UNIVERSIDADE FEDERAL DE ALAGOAS – UFAL
INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS E DA SAÚDE – ICBS
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS DA SAÚDE – PPGCS

JOSÉ CLEMENTINO NETO

# ATIVIDADE ANTITUMORAL *IN VITRO* DE DERIVADOS 2-*N,N'*-DIALQUILAMINO-1,4-NAFTOQUINONAS SOBRE CÉLULAS DE GLIOBLASTOMA HUMANO (GBM02)

MACEIÓ – AL
2019

JOSÉ CLEMENTINO NETO

# ATIVIDADE ANTITUMORAL *IN VITRO* DE DERIVADOS 2-*N,N'*-DIALQUILAMINO-1,4-NAFTOQUINONAS SOBRE CÉLULAS DE GLIOBLASTOMA HUMANO (GBM02)

Tese de Doutorado apresentada ao Programa de Pós-graduação em Ciências da Saúde da Universidade Federal de Alagoas, para exame de Defesa, como requisito para obtenção do título de Doutor em Ciências da Saúde.

**Orientadora:** Prof.ª Dr.ª Adriana Ximenes Da Silva

**Coorientadora:** Prof.ª Dr.ª Magna Suzana Alexandre Moreira

MACEIÓ – AL

2019

**Catalogação na fonte**
**Universidade Federal de Alagoas**
**Biblioteca Central**
**Divisão de Tratamento Técnico**

Bibliotecária: Taciana Sousa dos Santos – CRB-4 – 2062

C626a Clementino Neto, José.

Atividade antitumoral *in vitro* de derivados 2-N,N´-dialquilamino-1,4-naftoquinonas sobre células de glioblastoma humano (GBM02) / José Clementino Neto. – 2019.

100 f.: il., grafs, tabs., color.

Orientadora: Adriana Ximenes da Silva.

Coorientadora: Magna Suzana Alexandre Moreira.

Tese (Doutorado em Ciências da Saúde) – Universidade Federal de Alagoas. Instituto de Ciências Biológicas e da Saúde. Programa de Pós-Graduação em Ciências da Saúde. Maceió, 2019.

Bibliografia: f. 83-100.

1. Cérebro - Tumores. 2. Glioblastoma. 3. Fármacos. 4. Dialquilamino. 5. Naftoquinonas. 6. Agentes antitumorais. I. Título.

CDU: 615.277:615.45

Universidade Federal de Alagoas
Instituto de Ciências Biológicas e da Saúde
Programa de Pós-graduação em Ciências da Saúde

ICBS - UFAL – *Campus* A. C. Simões
Av. Lourival Melo Mota, S/N
Cidade Universitária – Maceió-AL
CEP: 57072-900
E-mail: ppgcs9@gmail.com
Fone: 82 3214 1850

# Folha de Aprovação

José Clementino Neto

Atividade antitumoral *in vitro* de derivados 2-N, N´-dialquilamino-1, 4-naftoquinonas sobre células de glioblastoma humano (GBM02)

Tese submetida ao corpo docente do Programa de Pós-Graduação em Ciências da Saúde da Universidade Federal de Alagoas e aprovada em 16 de dezembro de 2019.

**Banca Examinadora**

Olagide Wagner de Castro/UFAL

Eliane Aparecida Campesatto/UFAL

Morgana Vital de Araújo/SESAU

*Aos meus pais, José Clementino Filho (in memorian) e Marilene Siqueira de Miranda, e ao meu irmão Rodrigo Miranda Clementino, por toda educação, carinho, companheirismo concedidos e por serem minhas fontes de humildade, caráter e força de vontade.*

*À minha esposa Luana Rodrigues da Silva, por todo o amor fornecido e por ser a grande responsável por essa conquista, tendo me escutado, aconselhado e apoiado nos momentos mais difíceis dessa trajetória.*

*DEDICO*

## AGRADECIMENTOS

Primeiramente a **Deus**, por ter me concedido saúde, capacidade, tranquilidade e serenidade nos momentos bons e, principalmente, nos mais difíceis da minha vida, possibilitando que eu estivesse apto para realizar o meu maior sonho.

Ao meu pai *(in memorian)*, **José Clementino Filho**, por ter me transmitido os melhores sentimentos possíveis e ter moldado todo o meu caráter e minha educação. Esse sonho só foi realizado porque foi sonhado junto com ele, meu melhor amigo e minha fonte de inspiração. Tenho certeza que mesmo agora distante, emanou energias nos momentos de dificuldade, me dando forças para nunca desistir.

À minha mãe, **Marilene Siqueira de Miranda**, por ser minha maior fonte de inspiração, garra, força de vontade, humildade e inteligência. Imagino o quanto a vida tem sido difícil para a senhora desde o ano de 2011, mas quero que saiba que sou eternamente grato por toda a educação, amor e carinho fornecido a mim durante todos esses anos.

Ao meu irmão, **Rodrigo Miranda Clementino**, por todo o companheirismo e pelas histórias de vida compartilhadas. Sua amizade me fortalece e engrandece de um jeito que talvez você desconheça. Espero estar por perto para comemorar todas as suas conquistas que ainda estão por vir.

À minha esposa, **Luana Rodrigues da Silva**, um verdadeiro anjo que Deus enviou para cuidar de mim. Não tem um só dia, desde dezembro de 2008, que eu não agradeça a Deus por ter colocado você no meu caminho. Foram muitos os momentos difíceis nos últimos 8 anos, mas em todos eles eu tive o seu ombro para chorar e, principalmente, a sua mão para ajudar a me levantar. Você é um exemplo de mulher: batalhadora, aguerrida, inteligente, carinhosa e de um coração enorme. Se esse sonho está sendo realizado, tenha certeza que você é a grande responsável por isso.

À minha orientadora, **Prof.ª Dr.ª Adriana Ximenes da Silva**, por todos os ensinamentos e atenção a mim fornecidos. Foi uma grande honra ter feito parte de seu laboratório (LEMC-UFAL) durante esses quase 5 anos. Seu jeito de ser, forma de

tratar a todos, humildade e inteligência são referências para todos os seus amigos e alunos. A convivência com a senhora me fez crescer muito como profissional e, principalmente, como ser humano.

À minha coorientadora, **Prof.ª Dr.ª Magna Suzana Alexandre Moreira**, por ter me recebido da melhor maneira possível em seu laboratório (LAFI-UFAL). Seu carisma e forma como trata o próximo são inspirações para todos que a cercam. Agradeço toda a confiança depositada em mim e todos os momentos de convivência, que me fizeram engrandecer em todos os âmbitos.

À **Prof.ª Dr.ª Fabiana de Andrade Cavalcante**, por ter me concedido a oportunidade de conhecer o universo da pesquisa científica, em 2009.

Ao **Prof. Dr. Celso de Amorim Câmara**, pelo fornecimento dos derivados 2-*N,N'*-dialquilamino-1,4-naftoquinonas, objetos desse estudo.

Ao **Prof. Dr. Vivaldo Moura Neto**, pelo fornecimento das células de glioblastoma humano (GBM02), o que possibilitou a realização de todos os testes experimentais *in vitro*.

Aos meus companheiros do LEMC-UFAL, **Carmelita Bastos Mendes, Lucas Costa, Eduardo Oliveira, Lanni Sarmento, Giselma Alcântara, Lucas Chagas, Maísa Araújo, Cibelle Bastos, Nayara Franzon, Dayanne Lima e Guilherme Albuquerque,** por todo o suporte concedido, a amizade construída ao longo dos anos e pelo ambiente de família característico do nosso grupo. Em especial aos grandes amigos, **Carmelita e Lucas Costa**, por estarem sempre à disposição para ajudar e conversar, não só no âmbito profissional, desde o início da nossa convivência. Espero conservar a amizade de todos pelo resto da vida.

A **todos os integrantes da grande família LAFI-UFAL**, em especial, **Amanda Evellyn, Karoline Jatobá, João Kaycke, João Flávio, Rafael Omena**, por toda a ajuda fornecida a mim e pelos laços de amizade criados e fortalecidos nesses anos. Espero que nossa amizade dure por muito tempo.

À **Dra. Morgana Vital de Araújo**, por todos os ensinamentos passados e por ter sido a base da construção de todo o conhecimento adquirido sobre pesquisa *in vitro*. Além disso, sua humildade e seu caráter enriqueceram o meu modo de ser. É uma grande honra poder falar que sou seu amigo.

Aos meus avós maternos, **João Batista Rodrigues de Miranda e Maria Siqueira de Miranda**, e paternos, **José Clementino e Carmelita Tertuliano Clementino (*in memoria*)**, por terem contribuído da melhor maneira possível em minha educação e por todo o carinho fornecido a mim.

Aos familiares, **Jean Dellon Clementino, Daniele Rose, Márcia Cerqueira, Marcos Clementino, Mércia Clementino, Nelson Menezes, João Maria Clementino, Phelipe Gabriel, Davi Cerqueira, Matheus Eduardo, Weidilla Miranda e João Batista**, por toda a atenção e suporte prestados no momento mais difícil da minha vida. Essa conquista também é de todos vocês.

Aos amigos, **Arthur Dresch, André Ítalo, Rafael Canuto, Darlington Macêdo, Darlio Cedrim, Pedro Henrique, Leonardo Araújo, Dennis Lins, Luís Paulo, Murilo Marques, Rodolfo Siciliani, José Jonas, Fernandes Vieira, Guilherme Issa**, pelos 27 anos (a maioria) de amizade verdadeira e por todos os momentos marcantes que passamos juntos e que me fizeram crescer muito como pessoa.

Aos **funcionários da Universidade Federal de Alagoas**, em especial **ao Seu Galego**, um grande amigo de conversas.

À **Universidade Federal de Alagoas (UFAL)** e ao **Programa de Pós-Graduação em Ciências da Saúde (PPGCS)**, pela oportunidade oferecida de realizar o meu sonho e por todo o suporte e apoio prestados.

À **Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Ensino Superior (CAPES)** e à **Fundação de Apoio à Pesquisa do Estado de Alagoas (FAPEAL)** pelo apoio financeiro e pela concessão da bolsa.

***Muito Obrigado!***

*“Só eu sei cada passo por mim dado*
*Nessa estrada esburacada que é a vida,*
*Passei coisas que até mesmo Deus duvida,*
*Fiquei triste, capiongo, aperreado,*
*Porém nunca me senti desmotivado,*
*Me agarrava sempre numa mão amiga,*
*E de forças minha alma era munida*
*Pois do céu a voz de Deus dizia assim:*
*- Suba o queixo, meta os pés, confie em mim,*
*Vá para a luta que eu cuido das feridas”.*

(Bráulio Bessa)

## RESUMO

Glioblastoma multiforme (GBM) é um tipo de tumor originado em células da glia com elevado grau de proliferação e invasividade, o que o torna o tumor mais maligno do Sistema Nervoso Central (SNC), associado a altos índices de morbidade e mortalidade. As intervenções terapêuticas são baseadas em ressecção do tumor, seguida de tratamento radioterápico e quimioterápico, possibilitando uma taxa de sobrevida média curta, de apenas 15 meses. Dessa maneira, faz-se necessária a busca por novos protótipos de fármacos mais eficazes para o tratamento do GBM. As naftoquinonas (NQs), fazem parte da importante classe de produtos naturais das quinonas e são associadas a uma série de atividades biológicas, dentre elas, a anticâncer. Portanto, o presente estudo avaliou a atividade antitumoral *in vitro* de derivados 2-*N,N'*-dialquilamino-1,4-naftoquinonas (1a – 1n) sobre células de glioblastoma humano (GBM02). Inicialmente, para a avaliação dos efeitos dos derivados sobre as viabilidades de GBM02 e de células monocucleares sanguíneas (monócitos e linfócitos) foi utilizado o ensaio colorimétrico do MTT. Em seguida, a seletividade dos derivados foi calculada por meio da razão entre as concentrações citotóxicas para 50% dos monócitos e linfócitos ($CC_{50}$) e inibitórias de 50% de GBM02 ($CI_{50}$). Na sequência, o efeito antimigratório sobre GBM02 após os tratamentos foi observado pelo ensaio de *scratch*. As análises morfológicas de GBM02 ocorreram por meio de microscopia óptica e os mecanismos de morte (estresse oxidativo, ciclo celular e apoptose) das células tumorais foram analisados por citometria de fluxo. Os resultados foram expressos como a média ± e.p.m. e analisados estatisticamente por ANOVA one-way seguido do pós-teste de Dunnett, sendo considerados significantes quando *p<0,05, **p<0,01, ***p<0,001 comparados ao controle. Todos os derivados inibiram a viabilidade de GBM02, com exceção dos 1a, 1b e 1c; os mais eficazes foram os derivados 1d (69,2 ± 2,7%***), 1e (72,2 ± 1,2%***), 1f (72,5 ± 1,5%***), 1g (70,5 ± 0,2%***), 1h (67,6 ± 0,6%***), 1k (71,6 ± 0,1%***) e 1n (64,1 ± 1,4%***) e, entre eles, o mais potente foi o 1e ($CI_{50}$ 14,9 ± 4,6 µM). Os derivados 1a, 1l e 1n não foram tóxicos para monócitos e linfócitos; e os 1e (18,3 ± 11,1%*), 1f (31,6 ± 9,8%**) e 1g (18,9 ± 2,2%*) apresentaram baixa citotoxicidade. Os derivados 1e (IS > 6,7), 1f (IS > 1,4), 1g (IS > 1,4), 1k (IS > 2,1) e 1n (IS > 2,4) foram mais seletivos para GBM02 do que para monócitos e linfócitos. Dentre estes, somente 1e (40,6%**) e 1n (72,4%***) inibiram a migração de GBM02. Os derivados 1e e 1n provocaram alterações no padrão morfológico das células tumorais, induziram apoptose em GBM02 e promoveram a parada do ciclo celular nas fases S e G0/G1, respectivamente. Somente o derivado 1n (6,0%***) estimulou o estresse oxidativo em GBM02. Os derivados 2-*N,N'*-dialquilamino-1,4-naftoquinonas foram mais eficazes na ação antitumoral sobre GBM02 do que o fármaco padrão utilizado no tratamento quimioterápico, a temozolamida (TMZ). Entre todos os derivados, os 1e e 1n, foram os que apresentaram atividades antitumorais mais satisfatórias, ao induzirem apoptose de GBM02 e ocasionarem menores efeitos tóxicos sobre células humanas saudáveis. Dessa forma, estes dois derivados, demonstraram-se efetivos agentes antitumorais, e devem ser submetidos a novos protocolos experimentais na cadeia de desenvolvimento de fármacos antitumorais, com a finalidade de se tornarem futuras opções terapêuticas para esta doença de péssimo prognóstico e até então sem cura.



**Palavras-chave:** Cérebro – Tumores. Glioblastoma. Fármacos. Dialquilamino. Naftoquinonas. Agentes antitumorais.

## ABSTRACT

Glioblastoma multiforme (GBM) is a type of tumor originated in glial cells with high proliferation and invasiveness, which makes it the most malignant tumor of the Central Nervous System (CNS), associated with high morbidity and mortality index. Therapeutic interventions are based on tumor resection followed by radiotherapy and chemotherapy treatment, allowing an short average survival rate of only 15 months. Thus, it is necessary to search for new prototypes of drugs more effective for the treatment of GBM. Naphthoquinones (NQs) are included in the important class of natural products called quinones and are associated with several biological activities, including anticancer. Therefore, the present study evaluated the in vitro antitumor activity of 2-*N, N'*-dialkylamino-1,4-naphthoquinone derivatives (1a - 1n) against human glioblastoma cells (GBM02). Initially to evaluate the effects of the derivatives on the cell viability of GBM02 and blood mononuclear cells (monocytes and lymphocytes) the MTT colorimetric assay was used. Then, the derivatives selectivity was calculated by the ratio between cytotoxic concentrations against 50% of the monocytes and lymphocytes ($CC_{50}$) and 50% inhibitory concentrations ($IC_{50}$) against GBM02 cells. In sequence, the antimigratory effect on GBM02 cells after treatments was observed using the scratch assay. Morphological analyzes were performed by light microscopy and the mechanisms of tumor cell death (oxidative stress, cell cycle and apoptosis) were analyzed by flow cytometry. Results were expressed as the mean ± SEM and analyzed by one-way ANOVA followed by the Dunnett test, they were considered significant when *p <0.05, **p <0.01, and ***p <0.001 compared to control. All derivatives inhibited GBM02 cell viability except 1a, 1b, and 1c; the most effective ones were the derivatives 1d (69.2 ± 2.7%***), 1e (72.2 ± 1.2%***), 1f (72.5 ± 1.5%***), 1g (70.5 ± 0.2%***), 1h (67.6 ± 0.6%***), 1k (71.6 ± 0.1%***), and 1n (64.1 ± 1.4%***) and, among them, the most potent one was 1e ($IC_{50}$ of 14.9 ± 4.6 µM). The derivatives 1a, 1l, and 1n were not toxic to monocytes and lymphocytes; and 1e (18.3 ± 11.1% *), 1f (31.6 ± 9.8% **), and 1g (18.9 ± 2.2%*) presented low cytotoxicity. The derivatives 1e (SI > 6.7), 1f (SI > 1.4), 1g (SI > 1.4), 1k (SI > 2.1), and 1n (SI > 2.4) were more selective for GBM02 cells than for monocytes and lymphocytes. Among those derivatives, only 1e (40.6%**) and 1n (72.4%***) inhibited GBM02 migration. Moreover, 1e and 1n provoked changes in the morphology of tumor cells, induced apoptosis in GBM02 cells and promoted cell cycle arrest in the S and G0/G1 phases, respectively. Only the derivative 1n (6.0%***) stimulated oxidative stress in GBM02 cells. The 2-*N, N'*-dialkylamino-1,4-naphthoquinone derivatives were more effective against GBM02 than the standard drug used in chemotherapeutic treatments, temozolomide (TMZ). Among all derivatives, 1e and 1n were the ones that presented the most satisfactory antitumor activity for inducing GBM02 apoptosis and causing less toxic effects to healthy human cells. In this way, these two derivatives have been shown to be effective antitumor agents and should be subjected to new experimental protocols in the antitumor drugs development chain, with the purpose of becoming future therapeutic options for this disease of poor prognosis and until then without cure.



**Keywords:** Brain – Tumors. Glioblastoma. Drugs. Dialkylamino. Naphthoquinones. Antitumor agents.

## LISTA DE FIGURAS


Figura 1 - Esquema representativo da classificação atual dos gliomas, segundo a OMS (2016) ..... 21

Figura 2 - Ilustração das alterações genéticas e moleculares que ocorrem durante o processo de gliomagênese ..... 24

Figura 3 - Ressonâncias Magnéticas Nucleares (RMN) de GBM ..... 27

Figura 4 - Observação microscópica de algumas características histológicas associadas ao diagnóstico diferencial do GBM ..... 27

Figura 5 - Ilustração da conversão da TMZ em MTIC ..... 30

Figura 6 - Ilustração representativa do mecanismo de ação da TMZ ..... 31

Figura 7 - Estruturas químicas das *orto*-naftoquinonas (1,2-naftoquinonas) e *para*-naftoquinonas (1,4-naftoquinonas) ..... 35

Figura 8 - Estruturas químicas das Lausona, Lapachol e β-Lapachona ..... 36

Figura 9 - Modelo de análise quantitativa do efeito antimigratório dos derivados 2-*N,N'*-dialquilamino-1,4-naftoquinonas sobre GBM02 ..... 50

Figura 10 - Microfotografias representativas dos efeitos dos derivados 2-*N,N'*-dialquilamino-1,4-naftoquinonas 1e, 1f, 1g, 1k, 1n, e da TMZ sobre a migração de GBM02 ..... 58

Figura 11 - Microfotografias representativas dos efeitos dos derivados 2-*N,N'*-dialquilamino-1,4-naftoquinonas, 1e e 1n, e da TMZ sobre a morfologia de GBM02 ..... 61

Figura 12 - Esquema representativo do possível mecanismo de ação antitumoral do derivado 2-*N,N'*-dialquilamino-1,4-naftoquinona 1n sobre GBM02 ..... 80

## LISTA DE GRÁFICOS


Gráfico 1 - Efeito dos derivados 2-*N,N'*-dialquilamino-1,4-naftoquinonas 1e, 1f, 1g, 1k e 1n e da TMZ sobre a migração de GBM02 ..... 60

Gráfico 2 - Efeito dos derivados 2-*N,N'*-dialquilamino-1,4-naftoquinonas, 1e e 1n, e da TMZ na indução de apoptose em GBM02 ..... 64

Gráfico 3 - Efeito dos derivados 2-*N,N'*-dialquilamino-1,4-naftoquinonas, 1e e 1n, e da TMZ sobre o ciclo celular de GBM02 ..... 65

Gráfico 4 - Efeito dos derivados 2-*N,N'*-dialquilamino-1,4-naftoquinonas, 1e e 1n, e da TMZ sobre o estresse oxidativo em GBM02 ..... 66

## LISTA DE TABELAS


Tabela 1 - Estimativa de novos casos de câncer do SNC nas diferentes regiões do Brasil, no biênio 2018 – 2019 ..... 22

Tabela 2 - Características dos subtipos de GBM, classificados de acordo com sua origem ..... 23

Tabela 3 - Características dos subtipos de GBM, classificados de acordo com aspectos moleculares e genéticos ..... 25

Tabela 4 - Apresentação dos Derivados 2-*N,N'*-dialquilamino-1,4-naftoquinonas (1a – 1n) ..... 43

Tabela 5 - Efeito dos derivados 2-*N,N'*-dialquilamino-1,4-naftoquinonas e da TMZ sobre a viabilidade celular de GBM02 ..... 54

Tabela 6 - Efeito dos derivados 2-*N,N'*-dialquilamino-1,4-naftoquinonas e da TMZ sobre a viabilidade celular de monócitos e linfócitos .... 55

Tabela 7- Índice de seletividade dos derivados 2-*N,N'*-dialquilamino-1,4-naftoquinonas e da TMZ ..... 57

## LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

| | |
|---|---|
| °C | Graus Celsius |
| 7-AAD | 7-aminoactinomicina D |
| µL | Microlitros |
| µM | Micromolar |
| ANOVA | Análise de Variância |
| BAX | *Bcl-2-Associated X protein* (proteína X associada à Bcl-2) |
| BEV | Bevacizumabe |
| BHE | Barreira Hematoencefálica |
| CDK | *Cyclin-Dependent Kinases* (quinase dependente de ciclina) |
| $CC_{50}$ | Concentração Citotóxica 50% |
| $CI_{50}$ | Concentração Inibitória 50% |
| $CO_2$ | Dióxido de carbono |
| DMEM | *Dulbecco's Modified Eagle* (Meio *Eagle* modificado por *Dulbecco's*) |
| DMSO | Dimetilsufóxido |
| DNA | *Deoxyribonucleic Acid* (ácido desoxirribonucleico) |
| EGF | *Epidermal Growth Factor* (fator de crescimento epidermal) |
| EGFR | *Epidermal Growth Factor Receptor* (receptor do fator de crescimento epidermal) |
| $E_{máx}$ | Efeito máximo |
| e.p.m | Erro padrão da média |
| EROs | Espécies Reativas de Oxigênio |
| Fas | *Factor apoptosis stimulating* (fator estimulante de apoptose) |
| FDA | *Food and Drug Administration* (administração de fármacos e alimentos) |
| $Fe^{2+}$ | Íon ferroso |
| FGF | *Fibroblast Growth Factor* (fator de crescimento de fibroblastos) |
| GBM | Glioblastoma Multiforme |
| Gy | *Gray* |
| HE | Hematoxilina e Eosina |
| $H_2O_2$ | Peróxido de hidrogênio |
| IDH1 | Isocitrato-Desidrogenase 1 |

| | |
|---|---|
| IDH2 | Isocitrato-Desidrogenase 2 |
| IGF | *Insulin Growth Factor* (fator de crescimento semelhante à insulina) |
| INCA | Instituto Nacional do Câncer |
| IS | Índice de Seletividade |
| Kg | Quilogramas |
| L-Glu | L-Glutamina |
| M | Molar |
| m | Metros |
| MEC | Matriz Extracelular |
| mg | Miligramas |
| mL | Mililitros |
| mm | Milímetros |
| mM | Milimolar |
| MMPs | *Matrix Metalloproteinases* (metaloproteinases da matriz) |
| MTT | Metil-Tiazolil-Tetrazólio |
| MTIC | 5-(3-metiltriazen-1-il)imidazol-4-carboxamida |
| MGMT | O6-metilguanina metiltransferase |
| NF1 | Neurofibromatose tipo 1 |
| nm | Nanômetros |
| NQs | Naftoquinonas |
| $O_2$ | Oxigênio |
| $O_2^-$ | Ânion superóxido |
| OH | Grupamento hidroxila |
| $OH^-$ | Ânion hidroxila |
| OMS | Organização Mudial da Saúde |
| p53 | Proteína de reparo do ácido desoxirribonucleico |
| PBS | *Phosphate Buffered Saline* (Tampão fosfato salina) |
| PE | *Phycoerythrin* (Ficoeritrina) |
| PDGFR | *Platelet-Derived Growth Factor Receptor* (receptor do fator de crescimento derivado de plaquetas) |
| PI3KC | *Phosphoinositide 3-Kinases* (fosfatidilinositol-3-cinase) |
| PIG3 | *p53-Inducible Gene 3* ( gene 3 induzido por p53) |
| PNs | Produtos Naturais |

| | |
|---|---|
| PTEN | *Phosphatase and Tensin Homolog* (homólogo a fosfatase e tensina) |
| PUMA | *p53 Upregulated Modulator of Apoptosis* (modulador de apoptose regulado por p53) |
| QT | Quimioterapia |
| RM | Ressonância Magnética |
| RNA | *Ribonucleic Acid* (ácido ribonucleico) |
| rpm | Rotações por minuto |
| RPMI | *Roswell Park Memorial Institute* |
| RT | Radioterapia |
| SFB | Soro Fetal Bovino |
| SNC | Sistema Nervoso Central |
| SOD | Superóxido Desmutase |
| TC | Tomografia computadorizada |
| TGF-β | *Tranformig Growth Factor Beta* (fator de crescimento transformador beta) |
| TMZ | Temozolamida |
| TNF | *Tumoral Necrose Factor* (fator de necrose tumoral) |
| TNFR | *Tumoral Necrose Factor Receptor* (receptor do fator de necrose tumoral) |
| TOPO I | Topoisomerase I |
| TOPO II | Topoisomerase II |
| VEGF | *Vascular Endothelial Growth Factor* (fator de crescimento do endotélio vascular) |
| VEGFR-1 | *Vascular Endothelial Growth Factor Receptor 1* (receptor 1 do fator de crescimento do endotélio vascular) |
| VEGFR-2 | *Vascular Endothelial Growth Factor Receptor 2* (receptor 2 do fator de crescimento do endotélio vascular) |
| v/v | Volume/volume |

**SUMÁRIO**

**1 INTRODUÇÃO** ..... 18
**2 REVISÃO DE LITERATURA** ..... 20
**2.1 Glioblastoma** ..... 20
**2.2 Tratamentos para o glioblastoma** ..... 28
**2.3 Naftoquinonas** ..... 34
**3 HIPÓTESE** ..... 40
**4 OBJETIVOS** ..... 41
**4.1 Objetivo geral** ..... 41
**4.2 Objetivos específicos** ..... 41
**5 MATERIAL** ..... 42
**5.1 Células de glioblastoma GBM02** ..... 42
**5.2 Células mononucleares sanguíneas** ..... 42
**5.3 Derivados 2-*N,N'*-dialquilamino-1,4-naftoquinonas** ..... 42
**5.4 Substâncias** ..... 45
**5.5 Aparelhagem** ..... 45
**6 MÉTODOS** ..... 47
**6.1 Avaliação dos efeitos antitumoral e citotóxico dos derivados 2-*N,N'*-dialquilamino-1,4-naftoquinonas** ..... 47
6.1.1 Avaliação do efeito antitumoral dos derivados 2-*N,N'*-dialquilamino-1,4-naftoquinonas sobre GBM02 ..... 47
6.1.2 Avaliação do efeito citotóxico dos derivados 2-*N,N'*-dialquilamino-1,4-naftoquinonas sobre monócitos e linfócitos ..... 47
**6.2 Avaliação da seletividade dos derivados 2-*N,N'*-dialquilamino-1,4-naftoquinonas** ..... 48
**6.3 Avaliação do efeito antimigratório dos derivados 2-*N,N'*-dialquilamino-1,4-naftoquinonas sobre GBM02** ..... 49
**6.4 Avaliação do efeito dos derivados 2-*N,N'*-dialquilamino-1,4-naftoquinonas, 1e e 1n, sobre a morfologia de GBM02** ..... 50
**6.5 Avaliação do efeito dos derivados 2-*N,N'*-dialquilamino-1,4-naftoquinonas, 1e e 1n, na indução de apoptose em GBM02** ..... 51

**6.6 Determinação do efeito dos derivados 2-*N,N'*-dialquilamino-1, 4-naftoquinonas, 1e e 1n, sobre as diferentes fases do ciclo celular de GBM02** ..... 52
**6.7 Determinação do efeito dos derivados 2-*N,N'*-dialquilamino-1,4-naftoquinonas, 1e e 1n, sobre o estresse oxidativo em células de GBM02** 53
**6.8 Análise estatística** ..... 53
**7 RESULTADOS** ..... 54
**7.1 Efeitos antitumoral e citotóxico dos derivados 2-*N,N'*-dialquilamino-1,4-naftoquinonas** ..... 54
7.1.1 Efeito antitumoral dos derivados 2-*N,N'*-dialquilamino-1,4-naftoquinonas sobre GBM02 ..... 54
7.1.2 Efeito citotóxico dos derivados 2-*N,N'*-dialquilamino-1,4-naftoquinonas sobre monócitos e linfócitos ..... 55
**7.2 Seletividade dos derivados 2-*N,N'*-dialquilamino-1,4-naftoquinonas** . 56
**7.3 Efeito antimigratório dos derivados 2-*N,N'*-dialquilamino-1,4-naftoquinonas sobre GBM02** ..... 57
**7.4 Efeito dos derivados 2-*N,N'*-dialquilamino-1,4-naftoquinonas, 1e e 1n, sobre a morfologia de GBM02** ..... 60
**7.5 Efeito dos derivados 2-*N,N'*-dialquilamino-1,4-naftoquinonas, 1e e 1n, na indução de apoptose em GBM02** ..... 63
**7.6 Efeito dos derivados 2-*N,N'*-dialquilamino-1,4-naftoquinonas, 1e e 1n, sobre as diferentes fases do ciclo celular de GBM02** ..... 63
**7.7 Efeito dos derivados 2-*N,N'*-dialquilamino-1,4-naftoquinonas, 1e e 1n, sobre o estresse oxidativo em GBM02** ..... 63
**8 DISCUSSÃO** ..... 67
**9 CONCLUSÃO** ..... 81
**10 PERSPECTIVAS** ..... 82
**REFERÊNCIAS** ..... 83

## 1 INTRODUÇÃO

O Glioblastoma Multiforme (GBM) é o tumor maligno do Sistema Nervoso Central (SNC) mais comum nas populações adulta e idosa, e está associado a elevadas taxas de morbidade e mortalidade em todo o mundo (ALEXANDER; CLOUGHESY, 2017). Caracterizado por amplas heterogeneidades histológicas, moleculares e genéticas, o GBM corresponde a 20% de todos os tumores do SNC na idade adulta, e sua incidência é maior no sexo masculino. De maneira geral, cerca de 3,7 indivíduos a cada 100.000 pessoas são acometidos por este tipo de câncer (NIZAMUTDINOV et al., 2018).

A etiologia do GBM ainda não está totalmente esclarecida. Dentre os principais fatores de risco relacionados ao desenvolvimento do tumor destacam-se exposição prévia à radiação, choques mecânicos na região da cabeça e fatores genéticos (TYAGI et al., 2016). Clinicamente, o crescimento da massa tumoral acarreta no aumento da pressão intracraniana, o que resulta em sinais e sintomas como dor de cabeça, náusea, vômito, tontura e sonolência. Os déficits neurológicos expressos são consequências diretas de alterações das atividades desempenhadas pela área cerebral em que o tumor se faz presente (BERGO et al., 2019).

A técnica padrão ouro utilizada no diagnóstico de GBM é a ressonância magnética (RM) que, aliada às análises histológica e genética do tecido tumoral, revela a complexidade do tumor e permite o desenvolvimento de estratégias precisas para um tratamento eficaz (BATASH et al., 2017). Por outro lado, as altas capacidades de proliferação, migração e invasão fazem com que os pacientes diagnosticados com GBM tenham um prognóstico desfavorável, com uma sobrevida média de, se tratados, aproximadamente 15 meses (STOYANOV et al., 2017).

O tratamento para pacientes acometidos com GBM consiste inicialmente em um procedimento de remoção cirúrgica da maior parte da massa tumoral, seguido de radioterapia (RT) e quimioterapia (QT) (NIEDER; ANDRATSCHKE; GROSU, 2016). O principal fármaco utilizado no âmbito da quimioterapia é a Temozolamida (TMZ), um pró-fármaco que promove a alquilação do ácido desoxirribonucleico (DNA) e induz apoptose celular de GBM. Assim como outros quimioterápicos, a TMZ está associada a uma série de efeitos colaterais que dificultam o tratamento. As heterogeneidade do tumor e resistência à QT, são fatores limitantes da eficácia da TMZ, e fazem com que o aumento da sobrevida gerado seja pequeno (ANJUM et al., 2017; LEE, 2017). Diante

do exposto, torna-se necessária a busca por novos protótipos de fármacos que promovam a cura total da doença ou que, no mínimo, prolonguem por mais tempo e com maior segurança a sobrevida de todos os pacientes.

Os produtos naturais (PNs) e seus derivados sintéticos têm grande importância no desenvolvimento de novos fármacos para tratar diversas doenças, inclusive o câncer. Seus grupos farmacofóricos biologicamente ativos são o ponto de partida para o surgimento de novos medicamentos (LI; LOU, 2018). Mais de 50% dos medicamentos que foram desenvolvidos nas últimas 3 décadas contêm algum PN ou derivado dele (NEWMAN; CRAGG, 2016). Nesse contexto de desenvolvimento, podem ser citados alguns fármacos antitumorais, como por exemplo: paclitaxel, utilizado para o tratamento de cânceres de mama e ovário, e a vincristina, usada no combate à leucemia linfocítica (CRAGG; PEZUTTO, 2016).

As naftoquinonas (NQs) fazem parte da classe de produtos naturais das quinonas e podem ser amplamente encontradas na natureza em plantas, fungos, bactérias, organismos marinhos, entre outros. São substâncias dicetônicas derivadas do anel naftaleno, e que contêm dois grupos carbonílicos, que a depender das suas posições, originam isoformas com propriedades distintas (SÁNCHEZ-CALVO et al., 2016). Nos últimos anos, vários grupos de pesquisa científica têm associado as NQs e seus derivados sintéticos a uma série de efeitos biológicos, dentre eles, o anticâncer (TABRIZI; CHINIFOROSHAN, 2017; GOLMAKANIYOON et al., 2019).

É bem relatado na literatura que as NQs e seus derivados sintéticos apresentam grande capacidade de indução da geração de espécies reativas de oxigênio (EROs), o que acarreta em um desequilíbrio redox celular irreversível. Além disso, estimulam vias apoptóticas, promovem alterações sobre as diferentes fases do ciclo celular e inibem as enzimas topoisomerases I e II (TOPO I e II), responsáveis pelo relaxamento do DNA (PEREYRA et al., 2019). Todas essas características são importantes para protótipos de fármacos candidatos a apresentarem atividade antitumoral frente ao GBM.

Portanto, sendo o GBM a neoplasia mais grave do SNC cujos tratamentos existentes não resultam em uma sobrevida mais longa para os pacientes, torna-se essencial a busca por novos compostos como opção terapêutica para este câncer. Diante das características das NQs, decidiu-se avaliar um possível efeito antitumoral *in vitro* de derivados 2-*N,N'*-dialquilamino-1,4-naftoquinonas sobre células de glioblastoma humano (GBM02).

# 2 REVISÃO DE LITERATURA

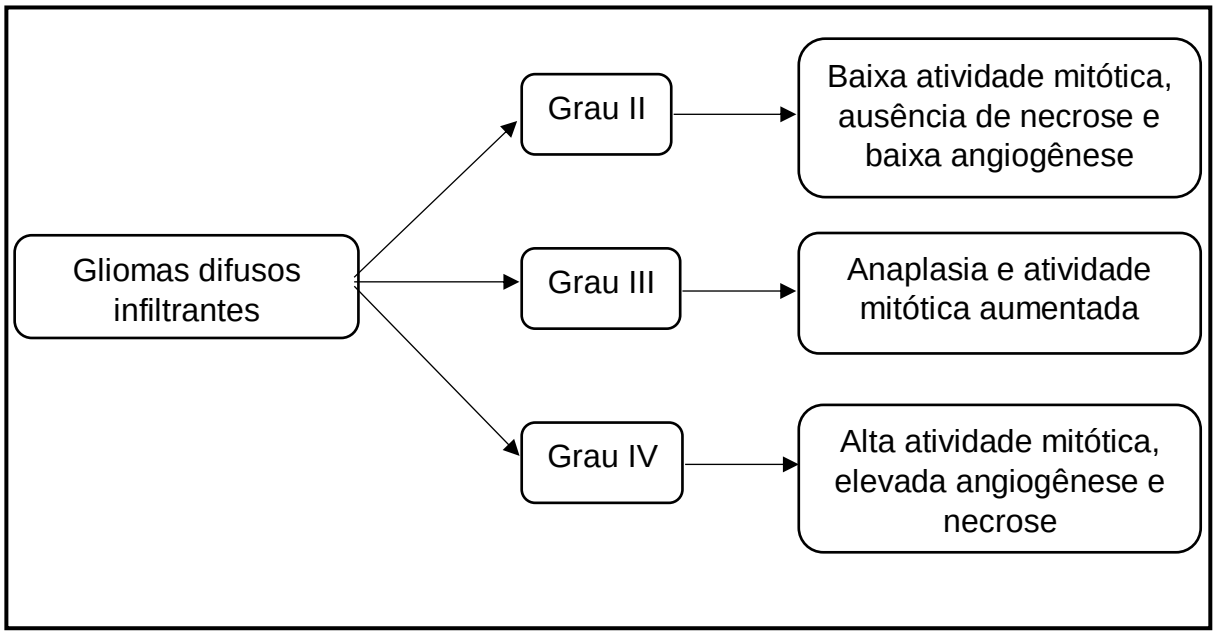
## 2.1 Glioblastoma

O câncer é uma das principais doenças e causas de morte no mundo, no século XXI (UHLEM et al., 2017). Os tumores do SNC que se originam no cérebro, fazem parte do grupo mais complexo e de pior prognóstico entre os cânceres humanos. A complexidade desses tipos de tumores se dá em função de grandes diversidades etiológicas, biológicas e moleculares, que geram progressões clínicas variadas (CROCETTI et al., 2012). Grande parte dos cânceres cerebrais se originam por meio de alterações em precursores de células gliais (glioblastos) ou em células gliais (astrócitos, ependimócitos e oligodendrócitos) propriamente ditas, e recebem a denominação de gliomas (MAUGERI, 2016; FREITAS 2017).

Os tumores cerebrais eram classificados, de acordo com a Organização Mundial da Saúde (OMS), até o ano de 2007, em grupos com diferentes graus de malignidade, levando-se em consideração somente características histopatológicas. Dessa forma, os astrocitomas, tumores de origem glial que se assemelham a astrócitos, foram agrupados e classificados em graus de I a IV. Portanto, de acordo com essa classificação: o de grau I, astrocitoma pilocítico, apresenta baixa capacidade proliferativa e alta possibilidade de cura após uma remoção cirúrgica; o de grau II, astrocitoma difuso, tem baixa atividade mitótica, anaplasia e atipias citológicas; o de grau III, astrocitoma anaplásico, se caracteriza por atipia nuclear e aumento da atividade mitótica; e o astrocitoma de grau IV, GBM, é o que apresenta maior malignidade em decorrência de elevada atividade mitótica, angiogênese e necrose (LOUIS et al., 2007).

No entanto, no ano de 2016 houve uma reformulação nos critérios de agrupamentos dos diferentes tumores cerebrais, e passou-se a levar em consideração não somente os perfis histopatológicos mas também parâmetros genéticos, e moleculares de diagnóstico. Dessa maneira, todos os gliomas difusos infiltrantes passaram a compor um único grupo, independentemente de sua origem (astrocítica, oligodendodrial ou mista). O astrocitoma pilocítico, que era considerado um astrocitoma de grau I, passou a ser classificado como outro tipo de tumor astrocítico. Logo, a classificação atual dos tumores do SNC segundo a OMS compreende os gliomas difusos infiltrantes de graus II, III e IV (Figura 1) (LOUIS et al., 2016).

**Figura 1 – Esquema representativo da classificação atual dos gliomas, segundo a OMS (2016)**




Fonte: Autor (2019), adaptado de LOUIS et al. (2016).

Em termos de incidência, os cânceres do SNC correspondem à aproximadamente 1,8% de todos os tumores malignos (STEWART; WILD, 2014). Nos Estados Unidos da América (EUA) cerca de 2,4% das mortes ocasionadas por câncer, são consequências do desenvolvimento de tumores no SNC. Em países Europeus a média de incidência de tumores cerebrais compreende valores de 11,2 e 8,5 a cada 100 mil habitantes, para homens e mulheres, respectivamente (BRAY et al., 2018). Mudanças no perfil de acesso ao atendimento médico, testes de diagnósticos mais aprimorados e uma maior oferta de bons profissionais na área da saúde, são alguns fatores que contribuem para o aumento no número de diagnósticos e consequentemente de incidência de câncer no SNC na população ao redor do mundo (MAUGERI, 2016).

No Brasil, em 2015, foram registrados 9.033 óbitos em decorrência de câncer no SNC (BRASIL, 2017). Além disso, de acordo com o Instituto Nacional do Câncer (INCA), estima-se que para o biênio de 2018 – 2019 sejam relatados 11.620 novos casos em homens e 11.020, em mulheres. Dentre as regiões do Brasil com maior previsão de ocorrência desse tipo de tumor estão a sudeste, sul e nordeste (Tabela 1). Apesar de não se encontrar entre os dez tipos de câncer mais frequentes nos adultos do Brasil, na faixa etária dos 0 aos 14 anos os tumores do SNC ocupam a

segunda posição (INCA, 2017). Ainda segundo o INCA, no Brasil, os gliomas são o tipo mais comum de tumor do SNC, correspondendo a 40 – 60% do número total.

**Tabela 1 – Estimativa de novos casos de câncer do SNC nas diferentes regiões do Brasil, no biênio 2018 - 2019**

| Regiões do Brasil | Número de casos estimados de câncer no SNC para o biênio 2018 - 2019 |
|---|---|
| **Norte** | 540 |
| **Nordeste** | 2390 |
| **Centro-Oeste** | 860 |
| **Sudeste** | 4740 |
| **Sul** | 2790 |

Fonte: Autor (2019), adaptado de INCA (2017).

O GBM, glioma de grau IV, é o tumor mais maligno e comum do SNC. Essa neoplasia se caracteriza por estar associada a altas taxas de morbidade e mortalidade, principalmente em indivíduos adultos e idosos (LATHIA et al., 2015). Estima-se que, ao redor do mundo, sua incidência seja de 3,69 a cada 100.000 pessoas. Este tumor corresponde a 15% de todos os tumores intracranianos em indivíduos com idades entre 40 e 85 anos, com maior ocorrência na faixa etária que compreende dos 74 aos 85 (TAMIMI et al., 2015; GERSEY et al., 2017).

Dentre as principais características que fazem do GBM um tumor de elevada agressividade, pode-se destacar a neoangiogênese e a heterogeneidade intratumoral (AUM et al, 2014; PAW et al, 2015). Essas características associadas às altas capacidades de proliferação, migração e invasão, fazem com que o prognóstico de casos de GBM não seja favorável. Deste modo, os pacientes acometidos com este tumor e submetidos a tratamento apresentam uma taxa de sobrevivência média muito pequena, que varia de 15 meses a 5 anos, onde apenas menos de 5,5% sobrevivem durante o tempo médio máximo (SMOLL; SCHALLER; GAUTSCHI, 2013; WELLER et al., 2013; SPRATT et al., 2014; SUNDAR et al., 2014; OSTROM et al., 2017).

As características fenotípicas de um tumor estão diretamente associadas às células precursoras que lhe dão origem e a alterações genéticas que ocorrem de forma subsequente nessas células (OSUKA; VAN MEIR, 2017). Nesse contexto, no

que diz respeito à origem, o GBM pode ser classificado como primário ou secundário (FRIEDMANN – MORVINSKI, 2012) (Tabela 2). O primário, que surge sem a necessidade de uma lesão precursora, se caracteriza por ser o mais comum, agressivo e invasivo e por acometer com maior frequência a população idosa. Já o secundário, que se desenvolve a partir de um astrocitoma de baixo grau, é menos comum e tem maior incidência em indivíduos adultos com menos de 45 anos (BRENNAN et al., 2013). Apesar de histologicamente indistinguíveis, os dois tipos de GBM podem ser diferenciados por meio de suas características genéticas e moleculares. Essas características são determinantes para a heterogeneidade do tumor, diferenciação da resistência aos tratamentos e gravidade do prognóstico inerente à cada tipo (PEÑARANDA-FAJARDO; MEIJER; KRUYT, 2016).

