5.67 new cases per 100,000 men and 4.56 for every 100,000 women [2], being 5 times more incident in Brazil than worldwide. CML is a malignant disorder of the hematopoietic stem cells (HSC) characterized by a reciprocal chromosomal translocation between human chromosome 9 and 22, t(9;22)(q34;q11), resulting in the

formation of the BCR-ABL1 oncogene (Philadelphia chromosome) [3]. The BCR-ABL1 fusion protein is a constitutively active tyrosine kinase that enhances cell survival, proliferation, reprogrammed adhesion, and differentiation [4,5].

Target therapy has been used to treat several types of cancer. Imatinib Mesylate (IM) was the first BCR-ABL1 tyrosine kinase inhibitor (TKIs) approved drug by the Food and Drug Administration (FDA) to treat CML patients with t(9;22) [6]. Although TKIs achieved an excellent effective treatment, approximately 15–25% of patients develop resistance at some point during TKI therapy [7]. In this context, drug resistance along with toxicity is often regarded as the main clinical obstacle to effective chemotherapy in patients diagnosed with CML [8].

* Corresponding authors at: Federal University Fluminense, Institute of Chemistry, Campus do Valonguinho, CEP: 24020-150, Niterói, Rio de Janeiro, Brazil (D.R. da Rocha). Federal University of Ceará, Coronel Nunes de Melo, nº 1000, Rodolfo Teófilo, CEP:60416-000 Fortaleza, Ceará, Brazil (R.C. Montenegro).

E-mail addresses: rcm.montenegro@gmail.com (R.C. Montenegro), davidrocha@id.uff.br (D.R. da Rocha).

¹ Both authors contributed equally

<https://doi.org/10.1016/j.comtox.2021.100197>

Received 11 June 2021; Received in revised form 17 October 2021; Accepted 19 October 2021
2468-1113/© 2021

**Synthesis, molecular docking, and biological activity of thioether derived from juglone
in preclinical models of chronic myeloid leukemia**

Adryann J. de S. Portilho^{a,*}, Carinne B. S. M. R. Gomes^{b,*}, Caroline S. Moreira^b, Luana da S. M. Forezi^b, Pâmella S. Cordeiro^b, Vanessa do Nascimento^b, Julio P. Daniel^a, Marne C. Vasconcellos^c, Maria E. A. de Moraes^a, Caroline de F. A. Moreira-Nunes^a, Vitor F. Ferreira^d, Raquel C. Montenegro^{a,**} and David R. da Rocha^{b,**}

^a Pharmacogenetics Laboratory, Drug Research and Development Center (NPDM), Federal University of Ceará, Fortaleza, Brazil.

^b Institute of Chemistry, Federal University Fluminense, Niterói, Rio de Janeiro, Brazil.

^c Faculty of Pharmaceutical Sciences, Federal University of Amazonas, Manaus, Amazonas, Brazil.

^d Faculty of Pharmacy, Federal University Fluminense, Niterói, Rio de Janeiro, Brazil.

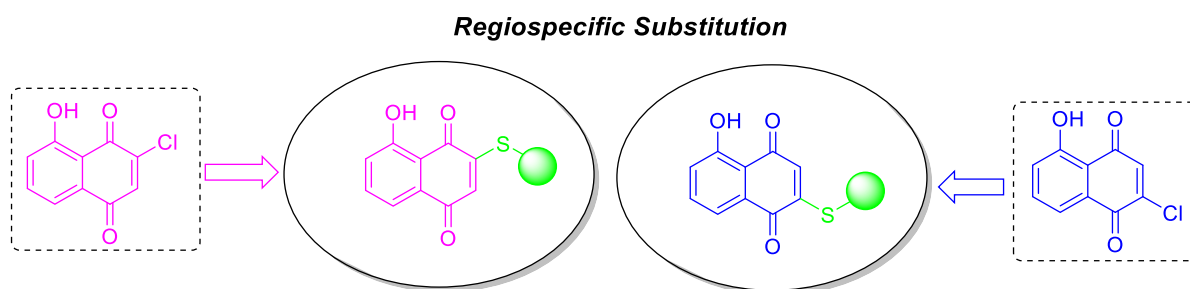
*Both authors contributed equally

****Corresponding authors:**

David Rodrigues da Rocha. Federal University Fluminense, Institute of Chemistry, Campus do Valonguinho, CEP: 24020-150, Niterói, Rio de Janeiro, Brazil. E-mail: davidrocha@id.uff.br

Raquel C. Montenegro. Federal University of Ceará, Coronel Nunes de Melo, nº 1000, Rodolfo Teófilo, CEP:60416-000 Fortaleza, Ceará, Brazil. E-mail: rcm.montenegro@gmail.com

Graphical Abstract



Abstract

In this work, 16 new thio-1,4-naphthoquinones were synthesized, and their antiproliferative effects against tumor cell lines SK-MEL-19, AGP-01, ACP-02, HL-60, K-562, K-562-Lucena-1, FEPS, and non-neoplastic human fibroblast MRC-5, were examined. The compounds were selective active against leukemia cell lines. Based on the screening results for cytotoxic activity, naphthoquinone **11a** showed higher cytotoxicity on the chemoresistant leukemia (FEPS) cell line when compared to the chemosensitive (K-562) cell line. Moreover, naphthoquinone **11a** presented excellent ADME/T, indicating good oral absorption. Target prediction revealed DNA topoisomerase I (*TOP1*) as a possible target of **11a**. The molecular docking prediction showed an -11.94 kcal/mol binding affinity interaction of **11a** with *TOP1*, involving three hydrogen bonds to ARG364, A113, and G11 from the active site of the enzyme. In addition, naphthoquinone **11a** significantly suppressed the expression of the *TOP1* gene in K-562 and FEPS leukemia cell lines. The naphthoquinone **11a** induced significant changes in cell morphology, demonstrating cell and nuclear shrinkage, blebbing formation as well and fragmentation of the cell into apoptotic bodies. Thus, **11a** could be a drug that leads to a new set of *TOP1* major inhibitors. In summary, the present study showed a cytotoxic effect of **11a** against chemoresistant and chemosensitive leukemia cell lines with *TOP1* as a possible target.

Keywords: Chronic myeloid leukemia, Naphthoquinone, Cytotoxic activity, *TOP1*.

1. Introduction

Among all the different types of cancer, chronic myeloid leukemia (CML) is a myeloproliferative neoplasm with a worldwide annual incidence rate of 1–2 cases per 100.000 men and women [1]. In Brazil, it is estimated that there are 5.920 new cases of leukemia in men and 4.890 in women each year (2020/2022 biennium), with these values corresponded to a risk of 5.67 new cases per 100.000 men and 4.56 for every 100.000 women [2], being 5 times more incident in Brazil than worldwide. CML is a malignant disorder of the hematopoietic stem cells (HSC) characterized by a reciprocal chromosomal translocation between human chromosome 9 and 22, $t(9;22)(q34;q11)$, resulting in the formation of the *BCR-ABL1* oncogene (Philadelphia chromosome) [3]. The BCR-ABL1 fusion protein is a constitutively active tyrosine kinase that enhances cell survival, proliferation, reprogrammed adhesion, and differentiation [4,5].

Target therapy has been used to treat several types of cancer. Imatinib Mesylate (IM) was the first *BCR-ABL1* tyrosine kinase inhibitor (TKIs) approved drug by the Food and Drug Administration (FDA) to treat CML patients with $t(9;22)$ [6]. Although TKIs achieved an excellent effective treatment, approximately 15–25% of patients develop resistance at some point during TKI therapy [7]. In this context, drug resistance along with toxicity is often regarded as the main clinical obstacle to effective chemotherapy in patients diagnosed with CML [8]. Therefore, overcoming drug resistance is important for the treatment of disease progression and relapse of CML.

In this context, natural, synthetic, and semi-synthetic drugs can be a useful tool to find new drugs against cancer. Quinones are natural or synthetic compounds with structures correlated with aromatic systems and that present a conjugated cyclic dione fragment in the structure. These compounds also have some fused heterocyclic rings that have been shown to add important cytotoxic activities against various cancer cells [9]. Naphthoquinones are derived from natural juglones, a family of compounds known for their vast biological application [10-22]. Montenegro and co-workers [18] found that juglone induced apoptosis by an extrinsic pathway in a leukemia cell line. Other studies demonstrated the cytotoxic and genotoxic potentials of juglone leading to cell death [23,24].

Several studies show that the presence of hydroxyl groups at the C-5 or C-8 positions of the aromatic ring provides greater efficiency in the redox cycle, thus inducing a higher toxic effect on the cells [25]. Yoshino and co-workers [26] revealed that juglone with

a hydroxyl group in the benzene moiety induced lipid peroxidation and caused potent DNA damage.

DNA topoisomerase I (*TOPI*) enzyme regulates DNA topology by transiently cleaving and replicating DNA strands and performs catalytic functions during replication and transcription [27]. The inhibition of this enzyme leads to the collision of the replication machinery because *TOPI* replication activity is slowed down by the drug, consequently causing potent DNA molecule damage. Therefore, DNA topoisomerases are important targets for the development of cytotoxic agents [28].

The main group of DNA topoisomerase I inhibitors are derivatives of the alkaloid camptothecin, including the analogs topotecan and irinotecan, which are used in the chemotherapy of different leukemias and solid tumors [29,30]. Among camptothecin analogs, irinotecan is a unique prodrug that needs to be hydrolyzed into the active metabolite SN-38 by carboxylesterases [31]. Currently, the conventional TOP inhibitors have severe side effects, such as diarrhea, hematological toxicity, and neutropenia. These effects are likely induced by the inefficient metabolism of TOP inhibitors, which can be cause for large interindividual pharmacokinetic variability [32]. Furthermore, camptothecin and its derivatives demonstrate problems with solubility, which can be a problem for their clinical use [33].

In this context, the present study aimed to evaluate the cytotoxic potential of naphthoquinones derived from juglone in the chemosensitive K-562 and chemoresistant FEPS CML cell lines. Furthermore, only naphthoquinone **11a** pharmacokinetic profiles were valued to unveil their ADME/T properties and molecular docking. Target validation was performed to evaluate the modulation of the *TOPI* gene expression by **11a** using RT-qPCR.

2. Experimental section

2.1. Chemistry

Commonly used reagents in the laboratory were purchased from Sigma-Aldrich and were used without further purification. The glass column chromatography was performed with the solid support of silica gel 60 purchased from Merck (70–230 mesh). The analyses

by thin-layer chromatography for analytical purposes were performed with silica gel plates (Merck, TLC silica gel 60 F254) deposited in polystyrene. The substances were visualized using UV light or aqueous ammonium sulfate solutions (10%). Reaction yields refer to homogeneous materials that were separated by chromatography and analyzed by spectroscopic techniques. The melting points were obtained on a Fischer-Johns device and were not corrected. The infrared spectra were measured with KBr pellets in a Perkin-Elmer spectrophotometer model 1420 FT-IR, and the spectra were calibrated relative to the polystyrene absorbance of 1601.8 cm^{-1} . NMR spectra were obtained on a Varian Unity Plus VXR (500 MHz) instrument and were accumulated in DMSO- d_6 or CDCl_3 solutions. The chemical displacement results were reported in units of δ (ppm) in the field below the solvent and were used as an internal standard. Coupling constants (J) are reported in Hertz, and they refer to the apparent multiplicities of the signals. High-resolution mass spectra (HRMS) were obtained on a MICROMASS Q-TOF mass spectrometer (Waters) in positive mode.

*2.1.1. General procedures for synthesis of derivatives **11** and **12**, regioselective method*

In a round bottom flask, 0.87 g of juglone (**10**) (5.44 mmol) and 40 mL of absolute ethyl alcohol were added. Then, a 5.44 mmol solution of the corresponding thiol in 10 mL of absolute ethyl alcohol was added. The reaction was carried out under constant stirring for 4 hours, followed by TLC. After consumption of the starting material, the mixture was evaporated under reduced pressure. The crude product was purified by column chromatography using hexane/toluene as the eluent mixture.

*2.1.2. General procedure for preparing **11** and **12**, regiospecific conditions*

In a bitubulated flask under an inert atmosphere and with stirring, disulfide (0.50 mmol) and degassed ethanol (5 mL) were added. After complete dissolution of the disulfide, NaBH_4 (1.0 mmol) was added and stirred for 30 min. When finished, chlorinated intermediates (**13** or **14**, 0.4 mmol) were added and stirred for an additional hour. Subsequently, a saturated ammonium chloride solution was added to neutralize the medium, and the ethanol was evaporated. Next, extraction was performed using ethyl acetate (3×50 mL). The organic phase was washed with H_2O (3×50 mL), dried with anhydrous Na_2SO_4 , and evaporated under reduced pressure. The product was purified by silica gel column chromatography using a hexane/ethyl acetate mixture as the eluent.

5-hydroxy-2-(4-tolylthio)naphthalene-1,4-dione (11a). The compound **11a** was obtained in 40% yield (regioselective method) and 73% yield (regiospecific method) as an orange solid with m.p. 171-173 °C; IR (KBr) ν/cm^{-1} 1657, 1625, 1598, 1562, 1467, 1450, 1357, 1299, 1245, 1227, 1184, 1162, 1126, 1104, 1092, 878, 851, 830, 815, 797, 758, 730, 667, 655; ^1H NMR (CDCl_3 , 300.00 MHz) δ 12.09 (s, 1H), 7.68 (dd, 1H, J 7.5 and 1.2), 7.57 (dd, 1H, J 8.4 and 7.5), 7.39-7.43 (m, 2H), 7.30-7.32 (m, 2H), 7.25 (dd, 1H, J 8.4 and 1.2), 6.05 (s, 1H), 2.43 (s, 3H); ^{13}C NMR/APT (CDCl_3 , 75,0 MHz) δ 187.5, 181.6, 161.6, 158.7, 141.3, 135.7, 135.6, 131.9, 131.4, 127.7, 125.2, 123.7, 119.9, 114.8, 21.5; HRMS-ESI Calcd. For $\text{C}_{17}\text{H}_{13}\text{O}_3\text{S}^+$: 297,0580 Found: 297.0593.

8-hydroxy-2-(4-tolylthio)naphthalene-1,4-dione (12a). The compound **12a** was obtained in 47% yield (regioselective method) and 80% yield (regiospecific method) as a brown solid with m.p. 167-169 °C; IR (KBr) ν/cm^{-1} 1646, 1627, 1573, 1559, 1450, 1298, 1281, 1267, 1211, 1184, 1169, 1136, 1107, 1084, 880, 845, 827, 811, 790, 731, 707, 695, 671; ^1H NMR (CDCl_3 , 300.00 MHz) δ 11.72 (s, 1H), 7.59-7.64 (m, 1H), 7.54-7.56 (m, 1H), 7.39-7.43 (m, 2H), 7.29-7.32 (m, 2H), 7.21-7.25 (m, 1H), 6.07 (s, 1H), 2.43 (s, 3H); ^{13}C NMR/APT (CDCl_3 , 125.0 MHz) δ 187.3, 181.4, 162.0, 156.9, 141.3, 137.2, 135.7, 132.4, 131.4, 129.0, 123.9, 123.3, 119.4, 114.8, 21.5; HRMS-ESI Calcd. for $\text{C}_{17}\text{H}_{12}\text{NaO}_3\text{S}^+$: 319,0399 Found for $\text{C}_{17}\text{H}_{12}\text{NaO}_3\text{S}^+$: 319.0394.

5-hydroxy-2-(2-tolylthio)naphthalene-1,4-dione (11b). The compound **11b** was obtained in 24% yield (regioselective method) and 59% yield (regiospecific method) as an orange solid with m.p. 110-112 °C; IR (KBr) ν/cm^{-1} 1667, 1620, 1562, 1471, 1450, 1360, 1318, 1296, 1252, 1228, 1165, 1098, 1059, 876, 852, 830, 795, 762, 749, 713, 669, 656; ^1H NMR (CDCl_3 , 300,00 MHz) δ 12.08 (s, 1H), 7.70 (dd, 1H, J 7.5 and 1.1), 7.57-7.60 (m, 1H), 7.51 (dd, 1H, J 7.6 and 1.1), 7.43-7.46 (m, 1H), 7.40-7.42 (m, 1H), 7.30-7.33 (m, 1H), 7.26 (dd, 1H, J 8.4 and 1.1), 5.89 (s, 1H), 2.41 (s, 3H); ^{13}C NMR/APT (CDCl_3 , 75 MHz): δ 187.4, 181.6, 161.6, 157.0, 143.2, 136.7, 135.8, 131.9, 131.8, 131.4, 128.0, 127.3, 126.4, 125.3, 119.9, 114.9, 20.5; HRMS-ESI Calcd. for $\text{C}_{17}\text{H}_{13}\text{O}_3\text{S}^+$: 297.0580 Found for $\text{C}_{17}\text{H}_{13}\text{O}_3\text{S}^+$: 297.0585.

8-hydroxy-2-(2-tolylthio)naphthalene-1,4-dione (12b). The compound **12b** was obtained in 4% yield (regioselective method) and 71% yield (regiospecific method) as a brown solid

with m.p. 140-142 °C; IR (KBr) ν/cm^{-1} 1628, 1647, 1596, 1559, 1473, 1453, 1360, 1286, 1261, 1210, 1166, 1134, 1086, 1060, 960, 878, 846, 825, 790, 756, 727, 709, 694, 672, 545, 534; ^1H NMR (CDCl_3 , 300.00 MHz) δ 11.73 (s, 1H), 7.60-7.64 (m, 1H), 7.56 (dd, 1H, J 7.4 and 1.2), 7.51 (dd, 1H, J 12.0 and 1.1), 7.42-7.46 (m, 1H), 7.39-7.41 (m, 1H), 7.29-7.33 (m, 1H), 7.24 (dd, 1H, J 8.4 and 1.2), 5.92 (s, 1H), 2.42 (s, 3H); ^{13}C NMR/APT (CDCl_3 , 75.0 MHz): δ 187.4, 181.3, 162.0, 155.1, 143.3, 137.2, 136.8, 132.4, 131.8, 131.4, 128.6, 128.0, 126.1, 123.9, 119.5, 114.9, 20.5; HRMS-ESI Calcd. for $\text{C}_{17}\text{H}_{13}\text{O}_3\text{S}^+$: 297.0580 Found for $\text{C}_{17}\text{H}_{13}\text{O}_3\text{S}^+$: 297.0590.

2-((4-chlorophenyl)thio)-5-hydroxynaphthalene-1,4-dione (11c). The compound **11c** was obtained in 39% yield (regioselective method) and 67% yield (regiospecific method) as a deep red solid with m.p. 127-131 °C; IR (KBr) ν/cm^{-1} 1625, 1568, 1475, 1450, 1261, 1227, 1207, 1165, 1135, 1088, 1074, 1012, 871, 841, 826, 763, 730, 696, 683, 542; ^1H NMR (CDCl_3 , 500.00 MHz) δ 12.03 (s, 1H), 7.69 (dd, 1H, J 7.5 and 1.1), 7.57-7.61 (m, 1H), 7.47-7.51 (m, 4H), 7.27 (dd, 1H, J 8.5 and 1.1), 6.03 (s, 1H); ^{13}C NMR/APT (CDCl_3 , 125.0 MHz) δ 187.3, 181.3, 161.6, 157.7, 137.5, 137.0, 135.9, 131.7, 130.9, 127.9, 125.8, 125.4, 120.0, 114.7; HRMS-ESI Calcd. for $\text{C}_{16}\text{H}_{10}\text{ClO}_3\text{S}^+$: 317.0034 Found for $\text{C}_{16}\text{H}_{10}\text{ClO}_3\text{S}^+$: 317.0027.

2-((4-chlorophenyl)thio)-8-hydroxynaphthalene-1,4-dione (12c). The compound **12c** was obtained in 44% yield (regioselective method) and 95% yield (regiospecific method) as an orange solid with m.p. 165-167 °C; IR (KBr) ν/cm^{-1} 1625, 1568, 1451, 1363, 1299, 1261, 1208, 1165, 1089, 1012, 872, 826, 731, 696, 629; ^1H NMR (CDCl_3 , 500.00 MHz) δ 11.67 (s, 1H), 7.62-7.65 (m, 1H), 7.57 (dd, 1H, J 7.5 and 1.2), 7.47-7.51 (m, 4H), 7.25 (dd, 1H, J 8.4 and 1.2), 6.07 (s, 1H); ^{13}C NMR/APT (CDCl_3 , 75.0 MHz) δ 187.0, 181.2, 162.0, 155.9, 137.6, 137.4, 137.2, 132.2, 130.9, 129.2, 125.5, 124.1, 119.6, 114.7; HRMS-ESI Calcd. for $\text{C}_{16}\text{H}_{10}\text{ClO}_3\text{S}^+$: 317.0034 Found for $\text{C}_{16}\text{H}_{10}\text{ClO}_3\text{S}^+$: 317.0031.

5-hydroxy-2-((4-methoxyphenyl)thio)naphthalene-1,4-dione (11d). The compound **11d** was obtained in 12% yield (regioselective method) and 56% yield (regiospecific method) as a brown-orange solid with m.p. 161-164 °C; IR (KBr) ν/cm^{-1} 1664, 1623, 1590, 1561, 1493, 1452, 1357, 1293, 1240, 1206, 1165, 1091, 1019, 960, 845, 833, 768, 761, 651; ^1H NMR (CDCl_3 , 300.00 MHz) δ 12.09 (s, 1H), 7.68 (dd, 1H, J 7.5 and 1.1), 7.56-7.59 (m, 1H), 7.42-

7.45 (m, 2H), 7.25 (dd, 1H, *J* 11.1 and 1.1), 7.00-7.03 (m, 2H), 6.04 (s, 1H), 3.87 (s, 3H); ^{13}C NMR/APT (CDCl_3 , 75.0 MHz) δ 187.5, 181.7, 161.7, 161.5, 159.1, 137.2, 135.7, 131.8, 127.7, 125.2, 119.9, 117.4, 116.2, 114.8, 55.6; HRMS-ESI Calcd. for $\text{C}_{17}\text{H}_{13}\text{O}_4\text{S}^+$: 313.0529 Found for $\text{C}_{17}\text{H}_{13}\text{O}_4\text{S}^+$: 313.0547.

8-hydroxy-2-((4-methoxyphenyl)thio)naphthalene-1,4-dione (12d). The compound **12d** was obtained in 42% yield (regioselective method) and 57% yield (regiospecific method) as an orange solid with m.p. 153-157 °C; IR (KBr) ν/cm^{-1} 1634, 1592, 1562, 1494, 1457, 1444, 1288, 1250, 1202, 1172, 1159, 1133, 1102, 1085, 1020, 1007, 957, 878, 844, 833, 825, 800, 789, 736, 711, 692, 683, 672, 533; ^1H NMR (CDCl_3 , 300.00 MHz) δ 11.72 (s, 1H), 7.60-7.63 (m, 1H), 7.56 (dd, 1H, *J* 7.4 and 1.2), 7.42-7.45 (m, 2H), 7.23 (dd, 1H, *J* 8.3 and 1.2), 7.00-7.03 (m, 2H), 6.07 (s, 1H), 3.87 (s, 3H); ^{13}C NMR/APT (CDCl_3 , 75.0 MHz) δ 187.4, 181.4, 161.9, 161.7, 157.3, 137.3, 137.2, 132.4, 129.0, 123.9, 119.4, 117.1, 116.2, 114.8, 55.6; HRMS-ESI Calcd. for $\text{C}_{17}\text{H}_{13}\text{O}_4\text{S}^+$: 313,0529 Found for $\text{C}_{17}\text{H}_{13}\text{O}_4\text{S}^+$: 313.0532.