**Tabela 2 – Características dos subtipos de GBM, classificados de acordo com sua origem**

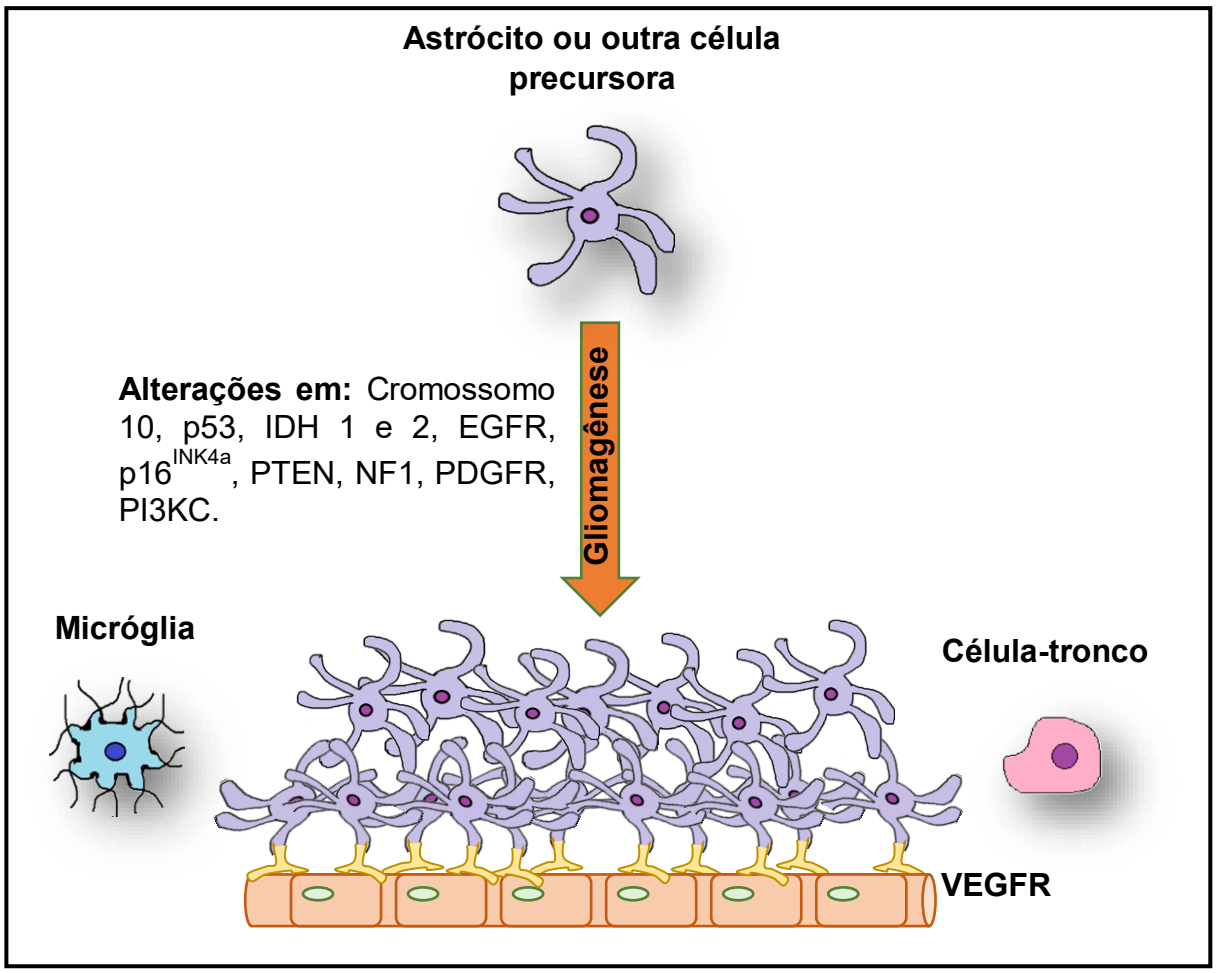
| Características | GBM primário | GBM secundário |
|---|---|---|
| **Lesão precursora** | Ausente | Astrocitoma difuso ou anaplásico |
| **Proporção** | 90 % | 10% |
| **Média de idade do diagnóstico** | 62 anos | 44 anos |
| **Média de sobrevida após o diagnóstico** | 12,5 meses | 27,5 meses |
| **Localização** | Supratentorial | Frontal |
| **Necrose** | Extensiva | Limitada |

Fonte: Autor (2019), adaptado de MANSOURI; KARAMCHANDANI; DAS (2017).

Ao se levar em consideração os aspectos moleculares e genéticos, consolidados ao longo do processo de gliomagênese (Figura 2), o GBM pode ser classificado em quatro subtipos diferentes: clássico, mesenquimal, proneural e neural (OHGAKI; KLEIHUES, 2013) (Tabela 3). O clássico é caracterizado por perda de heterozigoze no cromossomo 10; mutações na proteína de reparo do DNA, p53, e nas enzimas que atuam promovendo o reparo oxidativo, as isocitrato-desidrogenase-1 (IDH1) e 2 (IDH2); amplificação da expressão do receptor do fator de crescimento epidermal (EGFR); supressão da CDKN2A-p16$^{INK4a}$, responsável pelo controle da progressão da fase G1 para a S, no ciclo celular; e mutação no gene PTEN (homólogo da fosfatase e tensina), relacionado à resistência ao tratamento. No mesenquimal os

padrões de expressão gênica astrocitária e os marcadores microgliais se encontram elevados, e há depleção dos genes PTEN e neurofibromatose tipo 1 (NF1), regulador negativo da via Ras. Aumento da expressão de genes proneurais em oligodendrócitos, alterações em p53, IDH1, no receptor do fator de crescimento derivado de plaquetas (PDGFR) e na enzima fosfatidilinositol-3-cinase (PI3KC), estão associados ao subtipo proneural (ARJONA; REY; TAYLOR, 2006; FURNARI et al., 2007; VERHAAK et al., 2010; CRESPO et al., 2011). Por fim, no neural, há aumento da expressão gênica de marcadores astrocitários e oligodendríticos (REUSS, et al., 2015).

**Figura 2 – Ilustração das alterações genéticas e moleculares que ocorrem durante o processo de gliomagênese**




Notas: A heterogeneidade celular de GBM inclui micróglia, células endoteliais e células–tronco. As principais alterações durante a gliomagênese compreendem modificações em: cromossomo 10, p53, IDH 1 e 2, EGFR, $p16^{INK4a}$, PTEN, NF1, PDGFR, PI3KC.
Fonte: Autor (2019), adaptado de Lima et al. (2012).

**Tabela 3 – Características dos subtipos de GBM, classificados de acordo com aspectos moleculares e genéticos**

| Características | Clássico | Mesenquimal | Proneural | Neural |
|---|---|---|---|---|
| **Frequência (%)** | 25 | 26,7 | 16,9 | 14,3 |
| **Idade** | Adultos e idosos | Adultos e idosos | Jovens | Jovens |
| **Prognóstico** | Ruim | Ruim | Bom | Bom |
| **Processo ativo** | Proliferação | Angiogênese | Neurogênese | Neurogênese |
| **Marcador celular** | Célula tronco | Célula tronco | Neuroblasto | Neuroblasto |
| **PTEN** | Deletado | Deletado | Normal | Normal |
| **Cromossomo 10** | Deletado | Deletado | Normal | Normal |
| **EGFR** | Amplificado | Amplificado | Normal | Normal |
| **Vias alteradas** | p53, EGFR, IDH, CDKN2A-p16$^{INK4a}$ | NF1 | p53, PI3KC, PDGFR, IDH | p53, PI3KC, PDGFR, IDH |

Fonte: Autor (2019), adaptado de LOMBARDI; ASSEM (2017).

As alterações genéticas mais comumente associadas ao GBM primário compreendem: perda de heterozigoze no cromossomo 10, deleção de CDKN2A-p16$^{INK4a}$, aumento da expressão do receptor do fator de crescimento endotelial (EGFR) e mutação de PTEN (FUEYO et al., 2003; OHGAKI et al., 2004). Já o GBM secundário apresenta com maior frequência mutações em IDH1 e 2, e p53 (STURM, et al., 2014). Cerca de 80% dos astrocitomas difusos e anaplásicos, precursores de GBM secundário, também expressam mutações em IDH1, enquanto que em GBM primário essa expressão é de apenas 5%. Deste modo, tal mutação se mostra um importante marcador genético para diagnóstico de GBM secundário (YAN et al., 2009).

Os principais fatores de risco relacionados ao GBM são: exposição prévia à radiação, fatores imunes e genéticos (polimorfismos em polipeptídeos), perda ou diminuição da sensibilidade a alergias, choques mecânicos na região da cabeça (SCHWARTZBAUM et al., 2007; WRENSCH et al., 2009; SCHWARTZBAUM et al., 2010; ZHEN et al. 2010). Apenas 1% dos casos são associados à hereditariedade (HOUBEN et al., 2005). Doenças atópicas (asma, eczema, psoríase) e alergias representam um menor risco de incidência do tumor (LACHANCE, 2011). Além disso, é importante ressaltar que o GBM tem maior incidência em homens adultos ou idosos, de etnia branca, e de países desenvolvidos, onde ocorre menor índice de subnotificações (THAKKAR et al., 2014). Outros fatores não demonstram uma relação

direta com o surgimento do GBM, como por exemplo, consumo alimentar de compostos nitrosos, tabagismo, ingestão de bebidas alcóolicas e uso de drogas ilícitas (AGNIHOTRI et al., 2013; JIGISHA, 2014). Já características inerentes ao tumor como ressecabilidade, tamanho, localização, multifocalidade, constituem os fatores prognósticos (NIEDER, 2005).

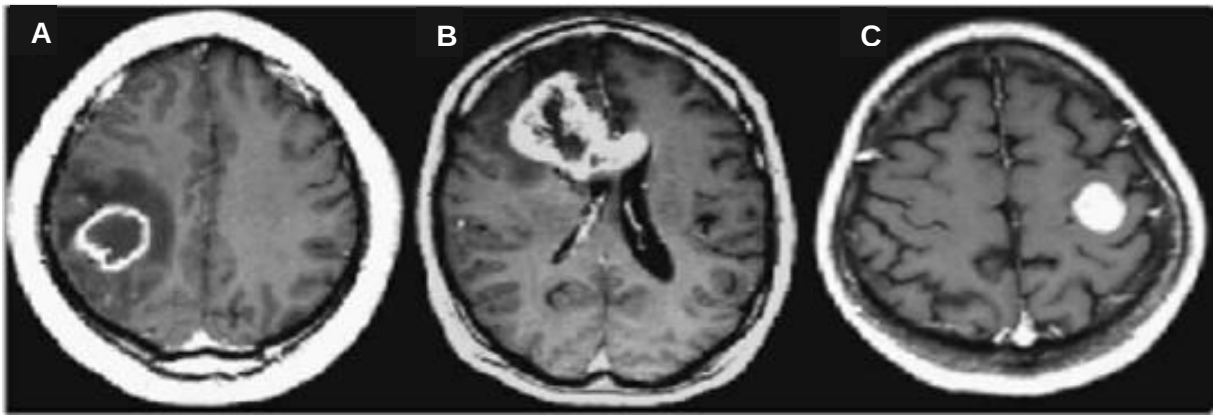
Clinicamente, os pacientes acometidos com o GBM apresentam sinais e sintomas associados às áreas cerebrais em que o tumor se faz presente (HANIF et al., 2018). Assim sendo, problemas auditivos e visuais indicam a presença do tumor no lobo temporal. Perda de cognição e alterações na personalidade estão associadas à localização de GBM no lobo frontal (SALAH-UDDIN; JARMI, 2015). Por apresentar alta capacidade de proliferação, o tumor tem seu tamanho aumentado de maneira rápida, o que acarreta na elevação da pressão intracraniana e consequente dor de cabeça. Essa dor de cabeça, de gravidade progressiva, está presente em cerca de 50% dos pacientes e costuma vir associada a episódios de convulsões, náuseas e vômitos (OMURO; DE ANGELIS, 2013).

As durações e gravidades dos sinais e sintomas relacionados ao GBM variam de acordo com o seu subtipo. Pacientes com GBM primário apresentam duração curta dos sintomas, de em média 3 meses. Já os acometidos com o secundário, expressam os sinais por um período maior. A intensidade de expressão desses males é maior no secundário do que no primário, o que contribui para uma progressão de doença mais agressiva e de pior prognóstico (NIKOLOV et al., 2018).

O diagnóstico de GBM é realizado por meio de técnicas não invasivas como, Tomografia Computadorizada (TC) e RM, ou por procedimentos invasivos, como a angiografia por cateter. A RM é o método de excelência, já que permite observar a heterogeneidade e complexidade do tumor, de forma melhor que a TC (FAKHOURY, 2016; LOHMMAN et al., 2019) (Figura 3).

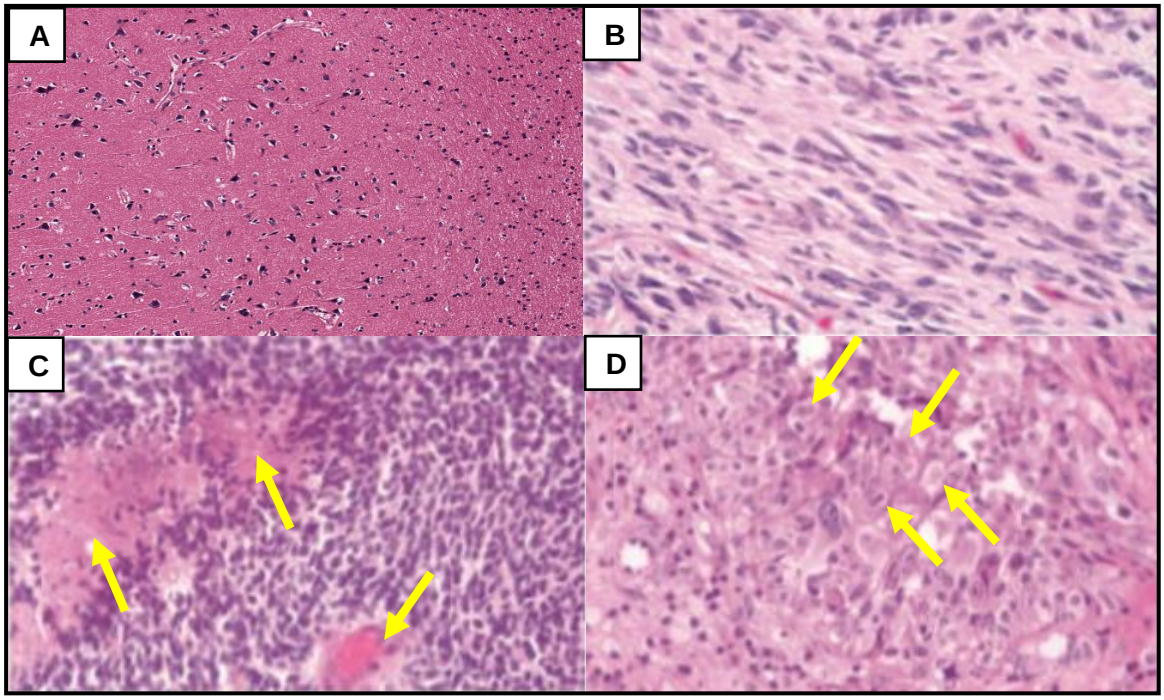
A especificidade do subtipo do GBM é determinada por meio de uma análise do perfil genético e histológico do tecido tumoral, obtido através de biopsia aspirativa ou remoção cirúrgica (MOTON et al., 2015). Os padrões genéticos associados a cada subtipo de GBM, e alvos de análise no diagnóstico diferencial, foram descritos anteriormente. Já as principais características histológicas que são observadas no diagnóstico definitivo, compreendem: aumento no número de células, necrose, pleomorfismo nuclear, presença de células em processo de mitose e proliferação endotelial vascular (NEUMAN et al., 2016; NAM; GROOT, 2017) (Figura 4).

**Figura 3 – Ressonâncias Magnéticas (RM) de GBM**




Notas: RM de três pacientes diferentes acometidos com GBM. **A** – Massa tumoral localizada no lobo parietal direito, com necrose central e edema circundante; **B** – Crescimento irregular da massa tumoral no corpo caloso; **C** – Tumor com crescimento homogêneo, sem edema, no lobo frontal esquerdo.
Fonte: HANIF et al. (2018).

**Figura 4 – Observação microscópica de algumas características histológicas associadas ao diagnóstico diferencial do GBM**




Notas: Histologia de um paciente saudável (**A**) e de três pacientes (jovens) acometidos com diferentes subtipos de GBM (**B, C, D**). **A** – Histoarquitetura normal do córtex cerebral; **B** – Celularidade aumentada e pleomorfismo nuclear; **C** – Setas mostrando presença de áreas necróticas; **D** – Setas demonstrando células com aparência epitelióide. Corados por Hematoxilina e eosina (HE).
Fonte: NEUMAN et al. (2016) e GTEX (2019).

O diagnóstico diferencial de GBM é de fundamental importância para a tomada de decisão sobre o manejo clínico do paciente, sendo, portanto, o ponto de partida para o início de uma terapia adequada que visa a melhoria de um prognóstico desfavorável (CARLSSON; BROTHERS; WAHLESTEDT, 2014).

## 2.2 Tratamentos para o Glioblastoma

As heterogeneidade molecular e diversidade genética associadas ao GBM, assim como sua alta capacidade de invasão, dificultam o desenvolvimento e a eficácia de qualquer terapia (OSUKA; MEIR, 2017). O tratamento padrão para GBM visa, portanto, aumentar o tempo de sobrevida e melhorar o prognóstico, e é baseado em um tripé de ações, composto por: remoção cirúrgica, RT e QT (RYKEN et al., 2014; WELLER et al., 2014; KIM et al, 2015).

A neurocirurgia oncológica, primeira etapa do tratamento, é realizada com a finalidade de se remover a maior parte da massa tumoral e promover melhoras no fluxo sanguíneo local e nos sintomas expansivos, como por exemplo diminuição de crises convulsivas e do déficit neurológico (RODER et al., 2014). Caso a remoção cirúrgica ocorra no início do desenvolvimento do tumor, a probabilidade de melhor prognóstico é maior, entretanto em nenhum período se faz presente a possibilidade de cura total. Pacientes que se submetem ao procedimento cirúrgico tem um tempo de sobrevida de aproximadamente 15 meses (THAKKAR et al., 2014).

A eficácia da neurocirurgia está diretamente relacionada ao tamanho e à localização do tumor. Desse modo, quanto maior e mais invasiva é a massa tumoral, mais difícil é o procedimento de remoção (ELLOR; PAGANO-YOUNG; AVGEROPOULOS, 2014; DAVIS, 2016). A remoção total bruta do tumor gera uma sobrevida 50% maior do que uma ressecção subtotal (BROWN et al., 2016; SUCHORSKA et al., 2016). Tumores que ocupam áreas como tronco cerebral ou núcleos da base não são passíveis desse processo invasivo, uma vez que é grande o risco de se lesionar áreas não malignas e gerar déficit neurológico (MRUGALA, 2013; SANAL; BERGER, 2018).

Algumas técnicas como mapeamento funcional, ressonância magnética intraoperatória e a utilização de corantes fluorescentes, são utilizadas no ato cirúrgico para assegurar as máximas precisão e extensão na remoção da massa tumoral, e

garantir a devida preservação da função neurológica (YOUNG et al., 2015; SÁNCHEZ, 2016).

Por outro lado, a alta capacidade de proliferação de GBM faz com que mesmo após realizada a cirurgia e removida a maior parte do tumor, as células tumorais remanescentes voltem a se multiplicar, recuperando rapidamente a carga tumoral de antes do procedimento cirúrgico, e provocando a recidiva da doença. Nesses casos, a repetição da cirurgia pode ajudar no controle dos sintomas e permitir a adição de uma quimioterapia intralesional que dificulte a rápida progressão tumoral (GALLEGO, 2015; WICK et al, 2018).

A RT é utilizada extensivamente no tratamento de diversos tumores, incluindo GBM, por promover alterações no DNA através da radiação e induzir a morte das células tumorais por vias apoptótica, necrótica ou autofágica (GOLDEN; APETOH, 2015). Em contrapartida, as ações indiretas desta forma de tratamento originam uma série de efeitos colaterais. Cerca de 32% dos pacientes submetidos a esta técnica apresentam fortes dores de cabeça, de 10 a 16% desenvolvem episódios de náusea e vômitos, e 5% apresentam otite externa. Assim sendo, os pacientes não devem ser expostos a doses elevadas, a fim de se minimizar os efeitos indiretos e indesejáveis, que podem durar de 4 a 6 semanas após o término do tratamento (SPENCER et al., 2018).

Os benefícios decorrentes da RT após o processo de remoção cirúrgica, resultam em um aumento do tempo de sobrevida de 14 a 36 semanas. Os efeitos benéficos máximos da RT frente ao GBM são alcançados na dose de 60 *Gray* (Gy) (LEE et al., 2017; MANN et al. 2018). Em casos de GBM recorrente uma nova RT pode ser realizada, de maneira que a dose acumulada não seja superior aos 100 Gy, uma vez que a partir destes níveis de radiação ocorre um aumento significativo na incidência de necrose tecidual (NIEDER et al., 2006).

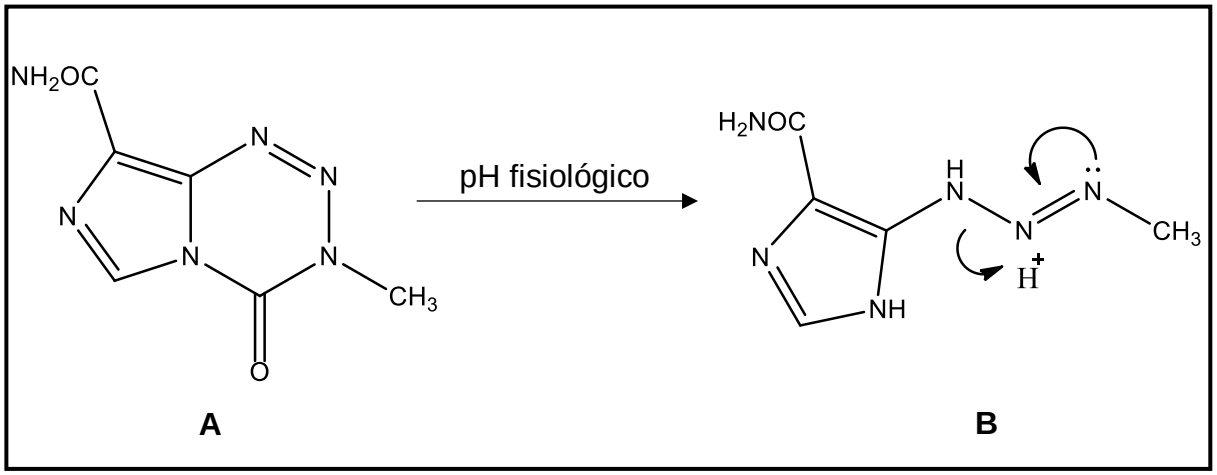
A partir de 2005, além da utilização da RT após a supressão cirúrgica da massa tumoral, passou-se a utilizar no tratamento para GBM, uma combinação entre RT e QT. Essa associação aumenta o tempo de sobrevida dos pacientes em 2,5 meses quando comparada às duas formas de tratamento de maneira isoladas (STUPP et al., 2005).

Desde a década de 1950, momento em que a quimioterapia começou a se tornar amplamente difundida, vários protótipos de fármacos vêm sendo testados no combate aos diferentes tipos de tumores. Nos anos 70, foi sintetizada a classe das

imidazotetrazinas, da qual faz parte o fármaco padrão utilizado atualmente no tratamento quimioterápico de GBM, a TMZ (THOMAS; RECHT; NAGPAL, 2013). Os usos da TMZ para os tratamentos de astrocitoma anaplásico recorrente e GBM foram aprovados em 1999 e 2005, respectivamente, pela *Food and Drug Administration* (FDA) (YUNG et al., 1999; COHEN; JOHNSON; PAZDUR, 2005).

A TMZ {3-metil-4-oxoimidazo-[5,1-d]-[1,2,3,5]-tetrazina-8-carboxamida}, um derivado da dacarbazina, é um agente alquilante do DNA que, ao atuar sobre a fase G2/M do ciclo celular, induz a morte programada de GBM (VILLANO; SEERY; BRESSLER, 2009; WESOLOWSKI; RAJDEV; MUKHERJI, 2010). Trata-se de um pró-fármaco, que a nível de pH fisiológico é rapidamente convertido no metabólito secundário 5-(3-metiltriazen-1-il)imidazol-4-carboxamida (MTIC), sendo esse o responsável pela atividade antitumoral (Figura 5) (YAN et al., 2016).

**Figura 5 – Ilustração da conversão da TMZ em MTIC**

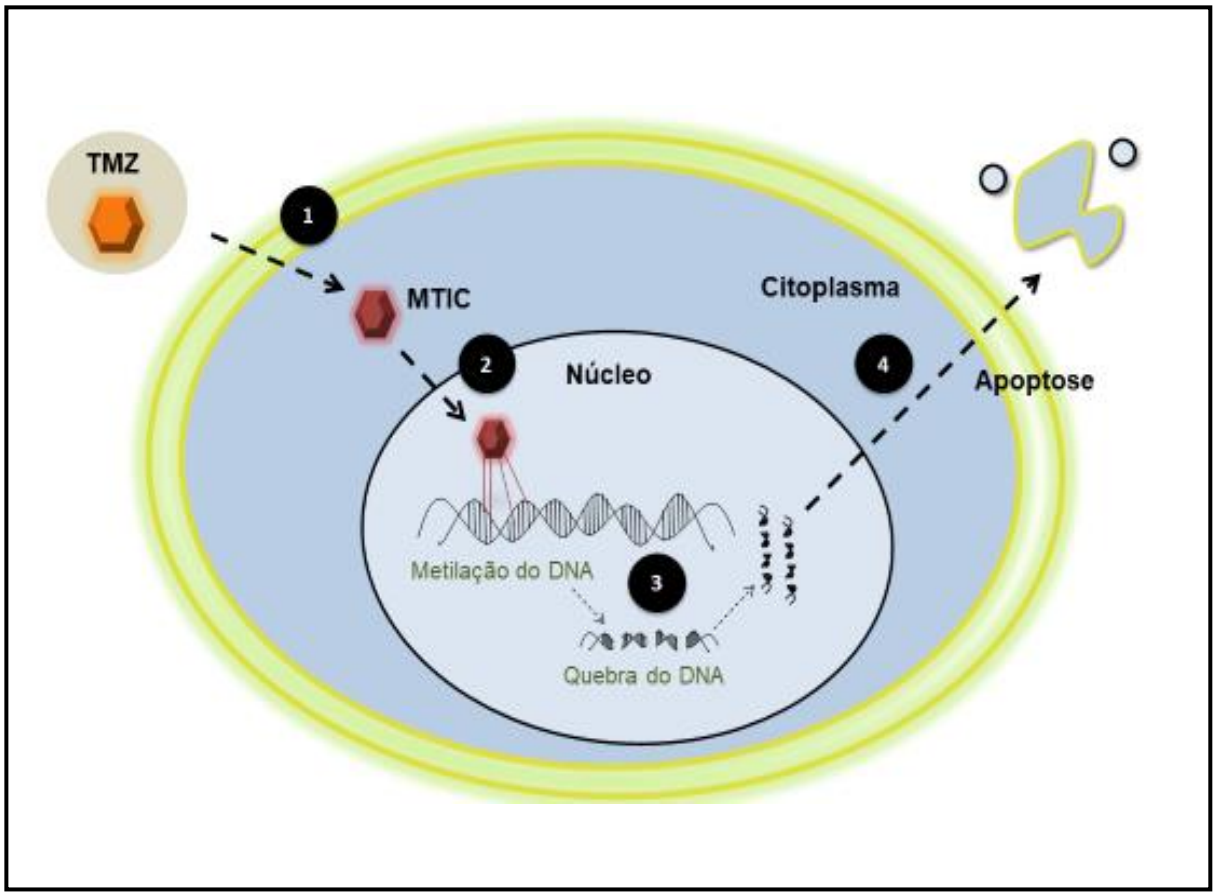



Notas: Conversão do TMZ (**A**) em MTIC (**B**).

Fonte: Autor (2019).

As principais alterações que o MTIC causa no DNA, e que resultam em morte celular, compreendem metilações nas posições N7 e O6 das guaninas, e N3 das adeninas (Figura 6). Esse estado metilado, entretanto, pode ser revertido através de reparo de incompatibilidade de DNA ou excisão de base, realizada por enzimas como O6-metilguanina metiltransferase (MGMT) (THOMAS et al., 2017). A resistência ao tratamento com o TMZ se faz presente quando os promotores de excisão da base, como MGMT, estão altamente expressos (CHRISTMANN et al., 2011; PEGG, 2011; LAI et al., 2018).

**Figura 6 – Ilustração representativa do mecanismo de ação da TMZ**




Notas: Mecanismo de ação da TMZ. **1** – A TMZ a nível de pH fisiológico é rapidamente convertida no metabólito MTIC. **2** – O MTIC, metabólito secundário responsável pela ação antitumoral da TMZ, promove a alquilação do DNA, adicionando grupamentos metil nas posições N7 e O6 das guaninas, e N3 das adeninas. **3** – As metilações do DNA resultam em quebra da molécula. **4** – Todo o processo acarreta em apoptose de GBM.
Fonte: Autor (2019), adaptado de WESOLOWSKI; RAJDEV; MUKHERJI (2010).

Por apresentar características como baixo peso molecular e elevada lipofilicidade, a TMZ consegue atravessar a barreira hematoencefálica, o que torna possível sua administração por via oral. Do ponto de vista clínico, os pacientes com diagnóstico recente de GBM recebem TMZ na dose de 75 mg/m$^2$/dia, durante 6 semanas. Nesse período de tempo também são expostos à RT (60 Gy). Em seguida são submetidos a 6 ciclos, de 5 dias seguidos, cada, onde fazem uso de 150 mg/m$^2$/dia de TMZ. O intervalo a ser respeitado entre os ciclos é de 23 dias (LEE, 2016).

A TMZ, diferentemente de outros agentes alquilantes, é um medicamento bem tolerado (CHANG et al. 2014). Seus principais efeitos adversos compreendem leve supressão da medula óssea, neutropenia, trombocitopenia, leucopenia, fadiga, alopecia e sintomas gastrointestinais (LI et al., 2012; YAO et al., 2013). Alguns estudos indicam que o uso da TMZ por longos períodos de tempo pode levar a carcinogênese e ao desenvolvimento de hepatite B (GEIGER et al., 2006; GREWAL et al., 2007; GOLDBECKER et al., 2011)

Além da TMZ, um outro fármaco amplamente utilizado no tratamento de GBM, principalmente o recorrente, é o bevacizumabe (BEV). O BEV é um anticorpo monoclonal que se liga de forma amplamente seletiva a todas as isoformas do fator de crescimento do endotélio vascular (VEGF), impedindo desta maneira a ligação do VEGF aos seus receptores VEGFR-1 e VEGFR-2 nas células endoteliais, o que dificulta o processo tumoral de angiogênese (GIL-GIL et al., 2013; LAU; MAGILL; AGHI, 2014). O uso do BEV para o tratamento de GBM reincidente foi aprovado pela FDA em 2009 (COHEN et al., 2009).

As altas capacidades proliferativa e migratória de GBM estão associadas ao constante processo de angiogênese, que consiste no desenvolvimento de novos vasos a partir de outros pré-existentes. Fatores pró-angiogênicos como o VEGF, promovem o crescimento de vasos, o que aumenta a oferta de oxigênio ($O_2$) e mantém o microambiente favorável ao rápido crescimento tumoral (YU et al., 2016). Nesse contexto, a utilização de BEV traz importantes benefícios, como redução da permeabilidade vascular, do volume sanguíneo que circunda o tumor e do edema peritumoral (NARITA, 2015).

Clinicamente, o BEV deve ser administrado intravenosamente a cada 2 ou 3 semanas em doses que podem variar de 5 a 15 mg/kg, uma vez que não se observam diferenças significativas de efeitos nesse intervalo (KALOSHI et al., 2013). A monoterapia com BEV promove um retardo de 6 meses na progressão do quadro clínico de pacientes com GBM recorrente (FRIEDMAN et al., 2009). A utilização concomitante de BEV, TMZ e RT acarreta num aumento de sobrevida livre de progressão da doença de 4,4 meses, quando comparada à associação TMZ + RT. Entretanto, não há nenhum estudo que demonstre que BEV + TMZ + RT aumente a expectativa de vida dos pacientes (CHINOT et al., 2014). Proteinúria, hemorragia, tromboembolismo e perfuração gastrointestinal estão entre os efeitos adversos mais comuns relacionados ao uso do BEV (BRANDES et al., 2015).

A barreira hematoencefálica (BHE) é um importante fator regulador da atividade de quimioterápicos utilizados para o tratamento de tumores cerebrais, como o GBM. Fatores como peso molecular, lipofilicidade e carga, limitam a passagem de certas moléculas pela BHE (HARDER et al., 2018). Portanto, é um enorme desafio desenvolver medicamentos que possam atravessar, em concentrações terapêuticas eficazes, essa barreira formada por astrócitos, pericitos e células endoteliais (OBERMEIER; DANEMAN; RANSOHOFF, 2013).

Atualmente, a nanotecnologia é um ramo da ciência amplamente estudado que visa otimizar a quantidade de fármaco que efetivamente consegue ultrapassar a BHE e promover o efeito desejado (GLASER et al., 2017). Alguns estudos demonstram que modificações bioquímicas em determinados medicamentos e desenvolvimento de nanocarreadores permitem uma melhor ação antitumoral no cérebro (LEE et al., 2013; KIM et al., 2014; MU et al., 2016; KIEVIT et al., 2017).

A imunoterapia, outra forma de tratamento para vários tipos de tumores, vem sendo alvo de diversos avanços nos últimos anos (POLIVKA et al., 2017). No âmbito do GBM, no entanto, a ampla heterogeneidade e as diferentes respostas imunes sistêmicas fazem com que a identificação de antígenos imunológicos relevantes seja um desafio ainda maior (PATEL et al. 2014). Essa diversidade molecular se faz presente tanto em pacientes diferentes como até mesmo em um único paciente, o que dificulta a escolha de um alvo específico para o tratamento em larga escala (LI et al., 2016). Vacinas que agem em proteínas tumorais normais ou proteínas com alterações específicas de determinado tumor, vêm sendo testadas em ensaios pré-clínicos e clínicos. A administração de células T manipuladas, com o objetivo de aumentar a regressão do tumor, também constitui uma forma de terapia imunológica (SAMPSOM; MAUS; JUNE, 2017; LIM et al., 2018).

As características agressivas inerentes ao GBM como, elevadas capacidades de proliferação, migração e invasão, responsáveis pelos péssimos prognósticos e alto índice de mortalidade, associadas ao fato das terapias existentes não promoverem cura total e aumento significativo da expectativa de vida dos pacientes acometidos, fazem com que seja necessária a busca por novos protótipos de fármacos que melhorem o bem-estar e prologuem efetivamente o tempo de vida de todos os pacientes.

## 2.3 Naftoquinonas

Os PNs e seus derivados são agentes importantes no desenvolvimento de novos medicamentos para tratar as diversas doenças, incluindo o câncer (SHEN, 2015). Cerca de 60% de todos os medicamentos disponíveis no mercado têm em sua composição algum PN não modificado ou derivado sintético dele (MARTINS et al., 2014). As amplas diversidades estruturais e químicas associadas aos seus metabólitos secundários, são objetos de estudo de vários grupos de pesquisa científica que visam a descoberta de novas formas de tratamento para uma ampla variedade de enfermidades agressivas e até então sem cura.

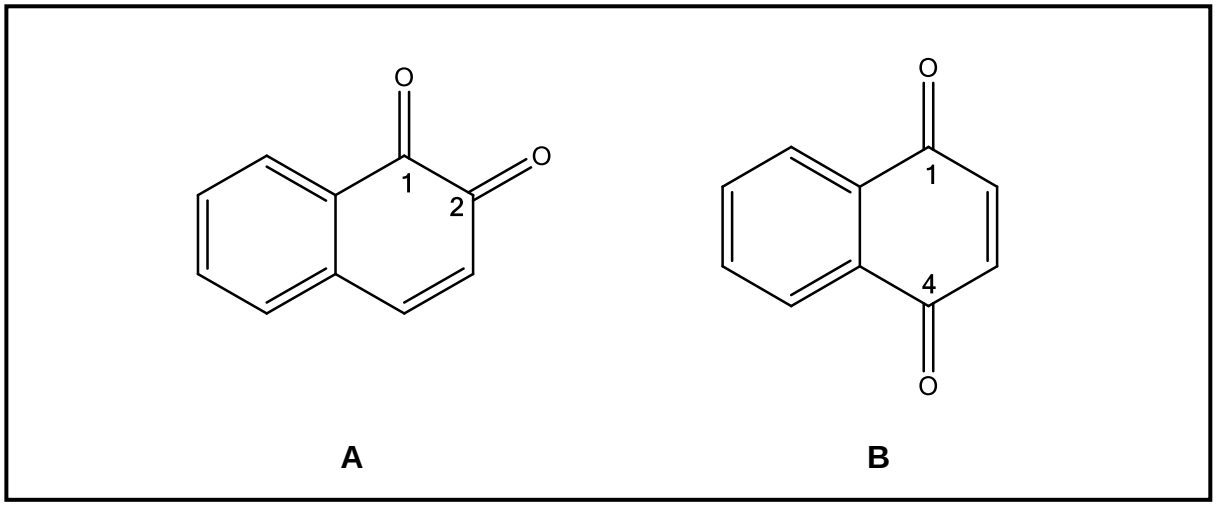
Historicamente, os PNs contribuíram de forma intensa para a expansão da atuação dos fármacos quimioterápicos. Desde a década de 1940 até o ano de 2009, 155 medicamentos foram aprovados pela FDA para tratar vários tipos de cânceres. Do número total de medicamentos anticâncer que surgiram nessas 7 décadas, 14% são PNs e 33% são derivados sintéticos de PNs (KINGHORN; CHIN; SWANSON, 2009).

Dentre os fármacos antitumorais desenvolvidos à base de PNs estão: paclitaxel, etoposídeo, camptotecina, vimblastina, vincristina, topotecano e irinotecano. Além disso, existe uma série de compostos que são isolados de diferentes plantas e algas marinhas, e que apresentam atividade anticâncer (ELRAYESS; EL-HAK, 2019). Em meio às principais classes de metabólitos secundários que desempenham essa atividade, podem ser citadas: alcaloides, antocianinas, flavonas, flavonois, chalconas, taninos e quinonas (BORTOLOTTO et al., 2017; CAI et al., 2017; JOSHI; VISHWAKARMA; BHARATE, 2017; LI et al., 2017; TANG et al., 2017; DARBAND et al., 2018; WANG et al., 2018).

As NQs fazem parte da importante classe de PNs das quinonas, e têm presenças relatadas em plantas, organismos marinhos, fungos, bactérias, vírus e insetos (FUTURO et al., 2018). As principais famílias de plantas em que as NQs estão presentes são as Avicenneaceae, Bignoniaceae, Boragienaceae, Droseraceae, Ebenaceae, Juglandaceae, Nepethaceae e Plumbagnaceae. Bactérias do gênero *Streptomyces* sp. e fungos dos Fusarium sp., *Marasmius* sp. e *Verticillium* sp., são alguns dos quais produzem NQs como metabólitos secundários (BABULA et al., 2009).

Estruturalmente, as NQs são substâncias dicetônicas derivadas do anel naftaleno e que contém dois grupos carbonílicos, que a depender da posição em que se encontram originam isoformas diferentes dessa substância. A presença dos grupos carbonílicos nas posições 1 e 2 do anel naftaleno caracteriza as *orto*-naftoquinonas (1,2-naftoquinonas), e nas posições 1 e 4, as *para*-naftoquinonas (1,4-naftoquinonas) (Figura 7) (QIU et al., 2018). Essas são as isoformas mais comuns de NQs que, por apresentarem estruturas diferentes, estão associadas a propriedades químicas e físicas distintas. A isoforma mais detalhada e estudada é a *para*-naftoquinona, por ser mais seletiva em suas reações eletrofílicas (KUMAGAI et al., 2012).

**Figura 7 – Estruturas químicas das *orto*-naftoquinonas (1,2-naftoquinonas) e *para*-naftoquinonas (1,4-naftoquinonas)**

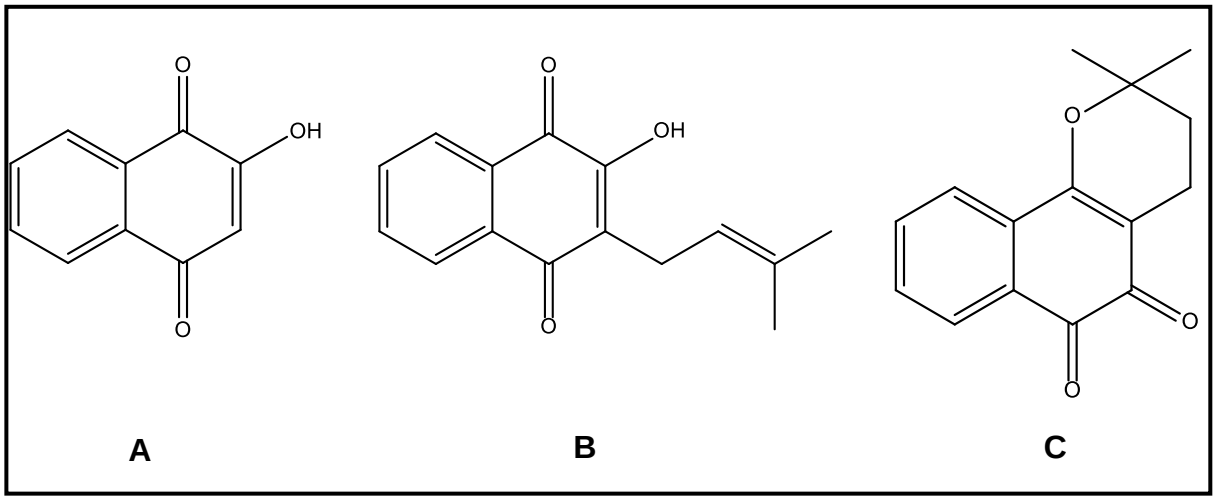



Notas: Estrutura química das (**A**) *orto*-naftoquinonas e (**B**) *para*-naftoquinonas.
Fonte: Autor (2019).

As especificidades químicas características das NQs provavelmente explicam suas relações com uma série de atividades biológicas. Nesse contexto, vários estudos recentes demonstram diversos efeitos farmacológicos para as NQs e seus derivados sintéticos, dos quais podem ser citados: antibacteriano (CACHÓN et al., 2014; VUKIC et al., 2017), antifúngico (IBIS et al., 2016; LEYVA et al., 2017; OLIVEIRA et al., 2017), leishmanicida (AWASTHI et al., 2016; ARAÚJO et al., 2017; MENDONÇA et al., 2018), anti-inflamatório (DONG et al., 2017; LOMBA et al., 2017; YANG et al., 2018), antimalária (PINGAEW et al., 2017; BRANDÃO et al., 2018), antiviral (MELLO et al., 2016; LIEBERHERR et al., 2017; NGOC et al., 2019), e anticâncer (HUANG et al, 2017; VALENÇA et al., 2017; LI et al., 2018; LIU et al., 2018).

Lausona, Lapachol e β-Lapachona são as três NQs naturais que, ao longo dos anos, mais influenciaram a expansão de estudos dessa classe de produtos naturais com a finalidade de desenvolvimento de novos insumos farmacológicos para o tratamento do câncer (Figura 8) (SILVA; FERREIRA, 2016).

**Figura 8 – Estruturas químicas das Lausona, Lapachol e β-Lapachona**




Notas: (**A**) Lausona, (**B**) Lapachol e (**C**) β-Lapachona.
Fonte: Autor (2019).

A Lausona (2-hidroxi-1,4-naftoquinona) é encontrada em plantas do gênero *Lawsonia* sp. e corresponde a uma das NQs mais simples da natureza. Trata-se de um pigmento de coloração laranja obtido principalmente das folhas das espécies *Lawsonia inermes* (SINGH; LUQMAN, 2014). A presença de um grupo hidroxila (OH) em diferentes posições de sua estrutura, faz com que existam alguns isômeros químicos, com diferentes propriedades químicas e biológicas (MURAKAMI et al., 2010). Tem sido relatado na literatura que a lausona e seus derivados apresentam atividade antitumoral frente aos cânceres de cólon, pulmão e boca. Alterações nas fases S e G2/M do ciclo celular e supressão da fosforilação de EGFR, são alguns dos mecanismos do seu efeito antitumoral (KAMEI et al., 1998; CHIEN et al., 2010).

O Lapachol {2-hidroxi-3-(3-metil-2-butenil)-1,4-nafotoquinona}, isolado pela primeira vez em 1882, é encontrado em várias plantas das famílias Verbenaceae, Proteaceae e Bignoniaceae, sendo no gênero *Tabebuia* sp., desta última, onde se faz mais presente. É facilmente obtido através de extração ácida da serragem ou aparas de madeira de várias espécies deste gênero, que são muito comuns no Brasil e na Argentina (SADANANDA et al., 2011). Sua atividade antitumoral está diretamente

relacionada à capacidade de induzir estresse oxidativo, produzindo EROs como: peróxido de hidrogênio ($H_2O_2$), ânion superóxido ($O_2^-$) e ânion hidroxila ($OH^-$). Desta maneira, promove um desequilíbrio redox irreversível nas células tumorais, o que culmina em apoptose celular (GOULART et al., 2004).