2-((furan-2-ylmethyl)thio)-5-hydroxynaphthalene-1,4-dione (11e). The compound **11e** was obtained in 16% yield (regioselective method) and 24% yield (regiospecific method) as an orange solid with m.p. 133-135 °C; IR (KBr) ν/cm^{-1} 1620, 1552, 1454, 1372, 1360, 1319, 1253, 1233, 1207, 1170, 1154, 1107, 1013, 934, 885, 862, 831, 764, 751, 741, 732, 672, 655, 596; ^1H NMR (CDCl_3 , 300.00 MHz) δ 12.12 (s, 1H), 7.65 (dd, 1H, *J* 7.4 and 1.1), 7.56-7.59 (m, 1H), 7.39 (m, 1H), 7.26-7.28 (m, 1H), 6.70 (s, 1H), 6.34-6.35 (m, 2H), 4.12 (s, 2H); ^{13}C NMR/APT (CDCl_3 , 75.0 MHz) δ 187.0, 181.5, 161.7, 155.5, 147.9, 135.8, 131.8, 127.3, 125.3, 120.0, 114.7, 111.0, 109.3, 27.9; HRMS-ESI Calcd. for $\text{C}_{15}\text{H}_{11}\text{O}_4\text{S}^+$: 287,0373 Found for $\text{C}_{15}\text{H}_{11}\text{O}_4\text{S}^+$: 287.0367.

2-((furan-2-ylmethyl)thio)-8-hydroxynaphthalene-1,4-dione (12e). The compound **12e** was obtained in 3% yield (regioselective method) and 30% yield (regiospecific method) as a yellow solid with m.p. 137-140 °C; IR (KBr) ν/cm^{-1} 1643, 1625, 1557, 1447, 1368, 1291, 1273, 1250, 1212, 1167, 1153, 1134, 1089, 1070, 1014, 937, 882,847, 827, 747, 719, 707, 695, 674, 599, 542, 534; ^1H NMR (CDCl_3 , 300.00 MHz) δ 11.66 (s, 1H), 7.61-7.65 (m, 2H), 7.39 (m, 1H), 7.23 (dd, 1H, *J* 7.4 and 2.2), 6.74 (s, 1H), 6.34-6.35 (m, 2H), 4.12 (s, 2H). ^{13}C NMR/APT (CDCl_3 , 75.0 MHz) δ 187.2, 181.0, 162.0, 153.6, 147.8, 137.3, 132.2, 128.5,

124.0, 119.6, 114.8, 111.0, 109.3, 27.8; HRMS-ESI Calcd. for $C_{15}H_{11}O_4S^+$: 287.0373 Found for $C_{15}H_{11}O_4S^+$: 287.0365.

5-hydroxy-2-(propylthio)naphthalene-1,4-dione (11f). The compound **11f** was obtained in 17% yield (regioselective method) as a yellow solid with m.p. 132-135 °C; IR (KBr) ν/cm^{-1} 1666, 1620, 1601, 1552, 1450, 1424, 1362, 1320, 1292, 1248, 1222, 1168, 1130, 1101, 1080, 1053, 879, 861, 831, 800, 766, 749, 733, 669, 629, 555; 1H NMR ($CDCl_3$, 300.00 MHz) δ 12.18 (s, 1H), 7.66 (dd, 1H, J 7.5 and 1.2), 7.54-7.59 (m, 1H), 7.27 (dd, 1H, J 8.4 and 1.2), 6.54 (s, 1H), 2.82 (t, 2H, J 7.3), 1.75-1.88 (m, 2H), 1.11 (t, 3H, J 7.4); ^{13}C NMR/APT ($CDCl_3$, 75.0 MHz) δ 187.0, 181.5, 161.6, 157.0, 135.7, 132.0, 128.9, 125.2, 119.9, 114.8, 32.9, 21.0, 13.8; HRMS-ESI Calcd. for $C_{13}H_{13}O_3S^+$: 249.0580 Found for $C_{13}H_{13}O_3S^+$: 249.0582.

8-hydroxy-2-(propylthio)naphthalene-1,4-dione (12f). The compound **12f** was obtained in 16% yield (regioselective method) and 31% yield (regiospecific method) as an orange-red solid with m.p. 141-143 °C; IR (KBr) ν/cm^{-1} 1627, 1556, 1454, 1367, 1292, 1274, 1241, 1218, 1170, 1138, 1069, 960, 884, 854, 830, 798, 744, 673, 629; 1H NMR ($CDCl_3$, 300.00 MHz) δ 11.72 (s, 1H), 7.60-7.64 (m, 2H), 7.22 (dd, 1H, J 6.9 and 2.7), 6.58 (s, 1H), 2.82 (t, 2H, J 7.3), 1.78-1.85 (m, 2H), 1.11 (t, 3H, J 7.4); ^{13}C NMR/APT ($CDCl_3$, 75.0 MHz) δ 187.3, 181.0, 162.0, 155.1, 137.2, 132.3, 127.9, 123.9, 119.5, 115.0, 32.8, 21.0, 13.8; HRMS-ESI Calcd. for $C_{13}H_{13}O_3S^+$: 249.0580 Found for $C_{13}H_{13}O_3S^+$: 249.0579.

5-hydroxy-2-(phenylthio)naphthalene-1,4-dione (11g). The compound **11g** was obtained in 28% yield (regioselective method) and 53% yield (regiospecific method) as a red solid with m.p. 137-140 °C; IR (KBr) ν/cm^{-1} 1664, 1626, 1532, 1453, 1357, 1299, 1240, 1165, 1098, 956, 924, 879, 851, 763, 692, 653, 631; 1H NMR ($CDCl_3$, 500.00 MHz) δ 12.07 (s, 1H), 7.69 (dd, 1H, J 7.5 and 1.1), 7.57-7.60 (m, 1H), 7.56-7.49 (m, 5H), 7.26 (dd, 1H, J 8.4 and 1.1), 6.05 (s, 1H); ^{13}C NMR/APT ($CDCl_3$, 125.0 MHz) δ 187.4, 181.5, 161.6, 158.3, 135.9, 135.8, 131.8, 130.8, 130.6, 127.8, 127.3, 125.3, 119.9, 114.8; HRMS-ESI Calcd. for $C_{16}H_{11}O_3S^+$: 283.0423 Found for $C_{16}H_{11}O_3S^+$: 283.0434.

8-hydroxy-2-(phenylthio)naphthalene-1,4-dione (12g). The compound **12g** was obtained in 25% yield (regioselective method) and 78% yield (regiospecific method) as an orange

solid with m.p. 108-110 °C; IR (KBr) ν/cm^{-1} 1622, 1598, 1574, 1563, 1455, 1442, 1290, 1265, 1231, 1206, 1169, 1158, 1140, 1098, 844, 828, 774, 745, 707, 690, 542, 535; ^1H NMR (CDCl_3 , 300.00 MHz) δ 11.71 (s, 1H), 7.61-7.64 (m, 1H), 7.57 (d, 1H, J 1.2), 7.51-7.56 (m, 5H), 7.24 (dd, 1H, J 8.4 and 1.2), 6.09 (s, 1H); ^{13}C NMR/APT (CDCl_3 , 75.0 MHz) δ 187.2, 181.3, 162.0, 156.5, 137.3, 135.9, 134.6, 132.4, 130.9, 130.6, 129.1, 124.0, 119.5, 114.8; HRMS-ESI Calcd. for $\text{C}_{16}\text{H}_{11}\text{O}_3\text{S}^+$: 283.0423 Found for $\text{C}_{16}\text{H}_{11}\text{O}_3\text{S}^+$: 283.0430.

5-hydroxy-2-((4-nitrophenyl)thio)naphthalene-1,4-dione (11h). The compound **11h** was obtained in 8% yield (regioselective method) as an orange solid with m.p. 207-210 °C; IR (KBr) ν/cm^{-1} 1665, 1616, 1562, 1514, 1452, 1344, 1292, 1229, 1163, 1089, 1013, 954, 881, 852, 799, 765, 744, 686, 652; ^1H NMR (CDCl_3 , 300.00 MHz) δ 11.94 (s, 1H), 8.34-8.39 (m, 2H), 7.74-7.79 (m, 2H), 7.71 (dd, 1H, J 7.5 and 1.2), 7.59-7.64 (m, 1H), 7.29 (dd, 1H, J 8.4 and 1.2), 6.09 (s, 1H); ^{13}C NMR/APT (CDCl_3 , 75.0 MHz) δ 187.1, 180.9, 161.8, 156.0, 144.2, 136.5, 136.2, 136.1, 131.5, 128.5, 125.3, 124.6, 120.2, 114.7; HRMS-ESI Calcd. for $\text{C}_{16}\text{H}_{10}\text{NO}_5\text{S}^+$: 328.0274 Found for $\text{C}_{16}\text{H}_{10}\text{NO}_5\text{S}^+$: 328.0281.

8-hydroxy-2-((4-nitrophenyl)thio)naphthalene-1,4-dione (12h). The compound **12h** was obtained in 40% yield (regioselective method) as an orange solid with m.p. 230-234 °C; IR (KBr) ν/cm^{-1} 1654, 1622, 1597, 1560, 1513, 1484, 1450, 1370, 1340, 1263, 1211, 1163, 1137, 1085, 1011, 959, 887, 844, 826, 790, 729, 688; ^1H NMR (CDCl_3 , 500.00 MHz) δ 11.60 (s, 1H), 8.34-8.37 (m, 2H), 7.75-7.78 (m, 2H), 7.64-7.67 (m, 1H), 7.58 (dd, 1H, J 7.4 and 1.0), 7.26-7.28 (m, 1H), 6.12 (s, 1H); ^{13}C NMR/APT (CDCl_3 , 125.0 MHz) δ 186.5, 181.1, 162.2, 154.3, 149.3, 137.6, 136.6, 136.0, 132.1, 129.8, 125.3, 124.4, 119.8, 114.6; HRMS-ESI Calcd. for $\text{C}_{16}\text{H}_{10}\text{NO}_5\text{S}^+$: 328,0274 Found for $\text{C}_{16}\text{H}_{10}\text{NO}_5\text{S}^+$: 328.0286.

2.2. Biological assays

2.2.1. Cell Culture

The tests were conducted in eight human cell lines: SK-MEL-19 (human melanoma), AGP-01 (gastric malignant ascites), ACP-02 (gastric adenocarcinoma), HL-60 (promyelocytic), K-562 (chronic myeloid leukemia—chemosensitive), K-562-Lucena-1, FEPS (chronic leukemia—chemoresistant) and MRC-5 (non-neoplastic human fibroblast). The K-562-Lucena-1 cell line is derived from the K-562 cell line following selection by

vincristine and presenting *ABCB1* overexpression [34], and the FEPS cell line, also derived from K-562 following selection by daunorubicin and presenting *ABCB1* and *ABCC1* overexpression [35], was kindly provided by Prof. Dr. Vivian Rumjanek from the Federal University of Rio de Janeiro. The cells were cultured in Dulbecco's Modified Eagle's Medium (DMEM, Gibco®) or Roswell Park Memorial Institute medium 1640 (RPMI 1640, Gibco®) supplemented with 10% fetal bovine serum (FBS, Gibco®), 100 U/mL of penicillin, and 100 µg/mL of streptomycin (Gibco®). All cells were cultured at 37 °C and 5% CO₂. In the case of K-562-Lucena-1 and FEPS, the medium was maintained with vincristine sulfate at a final concentration of 60 nM and daunorubicin at a concentration of 466 nM, respectively.

2.2.2. Cytotoxicity against cancer cell lines

The cytotoxicity of the compounds was evaluated in a *concentration-response curve* against eight different cell lines: SK-MEL-19, AGP-01, ACP-02, HL-60, K-562, K-562-Lucena-1, FEPS, and MRC-5. Cells were plated (5×10^3 cells/well) in a 96-well-plate, after 24 hours cells were treated with compounds (0.312–20 µM) for 72 hours. Doxorubicin was used as a positive control and cells in the negative control were treated with DMSO (0.01%). Cell viability was evaluated by the Alamar blue assay [36]. Briefly, Alamar blue solution (0.2 mg/ml) was added to each well for 3h at 37 °C. The fluorescence was read at 535 nm (reduced form; resorufin) and 595 nm (oxidized form; resazurin) using a microplate reader (Beckman Coulter Microplate Reader DTX 880, Bio-TEK).

2.2.3. Analysis of morphological changes

The K-562 and FEPS cell lines (5×10^3 cells per well) were plated for 24h at 37 °C. After this period, cells were treated with **11a** or SN-38 for 24h. Next, cells were stained with a Panotic LB Kit (Laborclin, Paraná, Brazil) and analyzed at 40X magnification by light microscopy (Motic® BA310, Canada). Cells showing morphological characteristics of apoptosis such cytoplasm protuberances, reduction of the cell and nuclear volume, blebbing were considered positive.

2.2.4. RNA isolation and quantitative real-time PCR

The K-562 and FEPS cell lines (5×10^3 cells per well) were plated for 24h at 37 °C. After 24 h, cells were treated with **11a** (0.1 μ M and 0.5 μ M) for 18 h, a time that does not modify cellular viability (supplementary). After treatment, cells were collected for mRNA extraction using TRIzol Reagent[®] (Invitrogen[™]) according to the manufacturer's protocol. From 20 ng of RNA, the cDNA was synthesized using HighCapacity cDNA Reverse Transcriptase kit (Life Technologies, Carlsbad, CA, USA) to convert the extracted and purified RNA to cDNA. The RNA concentration and quality were determined by using Nanodrop 2000 (ThermoFisher Scientific). The conversion step was performed on a Veriti[®] thermal cycler (Applied Biosystems[®], Foster City, CA, USA).

All requirements proposed in the Minimum Information for Publication of Quantitative Real-Time PCR Experiments—MIQE Guidelines were followed [37]. The gene selected for evaluation of expression was *TOP1* (Hs 01080056_m1), and the gene *ABL* (Hs 99999002_mH) served as the endogenous control. The RT-qPCR was performed using QuantStudio5 Real-Time PCR system (Applied Biosystems[®]). For each sample, concentrations were used as follows: 3 μ l of cDNA, 1 μ l of each primer/probe, 12.5 μ l of TaqMan[®] Gene Expression Master Mix (Life Technologies), and 8.5 μ l of Ultrapure water. Each sample was analyzed in triplicate for the validation of the technique and the values of CT and expression level were calculated using the $2^{-\Delta\Delta CT}$ (delta-delta threshold cycle), considering DMSO control as a calibrator of the experiment [38].

2.3. In silico studies

2.3.1. ADME/T and drug-likeness predictions

The ADME/T (Absorption, Distribution, Metabolism, Excretion, and Toxicity) of the compound was performed by using computational approaches [39]. Briefly, the structure of the naphthoquinone **11a** compound was drawn with the MarvinSketch program to collect the SMILES. The analysis of ADME/T was predicted by using AdmetSAR software (<http://lmmd.ecust.edu.cn: 8000/>) to examine the different pharmacokinetic parameters of **11a** [40]. The characteristics of drug-likeness were determined by in silico analysis using Molinspiration Online Property Calculation Toolkit software (<http://www.molinspiration.com/cgi-bin/properties>). According to the Lipinski rule of five,

for a drug to have good oral bioavailability, it must fulfill the following physicochemical parameters: molecular weight ≤ 500 ; logP ≤ 5 ; H-bond donors ≤ 5 ; H-bond acceptors ≤ 10 and TPSA ≤ 140 (\AA^2) [41].

2.3.2. Molecular targets prediction

We used a computerized virtual platform to screen for putative targets of candidate molecules. The target prediction was performed using the SwissTargetPrediction tool ([http:// www.swisstargetprediction.ch/](http://www.swisstargetprediction.ch/)) a web server to accurately predict the targets of bioactive molecules based on a combination of 2D and 3D similarity measures with known ligands [42]. To improve the reliability of prediction results, only high-probability targets were selected. Next, the targets identified were analyzed by the Therapeutic Target Database ([http:// bidd.nus.edu.sg/ group/cjttd/](http://bidd.nus.edu.sg/group/cjttd/), 2015-09-10), to verify whether these targets presented potential therapeutic values

2.3.3. Molecular docking

The AutoDock Vina program was used for *in silico* docking and the AutoDock Tools (ADT) program was used for the size and center answers of the three-dimensional search box (grid box) [43]. The 3-D structure of *TOP1* was used in the crystal structure of the human *TOP1* DNA complex (PDB ID: 1K4T). To prepare the compound for molecular docking analysis: (1) 2-D structures were converted into 3-D structures, (2) the program ADT was used to convert structures to the Vina format (pdbqt file), and (3) hydrogen atoms were added using the Pymol program.

2.4. Statistics analyses

Assays were performed in triplicate in three independent experiments. Results are shown as a mean \pm standard deviation (SD). The treated samples were compared to DMSO by Analysis of Variance (ANOVA) followed by the Bonferroni post-test. Significant differences were considered with an interval of confidence of 95% ($p < 0.05$). GraphPad Prism 5.01 software was used for data analysis.

3. Results

3.1. Chemistry

To obtain the thionaphthoquinones **11** and **12**, the synthesis of 5-hydroxy-1,4-naphthoquinone (juglone, **10**) was initially carried out by reacting the 1,5-naphthalene diol (**9**) with periodic acid. After obtaining compound **10**, the insertion of substituted thiophenols at the 2 or 3 positions of the juglone was promoted via a Michael addition. The resulting mixture containing the two desired isomers (**11** and **12**) was obtained as shown in **Figure 1**. It was found that isomers **11** and **12** had very similar TLC elution profiles due to their structural similarity. Consequently, it was impossible to purify the compounds using a conventional chromatographic column employing a silica flash (70-230 mesh). To bypass this problem, we applied a medium pressure column chromatographic system employing silica flash (70–230 mesh) to improve the separation capacity of the stationary phase and provide the conditions necessary for separation. Thus, the isomers **11** and **12** were isolated and their yields are broken down in **Figure 1**. Although we performed the separation of compounds **11** and **12**, it required high consumption of time and solvents. All thioethers of **11** and **12** were fully characterized by spectroscopic methods and high-resolution mass spectra (see Supplementary Information).

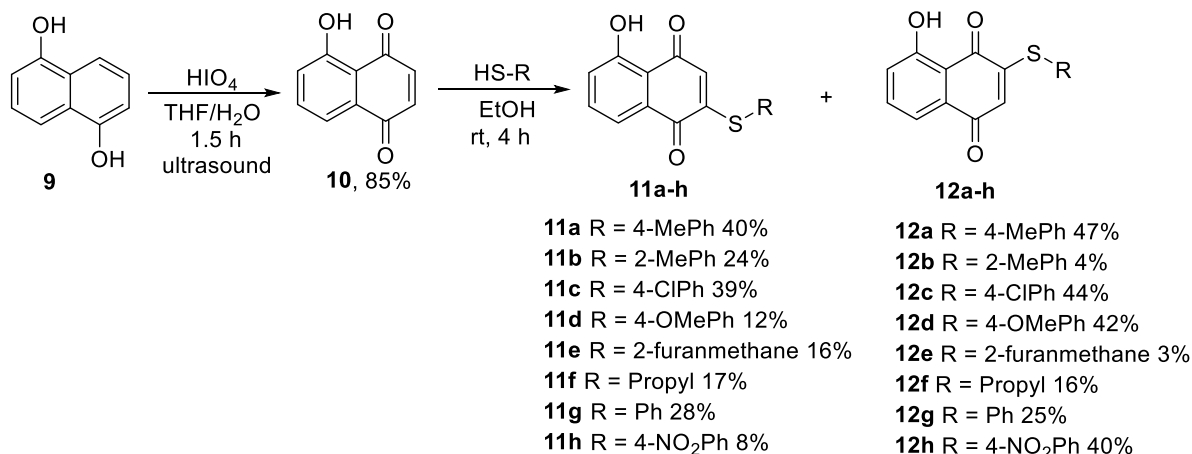


Figure 1. Synthesis of thionaphthoquinones **11a-h** and **12a-h**.

To circumvent the purification process detailed above, it was mandatory to develop a regiospecific methodology for preparing isomers **11** and **12**. To achieve this, the synthesis of chlorinated intermediates **13** and **14** were initially studied. First, compound **13** was obtained by the reaction of the juglone with chlorine gas, resulting in the dichlorinated intermediate **15**, which was then refluxed in ethanol resulting in compound **13** at 85% yield. To obtain the

chlorinated intermediate **14**, the hydroxyl groups of 1,5-naphthalene diol were initially protected using acetic anhydride under basic conditions, resulting in **16** at 96% yield. Then, an oxidative chlorination reaction was performed by reacting **16** with *N*-chlorosuccinimide (NCS) and subsequent acid hydrolysis in an alcohol medium, giving the regioisomer **14** at 80% yield (**Figure 2**).

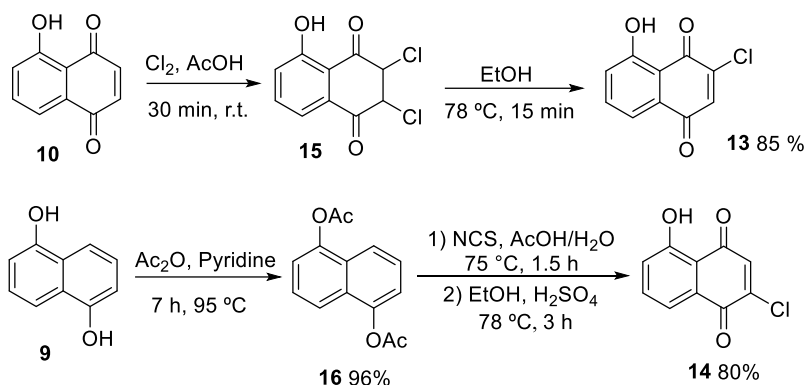


Figure 2. Synthetic route for preparing the chloro-1,4-naphthoquinones **13** and **14**.

After the preparation of the compounds **13** and **14** in good yield, thioethers **11** and **12** were prepared by reacting **13** and **14** with different disulfides in the presence of sodium borohydride using degassed anhydrous ethanol as the solvent as presented in **Figure 3**. All derivatives were purified by flash chromatography and were obtained in moderate to good yields. The reaction for obtaining compound **11f** did not work under the conditions studied. Compounds **11h** and **12h** could not be obtained by this methodology since the necessary disulfide was not available.