A β-Lapachona (7,8-benzo-2,2-dimetil-3,4-diidro-5,6-oxo-2H-cromeno), um importante derivado do Lapachol, possui efeito antitumoral para várias neoplasias, como: cânceres de mama, próstata, pulmão e pâncreas, entre outros. Trata-se de um composto cristalino de coloração roxa e que, assim como o Lapachol, é encontrada no gênero *Tabebuia* sp., mais precisamente na *Tabebuia avellanedae*, por toda a América do Sul (NIRMALA; SAMUNDEESWARI; SANKAR, 2011). Seu mecanismo de ação antitumoral envolve inibição das enzimas topoisomerases I e II (TOPO I e II), responsáveis pelo relaxamento do DNA superenovelado, o que resulta em indução de apoptose nas células tumorais (LI; AVERBOUKH; PARDEE, 1993; KRISHNAN; BASTOW, 2001; LEE et al., 2005).

Majiene e cols. (2019) associaram algumas NQs naturais, dentre elas, Plumbagina (5-hidroxi-2-metil-1,4-naftoquinona), Menadiona (2-metil-1,4-naftoquinona) e Lausona, à atividade antitumoral sobre células de GBM (linhagem C6). Os autores observaram que as Plumbagina e Menadiona foram mais citotóxicas para a linhagem de GBM do que a Lausona, tendo em vista que as duas primeiras apresentaram maiores atividades pró-oxidante e de inibição da fosforilação oxidativa mitocondrial, do que a última.

Recentemente, vários grupos científicos ao redor do mundo têm focado suas atenções no desenvolvimento de pesquisas que sintetizam derivados naftoquinônicos e avaliam possível atividade antitumoral frente a vários tipos de cânceres, incluindo gliomas. Beretta e cols. (2017), por exemplo, demonstraram que dois derivados sintéticos 1,4-naftoquinônicos apresentaram atividade citotóxica frente a linhagens de células de leucemia promielocítica (HL60), e cânceres de pulmão (A549), ovário (A2780) e próstata (PC3). Esse efeito, segundo os autores, foi decorrente da indução de estresse oxidativo e da inibição da atividade catalítica da TOPO I.

Kumar e cols. (2017) sintetizaram e avaliaram a atividade antitumoral de um derivado sintético análago da Lausona, a 2-Benzillausona. De acordo com o estudo, o derivado apresentou efeito frente às linhagens celulares de cânceres de mama (MCF-7), pulmão (A549), próstata (DU-145), faringe (FaDU) e reto (DLD1). A ação

antiproliferativa do novo composto foi decorrente da indução de apoptse por via das caspases e inibição da atividade da TOPO II.

Ravichandiran e cols. (2019) demonstraram um efeito antitumoral para alguns novos derivados 1,4-nafotquinonas, sintetizados e caracterizados por seu grupo de pesquisa. A avaliação da atividade antineoplásica foi realizada em linhagens celulares de canceres de pulmão (A549), mama (MCF-7) e cervical (HeLa). Observou-se que os compostos induziram apoptose, por regulação positiva da expressão gênica das caspases 3 e 7, e interromperam o ciclo celular das células tumorais na fase G1.

No âmbito da avaliação específica da atividade anti-glioma, Redaelli e cols. (2015) demonstraram que alguns derivados sintéticos da Juglona (5-hidroxi-1,4-naftoquinona), uma importante NQ natural, foram capazes de inibir o crescimento de células de glioma (GLI36) através da indução de estresse oxidativo, resultando em desbalanço redox e apoptose celular.

As NQs se fazem presentes em alguns fármacos já existentes no mercado e utilizados no tratamento quimioterápico de vários tipos de câncer. As antraciclinas (doxorrubicina, daunorrubicina e idarrubicina), utilizadas no combate aos linfomas, leucemias e cânceres de pulmão, útero, ovário e mama; e a mitoxantrona, uma antracenediona usada para os tratamentos de leucemia, linfoma e câncer de mama; são exemplos de NQs que compõem alguns medicamentos anticâncer disponíveis (WELLINGTON, 2015).

Um dos principais mecanismos de ação das NQs nos sistemas biológicos é a produção de EROs, originadas por biorredução do núcleo quinônico através da ação de enzimas específicas e do $O_2$. O substrato quinônico é biorreduzido pela coenzima NADPH, o que gera um ânion-radical semiquinona que, na presença do $O_2$, se oxida gerando $O_2^{\cdot-}$; o $O_2^{\cdot-}$ sofre ação da enzima superóxido desmutase (SOD), gerando $H_2O_2$, e paralelamente sofre reação catalisada pelo íon ferroso ($Fe^{2+}$), produzindo o $OH^{\cdot}$. Essas etapas constituem, de maneira resumida, o ciclo redox das naftoquinonas, fundamental para várias ações biológicas, incluindo a antitumoral. A intensa produção de EROs acarreta em danos irreversíveis a proteínas, lipídeos, DNA e ácido ribonucleico (RNA), e desta maneira, promove a morte celular (QIU et al, 2018).

As enzimas TOPO I e II, amplamente expressas em células tumorais, também são alvos importantes da ação biológica das NQs. Ambas atuam no processo de relaxamento do DNA, e são importantes para as etapas de transcrição, replicação e reparo do DNA de células neoplásicas. Logo, NQs que agem inibindo as ações das

TOPO I e II, desempenham significativas atividades antiproliferativas sobre às células cancerígenas (XU et al., 2016).

As capacidades das NQs de induzirem estresse oxidativo e atuarem sobre enzimas importantes no processo de proliferação tumoral, associadas ao fato de vários de seus derivados sintéticos serem relacionados a atividades antitumorais frente a diversos tipos de tumores, credenciam a realização de estudos que avaliam o efeito antitumoral de derivados sintéticos naftoquinônicos frente ao principal tipo de tumor cerebral, o GBM.

Portanto, diante da malignidade deste tumor cerebral, da baixa eficácia dos tratamentos atuais e das propriedades inerentes às NQs, sugestivas de importante atividade antitumoral, decidiu-se investigar possível efeito antitumoral *in vitro* de derivados 2-*N,N'*-dialquilamino-1,4-naftoquinonas sobre células de glioblastoma humano (GBM02), com a finalidade de se buscar novas opções terapêuticas para esta doença de péssimo prognóstico e até então sem cura.

## 3 HIPÓTESE

Os derivados 2-*N,N'*-dialquilamino-1,4-naftoquinonas apresentam efeito antitumoral *in vitro* significante sobre células de glioblastoma humano (GBM02).

# 4 OBJETIVOS

## 4.1 Objetivo geral

Avaliar o efeito antitumoral *in vitro* de derivados 2-*N,N'*-dialquilamino-1,4-naftoquinonas sobre células de glioblastoma humano (GBM02).

## 4.2 Objetivos específicos

- Investigar o efeito dos derivados sobre a viabilidade de GBM02;
- Investigar possível toxicidade dos derivados sobre células mononucleares sanguíneas;
- Analisar a seletividade dos derivados;
- Determinar o efeito dos derivados sobre a migração de GBM02;
- Avaliar a ação dos derivados sobre os aspectos morfológicos de GBM02;
- Analisar o efeito dos derivados sobre a indução de apoptose em GBM02;
- Avaliar a ação dos derivados sobre as diferentes fases do ciclo celular de GBM02;
- Analisar o efeito dos derivados sobre a indução de estresse oxidativo em GBM02.

# 5 MATERIAL

## 5.1 Células de glioblastoma GBM02

Para realização dos ensaios *in vitro* foram utilizadas células de glioblastoma GBM02, gentilmente cedidas pelo Professor Doutor Vivaldo Moura Neto, do Instituto Estadual do Cérebro Paulo Niemeyer (IECPN-RJ), Rio de Janeiro, Brasil.

Essa linhagem de tumor humano foi estabelecida em seu laboratório, no Departamento de Anatomia do Instituto de Ciências Biomédicas da Universidade Federal do Rio de Janeiro (UFRJ), a partir de amostras cirúrgicas, com o consentimento do Comitê de Ética em Pesquisa (CEP) do Hospital Universitário Clementino Fraga Filho (HUCFF-RJ), sob o protocolo CEPHUCFF No. 002/01.

As células GBM02, foram cultivadas em meio de cultura *Dulbecco's Modified Eagle*/F12 (DMEM/F12), suplementadas com 10% (v/v) de soro fetal bovino, 1% (v/v) de L-glutamina, 1% (v/v) de piruvato e 0,1% (v/v) de penicilina/estreptomicina, e mantidas em estufa a 37ºC e atmosfera contendo 5% de $CO_2$.

## 5.2 Células mononucleares sanguíneas

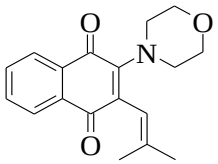
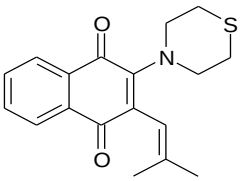
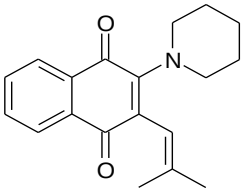
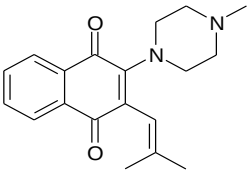
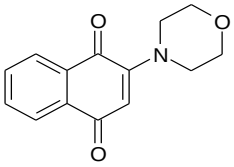
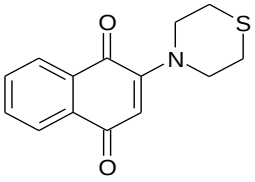
Monócitos e linfócitos, células mononucleares sanguíneas, foram isolados de amostras de sangue periférico de doadores voluntários (n=4). Essas células foram cultivadas em meio de cultura *Roswell Park Memorial Institute*-1640 (RPMI-1640) suplementado com 10% (v/v) de soro fetal bovino, 1% (v/v) de L-glutamina, 1% (v/v) de piruvato e 1% (v/v) de aminoácido, e mantidas em estufa a 37ºC contendo 5% de $CO_2$.

## 5.3 Derivados 2-*N,N'*-dialquilamino-1,4-naftoquinonas

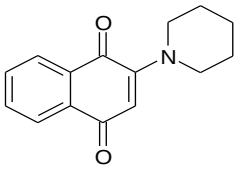
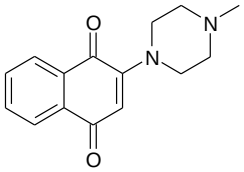
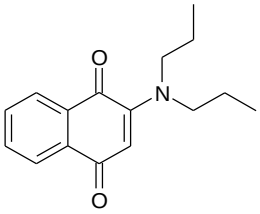
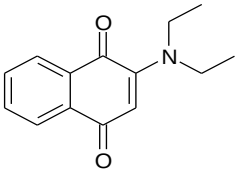
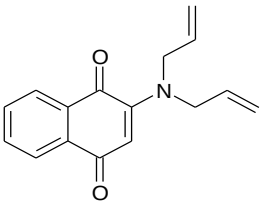
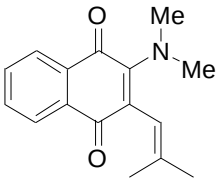
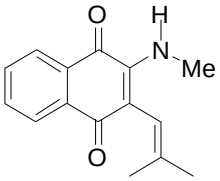
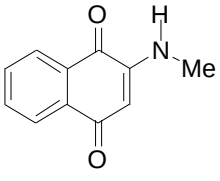
Os derivados 2-*N,N'*-dialquilamino-1,4-naftoquinonas (Tabela 4) foram sintetizados pelo professor Doutor Celso de Amorim Câmara, da Universidade Federal Rural de Pernambuco (UFRPE). Os procedimentos de síntese e caracterização química dos derivados foram descritos por David e cols. (2015), e realizados no Laboratório de Síntese de Compostos Bioativos (LSCB), sob supervisão do professor supracitado.

Para a realização dos experimentos *in vitro* todos os derivados foram diluídos em Dimetilsulfóxido (DMSO), originando soluções estoques na concentração de 100 mM. A partir dessas soluções estoques foram obtidas as utilizadas efetivamente nos ensaios experimentais por meio de diluições seriadas.

**Tabela 4 – Apresentação dos Derivados 2-*N,N'*-dialquilamino-1,4-naftoquinonas (1a – 1n)**

| Denominação | Nomenclatura da IUPAC | Estrutura química |
|---|---|---|
| **1a** | 2-(morfolina)-3-(2-metilprop-1-en-1-il)naftaleno-1,4-diona |  |
| **1b** | 2-(tiomorfolina)-3-(2-metilprop-1-en-1-il)naftaleno-1,4-diona |  |
| **1c** | 2-(piperidina)-3-(2-metilprop-1-en-1-il)naftaleno-1,4-diona |  |
| **1d** | 2-(4-metilpiperazina)-3-(2-metilprop-1-en-1-il)naftaleno-1,4-diona |  |
| **1e** | 2-morfolinanaftaleno-1,4-diona |  |
| **1f** | 2-tiomorfolinanaftaleno-1,4-diona |  |

Continua

| Denominação | Nomenclatura da IUPAC | Estrutura química |
|---|---|---|
| **1g** | 2-(piperidina)naftaleno-1,4-diona |  |
| **1h** | 2-(4-metilpiperazina)naftaleno-1,4-diona |  |
| **1i** | 2-(dipropilamina)naftaleno-1,4-diona |  |
| **1j** | 2-(dietilamina)naftaleno-1,4-diona |  |
| **1k** | 2-(dialilamina)naftaleno-1,4-diona |  |
| **1l** | 2-(dimetilamina)-3-(2-metilprop-1-en-1-il)naftaleno-1,4-diona |  |
| **1m** | 2-(metilamina)-3-(2-metilprop-1-en-1-il)naftaleno-1,4-diona |  |
| **1n** | 2-(metilamina)naftaleno-1,4-diona |  |

Fonte: Autor (2019), adaptado de ARAÚJO et al. (2017).

## 5.4 Substâncias

Soro fetal bovino (SFB) (Cultilab, Brasil), L-Glutamina (L-Glu) (Sigma-Aldrich, USA), Piruvato de sódio (Sigma-Aldrich, USA), Aminoácidos não essenciais (Sigma-Aldrich, USA), Penicilina/estreptomicina (Sigma-Aldrich, USA), Meio de cultura *Dulbecco's Modified Eagle*/F12 (DMEM/F12) (Gibco®, USA), Meio de cultura *Roswell Park Memorial Institute*-1640 (RPMI-1640) (Sigma-Aldrich, USA), Tampão fosfato salina (PBS) (Sigma-Aldrich, USA), Dimetilsufóxido (DMSO) (Sigma-Aldrich, USA; Dinâmica Contemporânea Química LTDA, Brasil), Tripsina (Sigma-Aldrich, USA), Temozolamida (TMZ) (Sigma-Aldrich, USA), Metil-Tiazolil-Tetrazólio (MTT) (Sigma-Aldrich, USA), Histopaque® 1077 (Sigma-Aldrich, USA), Metanol (Sigma-Aldrich, USA), Teste de coloração panótico rápido® (Laborclin, Brasil), Entelan® (EMD Milliopore Corporation), etanol 70% (Ciclo Farma, Brasil). Todos os kits de reagentes utilizados para a citometria foram oriundos da EMD Millipore Corporation, USA.

## 5.5 Aparelhagem

As células GBM02 e mononucleares sanguíneas foram mantidas em condições ideais de temperatura e umidade em estufa de $CO_2$ (Sheldon Mfg. Inc., USA). A visualização diária do estado das células foi realizada em microscópio óptico invertido modelo TCM400 (Labomed Inc., USA).

Para a realização de todos os experimentos, as células foram centrifugadas em uma centrífuga refrigerada modelo CT-6000R (Cientec, Brasil) e quantificadas no microscópio óptico eclipse E200 (Nikon, USA). O manejo de todas as células, de todos os derivados 2-*N,N'*-dialquilamino-1,4-naftoquinonas e reagentes que necessitaram de esterilidade foi realizado em uma cabine de segurança biológica de fluxo laminar classe II (ESCO Micro Pte. Ltd., Singapura).

O MTT utilizado nos ensaios de viabilidade celular e o PBS, solução diluente das amostras de sangue periférico, foram pesados em uma balança analítica modelo AUY220 (Shimadzu, USA). A avaliação da conversão do MTT em cristais de formazan, indicando a presença de células viáveis nas placas tratadas, foi realizada baseando-se na absorbância obtida após a leitura das placas em uma leitora de microplacas modelo TP-Reader (Thermoplate, USA).

As microfotografias do ensaio de migração celular foram obtidas no microscópio invertido TS100-F (Nikon, USA), no Laboratório de Biologia Celular (LBC) da Universidade Federal de Alagoas (UFAL). A análise morfológica de GBM02 foi realizada no microscópio óptico eclipse E200, já citado anteriormente.

A investigação do mecanismo de morte celular foi realizada no minicitômetro de fluxo Muse® cell analyzer (EMD Millipore Corporation, USA).

# 6 MÉTODOS

## 6.1 Avaliação dos efeitos antitumoral e citotóxico dos derivados 2-*N,N'*-dialquilamino-1,4-naftoquinonas

### 6.1.1 Avaliação do efeito antitumoral dos derivados 2-*N,N'*-dialquilamino-1,4-naftoquinonas sobre GBM02

As células GBM02 foram plaqueadas em placas de 96 poços, na concentração de $6x10^3$ células a cada 100 µL de DMEM/F12. Após aderidas, as células foram tratadas com os derivados 2-*N,N'*-dialquilamino-1,4-naftoquinonas, nas concentrações de 0,01, 0,1, 1, 10, 30 e 100 µM, e com a TMZ em 0,01, 0,1, 1, 10, 30, 100, 300, 600 e 900 µM, e incubadas em estufa à 37ºC, em atmosfera umedecida contendo 5% de $CO_2$, durante o tempo de 48 horas.

Após o período de incubação o sobrenadante foi retirado e adicionado a cada poço 50 µL de uma solução de MTT (0,5 mg/mL) em meio DMEM/F12. Baseado no princípio do método, colorimétrico, o MTT foi metabolizado por enzimas mitocondriais de células viáveis originando cristais roxos de formazan (MOSMANN, 1983).

Passadas 2 horas da adição do MTT à placa, os sobrenadantes foram retirados e em seguida adicionados 50 µL de DMSO em cada poço, com a finalidade de lisar as células viáveis e detecção de cristais de formazan nessas células. Após 30 minutos foi realizada a leitura da placa através de um leitor de microplacas na absorbância de 530 nm.

A concentração de cada derivado responsável por inibir 50% da viabilidade de GBM02 ($CI_{50}$), em 48 horas, foi calculada baseada em uma comparação com o controle DMSO 0,1% (controle do veículo na maior concentração, cujas células foram consideradas 100% viáveis).

### 6.1.2 Avaliação do efeito citotóxico dos derivados 2-*N,N'*-dialquilamino-1,4-naftoquinonas sobre monócitos e linfócitos

Inicialmente, as amostras de sangue periférico, coletadas de doadores voluntários (n=4), foram diluídas em iguais volumes de PBS 0,1 M. Essa solução foi cuidadosamente adicionada a um tubo falcon contendo histopaque®, na proporção de

2:1 e, posteriormente centrifugada a 2.837 rpm, durante 30 minutos a 26°C. Após a centrifugação, a solução foi separada, em virtude da densidade do histopaque®, em três diferentes camadas visíveis: uma superior (soro), a intermediária (células mononucleares sanguíneas e histopaque®) e uma inferior (hemácias). Em seguida a região intermediária foi cuidadosamente removida e submetida a duas centrifugações de 10 minutos cada, a 2.136 e 1.638 rpm a 26ºC, respectivamente, com a finalidade de se eliminar qualquer vestígio de histopaque® e se obter somente monócitos e linfócitos (ULMER et al., 1984).

Uma vez isolados, monócitos e linfócitos foram cultivados em placas de 96 poços na concentração de $4x10^5$ células a cada 50 µL de RPMI-1640. Por serem células não aderentes, e não necessitarem de um tempo para se fixarem ao poço, logo em seguida receberam os tratamentos com os derivados 2-*N,N'*-dialquilamino-1,4-naftoquinonas, nas concentrações de 0,01, 0,1, 1, 10, 30 e 100 µM, e com a TMZ em 0,01, 0,1, 1, 10, 30, 100, 300, 600 e 900 µM, e na sequência foram incubadas em estufa à 37ºC, em atmosfera umedecida contendo 5% de $CO_2$, durante o tempo de 48 horas.

Após esse período, foram adicionados 20 µL de MTT (5 mg/mL) em cada poço das placas, que foram novamente incubadas durante 4 horas em estufa, nas mesmas condições citadas anteriormente. Na sequência, foram adicionados 200 µL de DMSO/poço para solubilizar os cristais de formazan. Após 20 minutos foi realizada a medição das absorbâncias utilizando um leitor de microplacas a 550 nm.

A comparação dos resultados dos grupos tratados com os derivados e o tratado com o controle DMSO 0,1% (células foram consideradas 100% viáveis) permitiu a obtenção das concentrações dos derivados que apresentaram 50% de citotoxicidade em monócitos e linfócitos ($CC_{50}$).

## 6.2 Avaliação da seletividade dos derivados 2-*N,N'*-dialquilamino-1,4-naftoquinonas

Com a finalidade de avaliar se os derivados 2-*N,N'*-dialquilamino-1,4-naftoquinonas apresentaram ação mais seletiva para GBM02 do que para células mononucleares sanguíneas, fez-se necessário o cálculo do índice de seletividade de cada derivado, segundo a fórmula:

$$\text{Índice de seletividade (IS)} = \frac{\text{Concentração Citotóxica 50\% } (CC_{50})}{\text{Concentração Inibitória 50\% } (CI_{50})}$$

É importante destacar que quanto maior o valor numérico do IS, mais seletivo para GBM02 é o derivado.

### 6.3 Avaliação do efeito antimigratório dos derivados 2-*N,N'*-dialquilamino-1,4-naftoquinonas sobre GBM02

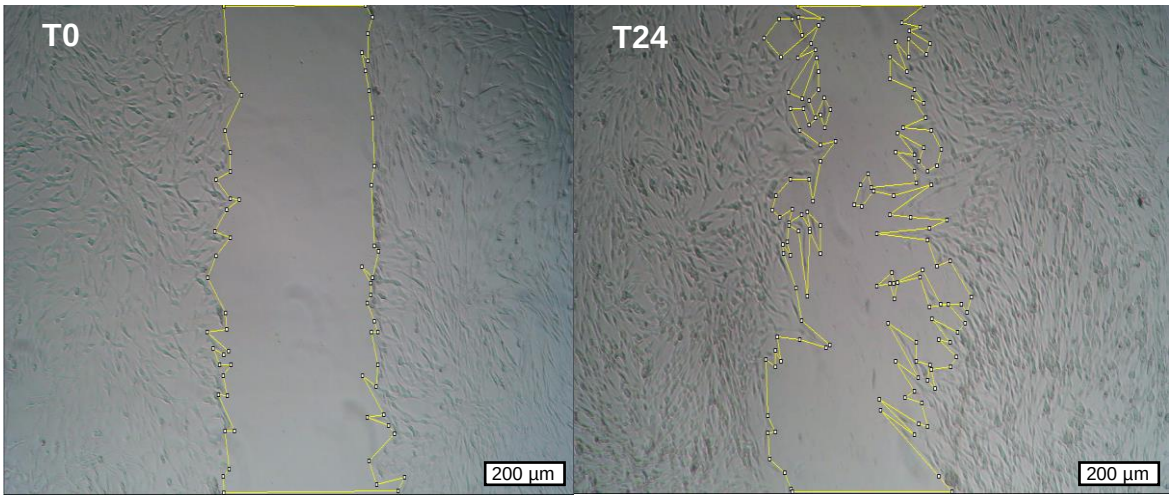
Para a avaliação do efeito antimigratório dos derivados 2-*N,N'*-dialquilamino-1,4-naftoquinonas sobre GBM02 foi realizado o ensaio de *Scratch* (LYANG; PARK; GUAN, 2007). Inicialmente, as células GBM02 foram plaqueadas em placas de 24 poços, na concentração de $10^5$ células em 400 µL de DMEM/F12. Após encontrarem-se aderidas e apresentando uma confluência de cerca de 90 a 95%, foi realizado um risco vertical, com uma ponteira de 200 µL, no centro de cada poço, a fim de estabelecer uma região sem células. Na sequência, o sobrenadante foi retirado para eliminar células em suspensão e em seguida reconstituiu-se o meio de cultura nos poços com 400 µL de DMEM/F12. Nesse momento, denominado de T0, foram realizadas microfotografias dos poços individualmente, em um microscópio óptico invertido, no aumento de 4x, marcando o local do poço fotografado.