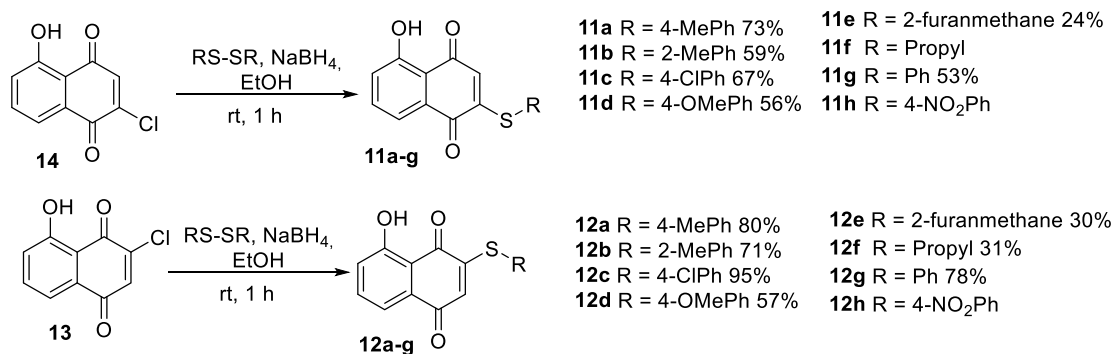


Figure 3. Regiospecific synthesis of thioethers **11** and **12**.

Comparing the overall yields achieved to obtain thionaphthoquinones **11** and **12** by regioselective (**Figure 1**) and regiospecific methods (**Figure 3**), the regiospecific methodology was superior because it provided the thioethers using simpler techniques and in higher yields, as shown in **Table 1**.

Table 1. Comparison between methods used in the synthesis of thioethers.

		Regioselective Methods				Regiospecific methods			
		Yields 11	overall 1 yields	Yields 12	overall 1 yields	Yields 11	overall 1 yields	Yields 12	overall 1 yields
a	4-MePh	40%	34%	47%	40%	73%	56%	80%	58%
b	2-MePh	24%	20%	4%	3%	59%	45%	71%	51%
c	4-ClPh	39%	33%	44%	37%	67%	51%	95%	69%
d	4-OMePh	12%	10%	42%	36%	56%	43%	57%	41%
e	furan-2-ylmethyl	16%	14%	3%	3%	24%	18%	30%	22%
f	Propyl	17%	14%	16%	14%	-	-	31%	22%
g	Ph	28%	24%	25%	21%	53%	41%	78%	56%
h	4-NO ₂ Ph	8%	7%	40%	34%	-	-	-	-

3.2. Compound **11a** shows cytotoxicity against cancer cell lines

To determine whether naphthoquinones displayed anticancer activity, cellular viability was measured after treatment with compounds. All naphthoquinones studied exhibited a strong inhibitory effect on cell viability against different leukemia cells, HL60, K-562, and K-562-Lucena-1 (**Table 2**). No cytotoxicity was observed for ACP-02, AGP-01, and SK-MEL-19. Soon after, it was proposed the cytotoxic evaluation of 16 naphthoquinones in the non-neoplastic human fibroblast cell line (MRC-5). Interestingly, the data revealed that naphthoquinone **11a** stood out with IC of 15.46 μ M after 72 h of treatment, demonstrating that this molecule has lower cytotoxic activity in the MRC-5 cell line when compared to other naphthoquinones.

Naphthoquinone 11a presented a strong cytotoxic activity against resistant leukemia cell line (FEPS) with an IC_{50} value of $0.60 \pm 0.20 \mu\text{M}$ (CI 95% 0.45 -0.98) and less cytotoxicity against non-neoplastic MRC-5 cell line with an IC of $15.46 \mu\text{M}$. Interestingly, the naphthoquinone 11a showed high selectivity index when compared to the other compounds, being 27.56x more potent in the chemoresistant cell line FEPS compared to MRC-5 cell line. Based on these results, we chose naphthoquinone 11a to perform *in silico* analyses and further *in vitro* experiments.

Table 2. Cytotoxic activity expressed as IC₅₀ in μM and standard deviation (SD), with its respective confidence interval in neoplastic and non-neoplastic cell lines and selectivity index, after of treated for 72h by compounds.

Compounds	IC ₅₀ $\mu\text{M}^a \pm \text{SD}$									
	SK-MEL-19	AGP-01	ACP-02	MRC-5	HL-60	SI	K-562	SI	K-562-Lucena 1	SI
11a	>10	>10	>10	15.46 (\pm 1.19) (8.88 - 17.90)	0.82 (\pm 0.22) (0.62 - 1.09)	18.85	1.12 (\pm 0.16) (0.90 - 1.38)	13.80	0.45 (\pm 0.13) (0.34 - 0.60)	17.17
11b	>10	>10	>10	8.12 (\pm 0.36) (5.45 - 11.89)	0.88 (\pm 0.15) (0.47 - 1.62)	10.36	0.88 (\pm 0.16) (0.73 - 1.06)	10.36	0.31 (\pm 0.18) (0.25 - 0.38)	24.60
11c	>10	>10	>10	8.10 (\pm 0.38) (5.57 - 12.94)	2.16 (\pm 0.40) (1.80 - 2.59)	4.67	2.53 (\pm 0.19) (2.15 - 2.97)	3.99	0.96 (\pm 0.24) (0.68 - 1.36)	10.52
11d	>10	>10	>10	9.98 (\pm 1.57) (7.32 - 14.02)	0.77 (\pm 0.23) (0.69 - 0.91)	12.96	1.28 (\pm 0.11) (1.14 - 1.45)	9.89	0.41 (\pm 1.47) (0.34 - 0.96)	24.34
11e	>10	>10	>10	12.15 (\pm 1.47) (6.52 - 30.67)	0.73 (\pm 0.92) (0.58 - 0.93)	16.64	0.34 (\pm 0.14) (0.26 - 0.42)	35.73	0.80 (\pm 0.44) (0.67 - 0.94)	15.18
11f	>10	>10	>10	14.05 (\pm 1.26) (7.61 - 20.19)	0.72 (\pm 0.19) (0.61 - 0.84)	19.51	0.35 (\pm 0.16) (0.26 - 0.42)	40.14	1.04 (\pm 0.55) (0.85 - 1.25)	13.50
11g	>10	>10	>10	11.44 (\pm 0.57) (5.72 - 15.29)	1.53 (\pm 0.15) (1.36 - 1.73)	7.47	0.64 (\pm 0.15) (0.49 - 0.84)	17.87	1.61 (\pm 0.39) (1.26 - 2.04)	7.10
11h	>10	>10	>10	10.15 (\pm 1.40) (5.31 - 17.45)	2.20 (\pm 0.28) (1.70 - 2.85)	4.61	0.89 (\pm 0.18) (0.73 - 1.07)	11.40	2.06 (\pm 1.14) (1.78 - 2.37)	4.92
12a	>10	>10	>10	7.15 (\pm 1.05) (5.32 - 14.87)	0.59 (\pm 0.16) (0.48 - 0.72)	12.11	0.88 (\pm 0.94) (0.76 - 1.02)	8.12	0.32 (\pm 0.27) (0.34 - 0.60)	22.34
12b	>10	>10	>10	10.16 (\pm 1.47) (5.52 - 12.91)	1.56 (\pm 0.19) (1.05 - 2.32)	6.51	1.13 (\pm 0.39) (0.93 - 1.37)	8.99	0.48 (\pm 0.24) (0.33 - 0.70)	21.14

12c	>10	>10	>10	10.11 (± 1.53) (7.31 - 11.30)	1.21 (± 0.16) (1.02 - 1.45)	8.35	1.31 (± 0.14) (1.14 - 1.51)	7.71	0.52 (± 0.38) (0.68 - 1.36)	19.44
12d	>10	>10	>10	13.75 (± 1.64) (6.78 - 30.67)	0.81 (± 0.11) (0.59 - 1.10)	16.97	0.44 (± 0.20) (0.34 - 0.57)	31.25	1.21 (± 0.36) (0.98 - 1.48)	11.36
12e	>10	>10	>10	11.02 (± 1.77) (5.10 - 14.21)	0.89 (± 0.13) (0.73 - 1.08)	12.42	0.43 (± 0.27) (0.32 - 0.55)	25.72	1.08 (± 0.21) (0.95 - 1.22)	10.24
12f	>10	>10	>10	9.34 (± 0.88) (8.89 - 10.28)	1.00 (± 0.30) (0.77 - 1.30)	9.34	0.34 (± 0.19) (0.27 - 0.44)	27.47	0.96 (± 1.46) (0.73 - 1.24)	9.72
12g	>10	>10	>10	10.63 (± 0.97) (9.31 - 13.12)	1.39 (± 0.26) (0.86 - 2.24)	7.64	0.48 (± 0.27) (0.40 - 0.56)	22.14	1.72 (± 0.22) (1.48 - 2.0)	6.71
12h	>10	>10	>10	10.71 (± 0.72) (7.76 - 16.56)	2.14 (± 0.16) (1.69 - 2.75)	5.00	0.96 (± 0.27) (0.74 - 1.23)	11.15	2.18 (± 0.19) (1.90 - 2.51)	4.91
Doxo^b	0.46 (± 0.28) (0.26 - 0.77)	0.46 (± 0.20) (0.38 - 0.56)	0.52 (± 0.27) (0.37 - 0.60)	0.24 (± 0.82) (0.16 - 0.25)	0.05 (± 0.10) (0.02 - 0.12)	4.80	0.14 (± 0.22) (0.10 - 0.19)	1.71	0.21 (± 0.45) (0.13 - 0.32)	1.14

^a Data are presented as IC₅₀ values, standard deviation and 95% confidence intervals obtained by nonlinear regression for all cell lines in triplicate from three independent experiments. ^bDoxorubicin (Doxo) was used as positive control. Only compounds with an IC₅₀ value lower than 10 μM were considered active for tumors cell lines.

3.3. Morphological features and cell death pattern caused by **11a**.

Morphological changes induced by **11a** were observed by Panotic LB Kit, as presented in **Figure 4**. Control cells demonstrated intact cells with normal morphology (**Figure 4a–d**). Naphthoquinone **11a** at 0.1 μM induced noticeable changes in the cell and nuclear volume in the K-562 cell line, which were considered a suggestion of apoptotic cells (**Figure 4c**). Furthermore, FEPS cells treated with 0.1 μM showed shrinkage of the cell and the nucleus, blebbing formation as well and fragmentation of the cell into apoptotic bodies, all typical of apoptotic features (**Figure 4f**). SN-38 also exhibited apoptotic at 0.1 μM , with all of these considered positive for apoptosis (**Figure 4b, e**).

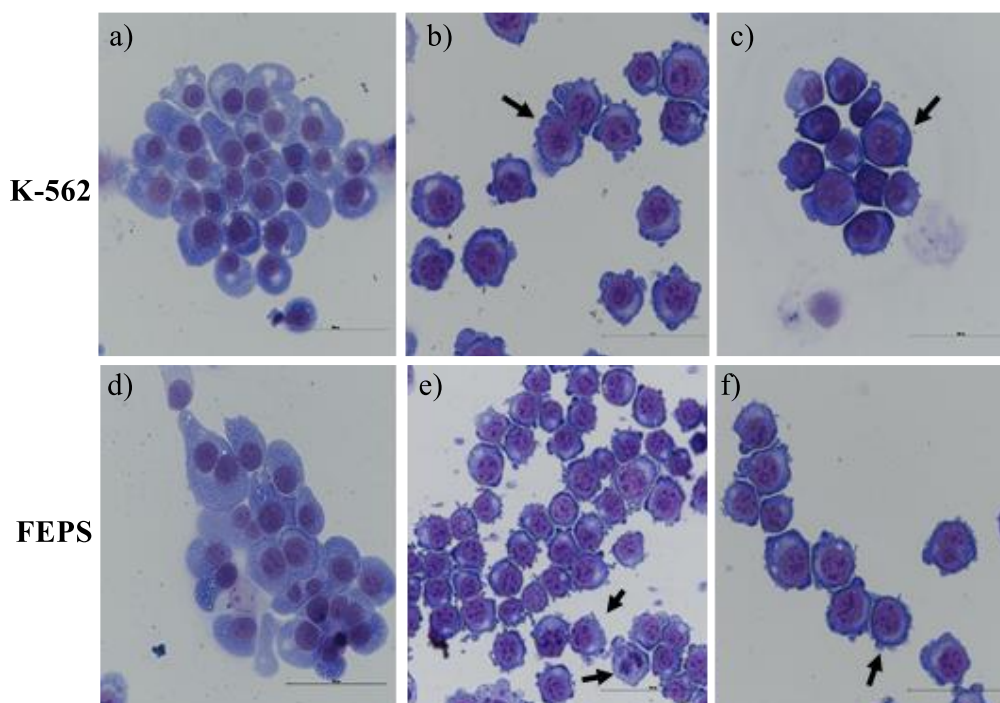


Figure 4. Morphology assessments by Panotic LB Kit. K-562 and FEPS cells line untreated (**a** and **d**) or treated with naphthoquinone **11a** (0.1 μM , **c** and **f**). SN-38 (0.1 μM) was used as positive control in the two cell lines (**b** and **e**), were analyzed by light microscopy.

3.4. ADME/T and drug-likeness results

The pharmacological and toxicokinetic safety of **11a** was also evaluated. Computational modeling by admetSAR and Molinspiration software was used. The results of ADME/T with probability scores are summarized in **Table 3**. In the absorption section, **11a**

was positive for the human epithelial cell line Caco-2 permeability and showed good human intestinal absorption (HIA). Moreover, the **11a** compound is a non-inhibitor of P-glycoprotein (P-gp) and was identified as non-substrate P-gp. In the distribution, naphthoquinone **11a** showed a high ability to bind with plasma protein (PPB) and was positive for being blood-brain barrier permeable (BBB). Concerning metabolism, results showed that **11a** was a noninhibitor of CYP450 1A2, CYP450 2C9, and CYP450 2C19. On the other hand, the **11a** molecule was a substrate for enzyme CYP450 3A4, and a nonsubstrate for CYP450 2C9 and CYP450 2D6. On excretion prediction, compound **11a** showed a half-life of > 30 minutes. For toxicity, **11a** was not an inhibitor for hERG; furthermore, it was positive for mutagenesis. Generally, the naphthoquinone **11a** exhibited a good ADME/T profile.

Table 3. Prediction of ADME/T properties of naphthoquinone **11a** using admetSAR server.

Model	Result	Probability
Absorption		
Caco-2 permeability	Positive	0.769
HIA (Human Intestinal Absorption)	Positive	0.990
Pgp-inhibitor	Negative	0.824
Pgp-substrate	Negative	0.871
Distribution		
PPB (Plasma Protein Binding)	High	-
BBB (Blood–Brain Barrier)	Positive	0.896
Metabolism		
CYP450 1A2 inhibition	Positive	0.917
CYP450 3A4 inhibition	Negative	0.588
CYP450 3A4 substrate	Positive	0.515
CYP450 2C9 inhibition	Positive	0.847
CYP450 2C9 substrate	Negative	1.000
CYP450 2C19 inhibition	Positive	0.628
CYP450 2D6 inhibition	Negative	0.806
CYP450 2D6 substrate	Negative	0.860
Subcellular localization	Mitochondrial	-
Excretion		

T1/2	> 30 min	-
Toxicity		
hERG (hERG Blockers)	Non-blocker	0.383
Ames (Ames Mutagenicity)	Positive	0.802

3.5. Molecular target prediction results

Furthermore, we identified possible targets of the naphthoquinone **11a** using a virtual screening platform. In this sense, from all targets analyzed, the DNA topoisomerase I enzyme showed the highest probability to be one of the targets to compound **11a** (supplementary table). Moreover, DNA topoisomerase I was selected for molecular docking analysis to confirm the credibility of the study.

3.6. Binding mode analysis of naphthoquinone **11a** docked to DNA topoisomerase I

To further examine the interaction of DNA topoisomerase I (*TOPI*) with **11a**, Autodock Tools and AutoDock 4.2.6 were used to predict protein-ligand binding. The free energy of binding (ΔG) analysis showed that **11a** strongly inhibited *TOPI* enzyme with a binding affinity of -11.94 kcal/mol, while the known inhibitors of *TOPI*, topotecan, and SN-38 docked displayed free energy of binding of -13.66 kcal/mol and -15.26 kcal/mol, respectively. Docking studies also revealed that **11a** interacted with catalytic residues, such as Arg-364 and bases A-113 and G-115 using three hydrogen bonds, **Figure 5**. Moreover, the interaction of topotecan with *TOPI* formed two hydrogen bonds with Arg-364 and Glu-356. For SN-38, two hydrogen bonds were formed with Arg-364 and Asp-533 (**Table 4**). It was interesting to note that, well-known *TOP* inhibitors, such as SN-38 and topotecan interacts and forms hydrogen bonds with Arg-364, as observed for **11a**. Therefore, we suggest that **11a** have the potential to be a candidate molecule for the development of new *TOP* inhibitors.

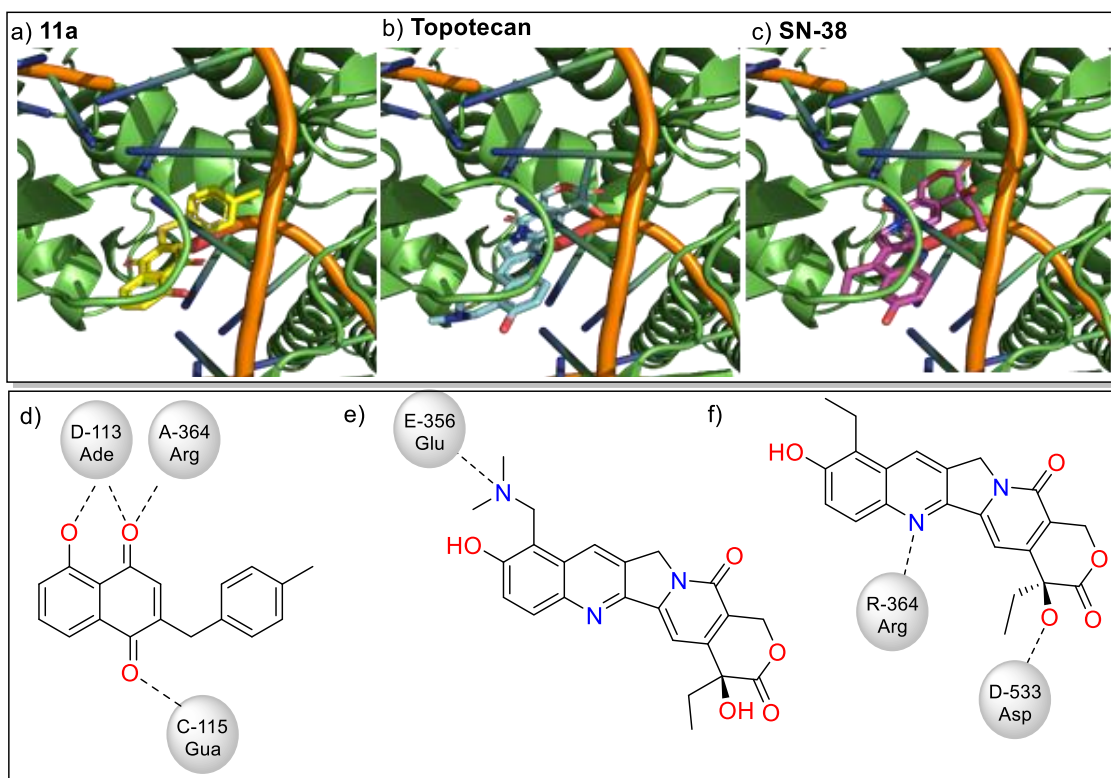


Figure 5. Molecular Docking of three compounds with enzyme *TOP1*. The 3D docking structure of three compounds were inserted into catalytic cavity of the *TOP1*. a) **11a** b) topotecan and c) SN-38. 2D representation of the interactions with amino acid residues in the active site of the enzyme: d) **11a**, e) topotecan and f) SN-38.

Table 4. Free energy of binding (ΔG) and interaction of inhibitors with DNA topoisomerase I predicted were estimated with AutoDock Tools and Autodock 4.2.6.

Compound	$\Delta G(\text{kcal/mol})$	Hydrogen Bond residues
Topotecan	-13.66 kcal/mol	Glu-356
SN-38	-15.26 kcal/mol	Arg-364, Asp-533
11a	-11.94 kcal/mol	Arg-364, A-113, G-115

3.7. **11a** compound downregulates Topoisomerase I gene: target validation.

To further understand whether **11a** could affect *TOP1* gene expression in a biological system, we performed RT-qPCR. First, we performed a comparative analysis of *TOP1* gene expression in both leukemia cell lines. The chemoresistant FEPS cell line had a significant increase in *TOP1* gene expression compared to chemosensitive K-562 ($p < 0.001$) **Figure 6a**.

Additionally, *TOP1* gene expression was evaluated in K-562 and FEPS cells after 18 hours of treatment with **11a**. The results showed a significant decrease in *TOP1* gene expression for both cell lines (**Figure 6b, c**). The expression levels of *TOP1* significantly reduced at 0.1 μM and 0.5 μM of **11a** in the K-562 cell line ($p < 0.001$) when compared with the negative control. On the other hand, the FEPS cell line reduced the levels of *TOP1* gene expression, significantly, only at 0.1 μM of **11a** ($p < 0.001$).

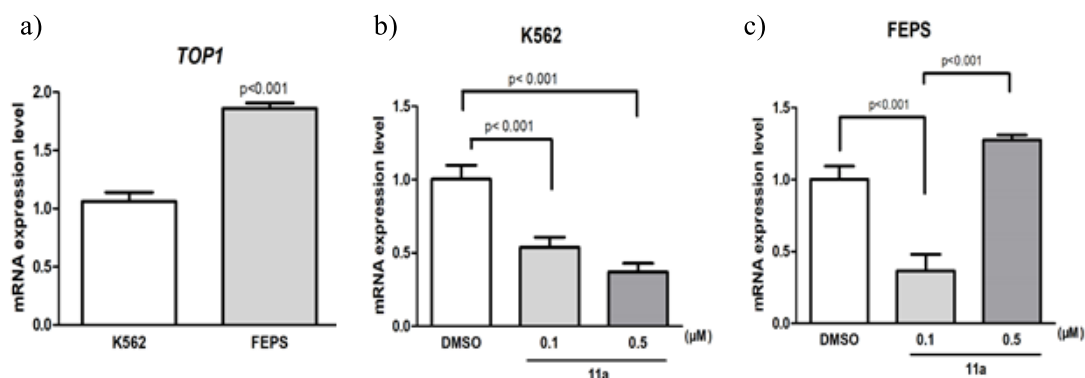


Figure 6. **11a** significantly suppressed *TOP1* gene expression in K-562 and FEPS cell lines. a) Comparison of *TOP1* gene expression between leukemia cell lines (chemosensitive K-562 and chemoresistant FEPS), b) and c) *TOP1* gene expression after K-562 and FEPS cell line treated with **11a**. *TOP1* gene expression was normalized by endogenous *ABL* gene and the DMSO group was used as calibrator. Data from expression analysis are presented as the mean \pm standard deviation of three independent experiments in triplicate. For comparison of *TOP1* expression between cell lines, a *t*-test was used. Samples treated with **11a** (0.1 μM and 0.5 μM) after 18 hours compared to DMSO were statistically analyzed by ANOVA followed by Bonferroni post-test. Significant differences ($p < 0.001$).

4. Discussion

Most quinones have important pharmacological and toxicological effects, and they are used as anticancer agents [44]. Although diverse naphthoquinones, especially juglone analogs, have been studied in medicinal chemistry, as they possess several pharmacologic effects, these substances have drawn attention especially for their cytotoxicity against cancer cells [45].

The mechanism of action related to naphthoquinone activities is still poorly understood. Several studies suggest the formation of reactive oxygen species (ROS), as well as apoptosis induction throughout the inhibition of the topoisomerase complex. All these can lead to the loss of cell reparability and DNA damage [46,47]. Therefore, this work comprises *in*

silico and *in vitro* techniques to elucidate the mechanism underlying naphthoquinone **11a** cytotoxicity against leukemia cell lines.

The evaluation of cytotoxicity is an important parameter for the study of new drugs. Naphthoquinone **11a** demonstrated a high cytotoxic effect against leukemic strains, and its greatest cytotoxic activity was seen in the resistant strain. On the other hand, **11a** showed low activity against the non-tumor line MRC-5. Our findings are consistent and better than those demonstrated by Karki *et al.* (2020) [48], Zang *et al.* (2018) [49], and Cardoso *et al.* (2014) [50] who revealed that the juglone has cytotoxic potential in an *in vitro* model in several tumor strains, such as colon cancer, pancreatic cancer, and acute lymphoblastic leukemia with IC₅₀ values ranging from 20 - 1.13 in colorectal cancer and leukemia, respectively. In this sense, we consider that **11a** has a cytotoxic effect with the ability to inhibit the growth of tumor cells *in vitro* and possibly modulating chemoresistance activity, in addition to having an acceptable safety profile and reduced toxicity in normal cells.

The use of computational methods has become quite widespread, mainly in the screening and development of new bioactive compounds. Thus, computational tools such as molecular docking provide a valuable alternative to decrease time and cost in the development of new compounds [51]. In this context, it was observed that known *TOP1* inhibitors, such as camptothecin and SN-38, interact and form hydrogen bonds with catalytic residues Arg364, Lys532, and Asn722, in addition to interacting with some DNA bases. These residues are considered the best hydrogen bonding sites for the formation of the drug-enzyme-DNA ternary complex [52].

According to Kadioglu *et al.* (2017) [53] *TOP1* inhibitors classified as “topoisomerase poisons” form a ternary complex, preventing the reconnection of transient breaks in the DNA molecule and leading to apoptosis in tumor cells. Thus, **11a** also interacted and formed hydrogen bonds with Arg364 residue and interactions with bases A-113 and G-115. Therefore, molecular docking studies suggest that naphthoquinone **11a** can inhibit the *TOP1* enzyme, through a similar mechanism of action as conventional *TOP1* inhibitors, however with a lesser effect for normal cells.

Numerous tumors show *TOP1* overexpression, which makes it an attractive target for anticancer therapy [54,55]. In this context, our findings demonstrated that **11a** decreased *TOP1* gene expression in the K-562 and FEPS strains, suggesting that **11a** may cause a disturbance in the covalent topoisomerase-DNA complex, being sufficient to induce apoptosis. Thus,

several studies have revealed that naphthoquinones can induce apoptosis depending on the treatment concentration [55,56]. During the process of apoptosis, a cell undergoes several morphological changes, which included reduction in cell volume, the appearance of cytoplasmic protuberances, presence of blebbing, and formation of apoptotic bodies [57,58]. In addition, the formation of blebbing in the plasma membrane occurs followed by karyorrhexis and leads to the separation of cell fragments, generating apoptotic bodies [59]. Our results follow the structural definitions of apoptosis since naphthoquinone **11a** induced cell and nuclear shrinkage, blebbing formation as well and fragmentation of the cell into apoptotic bodies, which indicated an apoptotic profile.

Finally, through molecular docking studies, it was possible to evaluate the interaction at the atomic level of **11a** with the *TOP1* enzyme, demonstrating satisfactory free binding energy (ΔG). In addition, naphthoquinone has been shown to induce apoptosis by inhibiting *TOP1* gene expression in leukemic strains. Given these current findings, juglones deserve further studies to consolidate their potential as a leading molecule with anticancer activity for unresponsive leukemias.

5. Conclusion

In summary, our work demonstrates the anticancer potential of compound **11a** on both chemosensitive K-562 and chemoresistant FEPS cell lines of CML. Our data suggests that naphthoquinone **11a** induces apoptosis by decreasing *TOP1* gene expression in both cell lines. Therefore, naphthoquinone **11a** could be a potential candidate for a new drug for the treatment of CML patients resistant with a lower chance of side effects.

Conflicts of Interest

The authors declare no conflicts of interest.

Acknowledgement

This study was financed in part by the Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior - Brasil (CAPES) - Finance Code 001. The authors are also grateful to the Brazilian Agencies CNPq and FAPERJ for financial assistance, as well as FIOCRUZ for the

HRMS analyses. In addition, we thank the Federal University of Ceará and Drug Research and Development Center (NPDM) for fellowships and structural support.

References

- [1]. E. Jabbour, H. Kantarjian, Chronic myeloid leukemia: 2014 update on diagnosis, monitoring, and management, *Annu. Clin. Upd. Hematol. Malign.* 89 (2014), 547-556, <https://doi.org/10.1002/ajh.23691>.
- [2]. INCA, Estimativa 2020 Incidência de cancer no Brasil. <https://www.inca.gov.br/sites/ufu.sti.inca.local/files//media/document//estimativa-2020-incidencia-de-cancer-no-brasil.pdf>. (Accessed 22 september 2020).
- [3]. J.D. Rowley. A new consistent chromosomal abnormality in chronic myelogenous leukaemia identified by quinacrine fluorescence and Giemsa staining, *Nature* 243 (2014), 290-293, <https://doi.org/10.1038/243290a0>.
- [4]. M. Rohrbacher, U. Berger, A. Hochhaus, G. Metzgeroth, K. Adam, T. Lahaye, S. Saussele, M.C. Muller, J. Hasford, H. Heimpel, R. Hehlmann, Clinical trials underestimate the age of chronic myeloid leukemia (CML) patients. Incidence and median age of Ph/ BCR-ABL-positive CML and other chronic myeloproliferative disorders in a representative area in Germany. *Leukemia* 23 (2009), 602–604, <https://doi.org/10.1038/leu.2008.245>.
- [5]. K. J. Aichberger, M. Mayerhofer, M.T. Krauth, H. Skvara, S. Florian, K. Sonneck, C. Akgul, S. Derdak, W. F. Pickl, W. Edgar, B. P. Monia, R. Moriggl, P. Valent, C. Sillaber, Identification of mcl-1 as a BCR/ABL-dependent target in chronic myeloid leukemia (CML): evidence for cooperative antileukemic effects of imatinib and mcl-1 antisense oligonucleotides. *Blood* 105 (2005), 3303–3311, <https://doi.org/10.1182/blood-2004-02-0749>.
- [6]. C. Talati, J. Pinilla-Ibarz, Resistance in chronic myeloid leukemia: definitions and novel therapeutic agents, *Curr. Opin. Hematol.* 25 (2018), 154–161, <https://doi.org/10.1097/moh.0000000000000403>.
- [7]. W.W. Zhang, J.E. Cortes, H. Yao, L. Zhang, N.G. Reddy, E. Jabbour, H.M. Kantarjian, D. Jones, Predictors of primary imatinib resistance in chronic myelogenous leukemia are distinct from those in secondary imatinib resistance, *J. Clin. Oncol.* 27 (2009), 3642–3649, <https://doi.org/10.1200/jco.2008.19.4076>.
- [8]. P.E. Westerweel, P.A.W. te Boekhorst, M. Levin, J.J. Cornelissen, New Approaches and Treatment Combinations for the Management of Chronic Myeloid Leukemia, *Front. Oncol.* 9 (2019), 665-670, <https://dx.doi.org/10.3389%2Fonc.2019.00665>.

- [9]. V.R. Campos, A.C. Cunha, W.A. Silva, V.F. Ferreira, C.S. de Sousa, P.D. Fernandes, V.N. Moreira, D.R. da Rocha, F.R.F. Dias, R.C. Montenegro, M.C.B.V. de Souza, F.C.S. Boechat, C.F.J. Franco, J.A.L.C. Resende, Synthesis of a new class of naphthoquinone glycoconjugates and evaluation of their potential as antitumoral agentes, RSC Adv. 5 (2015), 96222-96229, <https://doi.org/10.1039/C5RA19192K>.
- [10]. W.O. Foye, Cancer Chemotherapeutic Agents, American Chemical Society, Washington D.C., 1995.
- [11]. C.J. Canfield, M. Pudney, W.E. Gutteridge, Interaction of atovaquone with other antimalarial drugs against *Plasmodium falciparum* in vitro, Exp. Parasitol. 80 (1993), 373-381, <https://doi.org/10.1006/expr.1995.1049>.
- [12]. M.F.C. Cardoso, K. Salomão, A. C. Bombaça, D.R. da Rocha, F.C. da Silva, J.A.S. Cavaleiro, S.L. de Castro, V.F. Ferreira, Synthesis and anti-Trypanosoma cruzi activity of new 3-phenylthio-nor- β -lapachone derivatives, Bioorg. Med. Chem. 23 (2015), 4763-4768, <https://doi.org/10.1016/j.bmc.2015.05.039>.
- [13]. G.A.M. Jardim, T.L. Silva, M.O.F. Goulart, C.A. de Simone, J.M.C. Barbosa, K. Salomão, S.L. de Castro, J.F. Bower, E.N. da Silva Júnior, Rhodium-catalyzed C-H bond activation for the synthesis of quinonoid compounds: Significant Anti Trypanosoma cruzi activities and electrochemical studies of functionalized quinones, Eur J. Med. Chem. 126 (2017), 406-419, <https://doi.org/10.1016/j.ejmech.2017.05.011>.
- [14]. C.S. Moreira, A.C.J.A. Silva, J.S. Novais, A.M. Sá Figueiredo, V.F. Ferreira, D.R. da Rocha, H.C. Castro, Searching for a potential antibacterial lead structure against bacterial biofilms among new naphthoquinone compounds, J. Appl. Microbiol. 122 (2017), 651-662, <https://doi.org/10.1111/jam.13369>.
- [15]. M.F.C. Cardoso, A.T.P.C. Gomes, C.S. Moreira, M.M.Q. Simões, M.G.P.M.S. Neves, D.R. da Rocha, F.C. Silva, C. Moreirinha, A. Almeida, V.F. Ferreira, J.A.S. Cavaleiro, Efficient catalytic oxidation of 3-arylthio- and 3-cyclohexylthio-lapachone derivatives to new sulfonyl derivatives and evaluation of their antibacterial activities, Molecules 22 (2017), 302-313, <https://doi.org/10.3390/molecules22020302>.
- [16]. A.R. Louvis, N.A.A. Silva, F.S. Semaan, F.C. da Silva, G. Saramago, L.C.S.V. de Souza, B.L.A. Ferreira, H.C. Castro, J.P. Salles, A.L.A. Souza, R.X. Faria, V.F. Ferreira, D.L. Martins, Synthesis, characterization and biological activities of 3-aryl-1,4-naphthoquinones – green palladium-catalysed Suzuki cross coupling, New J. Chem. 40 (2016), 7643-7656, <https://doi.org/10.1039/C6NJ00872K>.

- [17]. M.V. de Araújo, C.C. David, J. Clementino Neto, L.A.P.L. de Oliveira, K.C.J. da Silva, J.M. dos Santos, J.K.S. da Silva, V.B.C.A. Brandão, T.M.S. Silva, C.A. Camara, M.S. Alexandre-Moreira, Evaluation on the leishmanicidal activity of 2-N,N'-dialkylamino-1,4-naphthoquinone derivatives, *Exp. Parasitol.* 176 (2017), 46–51, <https://doi.org/10.1016/j.exppara.2017.02.004>.
- [18]. R.C. Montenegro, A.J. Araújo, M.T. Molina, J.D.B. Marinho Filho, D.D. Rocha, E. López-Montero, M.O.F. Goulart, E.S. Bento, A.P.N.N. Alves, C. Pessoa, M.O. de Moraes, L.V. Costa-Lotufu, Cytotoxic activity of naphthoquinones with special emphasis on juglone and its 5-O-methyl derivative, *Chem. Biol. Interact.* 184 (2010), 439-448, <https://doi.org/10.1016/j.cbi.2010.01.041>.
- [19]. M.C. de Vasconcellos, D.P. Bezerra, A.M. Fonseca, M.R.P. Pereira, T.L.G. Lemos, O.D.L. Pessoa, C. Pessoa, M.O. de Moraes, A.P.N.N. Alves, L.V. Costa-Lotufu, Antitumour Activity of Biflorin, an o-Naphthoquinone Isolated from *Capraia biflora*, *Biol. Pharm. Bull.* 30 (2007), 1416-1421, <https://doi.org/10.1248/bpb.30.1416>.
- [20]. M.C. Vasconcellos, R.C. Montenegro, G.C.G. Militão, A.M. Fonseca, O.D.L. Pessoa, T.L.G. Lemos, C. Pessoa, M.O. Moraes, L.V. Costa-Lotufu, Bioactivity of bilorin, a typical o-naphthoquinone isolated from *Capria biflora* L. *Z. Naturforsch. C. J. Biosci.* 60 (2005), 394-398, <https://doi.org/10.1515/znc-2005-5-605>.
- [21]. N. Cenas, S. Prast, H. Nivinskas, J. Sarlauskas, E.S.J. Arnér, Interactions of nitroaromatic compounds with the mammalian selenoprotein thioredoxin reductase and the relation to induction of apoptosis in human cancer cells, *J. Biol. Chem.* 281 (2006), 5593–5603, <https://doi.org/10.1074/jbc.m511972200>.
- [22]. T.B. Gontijo, R.P. de Freitas, F.S. Emery, L.F. Pedrosa, J.B. Vieira Neto, B.C. Cavalcanti, C. Pessoa, A. King, F. de Moliner, M. Vendrell, E.N. da Silva Júnior, On the synthesis of quinone-based BODIPY hybrids: New insights on antitumor activity and mechanism of action in cancer cells. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* 27 (2017), 4446-4456, <https://doi.org/10.1016/j.bmcl.2017.08.007>.
- [23]. B.K. Aithal, M.R.S. Kumar, B.N. Rao, N. Udupa, B.S.S. Rao, Juglone, a naphthoquinone from walnut, exerts cytotoxic and genotoxic effects against cultured melanoma tumor cells, *Cell Biol. Int.* 33 (2009), 1039–1049, <https://doi.org/10.1016/j.cellbi.2009.06.018>.
- [24]. J. Wu, H. Zhang, Y. Xu, J. Zhang, W. Zhu, Y. Zhang, L. Chen, W. Hua, Y. Mao, Juglone induces apoptosis of tumor stem-like cells through ROS-p38 pathway in glioblastoma, *BMC Neurol*, 17 (2017), 70, <https://doi.org/10.1186/s12883-017-0843-0>.

- [25]. K. Ollinger, A.J. Brunmark, Effect of hydroxy substituent position on 1,4-naphthoquinone toxicity to rat hepatocytes, *J. Biol. Chem.* 266 (1991), 21496-21503.
- [26]. K. Murakamia, M. Haneda, S. Iwata, M. Yoshino, Effect of hydroxy substituent on the prooxidant action of naphthoquinone compounds, *Toxicol. in Vitro* 24 (2010), 905–909, <https://doi.org/10.1016/j.tiv.2009.11.018>.
- [27]. Y. Pommier. Drugging topoisomerases: lessons and challenges, *ACS Chem. Biol.* 8 (2013), 82-95, <https://doi.org/10.1021/cb300648v>.
- [28]. S.M. Vos, E.M. Tretter, B.H. Schmidt, J.M. Berger, All tangled up: how cells direct, manage and exploit topoisomerase function. *Nat. Rev. Mol. Cell. Biol.* 12 (2011), 827-841, <https://dx.doi.org/10.1038/nrm3228>.
- [29]. M.E. Wall, M.C. Wani, C.E. Cook, K.H. Palmer, A.T. McPhail, G.A. Sim, Plant Antitumor Agents. I. Isolation and Structure of Camptothecin a Novel Alkaloidal Leukemia and Tumor Inhibitor from *Camptotheca Acuminata*. *J. Am. Chem. Soc.* 88 (1966), 3888–3890, <https://doi.org/10.1021/ja00968a057>.
- [30]. Y. Pommier, Topoisomerase I inhibitors: camptothecins and beyond. *Nat. Rev. Cancer* 6 (2006), 789–802, <https://doi.org/10.1038/nrc1977>.
- [31]. A. Sparreboom, K. Fujita, W.C. Zamboni, Topoisomerase I-Targeting Drugs. In: B.A., Chabner, D.L., Longo (Eds), *Cancer Chemotherapy and Biotherapy: Principles and Practice*. 5th ed. Lippincott Williams & Wilkins, Philadelphia, 2010, pp. 342-355.
- [32]. J.M. van der Bol, R.H.J. Mathijssen, G.M. Creemers, A.S.T. Planting, W.J. Loos, E.A.C. Wiemer, L.E. Friberg, J. Verweij, A. Sparreboom, F.A. de Jong, A CYP3A4 phenotype-based dosing algorithm for individualized treatment of irinotecan. *Clin Cancer Res.* 16 (2010), 736–742, <https://doi.org/10.1158/1078-0432.ccr-09-1526>.
- [33]. J.A. Gottlieb, A.M. Guarino, J.B. Call, V.T. Oliverio, J.B. Block, Preliminary pharmacologic and clinical evaluation of camptothecin sodium (NSC-100880), *Cancer Chemother. Rep.* 54 (1970), 461–470.
- [34]. V.M. Rumjanek, G.S. Trindade, K. Wagner-Souza, M.C. Meletti-De-Oliveira, L.F. Marques-Santos, R.C. Maia, M.A.M. Capella, Multidrug resistance in tumour cells: characterization of the multidrug resistant cell line K562-Lucena 1. *An. Acad. Bras. Cienc.* 73 (2001), 57-69, <http://dx.doi.org/10.1590/S0001-37652001000100007>.
- [35]. N. Daflon-Yunes, F.E. Pinto-Silva, R.S. Vidal, B.F. Novis, T. Berguetti, R.R.S. Lopes, C. Polycarpo, V.M. Rumjanek, Characterization of a multidrug-resistant chronic myeloid leukemia cell line presenting multiple resistance mechanisms. *Mol. Cell. Biochem.* 383 (2013), 123 -135, <https://doi.org/10.1007/s11010-013-1761-0>.

- [36]. R.C. Borra, M.A. Lotufo, S.M. Gagiotti, F.M. Barros, P.M. Andrade, A simple method to measure cell viability in proliferation and cytotoxicity assays. *Braz. Oral Res.* 23 (2009), 255-262, <https://doi.org/10.1590/S1806-83242009000300006>.
- [37]. S.A. Bustin, V. Benes, J.A. Garson, J. Hellemans, J. Huggett, M. Kubista, R. Mueller, T. Nolan, M.W. Pfaffl, G.L. Shipley, J. Vandesompele, C.T. Wittwer, The MIQE guidelines: minimum information for publication of quantitative real-time PCR experiments. *Clin. Chem.* 55 (2009), 611–622, <https://doi.org/10.1373/clinchem.2008.112797>.
- [38]. T.D. Schmittgen, K.J. Livak, Analyzing real-time PCR data by the comparative CT method. *Nat. Prot.* 3 (2008), 1101-1108, <https://doi.org/10.1038/nprot.2008.73>.
- [39]. F. Cheng, W. Li, Y. Zhou, J. Shen, Z. Wu, G. Liu, P.W. Lee, Y. Tang, AdmetSAR: A comprehensive source and free tool for assessment of chemical ADMET properties, *J. Chem. Inf. Model.* 52 (2012), 3099–3105, <https://doi.org/10.1021/ci300367a>.
- [40]. H. Yang, C. Lou, L. Sun, J. Li, Y. Cai, Z. Wang, W. Li, G. Liu, Y. Tang, Admet SAR 2.0: web-service for prediction and optimization of chemical ADMET properties, *Bioinformatics* 35 (2019), 1067-1069, <https://doi.org/10.1093/bioinformatics/bty707>.
- [41]. D.F. Veber, S.R. Johnson, H. Y. Cheng, B.R. Smith, K. W. Ward, K. D. Kopple Molecular properties that influence the oral bioavailability of drug candidates. *J Med Chem.* 45 (2002), 2615- 2623, <https://doi.org/10.1021/jm020017n>.
- [42]. D. Gfeller, O. Michielin, V. Zoete, Shaping the Interaction Landscape of Bioactive Molecules, *Bioinformatics* 29 (2013), 3073-3079, <https://doi.org/10.1093/bioinformatics/btt540>.
- [43]. R. Quiroga, M.A. Villarreal, Vinardo: A Scoring Function Based on Autodock Vina Improves Scoring, Docking, and Virtual Screening, *Plos one* 11 (2016), e0155183, <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0155183>.
- [44]. L. Klotz, X. Hou, C. Jacob, 1,4-naphthoquinones: From oxidative damage to cellular and inter-cellular signaling, *Molecules* 19 (2014), 14902–14918, <https://doi.org/10.3390/molecules190914902>.
- [45]. J. Lu, J. Bao, G. Wu, W. Xu, M. Huang, X. Chen, Y. Wang, Quinones derived from plant secondary metabolites as anti-cancer agents, *Anticancer Agents Med. Chem.* 13 (2013), 456–463, <https://doi.org/10.2174/1871520611313030008>.
- [46]. V.R. Campos, E.A. dos Santos, V.F. Ferreira, R.C. Montenegro, M.C.B.V. de Souza, L.V. Costa-Lotufo, M.O. de Moraes, A.K.P. Regufe, A.K. Jordão, A.C. Pinto, J.A.L.C. Resende, A.C. Cunha, Synthesis of carbohydrate-based naphthoquinones and their substituted

phenylhydrazono derivatives as anticancer agents, RSC Adv. 2 (2012), 11438-11448, <https://doi.org/10.1039/C2RA21514D>.

[47]. S.N. Sunassee, C.G.L. Veale, N. Shunmoogam-Gounden, O. Osoniyi, D.T. Hendricks, M.R. Caira, J. de la Mare, A.L. Edkins, A.V. Pinto, E.N. da Silva Júnior, M.T. Davies-Coleman, Cytotoxicity of lapachol, β -lapachone and related synthetic 1,4-naphthoquinones against oesophageal cancer cells. Eur. J. Med. Chem. 62 (2013), 98-110, <https://doi.org/10.1016/j.ejmech.2012.12.048>.