Em seguida, as células foram os tratadas com os derivados 1e, 1f, 1g, 1k e 1n (30 µM), ou com a TMZ (100 µM). É válido destacar que, de maneira peculiar, nas soluções do controle DMSO 0,1%, dos derivados e da TMZ, foi utilizado meio DMEM/F12 suplementado com 1% (v/v) de L-glu, 1% (v/v) de piruvato e 0,1% (v/v) de penicilina/estreptomicina, sem suplementação com SFB, para evitar ou minimizar a proliferação celular, o que geraria um viés para a investigação de um possível efeito antimigratório.

Após a realização dos tratamentos, as placas foram armazenadas em estufa de $CO_2$, nas mesmas condições já citadas, por 24 horas, uma vez que a ausência do SFB no meio de cultura acarreta em morte celular após esse tempo. Transcorrido esse período foi realizada a segunda captura de imagens, nas mesma áreas fotografadas em T0, utilizando o mesmo microscópio e aumento da leitura anterior, para se verificar qualitativamente a resposta dos tratamentos sobre a migração de células para a região anteriormente vazia.

Na análise quantitativa, a área vazia dos poços em T0 e T24 foi determinada com o auxílio do programa *ImageJ*® e a porcentagem de inibição da migração celular nos diferentes grupos de tratamentos foi obtida de maneira indireta, levando-se em consideração as áreas vazias de T0 e T24, como está mostrado na Figura 9.

**Figura 9 – Modelo de análise quantitativa do efeito antimigratório dos derivados 2-*N,N'*-dialquilamino-1,4-naftoquinonas sobre GBM02**




$$\% \text{ de migração de GBM02} = 100 - \frac{\text{Área vazia em T24} \times 100}{\text{Área vazia em T0}}$$

Fonte: Autor (2019).

## 6.4 Avaliação do efeito dos derivados 2-*N,N'*-dialquilamino-1,4-naftoquinonas, 1e e 1n, sobre a morfologia de GBM02

As células GBM02 foram plaqueadas na concentração de $6x10^3$ células a cada 500 µL de DMEM/F12, em placas de 24 poços contendo lamínulas de 13 mm. Uma vez aderidas às lamínulas, realizou-se os tratamentos com os derivados 2-*N,N'*-dialquilamino-1,4-naftoquinonas 1e, nas concentrações de 7,5 e 15 µM, e 1n nas de 20 e 40 µM, além da TMZ na concentração de 300 µM e DMSO 0,1%. Em seguida, as placas foram incubadas em estufa de $CO_2$, em condições já conhecidas, por 48 horas, mesmo período de tempo dos ensaios de triagem inicial.

Após esse período, o sobrenadante foi retirado e as células foram lavadas 3 vezes com PBS 0,1 M e fixadas com metanol durante 2 minutos. Na sequência as células fixadas foram coradas com panótico rápido® (triarilmetano a 0,1%, xantenos a 0,1% e solução de tiazinas 0,1%). Ao final da coloração as lamínulas foram lavadas com água destilada, secas durante um *overnight*, e coladas nas lâminas com entelan®. As microfotografias representativas do aspecto morfológico de GBM02 após os diferentes tratamentos foram obtidas através de microscópio óptico, nas objetivas de 10x e 40x.

### 6.5 Avaliação do efeito dos derivados 2-*N,N'*-dialquilamino-1,4-naftoquinonas, 1e e 1n, na indução de apoptose em GBM02

A determinação do número de células apoptóticas foi realizada de acordo com as instruções do minicitômetro de fluxo Muse® Anexin & Dead Cell Kit. Este kit utiliza o reagente Anexina V-PE para detectar a exteriorização de fosfatidilserina na membrana plasmática das células. O marcador de morte celular 7-AAD também foi utilizado como um indicador de integridade estrutural da membrana plasmática, não marcando células vivas e células em apoptose inicial.

As células GBM02 foram plaqueadas, em placas de 12 poços, na concentração de $5x10^4$ células a cada 1mL de DMEM/F12. Depois de aderidas, as células foram tratadas com os derivados 2-*N,N'*-dialquilamino-1,4-naftoquinonas 1e, nas concentrações de 7,5 e 15 µM, e 1n nas de 20 e 40 µM, com a TMZ na concentração de 300 µM ou DMSO 0,1%. Em seguida foram incubadas em estufa de $CO_2$, durante 48 horas.

Após este período, as células foram desaderidas, transferidas para *eppendorffs*, centrifugadas a 1500 rpm e 4ºC, e suspensas em 1mL de PBS 0,1 M suplementado com 1% de soro fetal bovino. Na sequência, as células foram novamente centrifugadas, nas mesmas condições anteriores. Posteriormente, incubou-se 100 µL de cada suspensão celular com 100 µL do reagente anexina V-PE e 7-AAD, durante 20 minutos, em temperatura ambiente e ao abrigo da luz.

Após o tempo de incubação foi realizada a análise do efeito dos tratamentos sobre apoptose celular de GBM02 no Muse®. Dados quantitativos foram gerados para quatro diferentes populações de células: células vivas, em apoptose inicial, em

apoptose tardia e mortas. Esses dados foram obtidos através do *software* Muse® 1400 Analysis.

### 6.6 Determinação do efeito dos derivados 2-*N,N'*-dialquilamino-1,4-naftoquinonas, 1e e 1n, sobre as diferentes fases do ciclo celular de GBM02

O ensaio de ciclo celular foi realizado de acordo com instruções do Muse® Cell Cycle Kit. Esse método permite a mensuração do número de células que se encontram nas diferentes fases do ciclo celular: G0/G1, que compreende o preparo para a replicação dos cromossomos; fase S, caracterizada pela síntese e replicação do DNA; e G2/M, que representa a preparação para a mitose e a mitose propriamente dita.

As células GBM02 foram plaqueadas, $10^5$ células a cada 1 mL de DMEM/F12, em placas de 12 poços. Transcorrido o período para que aderissem, as células foram tratadas com os derivados 2-*N,N'*-dialquilamino-1,4-naftoquinonas 1e, nas concentrações de 7,5 e 15 µM, e 1n nas de 20 e 40 µM, com a TMZ na concentração de 300 µM ou DMSO 0,1%. As placas foram incubadas em estufa de $CO_2$, durante 48 horas.

Após 48 horas, as células foram desaderidas, transferidas para *eppendorfs* e submetidas a duas centrifugações de 5 minutos a 1500 rpm e 4ºC. Posteriormente, foram fixadas com etanol 70% e os tubos, congelados a -20ºC por 3 horas. Após este período, 200 µL de células fixadas com etanol 70% foram novamente centrifugados nas mesmas condições. O sobrenadante foi descartado e o concentrado de células foi suspenso em 250 µL de PBS 0,1 M suplementado com 1% de soro fetal bovino, para ser submetido à nova centrifugação, desta vez a 26ºC. Por fim, o *pellet* foi resuspenso em 200 µL do reagente Muse® *Cell Cycle*, e incubado durante 30 minutos em temperatura ambiente e ao abrigo da luz.

A avaliação do efeito dos diferentes tratamentos sobre as fases do ciclo celular de GBM02 foi realizada no Muse®. Os dados obtidos foram analisados no *software* Muse® 1400 Analysis.

## 6.7 Determinação do efeito dos derivados 2-*N,N'*-dialquilamino-1,4-naftoquinonas, 1e e 1n, sobre o estresse oxidativo em células de GBM02

A determinação do estresse oxidativo em células GBM02 foi realizada de acordo com as instruções do Muse® Oxidative Stress Kit, que permite mensurar a produção de superóxido na cultura celular.

Inicialmente, as células GBM02 foram plaqueadas na concentração de $6x10^5$ células a cada 1 mL de DMEM/F12, em placas de 12 poços. Após 24 horas, período em que aderiram, foram tratadas com os derivados 2-*N,N'*-dialquilamino-1,4-naftoquinonas 1e, nas concentrações de 7,5 e 15 µM, e 1n nas de 20 e 40 µM, com a TMZ na concentração de 300 µM ou DMSO 0,1%. As placas foram incubadas em estufa de $CO_2$, durante 48 horas.

Posteriormente, as células foram desaderidas mecanicamente em gelo, alocadas em *eppendorfs* e submetidas a duas centrifugações, de 5 minutos cada, a 1500 rpm e 4ºC. Na sequência, foram resuspensas em tampão de ensaio, e a uma alíquota de 10 µL de célula tratada foi adicionado 190 µL do reagente de estresse oxidativo. A incubação teve duração de 30 minutos e foi realizada a 37ºC e ao abrigo da luz.

A capacidade dos tratamentos de alterar o estresse oxidativo de GBM02 foi analisada no Muse® com o *software* Muse® 1400 Analysis.

## 6.8 Análise estatística

Todos os resultados foram expressos como a percentagem da média ± o erro padrão da média (e.p.m.), e as diferenças foram analisadas estatisticamente empregando-se a análise de variância ANOVA *one-way* seguido do pós-teste de Dunnett, e teste t (entre os derivados 1e e 1n), onde os valores de $p < 0,05$ foram considerados significantes. Os experimentos de viabilidade celular, migração e morfologia foram realizados em triplicata, os de mecanismo de morte, em duplicata, e todos de forma independente. Os dados quantitativos foram analisados com auxílio do programa GraphPad Prism® versão 5.0 (GraphPad *Software* Inc., San Diego CA, EUA). As imagens de microscopia óptica do ensaio de morfologia, obtidas de dez campos microscópicos aleatórios, e do protocolo do *scratch*, foram analisadas utilizando o *software* Fiji *ImageJ*®, versão 2.0.0/2015.

# 7 RESULTADOS

## 7.1 Efeitos antitumoral e citotóxico dos derivados 2-*N,N'*-dialquilamino-1,4-naftoquinonas

### 7.1.1 Efeito antitumoral dos derivados 2-*N,N'*-dialquilamino-1,4-naftoquinonas sobre GBM02

Ao se avaliar o efeito dos derivados (1a – 1n) sobre a viabilidade celular de GBM02, pode-se observar que, após 48 horas de tratamento, somente os derivados 1a, 1b e 1c não apresentaram atividade inibitória de GBM02, quando comparados ao grupo controle DMSO 0,1%. Dentre os derivados que inibiram de forma significativa a população celular tumoral, os que se mostraram mais eficazes foram os 1d (69,2 ± 2,7%), 1e (72,2 ± 1,2%), 1f (72,5 ± 1,5%), 1g (70,5 ± 0,2%), 1h (67,6 ± 0,6%), 1k (71,6 ± 0,1%) e 1n (64,1 ± 1,4%), com destaque para os que apresentaram maior potência: 1e (14,9 ± 4,6 µM), 1n (42,3 ± 4,9 µM) e 1k (46,9 ± 12,0 µM). O efeito máximo de cada tratamento foi encontrado na concentração de 100 µM. A TMZ não apresentou efeito antitumoral, após o mesmo tempo de tratamento, até a concentração máxima testada, 900 µM (Tabela 5).

**Tabela 5 – Efeito dos derivados 2-*N,N'*-dialquilamino-1,4-naftoquinonas e da TMZ sobre a viabilidade celular de GBM02**

| Tratamento | $CI_{50}$ (µM ± E.P.M.)[a] | $E_{máx}$ (% ± E.P.M.)[b] |
|---|---|---|
| **TMZ** | > 900 | ND |
| **1a** | > 100 | ND |
| **1b** | > 100 | ND |
| **1c** | > 100 | ND |
| **1d** | 81,7 ± 3,3 | 69,2 ± 2,7*** |
| **1e** | 14,9 ± 4,6 | 72,2 ± 1,2*** |
| **1f** | 71,5 ± 0,8 | 72,5 ± 1,5*** |
| **1g** | 72,5 ± 3,3 | 70,5 ± 0,2*** |
| **1h** | 73,5 ± 4,8 | 67,6 ± 0,6*** |

Continua

| Tratamento | $CI_{50}$ (µM ± E.P.M.)[a] | $E_{máx}$ (% ± E.P.M.)[b] |
|---|---|---|
| **1i** | 97,6 ± 2,4 | 50,6 ± 1,7*** |
| **1j** | > 100 | 34,2 ± 5,1*** |
| **1k** | 46,9 ± 12,0 | 71,6 ± 0,1*** |
| **1l** | > 100 | 49,4 ± 2,1*** |
| **1m** | > 100 | 43,4 ± 3,1*** |
| **1n** | 42,3 ± 4,9 | 64,1 ± 1,4*** |

Notas: [a]Concentração inibitória de 50% de GBM02, calculada por meio de curvas concentração-resposta. [b]Média ± erro padrão da média do efeito máximo sobre a viabilidade de GBM02, em triplicatas de um experimento representativo. Os valores do efeito máximo foram significativos quando ***p < 0,001 em relação ao grupo DMSO 0,1%. ND: efeito máximo não determinado até a concentração máxima testada, quando comparado ao grupo DMSO.
Fonte: Autor (2019).

### 7.1.2 Efeito citotóxico dos derivados 2-*N,N'*-dialquilamino-1,4-naftoquinonas sobre monócitos e linfócitos

Em células mononucleares sanguíneas, somente os derivados 1a, 1l e 1n não apresentaram citotoxicidade após 48 horas de tratamento. Alguns derivados que inibiram de forma significativa e eficaz as células tumorais, também foram citotóxicos para monócitos e linfócitos, como os 1d (61,5 ± 1,9%), 1h (79,8 ± 0,8%) e 1k (48,8 ± 5,9%). Os derivados 1e (18,3 ± 11,1%), 1f (31,6 ± 9,8%) e 1g (18,9 ± 2,2%) apresentaram baixa citotoxicidade quando comparados ao grupo DMSO 0,1%. A TMZ e um dos derivados que apresentou maiores eficácia e potência ao inibir a viabilidade de GBM02, o 1n, não foram citotóxicos para monócitos e linfócitos (Tabela 6).

**Tabela 6 – Efeito dos derivados 2-*N,N'*-dialquilamino-1,4-naftoquinonas e da TMZ sobre a viabilidade celular de monócitos e linfócitos**

| Tratamento | $CC_{50}$ (µM ± e.p.m.)[a] | $E_{máx}$ (% ± e.p.m.)[b] |
|---|---|---|
| **TMZ** | > 900 | ND |
| **1a** | > 100 | ND |
| **1b** | > 100 | 48,0 ± 1,0*** |
| **1c** | > 100 | 34,2 ± 9,7*** |

Continua

| Tratamento | $CC_{50}$ (µM ± e.p.m.)[a] | $E_{máx}$ (% ± e.p.m.)[b] |
|---|---|---|
| **1d** | 8,8 ± 0,1 | 61,5 ± 1,9*** |
| **1e** | > 100 | 18,3 ± 11,1* |
| **1f** | > 100 | 31,6 ± 9,8** |
| **1g** | > 100 | 18,9 ± 2,2* |
| **1h** | 19,2 ± 1,4 | 79,8 ± 0,8*** |
| **1i** | 10,1 ± 0,1 | 50,0 ± 7,5*** |
| **1j** | 38,7 ± 13,3 | 66,3 ± 0,5*** |
| **1k** | > 100 | 48,8 ± 5,9** |
| **1l** | > 100 | ND |
| **1m** | 87,0 ± 4,6 | 52,8 ± 10,0*** |
| **1n** | > 100 | ND |

Notas: [a]Concentração citotóxica de 50% de monócitos e linfócitos, calculada por meio de de curvas concentração-resposta. [b]Média ± erro padrão da média do efeito máximo sobre a viabilidade de GBM02, em triplicatas de um experimento representativo. Os valores do efeito máximo foram significativos quando *p < 0,05, **p < 0,01 e ***p < 0,001 em relação ao grupo controle DMSO 0,1%. ND: efeito máximo não determinado até a concentração máxima testada, quando comparado ao grupo DMSO.
Fonte: Autor (2019).

### 7.2 Seletividade dos derivados 2-*N,N'*-dialquilamino-1,4-naftoquinonas

As análises dos efeitos antitumoral e citotóxico, com a demonstração dos parâmetros farmacológicos $CI_{50}$, $CC_{50}$ e $E_{máx}$, permitiram determinar o índice de seletividade dos derivados 2-*N,N'*-dialquilamino-1,4-naftoquinonas. A TMZ e os derivados 1a, 1b, 1c e 1l não tiveram seus índices de seletividade determinados, por não inibirem 50% de GBM02 e monócitos e linfócitos, impossibilitando a realização dos cálculos de IS. Os derivados 1e (> 6,7), 1f (> 1,4), 1g (> 1,4), 1k (> 2,1) e 1n (> 2,4) apresentaram-se mais seletivos para GBM02 do que para as células mononucleares sanguíneas, com destaque para os derivados 1e e 1n, com valores acima de 6,7 e 2,4 vezes, respectivamente, mais seletivos para as células tumorais (Tabela 7).

**Tabela 7 – Índice de seletividade dos derivados 2-*N,N'*-dialquilamino-1,4-naftoquinonas e da TMZ**

| Tratamento | Cálculo do índice de seletividade ($CC_{50}/CI_{50}$) | Índice de seletividade (IS) |
|---|---|---|
| **TMZ** | > 900 / > 900 | ND |
| **1a** | > 100 / > 100 | ND |
| **1b** | > 100 / > 100 | ND |
| **1c** | > 100 / > 100 | ND |
| **1d** | 8,8 / 81,7 | 0,1 |
| **1e** | > 100 / 14,9 | > 6,7 |
| **1f** | > 100 / 71,5 | > 1,4 |
| **1g** | > 100 / 72,5 | > 1,4 |
| **1h** | 19,2 / 73,5 | 0,3 |
| **1i** | 10,1 / 97,6 | 0,1 |
| **1j** | 38,7 / > 100 | < 0,4 |
| **1k** | > 100 / 46,9 | > 2,1 |
| **1l** | > 100 / > 100 | ND |
| **1m** | 87,0 / > 100 | < 0,9 |
| **1n** | > 100 / 42,3 | > 2,4 |

Notas: ND: índice de seletividade não determinado até a concentração máxima testada.
Fonte: Autor (2019).

## 7.3 Efeito antimigratório dos derivados 2-*N,N'*-dialquilamino-1,4-naftoquinonas sobre GBM02

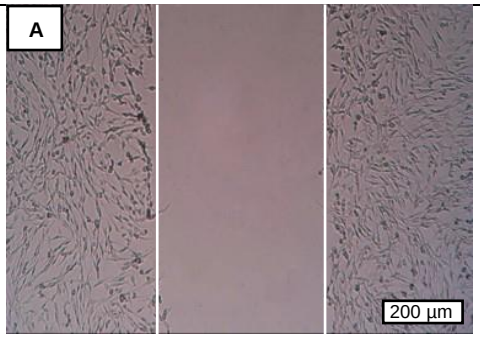
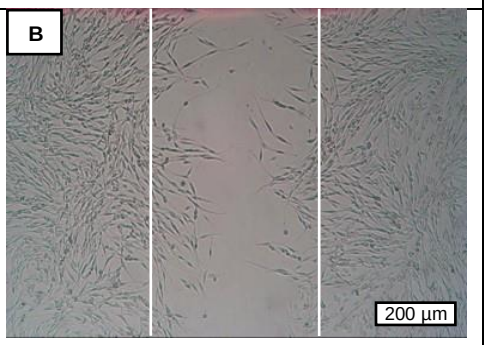
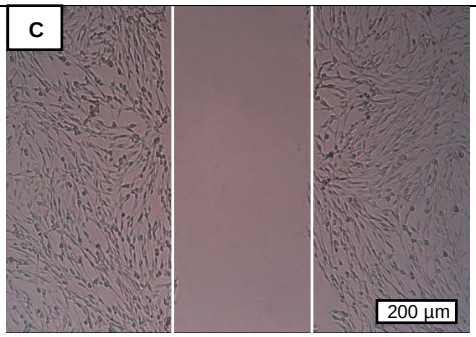
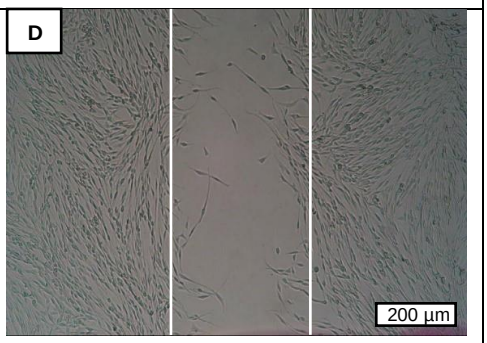
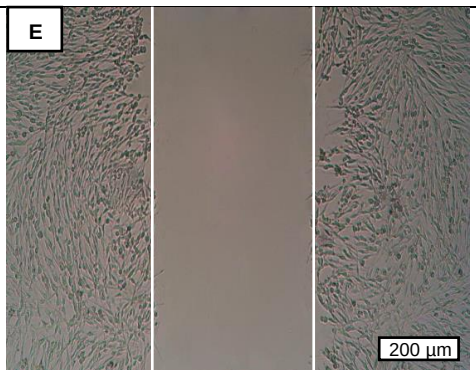
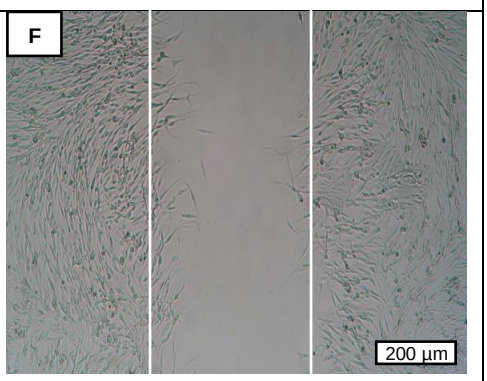
Para a avaliação do efeito antimigratório sobre GBM02 foram selecionados os derivados 1e, 1f, 1g, 1k e 1n, por terem apresentado os melhores efeitos de inibição da viabilidade celular de GBM02, as menores citotoxicidades em células mononucleares sanguíneas, e os que demonstraram mais seletivos para as células tumorais do que para monócitos e linfócitos.