[48]. N. Karki, S. Aggarwal, R.A. Laine, F. Greenway, J.N. Losso, Cytotoxicity of jugone and thymoquino against pancreatic cancer cells. Chem.-Biol. Interact. 327 (2020), 109142, <https://doi.org/10.1016/j.cbi.2020.109142>.

[49]. Q. Zhang, J. Dong, J. Cui, G. Huang, Q. Meng, S. Li, Cytotoxicity of Synthesized 1,4-Naphthoquinone Oxime Derivatives on Selected Human Cancer Cell Lines. Chem. Pharm. Bull. 66 (2018), 612–619, <https://doi.org/10.1248/cpb.c18-00013>.

[50]. M.F.C. Cardoso, P.C. Rodrigues, M.E.I.M. Oliveira, I.L. Gama, I.M.C.B. da Silva, I.O. Santos, D.R. Rocha, R.T. Pinho, V.F. Ferreira, M.C.B.V. de Souza, F.C. da Silva, F.P. Silva Jr, Synthesis and evaluation of the cytotoxic activity of 1,2-furanonaphthoquinones tethered to 1,2,3-1H-triazoles in myeloid and lymphoid leukemia cell lines, Eur. J. Med Chem. 12 (2014), 708-717, <https://doi.org/10.1016/j.ejmech.2014.07.079>.

[51]. S. George, K. Santhlingam, M. Chandran, P. Gangwar, M. Gururagavan, Docking Studies of Novel Coumarin Derivatives as Arylamine N-Acetyltransferase 2 Inhibitors. Asian J. Pharm. Clin. Res. 5 (2012), 94-96.

[52]. G.S. Laco, J.R. Collins, B.T. Luke, H. Kroth, J.M. Sayer, D.M. Jerina, Y. Pommier, Human Topoisomerase I Inhibition: Dockin Camptothecin and Derivates into a Structure-Based Active Site Model, Biochemistry 41 (2002), 1428–1435, <https://doi.org/10.1021/bi011774a>.

[53]. O. Kadioglu, A. Chan, A.C.L. Qiu, V.K.W. Wong, V. Colligs, S. Wecklein, H.F. Rached, T. Efferth, W.W. Hsiao, Artemisinin Derivatives Target Topoisomerase 1 and Cause DNA Damage *in Silico* and *in Vitro*, Front. Pharmac. 8 (2017), 711, <https://doi.org/10.3389/fphar.2017.00711>.

[54]. L. Liu, D. Xiong, P. Lin, H. Yang, Y. Dang, G. Chen, DNA topoisomerase 1 and 2A function as oncogenes in liver cancer and may be direct targets of nitidine chloride. Int. J. Oncol. 53 (2018), 1897–1912, <https://doi.org/10.3892/ijo.2018.4531>.

[55]. H. Wang, Y. Luo, G. Shen, X. Piao, W. Xu, Y. Zhang, J. Wang, Y. Feng, J. Li, Y. Zhang, T. Zhang, S. Wang, H. Xue, H. Wang, C. Wang, C. Jin, Two novel 1,4-

naphthoquinone derivatives induce human gastric cancer cell apoptosis and cell cycle arrest by regulating reactive oxygen species-mediated MAPK/Akt/STAT3 signaling pathways, *Mol. Med. Rep.* 20 (2019), 2571–2582, <https://doi.org/10.3892/mmr.2019.10500>.

[56]. Y. Wang, Y. Luo, X. Piao, G. Shen, L. Meng, Y. Zhang, J. Wang, J. Li, H. Wang, W. Xu, Y. Liu, Y. Zhang, T. Zhang, S. Wang, H. Sun, Y. Han, M. Jin, Y. Zang, D. Zhang, C. Jin, Novel 1,4-naphthoquinone derivatives induce reactive oxygen species-mediated apoptosis in liver cancer cells, *Mol. Med. Rep.* 19 (2019), 1654–1664, <https://doi.org/10.3892/mmr.2018.9785>.

[57]. B. Kar, S. Sivamani, Apoptosis: basic concepts, mechanisms and clinical implications, *Int. J. Pharm. Sci. Res.* 6 (2015), 940-950, [http://dx.doi.org/10.13040/IJPSR.0975-8232.6\(3\).940-50](http://dx.doi.org/10.13040/IJPSR.0975-8232.6(3).940-50).

[58]. J. Savill, V. Fadok, Corpse clearance defines the meaning of cell death, *Nature* 407 (2000), 784–788, <https://doi.org/10.1038/35037722>.

[59]. G.W. Dorn, Molecular mechanisms that differentiate apoptosis from programmed necrosis, *Toxicol. Pathol.* 41 (2013), 227-234, <https://doi.org/10.1177/0192623312466961>.

ANEXO 2

Artigo aceito na revista *Internacional Journal of Molecular Sciences*



International Journal of
Molecular Sciences



Article

1,4-Naphthoquinone (CNN1) Induces Apoptosis through DNA Damage and Promotes Upregulation of *H2AFX* in Leukemia Multidrug Resistant Cell Line

Adrhyann Jullyanne de Sousa Portilho¹, Emerson Lucena da Silva¹, Emanuel Cintra Austregésilo Bezerra¹, Carinne Borges de Souza Moraes Rego Gomes², Vitor Ferreira², Maria Elisabete Amaral de Moraes¹, David Rodrigues da Rocha², Rommel Mário Rodriguez Burbano², Caroline Aquino Moreira-Nunes^{1,*,†} and Raquel Carvalho Montenegro^{1,*†}

¹ Pharmacogenetics Laboratory, Drug Research and Development Center (NPDM), Federal University of Ceará, Fortaleza 60430-275, CE, Brazil; adrhyannportilho@gmail.com (A.J.d.S.P.); lucenaemerson@hotmail.com (E.L.d.S.); cintraemmanuel@gmail.com (E.C.A.B.); betemora@ufc.br (M.E.A.d.M.)

² Institute of Chemistry, Federal University Fluminense, São João Batista St., 188-Niterói, Rio de Janeiro 24220-900, RJ, Brazil; carinneborges@id.uff.br (C.B.d.S.M.R.G.); vitorferreira@id.uff.br (V.F.); davidrocha@id.uff.br (D.R.d.R.)

³ Department of Biological Sciences, Oncology Research Center, Federal University of Pará, Belém 66073-005, PA, Brazil; rommel@ufpa.br

* Correspondence: carolfam@gmail.com (C.A.M.-N.); rcm.montenegro@gmail.com (R.C.M.)

† These authors contributed equally to this work.

Citation: de Sousa Portilho, A.J.; da Silva, E.; Bezerra, E.C.A.; Moraes Rego Gomes, C.B.d.S.; Ferreira, V.; de Moraes, M.E.A.; da Rocha, D.R.; Burbano, R.M.R.; Moreira-Nunes, C.A.; Montenegro, R.C. 1,4-Naphthoquinone (CNN1) Induces Apoptosis through DNA Damage and Promotes Upregulation of *H2AFX* in Leukemia Multidrug Resistant Cell Line. *Int. J. Mol. Sci.* **2022**, *23*, x. <https://doi.org/10.3390/xxxxx>

Academic Editor: Sung-Hoon Kim

Received: 21 June 2022

Accepted: 10 July 2022

Published: date

Publisher's Note: MDPI stays neutral with regard to jurisdictional claims in published maps and institutional affiliations.



Copyright: © 2022 by the authors. Licensee MDPI, Basel, Switzerland. This article is an open access article distributed under the terms and conditions of the Creative Commons Attribution (CC BY) license (<https://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>).

Abstract: The multidrug resistance (MDR) phenotype is one of the major obstacles in the treatment of chronic myeloid leukemia (CML) in advantage stages such as blast crisis. In this scenario, more patients develop resistance mechanisms during the course of the disease, making tyrosine kinase inhibitors (TKIs) target therapies ineffective. Therefore, the aim of the study was to examine the pharmacological role of CNN1, a *para*-naphthoquinone, in a leukemia multidrug resistant cell line. First, the *in vitro* cytotoxic activity of Imatinib Mesylate (IM) in K-562 and FEPS cell lines was evaluated. Subsequently, membrane integrity and mitochondrial membrane potential assays were performed to assess the cytotoxic effects of CNN1 in K-562 and FEPS cell lines, followed by cell cycle, alkaline comet assay and annexin V-*Alexa Fluor*[®] 488/propidium iodide assays (Annexin/PI) using flow cytometry. RT-qPCR was used to evaluate the *H2AFX* gene expression. The results demonstrate that CNN1 was able to induce apoptosis, cell membrane rupture and mitochondrial membrane depolarization in leukemia cell lines. In addition, CNN1 also induced genotoxic effects and caused DNA fragmentation, cell cycle arrest at the G2/M phase in leukemia cells. No genotoxicity was observed on peripheral blood mononuclear cells (PBMC). Additionally, CNN1 increased mRNA levels of *H2AFX*. Therefore, CNN1 presented anticancer properties against leukemia multidrug resistant cell line being a potential anticancer agent for the treatment of resistant CML.

Keywords: chronic myeloid leukemia; multidrug resistance; 1,4-naphthoquinone; DNA damage; genotoxicity; apoptosis

1. Introduction

Since the advent and introduction of tyrosine kinase inhibitors (TKIs), significant improvements have occurred in the treatment of chronic myeloid leukemia (CML), increasing patient's survival rate [1–4]. Although an enormous therapeutic improvement has been demonstrated, there are still some patients that develop treatment resistance

1,4-naphthoquinone (CNN1) induces apoptosis through DNA Damage and promotes upregulation of *H2AFX* in leukemia multidrug resistant cell line

Adrhyann Jullyanne de Sousa Portilho¹, Emerson Lucena da Silva¹, Emanuel Austregésilo Cintra Bezerra¹, Carinne Borges de Souza Moraes Rego Gomes², Vitor Ferreira², Maria Elisabete Amaral de Moraes¹, David Rodrigues da Rocha², Rommel Mário Rodriguez Burbano³, Caroline Aquino Moreira-Nunes^{1,3‡*} and Raquel Carvalho Montenegro^{1‡*}.

¹Pharmacogenetics Laboratory, Drug Research and Development Center (NPDM), Federal University of Ceará, Fortaleza, CE, 60430-275, Brazil.

²Institute of Chemistry, Federal University Fluminense, São João Batista st, 188 - Niterói, Rio de Janeiro, Brazil.

³Department of Biological Sciences, Oncology Research Center, Federal University of Pará, Belém, PA, 66073-005, Brazil

‡ These authors contributed equally to this work.

*Correspondence: rcm.montenegro@gmail.com (R.C.M) and carolfam@gmail.com (C.A.M-N)

Abstract

The multidrug resistance (MDR) phenotype is one of the major obstacles in the treatment of chronic myeloid leukemia (CML) in advantage stages as blast crisis. In this scenario, more patients develop resistance mechanisms during the course of the disease, making tyrosine kinase inhibitors (TKIs) target therapies ineffective. Therefore, the aim of the study was to examine the pharmacological role of CNN1, a *para*-naphthoquinone, in a leukemia multidrug resistant cell line. First, the *in vitro* cytotoxic activity of Imatinib Mesylate (IM) in K-562 and FEPS cell lines was evaluated. Subsequently, membrane integrity and mitochondrial membrane potential assays were performed to assess the cytotoxic effects of CNN1 in K-562, FEPS, and peripheral blood mononuclear cells (PBMC) followed by cell cycle, alkaline comet assay and annexin V-*Alexa Fluor*[®] 488/propidium iodide assays (Annexin/PI) using flow cytometry in K-562 and FEPS. RT-qPCR was used to evaluate the expression of *H2AFX* gene. The results demonstrate that CNN1 was able to induce cell membrane rupture and

mitochondrial membrane depolarization in leukemia cell lines. In addition, CNN1 also induced genotoxic effect and caused DNA fragmentation, cell cycle arrest at the G2/M phase, but low DNA damage in PBMC cells. CNN1 also promote apoptosis, demonstrated through of increased of Annexin/PI. Additionally, CNN1 increased mRNA levels of *H2AFX*. Therefore, CNN1 presented anticancer properties against leukemia multidrug resistant cell line and a potential anticancer agent for the treatment of resistant CML.

Keywords: Chronic Myeloid Leukemia, Multidrug Resistance, 1,4-naphthoquinone, DNA Damage, Genotoxicity, Apoptosis.

1. Introduction

Since the advent and introduction of tyrosine kinase inhibitors (TKIs), significant improvements have occurred in the treatment of chronic myeloid leukemia (CML), increasing the patient's survival rate [1-4]. Although an enormous therapeutic improvement has been demonstrated, there are still some patients that develop resistance mechanisms during the course of the disease, and/or treatment, making the use with of TKIs ineffective [5,6]. In this scenario, the multidrug resistance (MDR) phenotype is well recognized in clinical practice and continues to be one of the major obstacles in the treatment of CML in blast crisis [7-10].

Approximately 20-40% of CML patients treated with TKIs fail due primary refractoriness (primary resistance), in which patients exhibit lack of efficacy to TKIs from initiation of therapy, while secondary resistance (acquired) is defined as the loss of response [11-14]. Moreover, the responses obtained in patients in the advanced stages of CML are low and typically short-lived [15-18].

Juglone (5-hydroxy-1,4-naphthoquinone) is a natural 1,4- naphthoquinone found in the Juglandaceae, a family of compounds known for their vast biological application [19-23]. Although a great number of naphthoquinones have been studied in medicinal chemistry, as they possess several pharmacologic properties, these compounds have drawn attention especially for their antitumor activity [24]. In addition, the naphthoquinones are potent inhibitors of topoisomerase, DNA repair enzymes and also can induce DNA damage [25 - 28].

Previously, our research group synthesized and evaluated *in silico* and *in vitro* antitumor activities of a series of synthetic naphthoquinones [28]. Among them, 5-hydroxy-2-(4-tolylthio) naphthalene-1,4-dione (CNN1), showed good pharmacokinetic profiles and cytotoxic effect against sensitive leukemia (K-562) and multidrug resistance leukemia (FEPS) cell lines. Moreover, CNN1 suppressed DNA Topoisomerase I (*TOP1*) expression in both cell lines. Therefore, this study aimed to examine whether CNN1 is able to circumscribe the multidrug resistant and induces cell death in leukemia cells.

2. Materials and Methods

2.1 Ethics aspects and lymphocytes isolation

Peripheral blood mononuclear cells (PBMC) were obtained from healthy donors, non-smoking individuals (two female and two males, ages 20 - 30 years), after signed the written consent form to participate in the study approved by the Ethics Research Committee of the Federal University of Ceará (registration number 52352121.0.0000.5054). Blood samples were collected according to Fenech (2012) [29]. The lymphocytes were isolated using Histopaque-1077 (Sigma- Aldrich, St. Louis, MO, USA) for comet assay. Briefly, 1×10^6 lymphocytes were seeded into six-well plates in Roswell Park Memorial Institute medium 1640 (RPMI 1640, Gibco ®), supplemented with 10% fetal bovine serum (FBS, Gibco ®), 100 U/mL of penicillin, 100 µg/mL of streptomycin (Gibco ®) and phytohemagglutinin A (PHA; Gibco-Invitrogen) for 20 h at 37°C.

2.2 Cell culture

Chronic myeloid leukemia cell lines (K-562), vincristine-resistant derivative (K-562-Lucena1), daunorubicin-resistant derivative (FEPS). K-562, K-562-Lucena1 and FEPS was kindly provided by Prof. Dr. Vivian Rumjanek from the Federal University of Rio de Janeiro [30]. The cells were cultured in Roswell Park Memorial Institute medium 1640 (RPMI 1640, Gibco ®, New York, NY, USA). The cell lines were supplemented with 10% fetal bovine serum (FBS, Gibco ®), 100 U/mL of penicillin,

and 100 µg/mL of streptomycin (Gibco ®). All cells were cultured at 37 °C and 5% CO₂.

2.3 CNN1 and chemicals

Stock solution of CNN1 (1mM) was dissolved in DMSO (0.02%) from Sigma® and Imatinib Mesylate (IM) (1mM) was used as a positive control. In other study realized by our group, CNN1 demonstrated cytotoxic activity against K-562, K-562-Lucena1 and FEPS cells after 72 h. The concentration of CNN1 (0.1 µM) used in tests was based in CI₅₀ determined before [28].

2.4 Leukemia cell lines

K-562 sensitive cell line, derived from a patient with CML. The K-562-Lucena-1 cell line is derived from the K-562 cell line following selection by vincristine and presenting *ABCB1* overexpression [31], and the FEPS cell line, also derived from K-562 following selection by daunorubicin and presenting *ABCB1* and *ABCC1* overexpression [22]. In the case of K-562-Lucena-1 and FEPS, the medium was maintained with vincristine sulfate at a final concentration of 60 nM and daunorubicin at a concentration of 466 nM, respectively. The following experiments were performed only in K-562 and FEPS cell lines based in previous study [28].

2.5 Cell viability assay

The cytotoxicity of the CNN1 and IM were evaluated in a *concentration-response curve* against leukemia cell lines (K-562 and FEPS). Cells were plated (5×10^3 cells/well) in a 96-well-plate, after 24 hours cells were treated with compounds (0.312 - 20 µM) for 72 hours. DMSO (0.01%) was used as a negative control. Cell viability was evaluated by the Alamar blue assay [33]. Briefly, Alamar blue solution (0.2 mg/ml) was added to each well for 3h at 37 °C. The fluorescence was read at 535 nm (reduced form; resorufin) and 595 nm (oxidized form; resazurin) using a microplate reader (Beckman Coulter Microplate Reader DTX 880, Bio-TEK).

2.6 Membrane integrity by propidium iodide (PI)

Cells (K-562 and FEPS) were seeded into 6-well plates at a density of 50×10^3 per well and maintained for 24 hours at 37 °C in incubator. After this period, cells were submitted to treatment with CNN1 (0.1 μ M) for 24 h. IM (0.1 μ M) was used as a positive control and DMSO (0.02%) as negative control. Posteriorly, cells were suspended in PBS and incubated in propidium iodide (1 μ g/ml) solution for 30 minutes at 37 °C, in the dark. Fluorescence intensity (from 10.000 cells) was immediately analyzed by flow cytometry (BD FACSVerse) with 488-nm laser excitation [34].

2.7 Mitochondrial membrane potential analysis

K-562 and FEPS cell lines (50×10^3 cells per well) were plated into 6-well for 24 h at 37°C. After that cells were treated with CNN1 at concentration 0.1 μ M for 24 h. IM (0.1 μ M or 10 μ M) was used as positive control and DMSO (0.02%) as negative control. Next, cell pellets were resuspended in rhodamine 123 solution (1 μ g/mL) for 20 minutes at 37°C, in the dark. Then, mitochondrial transmembrane potential ($\Delta\Psi_m$) was determined using flow cytometry system (BD FACSVerse) [35].

2.8 Cell cycle analysis

Cells were plated at a density of 50×10^3 cells per well into 6-well plates for 24 h at 37° C. After 24 h, cells were treated with CNN1 at 0.1 μ M for 24 h. DMSO (0.02%) as negative control. IM (0.1 μ M) was used as a positive control. Cells were pelleted and fixed with 70% alcohol for 30 minutes at 4°C. After, cells were submitted to Triton- X100 (0.1% v/v in PBS). Subsequently, cells are incubated for 40 minutes at 37° C and added propidium iodide (50 μ g/ml). Events (10.000) were evaluated by flow cytometry (BD FACSverseTM). All data were analyzed using FlowJo Software v.10 [36].

2.9 Alkaline comet assay

K-562, FEPS and PBMC were plated into 6-well plates at (5×10^3) per well for 24 hours at 37 °C in a CO₂ incubator. Then, cells were exposed to CNN1 at concentration (0.1 μ M) for 3 h. IM (0.1 μ M) was used as positive control and DMSO (0.02%) as negative control. Following exposure, the cells were suspended in 150 μ l in

0.8% of low melting agarose (LMPA) in phosphate buffered saline (PBS) without calcium and rapidly spread on three slides pre-coated with 1.5% normal melting agarose (NMA) and waited to solidify at 4 °C for 5 minutes. After that, slides containing cells were placed in the chilled lysis solution containing 100 mM EDTA, 2.5 M NaCl, 10 mM Tris, 10% DMSO and 1% Triton X-100, pH 10) at 4 °C for 24 h. The slides were incubated in fresh electrophoresis buffer (300 mM NaOH and 1 mM EDTA, pH \geq 13.0) for 20 min in order to unwinding the DNA. Then, horizontal electrophoresis at 300 mA and 34 V for 20 min was performed. Finally, slides were washed with distilled water for 5 min and fixed with absolute ethanol. Thereafter, slides were stained with propidium iodide at 20 μ g/mL. A total of 100 comets were counted for each sample using a fluorescence microscope (Kinetic Imaging, Liverpool, UK) [37].

2.10 Analysis of apoptosis

K-562 and FEPS cell lines were seeded into 12-well plates at a 50×10^3 per well for 24 hours. After that, cells were exposed to CNN1 (0.1 μ M) for 24 hours. To positive control was used IM (0.1 μ M) and DMSO (0.02%) as negative control. Subsequently, cells were washed with PBS and resuspended in 200 μ l Annexin-binding buffer consisting of 4 μ L Annexin V-FITC and then incubated with propidium iodide for 20 min. After incubation, cells were resuspended in 1x binding buffer. The fluorescent emission was measured by flow cytometry system (BD FACSVerser) [38].

2.11 RNA isolation

K-562 and FEPS cell lines (50×10^3 cells per well) were plated for 24 h at 37 °C. After 24 h, cells were treated with CNN1 (0.1 μ M) for 18 h, a time that does not modify cellular viability (Supplementary Figure S1). After treatment, cells were collected for mRNA extraction using TRIzol Reagent[®] (Invitrogen[™]) according to the manufacturer's protocol. The RNA concentration and quality were determined by using Nanodrop 2000 (ThermoFisher Scientific). From 20 ng of RNA, the cDNA was synthesized using HighCapacity cDNA Reverse Transcriptase kit (Life Technologies, Carlsbad, CA, USA) to convert the extracted and purified RNA to cDNA. The

conversion step was performed in a Veriti[®] thermal cycler (Applied Biosystems[®], Foster City, CA, USA) [39].

2.12 mRNA expression analysis

All requirements proposed in the Minimum Information for Publication of Quantitative Real-Time PCR Experiments - MIQE Guidelines were followed [40]. The experiments were performed using Fast SyberGreen kit (Applied Biosystems[®], Foster City, CA, USA) for H2A.X Variant Histone (*H2AFX*) gene and Beta-Actin (*ACTB*) gene as an endogenous control. The other genes selected for expression evaluation was *ABCB1* (Hs00184500_m1), *BCR-ABL1* (Hs03024541_ft) and the *ABL* gene (Hs99999002_mH) as the endogenous control, and each sample were used the concentrations following: 3 µl of cDNA, 1 µl of each primer/probe, 12.5 µl of TaqMan[®] Gene Expression Master Mix or Fast SyberGreen kit (Life Technologies'), and 8.5 µl of Ultrapure water. The RT-qPCR was performed using QuantStudio5 Real-Time PCR system (Applied Biosystems[®], Foster City, CA, USA). Each sample was performed in triplicate for the validation of the technique and the values of CT and gene expression levels were calculated using the $2^{-\Delta\Delta CT}$ (delta-delta threshold cycle) [41] using DMSO control as a calibrator of the experiment (Supplementary Table S1).

2.13 Statistical analyses

Each assay was performed in triplicate from three independent experiments. All data were expressed as mean \pm standard deviation (SD), the distribution of normality was verified by the Kolmogorov-Smirnov test and statistically compared to untreated control (DMSO) by Analysis of Variance (ANOVA) followed by Bonferroni's considering a ($p < 0.05$). The graph design and data obtained were analyzed in GraphPad Prism 5.0 software.

3. Results

2.1 CNN1 induces cytotoxicity in K-562 and FEPS leukemia cell lines

Previously, Portilho and co-workers [42] demonstrated that CNN1 has excellent cytotoxicity against different leukemia cells, after 72 h of treatment. CNN1 exhibited an

inhibitory effect on cell viability against K-562-Lucena-1 with an IC₅₀ value of 0.90 μM (CI 95% 0.34 - 1.27) and presented a strong cytotoxic activity to FEPS with an IC₅₀ of 0.60 μM (CI 95% 0.48 - 0.80) when compared to K-562 that demonstrated an IC₅₀ value of 1.12 μM (CI 95% 0.90 - 1.38). On the other hand, IM showed an IC₅₀ of 4.97 μM (CI 95% 3.69 - 5.70) to K-562-Lucena-1 and the IC₅₀ was of 9.66 (CI 95% 8.45 - 11.1) to FEPS, a much higher concentrations when compared to CNN1 in MDR cell lines. Only, to sensitive cell line, K-562, IM showed an IC₅₀ of 0.03 μM (CI 95% 0.01 - 0.05) (**Table 1**). Our results showed CNN1 as a potential candidate against patients with multidrug resistance.

Table 1. Cytotoxic activity expressed as IC₅₀ in μM and with its respective confidence interval of 95% in K-562, K-562-Lucena-1 and FEPS cell lines, after 72 hours of exposure.

Compounds	IC ₅₀ μM ^a		
	K-562	K-562-Lucena-1	FEPS
CNN1	1.12 (0.90 - 1.38)	0.90 (0.34 - 1.27)	0.60 (0.48 - 0.80)
^b IM	0.03 (0.01 - 0.05)	4.97 (3.69 - 5.70)	9.66 (8.45- 11.1)

^a Data are presented as IC₅₀ values, and 95% confidence intervals obtained by nonlinear regression for all cell lines from three independent experiments in three replicates. ^b Imatinib Mesylate (IM) was used as positive control.

2.2 CNN1 induces membrane disruption and mitochondrial depolarization in K-562 and FEPS cell lines

Flow cytometric analysis of membrane integrity (**Figure 1A**) showed that CNN1 (0.1 μM) significantly induced cell membrane disruption in K-562 ($p < 0.001$) and also in FEPS ($p < 0.001$) after 24 h of treatment (**Figure 1B-C**). Additionally, IM at 0.1 μM was able to disrupt the membrane integrity significantly only in K-562 ($p < 0.01$).

In the order to investigate whether compound CNN1 cause disruption of the mitochondrial membrane potential, rhodamine 123 was used after 24 h of treatment

(Figure 1D). Naphthoquinone CNN1 (0.1 μM) caused significant ($p < 0.001$) disruption of the mitochondrial membrane potential in K-562 e FEPS cell lines (**Figure 1E-F**), when compared to negative control. IM (0.1 μM or 10 μM) showed significant mitochondrial membrane depolarization in K-562 ($p < 0.001$) and FEPS ($p < 0.001$).

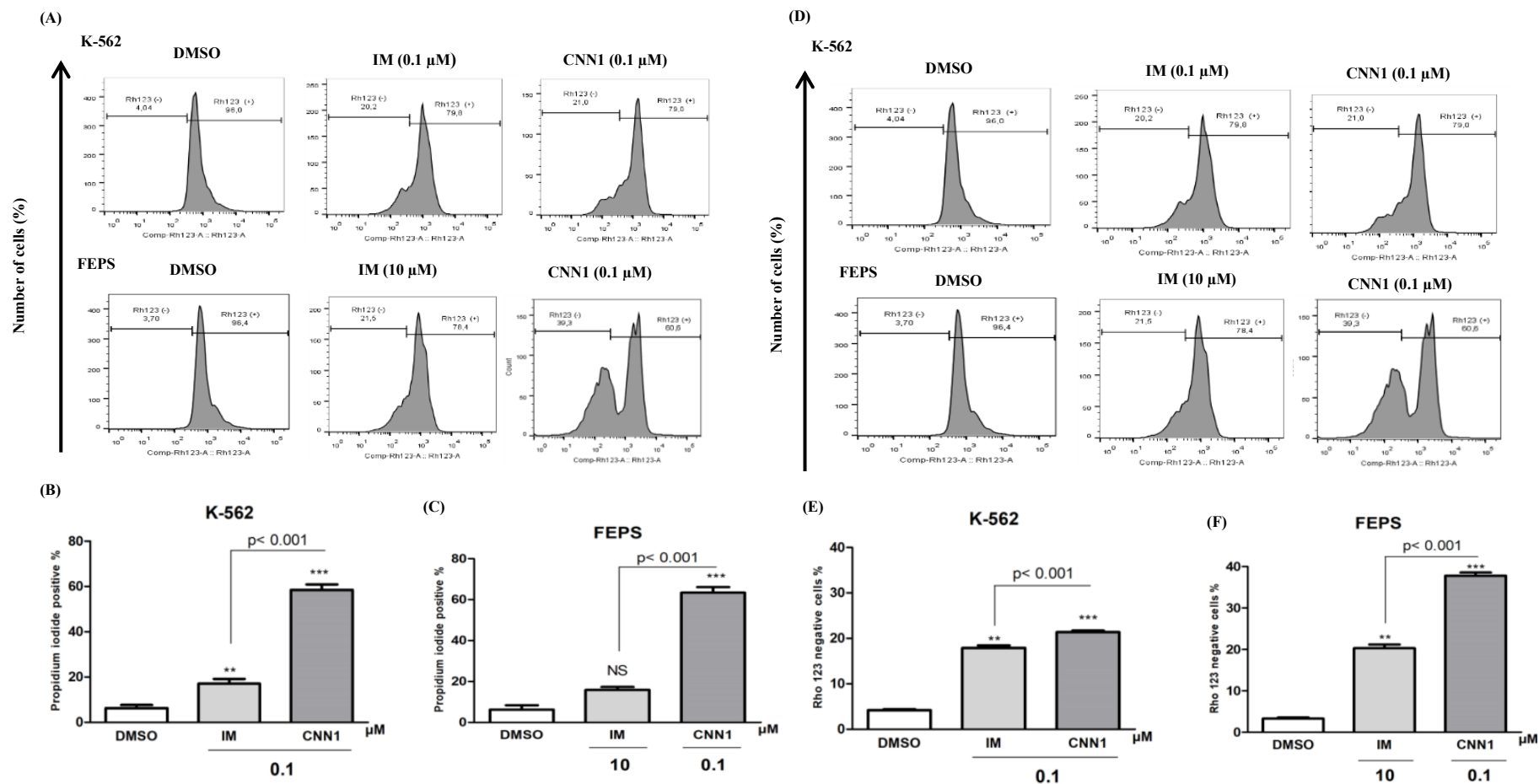


Figure 1. CNN1 caused significantly rupture in the membrane integrity and induces mitochondrial depolarization on K-562 and FEPS cells, after 24 h treatment (0.1 μ M). A) Detection of PI of the negative control (DMSO) and treated groups. B) CNN1 significantly affected the membrane integrity cell in K-562. C) CNN1 can also induce alteration in membrane integrity in FEPS. D) Identification of Rhodamine 123 of the negative control (DMSO) and treated groups. E) Rhodamine 123 negative cells after treatment with CNN1 in K-562 cell line. F) CNN1 induces depolarization mitochondrial membrane in FEPS after treatment. Data from membrane integrity are presented as mean \pm SD of three independent experiments. Treated samples were compared to DMSO and statistically analyzed by ANOVA followed by Bonferroni's posttest. Significant differences: ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$. NS = non-significant.

2.3 CNN1 induces DNA fragmentation, cell cycle arrest and DNA damage in leukemia cell lines

Cell cycle analysis was measured to evaluate whether CNN1 compound induces effects in cell cycle of K-562 e FEPS cell lines. Negative control presented 32.21% of cells in G0/G1 phase, 30.30% in S phase and 25.67 in G2/M phase. We found that CNN1 (0.1 μ M), after 24 h of treatment, triggered a significant accumulation of 39.9% of cells in G2/M phase ($p < 0.001$) and induced a significant decrease of cells in the S phase (18.27 %) in K-562 ($p < 0.05$) (**Figure 2A**). On FEPS cell line CNN1 (0.1 μ M) also caused cell cycle arrest of 40.70% at G2/M phase ($p < 0.001$) and decreases the number of cells at G0/G1 phase to 25.66% ($p < 0.05$) (**Figure 2B**). Treatment with IM (0.1 μ M or 10 μ M) increased the percentage of cells at G0/G1 phase in K-562 ($p < 0.01$) and FEPS ($p < 0.05$). In addition, negative control presented 7.46% at sub-G1 of K-562 and 5.84% at sub-G1 of FEPS, while CNN1 treatment increases the number of cells at sub-G1 to 10.85% and 9.35% ($p < 0.01$), respectively (**Figure 2 C-D**). The IM also induces increases in sub-G1 in K-562 ($p < 0.01$) and FEPS ($p < 0.001$).

The comet assay was performed to determine genotoxic potential of CNN1 (0.1 μ M) and IM (0.1 μ M) in K-562 and FEPS cell lines and PBMC after 3 h of exposure. CNN1 induces DNA damage in leukemia cell lines. CNN1 (0.1 μ M) significantly induced DNA damage of K-562 and FEPS leukemia cells in comparison to negative control ($p < 0.001$). Statistical analysis showed that CNN1 was more genotoxic to K-562 and FEPS than to non-malignant peripheral mononuclear blood cells (PBMC). Moreover, IM showed significant differences between K-562, FEPS and PBMC, where IM present significant genotoxic effects only in K-562 (**Figure 2E**).

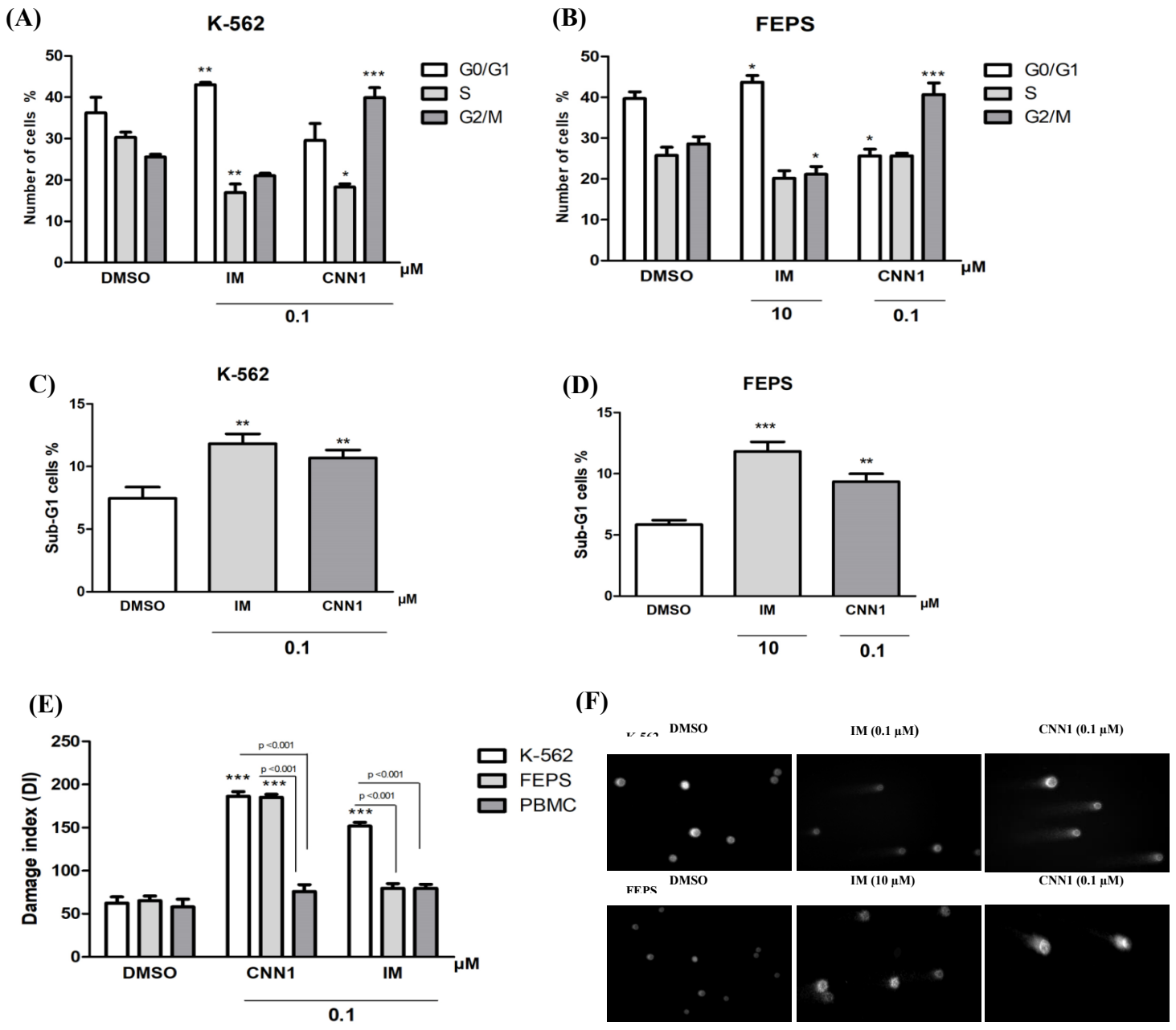


Figure 2. Induction of DNA fragmentation, cell cycle arrest and genotoxic after treatment with CNN1 in K-562, FEPS and PBMC by alkaline comet assay. IM was positive control. A) Effect of CNN1 in cell cycle in K-562 cell line. B) Activity of CNN1 in cell cycle in FEPS cell line. C) Representation of effect of CNN1 at number of cells in sub-G1 of K-562. D) CNN1 at number of cells in sub-G1 phase of K-562 and FEPS cell lines. E) Alkaline comet assay in leukemia cell lines and PBMC. F) Distribution of DNA migrations from negative control (DMSO) and treated groups, using light microscope. The number of cells in G0/G1, S and G2/M phase was calculated using *FlowJo*TM software. Treated samples were compared to DMSO. The bars represent the mean ± standard error of the mean of three independent experiments. Significant differences compared to control (DMSO) * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$ by ANOVA followed by Bonferroni posttest.

2.6 CNN1 induces apoptosis in K-562 and FEPS cell lines

In order to investigate whether CNN1 compound promotes apoptosis after 24 h of treatment, annexin V-Alexa Fluor® 488 and PI were used by flow cytometry (**Figure 3A**). After exposure of CNN1 (0.1 μM), the results showed a significant increase ($p < 0.001$) in early apoptotic cell (Annexin-V positive/PI negative) and increase ($p < 0.001$) of late apoptosis (Annexin V-positive/PI-positive) in K-562 and FEPS cell lines (**Figure 3B-C**), when compared to negative control, demonstrating the apoptosis as a cell death pathway. IM (0.1 μM or 10 μM) also demonstrated a significant increase of apoptotic cells in K-562 and FEPS.

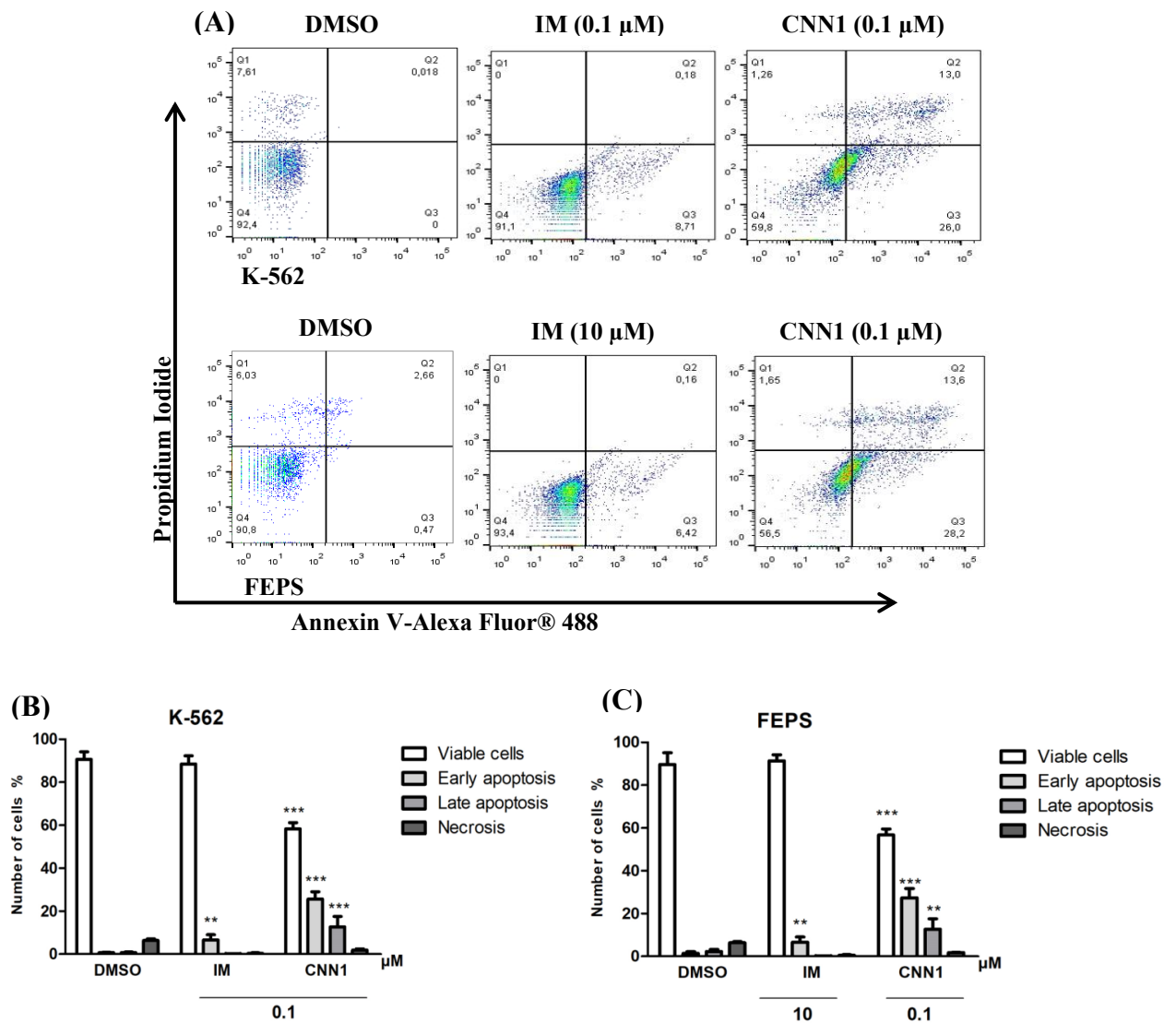


Figure 3. CNN1 increased apoptosis in K-5622 and FEPS cell lines. Percentage of apoptotic cells after 24h treatment (0.1 μ M) with CNN; cells were labeled with annexin-V and PI and the result was analyzed by flow cytometry. A) Representation of Dot Plot graph of the negative control (DMSO) and treated groups. B) Effect of CNN1 on cell death in K-562 cell line. C) CNN1 induced cell death in FEPS cell line. Bars represents the percentage of viable cells, early apoptosis, late apoptosis, and necrosis. Results are expressed as mean \pm SD of three independent experiments. Treated samples were compared to DMSO. Significant differences compared to control (DMSO) * p < 0.05, ** p < 0.01, *** p < 0.001 by ANOVA followed by Bonferroni posttest. Q1, necrosis; Q2, late apoptosis; Q3, early apoptosis and Q4 viable cells.

2.7 CNN1 significantly increased *H2AFX* gene expression in K-562 and FEPS cell lines

We also investigated whether CNN1 induces modulation of *H2AFX* gene expression after 18h of treatment. *H2AFX* is an important biomarker to monitor genotoxic events [42]. Samples treated with CNN1 (0.1 μ M) showed a significantly increase (p < 0.001) of *H2AFX* gene expression in K-562 and FEPS cell lines when compared to control, as show in **Figure 4**. Furthermore, we also determined whether CNN1 altered *ABCBI* mRNA expression, and no significant difference was found in *ABCBI* gene after 18 h of drug exposure (p > 0.06) in K-562 and FEPS cell lines. The results also showed no significant differences in *BCR-ABL1* expression in both K-562 (p > 0.27) and FEPS (p > 0.28) cell lines.