Desta forma, ao avaliar o efeito antimigratório destes derivados sobre GBM02, após 24 horas de tratamento, foi possível constatar visualmente que eles foram capazes de apresentar, no mínimo, uma tendência de diminuição da migração celular de T0 para T24, quando comparados ao grupo controle DMSO 0,1% (A e B), como

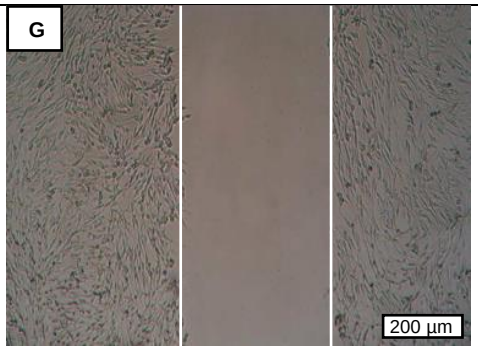
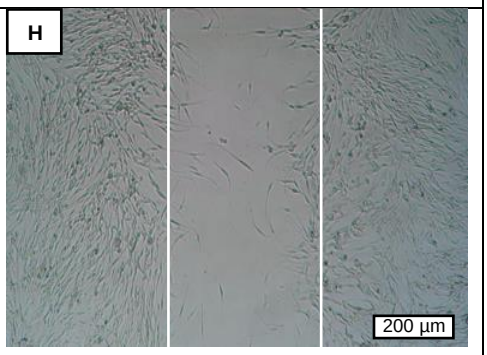
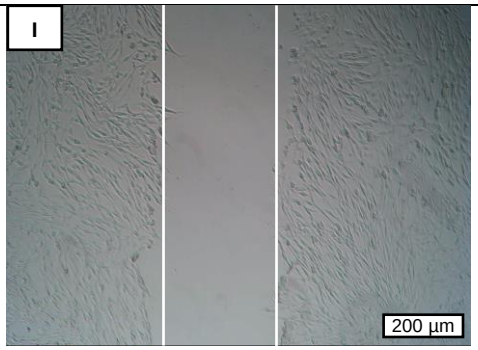
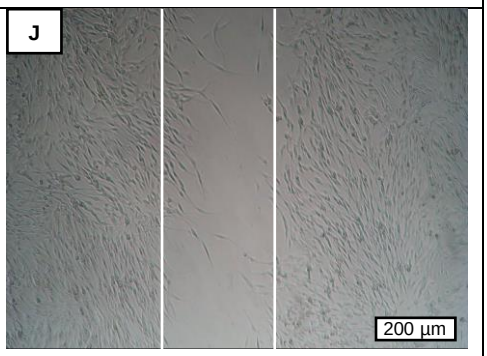
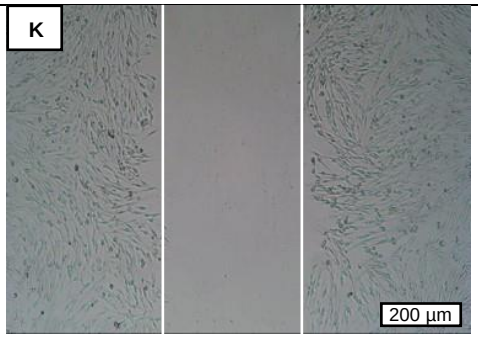
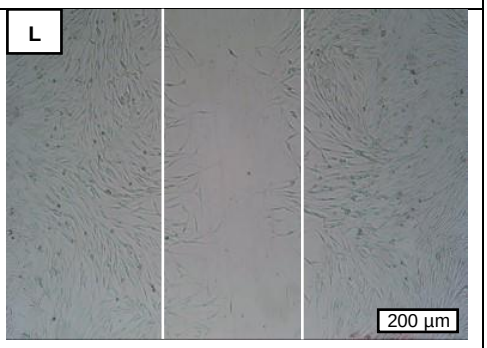
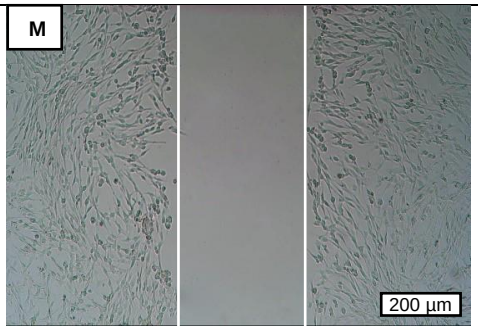
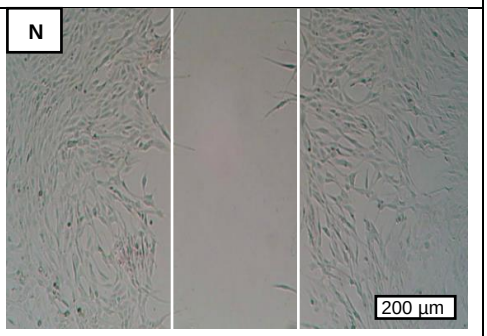
pode ser observado nas microfotografias representativas de 1f (G e H), 1g (I e J) e 1k (K e L). Já quando as células tumorais foram tratadas com os derivados 1e (E e F) e 1n (M e N), a inibição da migração celular foi ainda mais pronunciada. A TMZ (C e D), por sua vez, não alterou o perfil de deslocamento de GBM02 (Figura 10).

Quantitativamente, como mostra o Gráfico 1, somente os derivados 1e (40,6%) e 1n (72,4%) inibiram de forma significante a migração de GBM02, e os demais continuaram a apresentar apenas a tendência. A TMZ não demonstrou qualquer efeito.

**Figura 10 – Microfotografias representativas dos efeitos dos derivados 2-*N,N'*-dialquilamino-1,4-naftoquinonas 1e, 1f, 1g, 1k e 1n, e TMZ sobre a migração de GBM02**

<table>
<tr><th></th><th>T0</th><th>T24</th></tr>
<tr><td>DMSO 0,1%</td><td> 
</td><td> 
</td></tr>
<tr><td>TMZ 100 µM</td><td> 
</td><td> 
</td></tr>
<tr><td>1e 30 µM</td><td> 
</td><td> 
</td></tr>
</table>

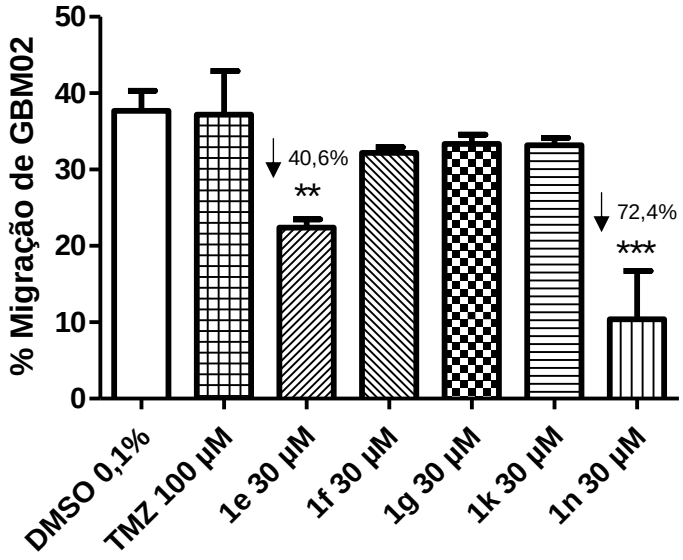
Continua

| | T0 | T24 |
|---|---|---|
| **1f 30 µM** |   |   |
| **1g 30 µM** |   |   |
| **1k 30 µM** |   |   |
| **1n 30 µM** |   |   |

Notas: Análise qualitativa da migração de GBM02. **A, C, E, G, I, K, M** – Microfotografias no momento T0, logo após a realização do risco e obtenção da área vazia. **B, D, F, H, J, L, N** – Microfotografias no momento T24, 24 horas após a realização do risco e dos tratamentos. Imagens obtidas em microscópio óptico invertido, no aumento de 4x.

Fonte: Autor (2019).

**Gráfico 1 – Efeito dos derivados 2-*N,N'*-dialquilamino-1,4-naftoquinonas 1e, 1f, 1g, 1k e 1n e da TMZ sobre a migração de GBM02**




Notas: Análise quantitativa da migração de GBM02. Os resultados foram expressos como a média ± erro padrão da média da porcentagem de migração de GBM02, em triplicatas de um experimento representativo. Os valores de porcentagem de migração de GBM02 foram significativos quando **p < 0,01 e ***p < 0,001 em relação ao grupo DMSO 0,1%.
Fonte: Autor (2019).

## 7.4 Efeito dos derivados 2-*N,N'*-dialquilamino-1,4-naftoquinonas, 1e e 1n, sobre a morfologia de GBM02

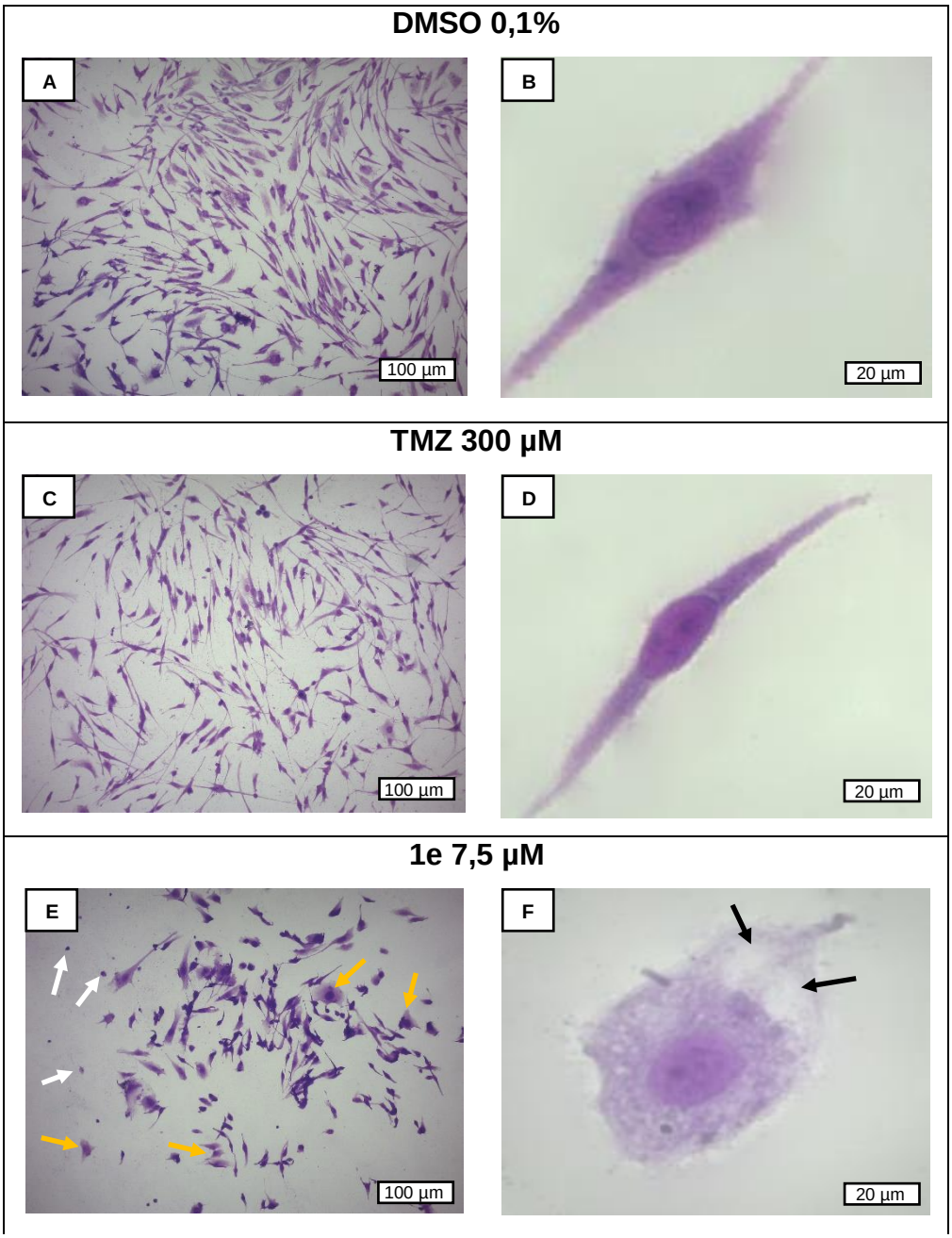
Para avaliação de alterações em seus aspectos morfológicos, as células GBM02 foram tratadas, por 48 horas, com os derivados 2-*N,N'*-dialquilamino-1,4-naftoquinonas 1e e 1n, selecionados por apresentarem o melhor perfil de resposta, com maior efeito antitumoral sobre GBM02, menor citotoxicidade em monócitos e linfócitos, e inibirem de forma significante a migração das células tumorais.

Pode-se observar na Figura 11 que as células tratadas com DMSO 0,1% (A e B), apresentaram morfologia protoplasmática, com prolongamentos alongados característicos de GBM02. Os tratamentos com os derivados 1e, 7,5 (E) e 15 µM (G), e 1n, 20 (I) e 40 µM (K), promoveram uma redução no número de células, surgimento de células com citoplasmas arredondados ou morfologia atípica (setas laranjas) e aumento de *debris* (setas brancas). Essas alterações ocorreram em maior escala em

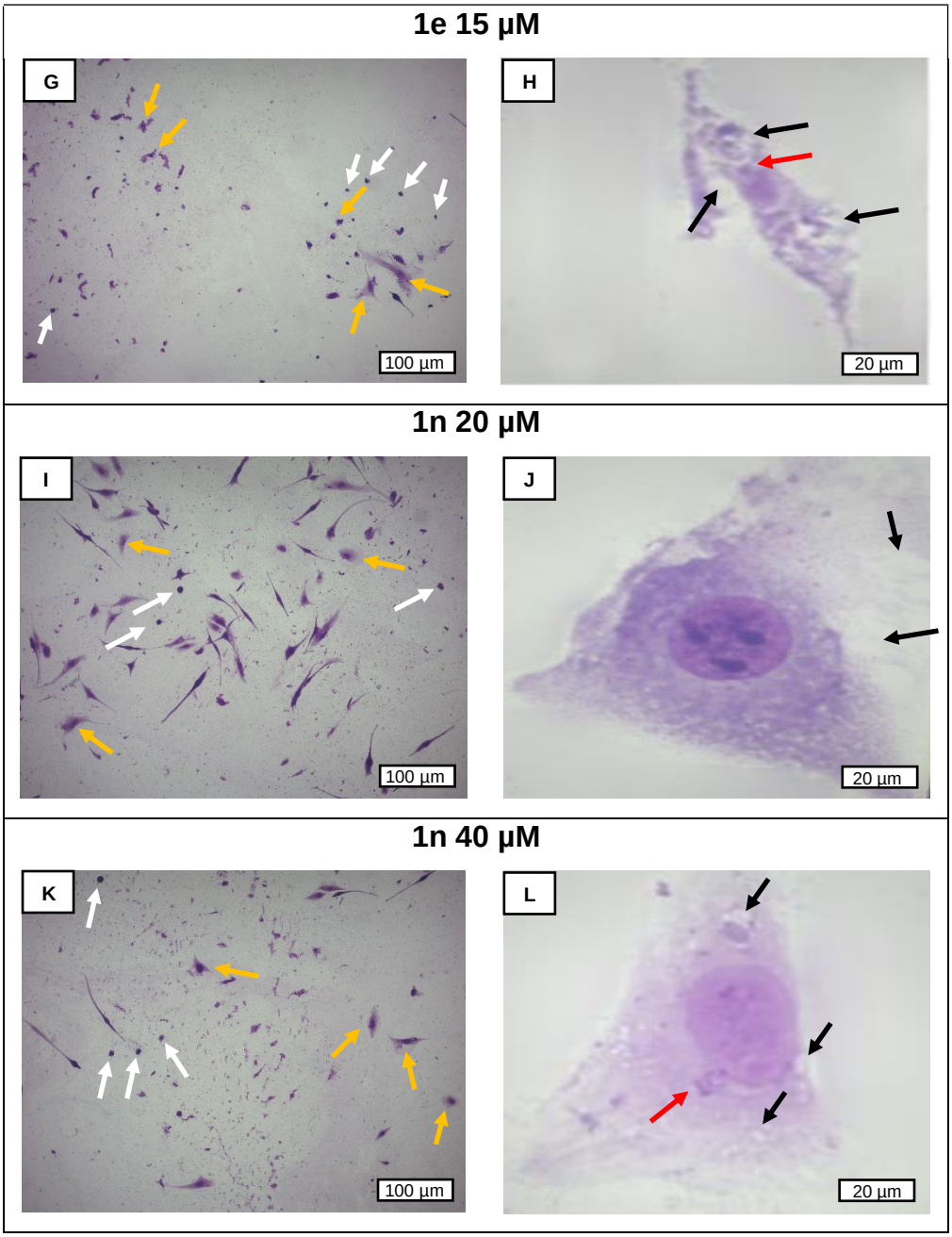
1e, na concentração de 15 µM, e 1n, 40 µM. A TMZ (C e D) não alterou a morfologia de GBM02.

A Figura 11 (F, H, J, L) mostra que, os tratamentos com os derivados promoveram a formação de vacúolos citoplasmáticos (setas pretas) em GBM02. As concentrações maiores originaram perda de conteúdo citoplasmático, rompimento de membrana nuclear e extravasamento de seu conteúdo (setas vermelhas).

**Figura 11 – Microfotografias representativas dos efeitos dos derivados 2-*N,N'*-dialquilamino-1,4-naftoquinonas, 1e e 1n, e da TMZ sobre a morfologia de GBM02**




Continua




Notas: Análise dos aspectos morfológicos de GBM02. Microfotografias da morfologia de GBM02 após os tratamentos, obtidas por meio de microscópio óptico nos aumentos de 10x (**A, C. E, G, I, K**) e 40x (**B, D, F, H, J, L**). As setas coloridas indicam: laranjas – células com citoplasma arredondado ou amorfas; brancas – *debris* celulares; pretas – vacúolos citoplasmáticos/ perda de conteúdo; vermelhas – rompimento de membrana nuclear/ extravasamento de conteúdo.

Fonte: Autor (2019).

### 7.5 Efeito dos derivados 2-*N,N'*-dialquilamino-1,4-naftoquinonas, 1e e 1n, na indução de apoptose em GBM02

Ao se avaliar o efeito dos derivados 1e, 7,5 µM, e 1n, 20 µM, sobre a indução de apoptose em GBM02, foi observado que ambos induziram morte celular programada nas células tumorais, após 48 horas de tratamento (Gráfico 2).

Quando comparados ao grupo DMSO 0,1%, os derivados 1e e 1n reduziram significativamente (36,6 e 57,1%) o número de GBM02 vivas (Gráfico 2A); aumentaram (6,0 e 21,6%) o número de células tumorais em estágio inicial de apoptose (Gráfico 2B); e elevaram (34,0 e 37,8%) de forma significante a quantidade de GBM02 em estágio final de apoptose (Gráfico 2C). A TMZ não induziu morte celular nas células tumorais, na concentração testada.

### 7.6 Efeito dos derivados 2-*N,N'*-dialquilamino-1,4-naftoquinonas, 1e e 1n, sobre as diferentes fases do ciclo celular de GBM02

A análise do efeito dos derivados 1e, 7,5 µM, e 1n, 20 µM, sobre as fases do ciclo celular de GBM02 mostra que ambos os derivados reduziram o processo mitótico de células tumorais, após 48 horas dos tratamentos (Gráfico 3).

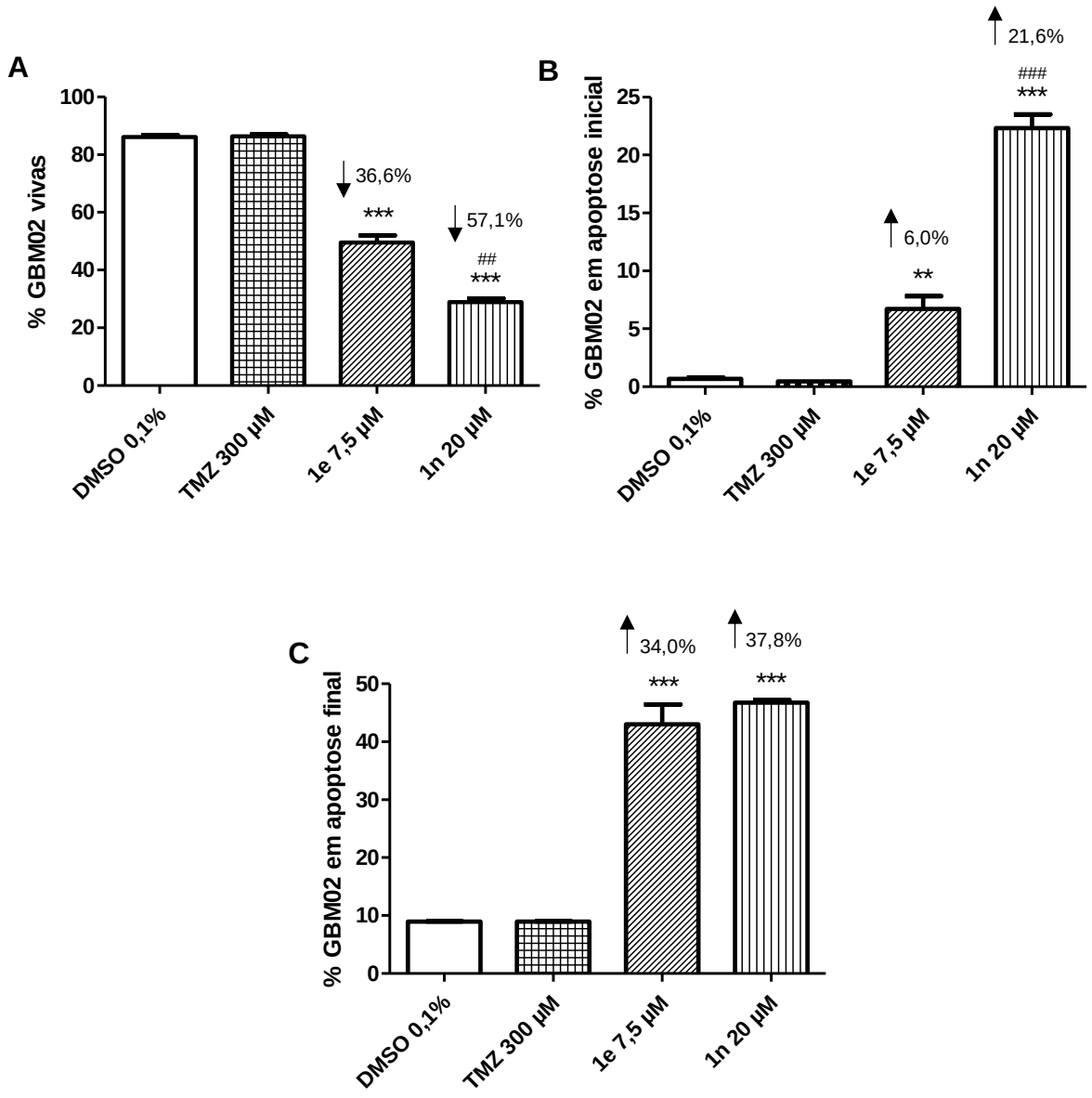
O derivado 1n, quando comparado ao grupo DMSO 0,1%, aumentou (22,3%) significativamente a proporção de células tumorais na fase G0/G1 (Gráfico 3A). Na fase S, os tratamentos proporcionaram efeitos contrários, em 1e houve aumento (2,0%) do número de células e em 1n, diminuição (8,3%) de forma significativa (Gráfico 3B). Ambos os derivados diminuíram (4,7 e 10,6%) significativamente a quantidade de GBM02 na fase G2/M (Gráfico 3C). A TMZ não alterou o número de células tumorais nas fases G0/G1 e S, e aumentou (4,8%) de forma significativa a população de GBM02 na fase G2/M.