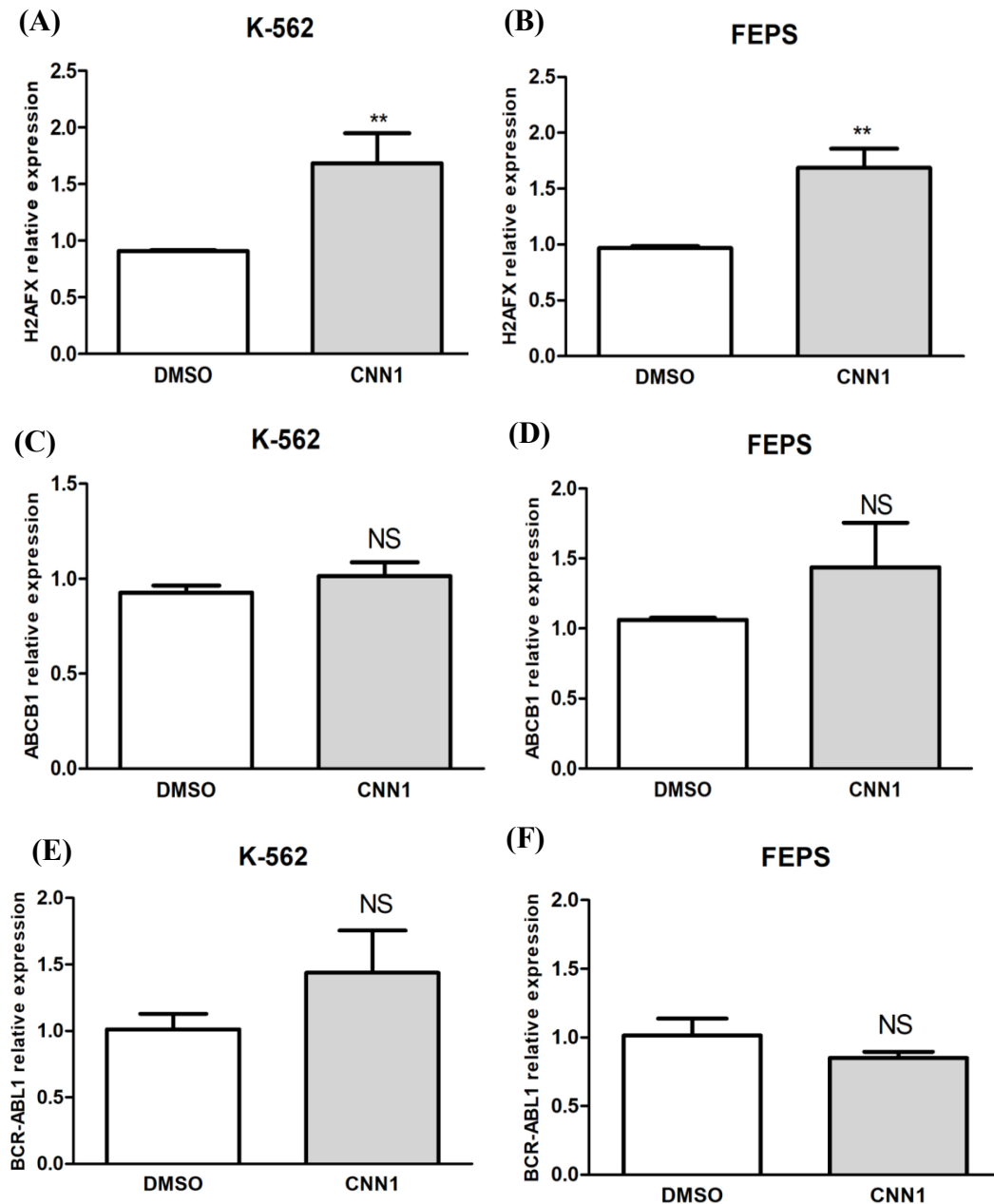


Figure 4. Relative gene expressions of *H2AFX*, *ABCB1* and *BCR-ABL1* in K-562 and FEPS cell lines after 18h of treatment. A) CNN1 significantly modulated *H2AFX* expression in K-562 cell line. B) CNN1 also demonstrated an increased *H2AFX* expression in FEPS cell line. C) No significant *ABCB1* expression after treatment with CNN1 in K-562 cell line D) CNN1 did not caused significant differences in *ABCB1* expression after treatment in FEPS cell line. E) and F) CNN1 did not significantly modulated *BCR-ABL1* expression in K-562 and FEPS cell lines, respectively. Results are expressed as the mean \pm SD of three independent experiments. Treated samples were compared to DMSO and statistically analyzed by t-test. Significant differences: ** $p < 0.01$. NS = non-significant.

4. Discussion

The naphthoquinones present different pharmacological properties, among them anticancer action, antifungal, antibacterial and antiviral activities, as well as allelopathic activities [43-46]. There are many studies that describe the effect of naphthoquinones, or its analogs, in several type of tumors, demonstrated an *in vitro* and *in vivo* chemotherapeutic potential of these compounds [47-49]. However, this is the first study that identified the antitumor effect of naphthoquinone against resistant leukemia cells (FEPS). The development of *MDR* is still a significant obstacle to provide effective treatment to many patients with cancer, including CML. In this sense, one strategy to overcome *MDR* is the use of compounds able to selectively target *MDR* cells [50].

Our previous study showed that CNN1 is more potent on resistance cell lines FEPS (IC₅₀ 0.60 μM) and K-562-Lucena-1 (IC₅₀ 0.90 μM) when compared to parental sensitive cell line K-562 (IC₅₀ 1.12 μM) [28]. Moreover, it was observed that CNN1 is less toxic to normal human cells such as fibroblasts (IC₅₀ 15.34 μM) when compared to leukemia cell lines. Our results suggest that CNN1 might cause few side effects, however clinical studies are still needed to confirm this hypothesis. *In vitro* experiments conducted by other authors demonstrate that 1,4 naphthoquinone, also presented a less toxic effect in peripheral blood mononuclear cells (PBMC) [26]. Although of CNN1 showed low toxicity to normal human cells, other research described that naphthoquinones are toxic to human lymphocytes [51].

To demonstrate the efficacy of CNN1 on resistant (FEPS) and sensitive (K-562) leukemia cell lines, experiments were performed to evaluate if CNN1 was able to induce apoptosis as a cell death mechanism. Analyzing the cell membrane integrity after treatment with CNN1, significant difference was found between the leukemic cell lines when compared to positive control ($p < 0.001$). In fact, CNN1 caused pronounced rupture in membrane integrity on K-562 and FEPS compared with IM standard therapy. Some naphthoquinones can induce disruption of membrane integrity [52]. Our presented data corroborate with a study by Montenegro and co-workers (2010) [53] that also described that 1,4-naphthoquinone induced alteration of cell membrane integrity (instability) on HL-60 cell line, derived from acute myeloid leukemia. Another study showed that HL-60 cells treated with naphthoquinone (β-lapachone) also presented disruption of membrane integrity, but only in low concentrations [54]. These data

reinforce the results presented in this paper and suggest that CNN1 is a compound with important anticancer properties.

The next question was to determine whether disruption of membrane integrity would be linked with cell death by *depolarization of mitochondrial membrane potential*, considered one of the hallmarks of apoptosis [55]. *In the current study, CNN1 caused depolarization of mitochondrial membrane potential in both leukemia cell lines and in a more pronounced manner when compared to IM ($p < 0.001$). Previous studies have reported a decrease in mitochondrial membrane potential induced by 1,4-naphthoquinone in liver cancer cells (Hep3B), leukemia cells (HL-60) and human breast adenocarcinoma cells (MCF-7) [56,26,57]. The deregulation of apoptotic pathways induces leukemic cells to accumulate, thus promoting further genetic alterations and also the leukemogenesis, therefore, mitochondrial damage may be a promising strategy in the regulation of apoptosis in CML [58]. The mechanism of apoptosis mainly consists of two core pathways that are the extrinsic initiated by activation of membrane-bound death receptors leading to caspase cleavage [59] and the intrinsic pathway is a mitochondrial-mediated pathway [60]. These findings support the involvement of intrinsic apoptosis pathway in cell death induced by CNN1 ($p < 0.001$), mediated by the loss of mitochondrial membrane potential.*

It was also investigated whether pronounced effect of CNN1 on leukemia multidrug resistant cell line, could reflect a cell cycle arrest. Our results showed that CNN1 induced cell cycle arrest at G2/M phase for both K-562 ($p < 0.001$) and FEPS ($p < 0.001$) cell lines. The tumors cell presents an increased rate of cellular proliferation, and this feature of uncontrolled cell division can be targeted to treat cancer patients [61]. The primary anticancer therapies that include chemotherapy and ionizing radiation induce cell death caused by DNA damage. Thus, DNA molecule is one of the main targets of these agents because DNA replication is essential on cell cycle progression [62]. Therefore, genotoxic compounds are attractive candidates to improve chemotherapy, which blocked cells in division with low adverse events [63]. In agreement with our results, previous data observed that others naphthoquinones also induced arrest at G2/M phase in cancer cell lines with a prominent MDR phenotype, including lung cancer [64] and breast cancer [65].

Furthermore, CNN1 showed a possible preferential genotoxic effect against K-562 and FEPS cells and did not cause significant DNA damage in peripheral blood mononuclear cells (PBMC). Data from previous work by our group showed that CNN1 reduced *TOP1* expression levels in both leukemia cell lines [28]. Thus, this evidence suggests that suppression of *TOP1* expression can be correlated with a genomic damage induced by CNN1 [66].

Some naphthoquinones have exhibited topoisomerase inhibition effects by catalytic activity or trapping of *TOP1*, that can result directly in DNA damage [67]. These data consolidate the selective genotoxic effect of CNN1 to MDR phenotype in FEPS cell line and suggest that CNN1 can be considered a promising lead compound with reduced side effects for development of new chemotherapeutic regimens [68].

In this research, the apoptosis induced by CNN1 was confirmed by phosphatidylserine externalization in K-562 ($p < 0.001$) and FEPS ($p < 0.001$) cell lines, similar findings were reported on *in vitro* models of breast cancer [69] lung adenocarcinoma [70] and colon carcinoma [46]. Apoptosis deregulation is a remarkable hallmark of cancer, enabling cancer cells to develop MDR phenotype, additionally this feature had been pointed out as the major cause of chemotherapy failure in CML [71]. The externalization of phosphatidylserine is a well-known apoptosis phenotypic characteristic, caused by an increase of mitochondrial permeability and release of cytochrome c and its accumulation in cytosol [72]. Our results showed that CNN1-mediated cytotoxicity is based on its ability to induce apoptosis by DNA fragmentation, loss of mitochondrial membrane potential and phosphatidylserine externalization.

In addition to the mechanism of cell death induced by CNN1 in K-562 and FEPS cell lines mediated by DNA damage, we investigated the *H2AFX* biomarker [42]. Our results indicate the hypothesis that CNN1 induces overexpression of *H2AFX* in K-562 ($p < 0.01$) and FEPS ($p < 0.01$), suggesting that this upregulation of *H2AFX* gene has a major role in initiating cell death in leukemia MDR cells through the DNA damage signaling pathway. To the best of our knowledge, our study is the first to describe *H2AFX* gene overexpression in mediated apoptosis of resistant leukemia cells (FEPS).

Several studies have shown that deregulation of the DNA damage response (DDR) pathway causes genomic instability in non-neoplastic cells and compromising tumor cell sensitivity to anticancer therapy [73-75]. *H2AFX* plays a key role in DNA

damage response and is important to DNA repair proteins signaling at sites that chromatin suffered a possible damaged, and for activation of checkpoint proteins, that block the cell cycle progression [76-78].

Other authors also described that *H2AFX* low expression compromise the apoptotic response to IM and promote blast crisis of CML, as well as the *H2AFX* deficiency promotes B-cell tumorigenesis, suggesting that deregulation could make cells more sensitive to leukemogenic factors [77]. In particular, the role of *H2AFX* as a tumor suppressor is involved to its regulation of apoptosis. [76]. Zangh and co-workers [78] reinforce that *H2AFX* dysfunction is considered one important event in cancer patients that develop resistance during treatment, including IM therapy, and demonstrated the importance of *H2AFX* in apoptosis regulation process of CML cells.

At last, we evaluated whether CNN1 could decrease the mRNA expression of *P-glycoprotein (P-gp)*, encoded by *ABCB1* (ATP - binding cassette, subfamily B, member 1), and the expression of *BCR-ABL1* transcripts. In our results, CNN1 does not caused decreased expression of *BCR-ABL1* and *ABCB1* in K-562 and FEPS cell lines. This result corroborates with a previous *in silico* study by our group, where CNN1 does not was considered inhibitor or substrate of P-gp [28]. Sales and co-workers [79] describe that FEPS had low transcript expression levels of *BCR-ABL1* compared to the parental K562, indicating that the *BCR-ABL1*-independent mechanism of resistance, such as occurs in CML patients with hyperexpression of *P-glycoprotein (P-gp)* is also found in the FEPS cell line model [80]. This finding reinforces that P-gp overexpression is the main mechanism of resistance found in FEPS cell line, and this *in vitro* model mimics the molecular events of MDR and poor adherence to IM observed in patients [41]. Taken together, Eadie and co-workers [81] showed that patients that are refractory or intolerant to IM treatment presented high levels of *ABCB1* mRNA, and they also failed to respond to subsequent treatment with nilotinib and dasatinib. Furthermore, recent studies demonstrated some evidence that IM, nilotinib and dasatinib are Pgp-substrates [82,83]. In this scenario, our finding suggests that CNN1 is characterized as a non-substrate for P-gp and might be able of overcome the interference of efflux transporters in MDR phenotype.

5. Conclusion

CNN1 naphthoquinone presented cytotoxicity activity based on its ability to induce apoptosis in K-562 and FEPS cell lines. Briefly, we showed that CNN1 blocks cell cycle progression, inducing DNA damage followed by the recruitment of *H2AFX* gene signaling, that seems to play a major role in initiating of apoptosis by intrinsic pathway. Therefore, these results indicated that CNN1 has a promising anticancer activity and as a potential lead compound to the development of a new treatment for CML patients who fail their TKI therapy due to intolerance and/or developed resistance, mainly in refractory disease advantage stages.

Abbreviations: ACTB, beta-actin; ANOVA, analysis of variance; MDR, multidrug resistance; CML, Chronic Myeloid Leukemia; TKIs, Tyrosine Kinase Inhibitors; PBMC, peripheral blood mononuclear cells; IM, Imatinib Mesylate, PI, propidium iodide; DMSO, dimethyl sulfoxide; H2AFX, H2A.X Variant Histone; ABCB1, Adenosine triphosphate- binding cassette subfamily B, member 1.

Author Contributions: Invitation received, C.A.M.-N.; Conceptualization, A.J.S.P, R.C.M, and C.A.M.-N.; Provision of data and subsequent analysis and interpretation, A.J.S.P, E.L.d.S, E.A.C.B, M.E.A.d.M, C.B.S.M.R.G, V.F, D.R.d.R, C.A.M.-N, and R.C.M; Writing—original draft preparation, A.J.S.P, C.A.M.-N, and R.C.M; Writing—review and editing, A.J.S.P, C.A.M.-N, and R.C.M.; Funding acquisition, R.M.R.B, C.A.M.-N, and R.C.M. All authors have read and agreed to published version of the manuscript.

Conflicts of interest: The authors declare no conflict of interest. The funders had no role in the design of the study; in the collection, analyses, or data interpretation; in the writing of the manuscript, or in the decision to publish the results.

Funding: This study was supported by Brazilian funding agencies: Coordination for the Improvement of Higher Education Personnel (CAPES; to A.J.S.P), National Council of Technological and Scientific Development (CNPq grant number 404213/2021-9 to CAM-N; and Productivity in Research PQ to, M.E.A.d.M, R.M.R.B and R.C.M.) and Foundation for Support Research in the State of Rio de Janeiro (FAPERJ; to D.R.d.R.). We also would like to thank PROPESP/UFPA for publication payment

Acknowledgement: The authors would like to thank the Multi-User Facility of Drug Research and Development Center of the Federal University of Ceará for technical support.

References

- [1] Steegmann J.L.; Baccarani M.; Breccia M.; Casado L.F.; García-Gutiérrez V.; Hochhaus A.; Kim D.W.; Kim T.D.; Khoury H.J.; Le Coutre P.; Mayer J.; Milojkovic D.; Porkka K.; Rea D.; Rosti G.; Saussele S.; Hehlmann R.; Clark R.E. European LeukemiaNet recommendations for the management and avoidance of adverse events of treatment in chronic myeloid leukaemia. *Leukemia*, **2016**, 8, 1648-71. doi: 10.1038/leu.2016.104.
- [2] Jabbour E.; Kantarjian H. Chronic myeloid leukemia: 2020 update on diagnosis, therapy and monitoring. *Am J Hemato*, **2020**, 6, 691-709, doi: 10.1002/ajh.25792.
- [3] Hochhaus A.; Baccarani M.; Silver R.T.; Schiffer C.; Apperley J.F.; Cervantes F.; Clark R.E.; Cortes J.E.; Deininger M.W.; Guilhot F.; Hjorth-Hansen H.; Hughes T P.; Janssen JJWM.; Kantarjian H.M.; Kim D.W.; Larson R.A.; Lipton J.H.; Mahon F.X.; Mayer J.; Nicolini F.; Niederwieser D.; Pane F.; Radich J.P.; Rea D.; Richter J.; Rosti G.; Rousselot P.; Saglio G.; Saúbele S.; Soverini S.; Steegmann J.L.; Turkina A.; Zaritskey A.; Hehlmann R. European LeukemiaNet, 2020 recommendations for treating chronic myeloid leukemia. *Leukemia*, **2020**, 34, 966-984. doi: 10.1038/s41375-020-0776-2.
- [4] Hochhaus A.; Breccia M.; Saglio G.; García-Gutiérrez V.; Réa D.; Janssen J. Apperley J. Expert opinion-management of chronic myeloid leukemia after resistance to second-generation tyrosine kinase inhibitors. *Leukemia*, **2020**, 6, 1495-1502. doi: 10.1038/s41375-020-0842-9.
- [5] Osman A.E.G.; Deininger M.W. Chronic Myeloid Leukemia: Modern therapies, current challenges and future directions. *Blood Rev*, **2021**, 49, 100825. doi: 10.1016/j.blre.2021.100825.
- [6] Alves R.; Gonçalves A.C.; Rutella S.; Almeida A.M.; De Las Rivas J.; Trougakos I.P. Sarmiento Ribeiro AB. Resistance to Tyrosine Kinase Inhibitors in Chronic Myeloid Leukemia-From Molecular Mechanisms to Clinical Relevance. *Cancers (Basel)*, **2021**, 26, 4820. doi: 10.3390/cancers13194820.

- [7] Cortes J.; Lang F. Third-line therapy for chronic myeloid leukemia: current status and future directions. *J Hematol Oncol*, **2021**, 1, 44, doi: 10.1186/s13045-021-01055-9.
- [8] Jabbour E.J.; Cortes J.E.; Kantarjian H.M. Resistance to tyrosine kinase inhibition therapy for chronic myelogenous leukemia: a clinical perspective and emerging treatment options. *Clin Lymphoma Myeloma Leuk*, **2013**, 13, 515-29. doi: 10.1016/j.clml.2013.03.018.
- [9] Atallah E.; Schiffer C.A. Discontinuation of tyrosine kinase inhibitors in chronic myeloid leukemia: when and for whom? *Haematologica*, **2020**, 1, 2738-2745. doi: 10.3324/haematol.2019.242891.
- [10] Tromp V.N.M.F.; Timmers L.; Koningen L.; Janssen J.J.W.M.; Westerweel P.E.; Geelen I.G.P.; de Jong J.; Beckeringh J.J.; Boons C.C.L.M.; Hugtenburg J.G. Tyrosine kinase inhibitor treatment discontinuation in chronic myeloid leukemia: patient views. *Leuk Lymphoma*, **2021**, 62, 649-658. doi: 10.1080/10428194.2020.1839655.
- [11]. Rohrbacher M.; Berger U.; Hochhaus A.; Metzgeroth G.; Adam K.; Lahaye T.; Saussele S.; Muller M.C.; Hasford J.; Heimpel H.; Hehlmann R. Clinical trials underestimate the age of chronic myeloid leukemia (CML) patients. Incidence and median age of Ph/ BCR-ABL-positive CML and other chronic myeloproliferative disorders in a representative area in Germany. *Leukemia*, **2009**, 23, 602–604, doi: 10.1038/leu.2008.245.
- [12] Aichberger K. J.; Mayerhofer M.; Krauth M.T.; Skvara H.; Florian S.; Sonneck K.; Akgul C.; Derdak S.; Pickl W. F.; Edgar W.; Monia B. P.; Moriggl R.; Valent P.; Sillaber C. Identification of mcl-1 as a BCR/ABL-dependent target in chronic myeloid leukemia (CML): evidence for cooperative antileukemic effects of imatinib and mcl-1 antisense oligonucleotides. *Blood*, **2005**, 105, 3303-3311, doi:10.1182/blood-2004-02-0749.
- [13] Talati C.; Pinilla-Ibarz J. Resistance in chronic myeloid leukemia: definitions and novel therapeutic agents. *Curr. Opin. Hematol*, **2018**, 25, 15-161, doi:10.1097/moh.0000000000000403.
- [14] Zhang W.W.; Cortes J.E.; Yao H.; Zhang L.; Reddy N.G.; Jabbour E.; Kantarjian H.M.; Jones D. Predictors of primary imatinib resistance in chronic myelogenous leukemia are distinct from those in secondary imatinib resistance, *J. Clin. Oncol*, **2009**, 27, 3642–3649, doi:10.1200/jco.2008.19.4076.
- [15] Westerweel P.E.; Boekhorst P.A.W.; Levin M.; Cornelissen J.J. New Approaches and Treatment Combinations for the Management of Chronic Myeloid Leukemia, *Front. Onco*, **2019**, 9, 665-670, doi:10.3389/fonc.2019.00665.

- [16] Jabbour E.; Kantarjian H. Chronic myeloid leukemia: 2014 update on diagnosis, monitoring, and management. *Annu. Clin. Upd. Hematol*, **2014**, *89*, 547-556, doi: 10.1002/ajh.2369.
- [17] Pommier Y.; Drugging topoisomerases: lessons and challenges. *ACS Chem. Biol*, **2013**, *8*, 82-95, doi:10.1021/cb300648v.
- [18] Vos M.; Tretter E.M.; Schmidt B.H.; Berger J.M. All tangled up: how cells direct, manage and exploit topoisomerase function. *Nat. Rev. Mol. Cell. Biol*, **2011**, *12*, 827-841, doi:10.1038/nrm3228.
- [19] Campos V.R.; Cunha A.C.; Silva W.A.; Ferreira V.F.; de Sousa C.S.; Fernandes P.D.; Moreira V.N., da Rocha D.R.; Dias F.R.F.; Montenegro R.C.; de Souza M.C.B.V.; Boechat F.C.S.; Franco C.F.J.; Resende J.A.L.C. Synthesis of a new class of naphthoquinone glycoconjugates and evaluation of their potential as antitumoral agents, *RSC Adv*. **2015**, *5*, 96222-96229, doi:10.1039/C5RA19192K.
- [20] Cardoso M.F.C.; Salomão K.; Bombaça A. C.; da Rocha D.R.; da Silva F.C.; Cavaleiro J.A.S.; de Castro S.L.; Ferreira V.F. Synthesis and anti-Trypanosoma cruzi activity of new 3-phenylthio-nor- β -lapachone derivatives, *Bioorg. Med. Chem*. **2015**, *23* 4763-4768, doi: 10.1016/j.bmc.2015.05.039.
- [21] Jardim G.A.M.; Silva T.L.; Goulart M.O.F.; de Simone C.A.; Barbosa J.M.C.; Salomão K.; de Castro S.L.; Bower J.F.; da Silva Júnior E.N. Rhodium-catalyzed C-H bond activation for the synthesis of quinonoid compounds: Significant Anti Trypanosoma cruzi activities and electrochemical studies of functionalized quinones, *Eur J. Med. Chem*. **2017**, *126*, 406-419, doi: 10.1016/j.ejmech.2017.05.011.
- [22] Moreira C.S.; Silva A.C.J.A.; Novais J.S.; Sá Figueiredo A.M.; Ferreira V.F.; da Rocha D.R.; Castro H.C. Searching for a potential antibacterial lead structure against bacterial biofilms among new naphthoquinone compounds, *J. Appl. Microbiol*, **2017** *122*, 651-662, doi:1111/jam.13369.
- [23] Louvis A.R.; Silva N.A.A.; Semaan F.S.; da Silva F.C.; Saramago G.; de Souza L.C.S.V.; Ferreira B.L.A.; Castro H.C.; Salles J.P.; Souza A.L.A.; Faria R.X.; Ferreira V.F.; Martins D.L. Synthesis, characterization and biological activities of 3-aryl-1,4-naphthoquinones - green palladium-catalysed Suzuki cross coupling, *New J. Chem*. **2016**, *40*, 7643-7656, doi:10.1039/C6NJ00872K.
- [24] Montenegro R.C.; de Vasconcellos M.C.; Barbosa G.S.; Burbano R.M.; Souza L.G.; Lemos T.L.; Costa-Lotufo L.V.; de Moraes M.O. A novel o-naphthoquinone inhibits N-cadherin expression and blocks melanoma cell invasion via AKT signaling.

Toxicol In Vitro, **2013**, *27*, 2076-83, doi: 10.1016/j.tiv.2013.07.011.

[25] da Rocha D.R.; de Souza A.C.; Resende J.A.; Santos W.C.; dos Santos E.A.; Pessoa C.; de Moraes M.O.; Costa-Lotufo L.V.; Montenegro R.C.; Ferreira V.F. Synthesis of new 9-hydroxy- α - and 7-hydroxy- β -pyran naphthoquinones and cytotoxicity against cancer cell lines. *Org Biomol Chem*, **2011**, *7*, 4315-22. doi: 10.1039/c1ob05209h.

[26] Montenegro R.C.; Araújo A.J.; Molina M.T.; Marinho F.J.D.; Rocha D.D.; López-Montero E.; Goulart M.O.; Bento E.S.; Alves A.P.; Pessoa C.; de Moraes M.O.; Costa-Lotufo L.V. Cytotoxic activity of naphthoquinones with special emphasis on juglone and its 5-O-methyl derivative. *Chem Biol Interact*, **2010**, *30*, 439-48, doi:10.1016/j.cbi.2010.01.041.

[27] de Araújo M.V.; David, C.C.; Clementino Neto J.; de Oliveira L.A.P.L.; da Silva K.C.J.; dos Santos J.M.; da Silva J.K.S.; Brandão V.B.C.A.; Silva T.M.S.; Camara C.A.; Alexandre-Moreira M.S. Evaluation on the leishmanicidal activity of 2-N,N'-dialkylamino-1,4-naphthoquinone derivatives. *Exp. Parasitol*, **2017**, *176*, 46–51, doi:10.1016/j.exppara.2017.02.004.

[28] Portilho A.J. S.; Carinne B.S.M.R.; Caroline S.M.; Forezi L.S.M.; Cordeiro P.S.; Nascimento V.; Daniel J.P.; Vasconcellos M.C.; Moraes M.E.A.; Moreira-Nunes C.F.A.; Ferreira V.F.; Montenegro R.C.; Rocha D.R. Synthesis, molecular docking, and biological activity of thioether derived from juglone in preclinical models of chronic myeloid leukemia. *Computational Toxicology*, **2021**, *20*, 100-197. doi:10.1016/j.comtox.2021.100197.

[29] Kawaguchi S.; Nakamura T.; Yamamoto A.; Honda G.S.Y. Is the comet assay a sensitive procedure for detecting genotoxicity? *J Nucleic Acids*, **2010**, *1* doi: 10.4061/2010/541050.

[30] Rumjanek V.M.; Trindade G.S.; Wagner-Souza K.; Meletti-De-Oliveira M.C.; Marques-Santos L.F.; Maia R.C.; Capella M.A.M. Multidrug resistance in tumour cells: characterization of the multidrug resistant cell line K562-Lucena 1. *An. Acad. Bras. Cienc*, **2001**, *73*, 57-69, doi: 0.1590/S0001-37652001000100007.

[31] Daflon-Yunes N.; Pinto-Silva N.; Vidal R.S.; Novis B.F.; Berguetti T.; Lopes R.R.S.; Polycarpo C.; Rumjanek V.M. Characterization of a multidrug-resistant chronic myeloid leukemia cell line presenting multiple resistance mechanisms. *Mol. Cell. Biochem*. **2013**, *383*, 123 -135, doi:10.1007/s11010-013-1761-0.

[32] Moreira M.A.; Bagni C.; de Pinho M.B.; Mac-Cormick T.M.; dos Santos Mota M.;

- Pinto-Silva F.E.; Daflon-Yunes N. Rumjanek VM. Changes in gene expression profile in two multidrug resistant cell lines derived from a same drug sensitive cell line. *Leuk Res*, **2014**, *38*, 983-7, doi: 10.1016/j.leukres.2014.06.001.
- [33] Borra R.C.; Lotufo M.A.; Gagiotti S.M.; Barros F.M.; Andrade P.M. A simple method to measure cell viability in proliferation and cytotoxicity assays. *Braz. Oral Res*, **2009**, *23*, 255-262, doi:10.1590/S1806-83242009000300006.
- [34] Crowley L.C.; Marfell B.J.; Scott A.P.; Waterhouse N.J. Quantitation of Apoptosis and Necrosis by Annexin V Binding, Propidium Iodide Uptake, and Flow Cytometry. *Cold Spring Harb Protoc*, **2016**, *11*, doi:10.1101/pdb.prot087288.
- [35] Ferlini C.; Scambia G. Assay for apoptosis using the mitochondrial probes, Rhodamine123 and 10-N-nonyl acridine orange. *Nat Protoc*, **2007**, *2*, 3111-4. doi:10.1038/nprot.2007.397.
- [36] Nair A.; Manohar S.M.. A flow cytometric journey into cell cycle analysis. *Bioanalysis*, **2021**, *13*, 1627-1644. doi:10.4155/bio-2021-0071.
- [37] Lu Y.; Liu Y.; Yang C. Evaluating In Vitro DNA Damage Using Comet Assay. *J Vis Exp*. **2017**, *11*, 56450. doi: 10.3791/56450.
- [38] Rieger A.M.; Nelson K.L.; Konowalchuk J.D.; Barreda D.R. Modified annexin V/propidium iodide apoptosis assay for accurate assessment of cell death. *J Vis Exp*, **2021**, *24*, 2597, doi:10.3791/2597.
- [39] Rio D.C.; Ares M.Jr.; Hannon G.J.; Nilsen T.W. Purification of RNA using TRIzol (TRI reagent). *Cold Spring Harb Protoc*. **2010**, *6*, doi: 10.1101/pdb.prot5439.
- [40] Bustin S.A.; Benes V.; Garson J.A.; Hellemans J.; Huggett J.; Kubista M.; Mueller R.; Nolan T.; Pfaffl M.W.; Shipley G.L.; Vandesompele J.; Wittwer C.T. The MIQE guidelines: minimum information for publication of quantitative real-time PCR experiments. *Clin. Chem*. **2009**, *55*, 611–622, doi.org/10.1373/clinchem.2008.112797.
- [41] Schmittgen T.; Livak K. Analyzing real-time PCR data by the comparative C_T method. *Nat Protoc*, **2008**, *3*, 1101–1108, doi.org/10.1038/nprot.2008.73.
- [42] Rahmanian N.; Shokrzadeh M.; Eskandani M. Recent advances in γ H2AX biomarker-based genotoxicity assays: A marker of DNA damage and repair. *DNA Repair (Amst)*. **2021**, 103243. doi: 10.1016/j.dnarep.2021.103243.
- [43] Vasconcellos M.C.; Montenegro R.C.; Militão G.C.; Fonseca A.M.; Pessoa O.D.; Lemos T.L.; Pessoa C.; Moraes M.O.; Costa-Lotufo L.V. Bioactivity of biflorin, a typical o-naphthoquinone isolated from *Capraria biflora* L. *Z Naturforsch C J Biosci*.

2005, 6, 394-8. doi: 10.1515/znc-2005-5-605.

[44] Lara L.S.; Lechuga G.C.; Moreira C.D.; Santos T.B.; Ferreira V.F.; da Rocha D.R.; Pereira M.C.S. Optimization of 1,4-Naphthoquinone Hit Compound: A Computational, Phenotypic, and In Vivo Screening against *Trypanosoma cruzi*. *Molecules*. **2021**, 26, doi: 10.3390/molecules26020423.

[45] de Carvalho A.S.; da Rocha D.R.; Ferreira V.F. Strategies for the Synthesis of Mono - and Bis-Thionaphthoquinones. *Curr Org Synth*. **2021**, 26, 535-546, doi:10.2174/1570179418666210224124603.

[46] de Freitas P.P.; Ribeiro R.C.B.; Dos Santos G.I.; Moreira C.S.; Rocha D.R.; de Carvalho S.F.; Ferreira V.F.; Gimba E.R.P. (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. *Mol Biol Rep*. **2021**, 48, 3253-3263. doi: 10.1007/s11033-021-06406-w.

[47] L. Klotz.; X. Hou.; C. Jacob. 1,4-naphthoquinones: From oxidative damage to cellular and inter-cellular signaling. *Molecules*, **2014**, 19, 14902-14918, doi: 10.3390/molecules190914902.

[48] Lu J.; Bao J.; Wu G.; Xu W.; Huang M.; Chen X.; Wang Y. Quinones derived from plant secondary metabolites as anti-cancer agents. *Anticancer Agents Med. Chem*. **2013**, 13, 456–463, doi:10.2174/1871520611313030008.

[49] Sunassee S.N.; Veale C.G.L.; Shunmoogam-Gounden N.; Osoniyi O.; Hendricks D.T.; Caira M.R.; de la Mare J.; Edkins A.L.; Pinto A.V.; da Silva Júnior E.N.; Davies-Coleman M.T. Cytotoxicity of lapachol, β -lapachone and related synthetic 1,4-naphthoquinones against oesophageal cancer cells. *Eur. J. Med. Chem*. **2013**, 62, 98-110, doi:10.1016/j.ejmech.2012.12.048.

[50] Wang J.; Seebacher N.; Shi H.; Kan Q.; Duan Z. Novel strategies to prevent the development of multidrug resistance (MDR) in cancer. *Oncotarget*, **2017**, 12, 84559-84571, doi:10.18632/oncotarget.19187.

[51]_Wilson A.S.; Davis C.D.; Williams D.P.; Buckpitt A.R.; Pirmohamed M.; Park B.K. Characterisation of the toxic metabolite(s) of naphthalene. *Toxicology*, **1996**, 18, 233-42. doi: 10.1016/s0300-483x(96)03515-9.

[52] Goleva T.N.; Lyamzaev K.G.; Rogov A.G.; Khailova L.S.; Epremyan K.K.; Shumakovich G.P.; Domnina L.V.; Ivanova O.Y.; Marmiy N.V.; Zinevich T.V.; Esipov D. S.; Zvyagilskay R.A.; Skulachev V.P.; Chernyak B.V.. Mitochondria-targeted 1,4-

naphthoquinone (SkQN) is a powerful prooxidant and cytotoxic agent. *Biochim Biophys Acta Bioenerg*, **2020**, 148210, doi:10.1016/j.bbabi.2020.148210.

[53] Montenegro R.C.; Araújo A.J.; Molina M.T.; Marinho Filho J.D.B.; Rocha D.D.; López-Montero E.; Goulart M.O.F.; Bento E.S.; Alves A.P.N.N.; Pessoa C.; de Moraes M.O.; Costa-Lotufo L.V. Cytotoxic activity of naphthoquinones with special emphasis on juglone and its 5-O-methyl derivative, *Chem. Biol. Interact*, **2010**, *184*, 439-448. doi:10.1016/j.cbi.2010.01.041.

[54] Cavalcanti B.C.; Silva E.N.S. Potent antileukemic action of naphthoquinoidal compounds: evidence for an intrinsic death mechanism based on oxidative stress and inhibition of DNA repair. *Braz. Chem. Soc*, **2013**, *24*, doi:10.1590/S0103-50532013000100019.

[55] Henry-Mowatt J.J.; Dive C.; Martinou J.C.; James D.. Role of mitochondrial membrane permeabilization in apoptosis and cancer. *Oncogene*, **2004**, *16*, 2850-60. doi:10.1038/sj.onc.1207534.

[56] Wang Y.; Luo Y.H.; Piao X.J.; Shen G.N.; Meng L.Q.; Zhang Y.; Jin C.H.; Novel 1,4-naphthoquinone derivatives induce reactive oxygen species-mediated apoptosis in liver cancer cells. *Mol Med Rep*, **2019**, *13*, 1654-1664, doi:10.3892/mmr.2018.9785.

[57] de Almeida P.D.O.; Santos B.J.G.; Santos F.C.C.; Rocha B.L, Dias R.B.; Schlaepfer S.C.B.; Valverde L.F.; Rocha C.A.G.; Soares M.B.P.; Bezerra D.P.; de Carvalho S.F.; Cardoso M.F.D.C.; Ferreira V.F.; Brito L.F.; Pires de S.L.; de Vasconcellos M.C.; Lima E.S. A new synthetic antitumor naphthoquinone induces ROS-mediated apoptosis with activation of the JNK and p38 signaling pathways. *Chem Biol Interac*, **2021**, *1*, 343:109444. doi: 10.1016/j.cbi.2021.109444.

[58] Neophytou C.M.; Trougakos I.P.; Erin N.; Papageorgis P. Apoptosis Deregulation and the Development of Cancer Multi-Drug Resistance. *Cancers (Basel)*, **2021**, *28*, 43633. doi:10.3390/cancers13174363.

[59] Xu X.; Lai Y.; Hua Z, C. Apoptosis and apoptotic body: disease message and therapeutic target potentials. *Biosci Rep*, **2019**, 1801-80992. doi: 10.1042/BSR20180992.

[60] Pistritto G.; Trisciuglio D.; Ceci C.; Garufi A.; D'Orazi G. Apoptosis as anticancer mechanism: function and dysfunction of its modulators and targeted therapeutic strategies. *Aging (Albany NY)*, **2016**, *8*, 603-19. doi: 10.18632/aging.100934.

- [61] Otto T.; Sicinski P. Cell cycle proteins as promising targets in cancer therapy. *Nat Rev Cancer*. **2017**, *27*, 93-115. doi:10.1038/nrc.2016.138.
- [62] Suski J.M.; Braun M.; Strmiska V.; Sicinsk P. Targeting cell-cycle machinery in cancer. *Cancer Cell*, **2021**, *39*, 759-778, doi:10.1016/j.ccell.2021.03.010.
- [63] Albertini R.J.; The lower alkyl methacrylates: Genotoxic profile of non-carcinogenic compounds. *Regul Toxicol Pharmacol*, **2017**, *84*, 77-93. doi:10.1016/j.yrtph.2017.01.001.
- [64] Cao Y.; Yin X.; Jia Y.; Liu B.; Wu S.; Shang M.. Plumbagin, a natural naphthoquinone, inhibits the growth of esophageal squamous cell carcinoma cells through inactivation of STAT3. *International Journal of Molecular Medicine*, **2008**, *42*, 1569-1576, doi:10.3892/ijmm.2018.3722.
- [65] Vukic M.D.; Vukovic N.L.; Djelic G.T.; Zaric S.L.; Baskic M.M.; Krstic D.D.; Tesevic G.B.; Kacaniova V.V. Antibacterial and cytotoxic activities of naphthoquinone pigments from *Onosma visianii* Clem. *EXCLI J*, **2017**, *16*, 16:73-88. doi:10.17179/excli2016-762.
- [66] Fowler P.; Meurer K.; Honarvar N.; Kirkland D. A review of the genotoxic potential of 1,4-naphthoquinone. *Mutat Res Genet Toxicol Environ Mutagen*, **2018**, *834*, 6-17. doi: 10.1016/j.mrgentox.2018.07.004.
- [67] Pommier Y.; Nussenzweig A.; Takeda S.; Austin C. Human topoisomerases and their roles in genome stability and organization. *Nat Rev Mol Cell Biol*, **2022**, *23*, 407-427. doi: 10.1038/s41580-022-00452-3.
- [68] Vos S.M.; Tretter E.M.; Schmidt B.H.; Berger J.M. All tangled up: how cells direct, manage and exploit topoisomerase function. *Nat. Rev. Mol. Cell. Biol*, **2011**, *12* 827-841, doi:10.1038/nrm3228.
- [69] Brodniewicz T.; Gryniewicz G. Preclinical drug development. *Acta Pol Pharm*, **2010**. doi:10.2174/1381612826666201019104712.
- [70] Matthaios D, Hountis P, Karakitsos P, Bouros D, Kakolyris S. H2AX a promising biomarker for lung cancer: a review. *Cancer Invest*, **2013**, *313*, 582-99. doi:10.3109/07357907.2013.849721.
- [71] Neophytou C.M.; Trougakos I.P.; Erin N.; Papageorgis P. Apoptosis Deregulation and the Development of Cancer Multi-Drug Resistance. *Cancers (Basel)*, **2021**, *28*, 43633, doi:10.3390/cancers13174363.
- [72] D'Arcy M.S.; Cell death: a review of the major forms of apoptosis, necrosis and autophagy. *Cell Biol Int*, **2019**, *43*, 582-592.

- [73] Huang R.X.; Zhou P.K. DNA damage response signaling pathways and targets for radiotherapy sensitization in cancer. *Signal Transduct Target Ther*, **2020**, *1*, 60. doi: 10.1038/s41392-020-0150-x.
- [74] Wang M.; Chen S.; Ao D. Targeting DNA repair pathway in cancer: Mechanisms and clinical application. *MedComm (2020)*, **2021**, *7*, 654-691. doi: 10.1002/mco2.103.
- [75] Smith H.L.; Southgate H.; Tweddle D.A. Curtin NJ. DNA damage checkpoint kinases in cancer. *Expert Rev Mol Med*, **2020**, *22*:e2. doi: 10.1017/erm.2020.3.
- [76] Podhorecka M.; Skladanowski A.; Bozko P. H2AX Phosphorylation: Its Role in DNA Damage Response and Cancer Therapy. *J Nucleic Acids*, **2010**, *3*, 920161, doi:10.4061/2010/920161.
- [77] Klemm L; Duy C.; Iacobucci I.; Kuchen S.; Levetzow G.; Feldhahn N. The B cell mutator AID promotes B lymphoid blast crisis and drug resistance in chronic myeloid leukemia. *Cancer Cell*, **2009**, *16*, 232–4, doi:10.1016/j.ccr.2009.07.030.
- [78] Zhang Y.J.; Lu C.R.; Cao Y.; Luo Y.; Bao R.F.; Yan S.; Xue M.; Zhu F.; Wang Z.; Duan L.N. Imatinib induces H2AX phosphorylation and apoptosis in chronic myelogenous leukemia cells in vitro via caspase-3/Mst1 pathway. *Acta Pharmacol Sin*. **2012**, *33*, 551-7, doi:10.1038/aps.2012.9.
- [79] De Oliveira S.L.; Mesquita F.P.; Portilho A.J.S.; Moraes F.M.O.; Moraes M.E.A.; Montenegro R.C.; Moreira-Nunes C.A. Comparison of *BCR-ABL* Transcript Variants Between Patients With Chronic Myeloid Leukaemia and Leukaemia Cell Lines. *In Vivo*. **2019**, *33*, 1119-1124. doi: 10.21873/invivo.11581.
- [80] Maia R.C.; Vasconcelos F.C.; Souza P.S.; Rumjanek V.M. Towards Comprehension of the ABCB1/P-Glycoprotein Role in Chronic Myeloid Leukemia. *Molecules*, **2018**, *7*,119. doi: 10.3390/molecules23010119.
- [81] Eadie, L.N.; Dang, P.; Saunders, V.A.; Yeung, D.T.; Osborn, M.P.; Grigg, A.P.; Hughes, T.P.; White, D.L. The clinical significance of ABCB1 overexpression in predicting outcome of CML patients undergoing first-line imatinib treatment. *Leukemia* **2017**, *31*, 75–82. doi: 10.1038/leu.2016.179.
- [82] Mahon, F.X.; Hayette, S.; Lagarde, V.; Belloc, F.; Turcq, B.; Nicolini, F.; Belanger, C.; Manley, P.W.; Leroy, C.; Etienne, G.; et al. Evidence that resistance to nilotinib may be due to BCR-ABL, Pgp, or Src kinase overexpression. *Cancer Res*. **2008**, *68*, 9809–9816. doi: 10.1158/0008-5472.CAN-08-1008.
- [83]. Shukla, S.; Sauna, Z.E.; Ambudkar, S.V. Evidence for the interaction of imatinib at the transport-substrate site(s) of the multidrug-resistance-linked ABC drug

transporters ABCB1 (P-glycoprotein) and ABCG2. *Leukemia*, **2008**, 22, 445–447. doi: 10.1038/sj.leu.2404897.

Dados suplementares

Supplementary table S1

Table 1. Sequence of oligonucleotides used for RT-qPCR.

Gene	Sequence (5' – 3')	NCBI reference sequence
<i>H2AFX</i>	F- ACCAGCACAAGTCGGTTA	NM_002105.3
	R - AAGGTTCTAGTCGTGGAAGG	
<i>ACTB</i> ¹	F- CTGGAACGGTGAAGGTGACA	NM_001101.5
	R- AAGGGACTTCCTGTAACAACGCA	

¹Actin Beta (ACTB) gene was used as the endogenous control.

Dados suplementares

Supplementary figure S1

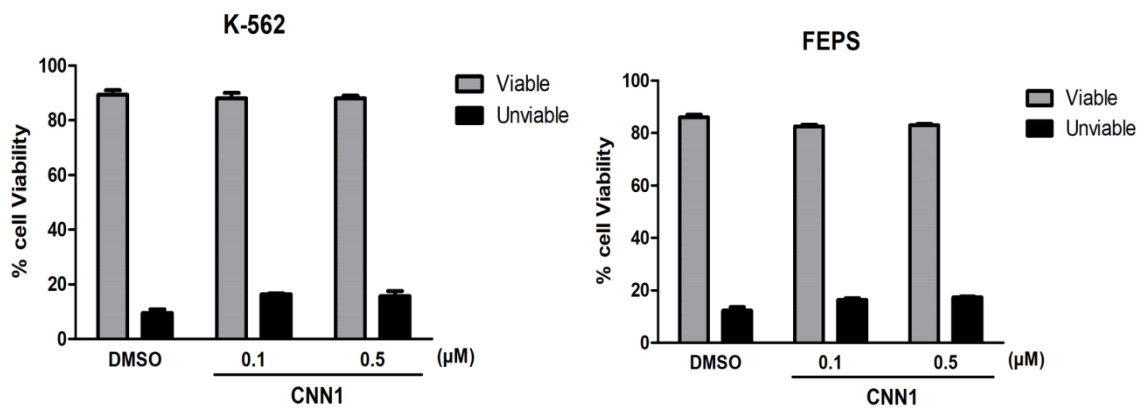


Figure: K-562 and FEPS after 18h of treatment with **CNN1** in trypan blue assay. The bars represent the mean \pm standard error of mean of three independent experiments in triplicate. It was no statistically significant difference in cell viability comparing the negative control with treated group by ANOVA.