### 7.7 Efeito dos derivados 2-*N,N'*-dialquilamino-1,4-naftoquinonas, 1e e 1n, sobre o estresse oxidativo em GBM02

Na caracterização do efeito dos derivados 1e, 7,5 µM, e 1n, 20 µM, e da TMZ sobre o estresse oxidativo em GBM02, foi constatado que, somente o derivado 1n

aumentou (6,0%) significativamente o estresse oxidativo nas células tumorais, quando comparado ao grupo controle DMSO 0,1%, após 48 horas de tratamento (Gráfico 4).

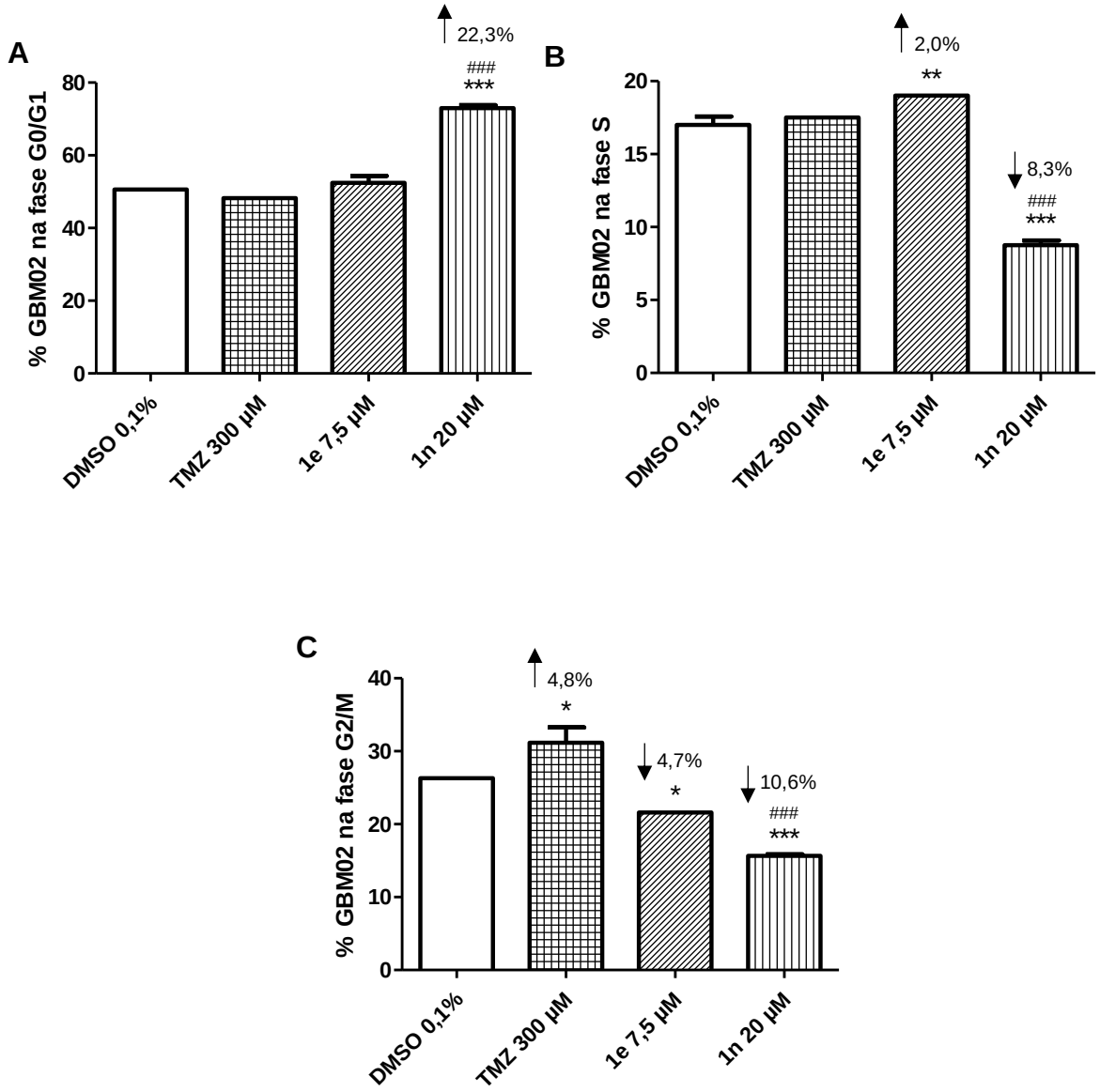
**Gráfico 2 – Efeito dos derivados 2-*N,N'*-dialquilamino-1,4-naftoquinonas, 1e e 1n, e da TMZ na indução de apoptose em GBM02**




Notas: Porcentagem de GBM02 vivas **(A)**, GBM02 em apoptose inicial **(B)** e GBM02 em apoptose final **(C)**. Os resultados foram expressos como a média ± erro padrão da média, em duplicatas de um experimento representativo. Os valores foram significativos quando **p < 0,01 e ***p < 0,001 em relação ao grupo DMSO 0,1%, e $^{\#\#}$p < 0,01 e $^{\#\#\#}$p < 0,001 em relação ao grupo 1e 7,5 µM.

Fonte: Autor (2019).

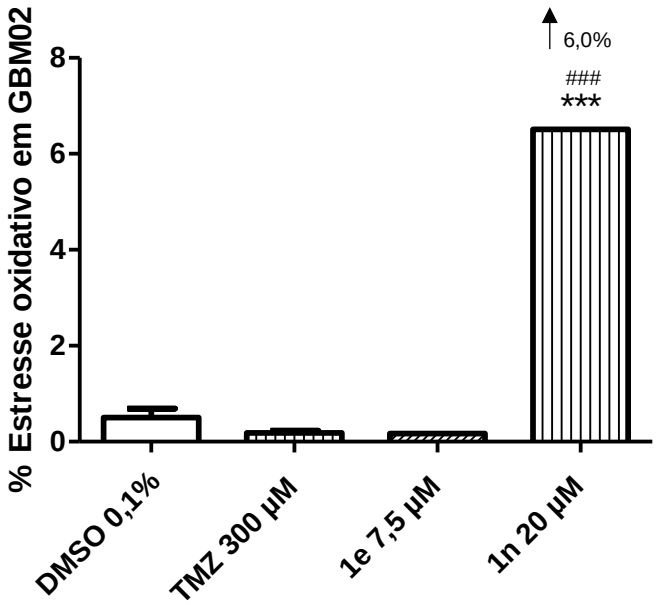
**Gráfico 3 – Efeito dos derivados 2-*N,N'*-dialquilamino-1,4-naftoquinonas, 1e e 1n, e da TMZ sobre o ciclo celular de GBM02**




Notas: Porcentagem de GBM02 na fase G0/G1 **(A)**, na fase S **(B)** e na fase G2/M **(C)**. Os resultados foram expressos como a média ± erro padrão da média, em duplicatas de um experimento representativo. Os valores foram significativos quando *p < 0,05, **p < 0,01 e ***p < 0,001 em relação ao grupo DMSO 0,1%, e $^{###}$p < 0,001 em relação ao grupo 1e 7,5 µM.

Fonte: Autor (2019).

**Gráfico 4 – Efeito dos derivados 2-*N,N'*-dialquilamino-1,4-naftoquinonas, 1e e 1n, e da TMZ sobre o estresse oxidativo em GBM02**




Notas: Porcentagem de estresse oxidativo em GBM02. Os resultados foram expressos por meio da média ± erro padrão da média, em duplicatas de um experimento representativo. Os valores foram significativos quando ***$p < 0,001$ em relação ao grupo DMSO 0,1% e $^{###}p < 0,001$ em relação ao grupo 1e 7,5 µM.

Fonte: Autor (2019).

## 8 DISCUSSÃO

No presente estudo foi investigada a atividade antitumoral de derivados 2-*N,N'*-dialquilamino-1,4-naftoquinonas sobre GBM02. Durante esta pesquisa foram realizados testes *in vitro* constituídos de uma série de análises. Inicialmente realizou-se os ensaios de viabilidades celulares de GBM02 e de células mononucleraes sanguíneas, com o intuito de se verificar a eficácia, a potência e segurança dos derivados, e assim, selecionar os de melhores resultados. Em seguida, o experimento de migração celular, com o objetivo de avaliar possível efeito antimigratório nas células tumorais após o tratamento. Na sequência, foram realizados ensaios de morfologia celular, com a finalidade de investigar alterações estruturais em GBM02 após o tratamento. Por fim, realizou-se experimentos para elucidar o mecanismo de ação dos derivados sobre a morte celular programada de GBM02.

O GBM está associado a elevadas capacidades de proliferação, migração e invasão, que são responsáveis por um dos piores prognósticos da oncologia moderna. A sobrevida gerada com o tratamento atual é muito curta (FRANCESCHI; MINICHILLO; BRANDES, 2017; GUAN et al., 2018). Portanto, o desenvolvimento de fármacos que apresentem atividade sobre esse tumor do SNC é de fundamental interesse e importância para a indústria farmacêutica e órgãos de saúde mundial.

Diversas 1,4-naftoquinonas sintéticas são associadas a algumas atividades biológicas, dentre elas, a anticâncer (CRETU et al., 2017; ALY et al., 2018; SCHEPETKIN et al., 2019). Logo, os derivados sintéticos naftoquinônicos são candidatos a demonstrarem atividade anti-GBM. Essas premissas, em conjunto, despertaram o interesse de se avaliar a atividade de derivados 2-*N,N'*-dialquilamino-1,4-naftoquinonas em células GBM02.

O desenvolvimento de fármacos tem sido amplamente dependente de estratégias moleculares e computacionais, e de formas inéditas de abordagem da síntese orgânica de novas moléculas (MA et al., 2015). As interações que ocorrem entre regiões específicas das estruturas das substâncias (grupos farmacofóricos) com os receptores das células-alvo é que são responsáveis pelo efeito biológico dos protótipos moleculares candidatos à fármacos. Desse modo, qualquer alteração estrutural nas moléculas, por mais simples que seja, pode acarretar em consequências na função desempenhada por elas (ALI, 2017).

Nesse contexto, vários grupos de pesquisa se detêm a estudar as mais variadas relações entre as estruturas químicas das novas substâncias e suas influências nas atividades biológicas. Estes estudos se baseiam na realização de várias modificações em uma mesma molécula, com o intuito de aumentar a eficácia e diminuir os riscos de toxicidade inerentes à sua utilização (FERREIRA; OLIVA; ANDRICOPULO, 2018).

Os derivados 2-*N,N'*-dialquilamino-1,4-naftoquinonas (1a - 1n), objetos de estudo deste trabalho, são caracterizados por possuírem um grupamento alquil e um alquilamino, ambos ligados à estrutura base da 1,4-naftoquinona. Eles diferem entre si em alguns aspectos: presença ou não do grupamento metilprop-1-en-1-il ligado à posição 3 (C3) do anel 1,4-naftoquinona; quanto a ciclização ou não de grupamentos alquilaminos na posição 2 (C2) do anel 1,4-naftoquinona; e quanto a presença de átomos diferentes (O, S e N) que compõem o grupamento alquilamino cíclico em C2 do anel naftoquinônico (Tabela 4, página 43).

É bem relatado na literatura que várias 1,4-naftoquinonas com grupamentos alquilamino em C2 e/ou alquil em C3 do anel base, apresentam atividade antitumoral frente a diversos tipos de cânceres. Shin e cols. (2017), por exemplo, demonstraram que derivados 2-amino-substituído-1,4-naftoquinonas apresentaram atividade antineoplásica sobre 3 linhagens de câncer de ovário (A2780, SKOV3 e OVCAR3). Ning e cols. (2018) mostraram que alguns derivados naftoquinônicos contendo grupamentos alquilaminos em C2, inibiram de forma eficaz a viabilidade de células de linhagens de cânceres de cólon (HCT-116), mama (MCF-7), cervical (HeLa), pulmão (H1299) e melanoma (B16).

Badolatto e cols. (2019) sintetizaram e avaliaram o efeito antitumoral de novos derivados 1,4-naftoquinonas com grupamento alquilamino em C2. Os autores observaram que os novos compostos apresentaram efeito antiproliferativo sobre linhagem de câncer de mama (MDA-MB-231). Wang e cols. (2015) demonstraram que derivados 1,4-naftoquinonas contendo grupamento alquil, mais precisamente o farnesil, em C3 do núcleo naftoquinônico, foram citotóxicos para linhagens de câncer de mama (MCF-7), leucemia (HL60) e adenocarcinomas colorretais (HT29 e SW480).

Diante dessas premissas, decidiu-se investigar, inicialmente, se o tratamento com os derivados 2-*N,N'*-dialquilamino-1,4-naftoquinonas seria capaz de inibir a viabilidade de células de glioblastoma humano (GBM02). Para isto, realizou-se o teste colorimétrico do MTT. Este experimento se baseia na conversão do sal de MTT, de

coloração amarela, em cristais de formazan, roxos, por ação de uma enzima mitocondrial específica, a succinato desidrogenase. Logo, quanto maior a ocorrência dessa conversão, maiores são as atividades mitocondriais e a quantidade de células viáveis (MOSMANN, 1983).

O período de tratamento de 48 horas foi selecionado por meio da realização de ensaios experimentais preliminares, onde foram avaliados os efeitos antitumorais dos derivados sobre GBM02 nos tempos de 24, 48 e 72 horas. Nesses experimentos, os resultados mais satisfatórios foram obtidos em 48 horas, sendo esta, portanto, a razão da escolha deste tempo de tratamento.

Os ensaios de viabilidade celular de GBM02 demonstraram que todos os derivados, com exceção dos 1a, 1b e 1c, foram capazes de reduzir a atividade metabólica mitocondrial e a quantidade de células tumorais viáveis após 48 horas dos tratamentos. A TMZ não apresentou efeito sobre GBM02, até a concentração máxima testada, 900 µM, no mesmo período de tempo (Tabela 5, página 54). Nosso grupo de pesquisa só observou ação da TMZ sobre a célula tumoral no tempo de 72 horas, onde alcançou um $E_{máx}$ de 47,3 ± 2,7% em 900 µM (VIANA, 2019).

Dentre os derivados que possuem em suas estruturas aminas cíclicas em C2 e grupamento metilprop-1-en-1-il em C3 (1a, 1b, 1c e 1d), somente o 1d apresentou atividade antitumoral sobre GBM02. A presença do núcleo metilpiperazina como a amina cíclica em 1d, provavelmente sobrepõe as inatividades geradas pela presença do grupo alquil em C3, observadas em 1a, 1b e 1c, e explica tal ação. Gokmen e cols. (2019) mostraram que algumas 1,4-naftoquinonas com o grupamento piperazina em C2 foram citotóxicas para linhagens de cânceres de mama (MDA-MB-231), próstata (DU-145) e colorretal (HCT-116), demonstrando a importância desse grupo químico para o efeito anticancerígeno.

Todos os derivados com a presença de aminas cíclicas acopladas ao núcleo naftoquinônico e ausência do grupo metilprop-1-en-1-il (1e, 1f, 1g e 1h), apresentaram o mesmo nível de inibição da viabilidade das células tumorais. Provavelmente a ausência do grupo alquil em C3 fez com que o efeito antitumoral desses compostos fosse semelhante, independente da variação de átomos (O, S, C e N) presentes na amina cíclica (Tabela 5, página 54). Alguns estudos recentes associam atividade antitumoral a diferentes substâncias que contêm os grupamentos morfolina, tiomorfolina, piperidina e piperazina, presentes em 1e, 1f, 1g e 1h, respectivamente (DIAO et al.,2017; TAHA et al., 2017; DAS et al., 2018; SINGH; JADHAV; KUMAR,

2018). Esses estudos corroboram os achados neste trabalho e reforçam a idéia de que estes grupamentos são importantes para a atividade sobre GBM02.

Pode-se observar que entre os derivados com aminas alifáticas em C2 e ausência de metilprop-1-en-1-il em C3 (1i, 1j e 1k), os que detêm uma maior cadeia alifática apresentaram melhores efeitos antitumorais, com destaque para o 1k, que difere dos demais pela presença de duplas ligações no grupamento amina alifática. Dentre as 1,4-naftoquinonas com grupamentos aminas de cadeias alifáticas curtas em C2 (1l, 1m e 1n), aquela com ausência de metilprop-1-en-1-il, 1n, promoveu a maior inibição da viabilidade das células tumorais (Tabela 5, página 54).

De maneira geral, os derivados que não apresentam em sua estrutura o grupamento metilprop-1-en-1-il ligado ao C3 do núcleo 1,4-naftoquinona, demonstraram maiores efeitos de inibição da viabilidade de GBM02, sendo, portanto, mais eficazes que a TMZ. Essa configuração estrutural parece ter facilitado a interação das moléculas com o alvo farmacológico específico na célula tumoral, o que resultou em maior eficácia. Levando-se em consideração os derivados de melhores efeitos (1d, 1e, 1f, 1g, 1h, 1k e 1n), o 1e mostrou-se mais potente, com uma $CI_{50}$ de aproximadamente 15 µM (Tabela 5, página 54).

Um dos grandes obstáculos no tratamento quimioterápico dos mais variados tipos de câncer, incluindo o GBM, é a toxicidade inerente a vários medicamentos, que resulta no surgimento de diversos efeitos colaterais, e por muitas vezes diminui a eficácia da terapia e aumenta o desconforto dos pacientes (NURGALI; JAGOE; ABALO, 2018). Por essa razão, é importante a realização de testes experimentais que forneçam informações de como o protótipo molecular candidato à fármaco antitumoral interage com as células normais do organismo, para assim serem identificados alguns dos possíveis riscos de sua utilização ou até mesmo se fazer uma triagem de quais moléculas devem ser submetidas a ensaios mais avançados na cadeia de desenvolvimento de fármacos.

Diante disso, decidiu-se avaliar a toxicidade dos derivados 2-*N,N'*-dialquilamino-1,4-naftoquinonas sobre às células mononucleares sanguíneas, monócitos e linfócitos, por meio do ensaio colorimétrico do MTT. Estas células participam ativamente da resposta imune no processo inflamatório associado a várias neoplasias, e com isso detêm de grande importância no combate à progressão do tumor (BISWAS, 2015; NISHIJIMA et al., 2015).

A avaliação da toxicidade de novas moléculas frente a células mononucleares sanguíneas tem sido amplamente utilizada em estudos que objetivam o desenvolvimento de novos fármacos antitumorais. Salustiano e cols. (2010) demonstraram que alguns derivados 1,4-naftoquinonas pentacíclicos foram citotóxicos para linhagens de leucemias (K562 e Lucena-1) e apresentaram uma toxicidade baixa, de aproximadamente 20%, sobre linfócitos. Kishore e cols. (2014) constataram que alguns derivados sintéticos da juglona inibiram algumas linhagens de cânceres, dentre elas, de mama (MCF-7), próstata (DU-145) e cervical (HeLa), e foram tóxicos sobre monócitos e linfócitos, inibindo cerca de 50% desta população celular.

O presente estudo demonstra que após 48 horas dos tratamentos, a maioria dos derivados foi citotóxica para monócitos e linfócitos. Somente os 1a, 1l e 1n não foram tóxicos até a concentração máxima testada, de 100 µM. É importante ressaltar que entre os compostos que apresentaram as maiores inibições da viabilidade de GBM02, os 1e, 1f e 1g tiveram uma ação tóxica relativamente baixa sobre as células mononucleares sanguíneas, e 1n não apresentou qualquer efeito sobre estas células. Estes dados são de extrema importância pois a limitação das NQs como protótipos de fármacos em fase de investigação pré-clínica é a toxicidade, a despeito de sua expressiva atividade. A TMZ não foi citotóxica no tempo de 48 horas até a concentração de 900 µM (Tabela 6, página 55).

Os diferentes grupamentos ligados a C2 do anel naftoquinônico nos derivados 1b, 1c e 1d parecem ser os responsáveis pelas variações de citotoxicidades apresentadas por eles, já que todos possuem em comum o metilprop-1-en-1-il em C3. No caso de 1a, a presença do grupo morfolina em C2, associado ao alquil em C3, possivelmente é responsável pela ausência de toxicidade (Tabela 6, página 55).

A ausência do grupo metilprop-1-en-1-il em C3 nos derivados 1f e 1g, diminuiu a toxicidade quando comparados a 1b e 1c, respectivamente, confirmando assim a participação de tal grupo no efeito tóxico destes. Já para os derivados 1e e 1h esta ausência gerou um aumento da citotoxicidade em monócitos e linfócitos, ao serem comparados com 1a e 1d, o que sugere que o grupo alquil limitou a ação tóxica dos grupamentos morfolina e piperazina, nestes últimos (Tabela 6, página 55). Estes resultados mostram que a associação do grupo metilprop-1-en-1-il com diferentes aminas cíclicas levam a respostas variadas, potencializando ou limitando a ação citotóxica.

O derivado 1k, além de promover a maior inibição de GBM02 dentre os que possuem aminas alifáticas em C2 (1i, 1j e 1k), também foi o que apresentou o menor efeito tóxico sobre as células mononucleares sanguíneas. A presença da dupla ligação na amina alifática parece ter influência nas duas atividades de 1k. Já entre os derivados que têm aminas alifáticas de cadeias curtas em C2 (1l, 1m e 1n), a presença de um único metil na amina alifática associado ao grupo metilprop-1-en-1-il em C3, faz com que 1m apresente toxicidade (Tabela 6, página 55).

É importante ressaltar que os derivados 1d e 1h, que possuem o grupo piperazina em sua estrutura, apresentaram maior toxicidade sobre as células mononucleares sanguíneas. O 1d mostrou-se o mais potente, com uma $CC_{50}$ de 8,8 µM (Tabela 6, página 55).

Um princípio importante utilizado no desenvolvimento de medicamentos anticancerígenos, é o da seletividade. É de fundamental importância que os protótipos moleculares candidatos a fármacos tenham ação direcionada às células tumorais (toxicidade seletiva), e assim possam ter efeitos adversos minimizados (TONGE, 2018).

O IS é uma ferramenta amplamente empregada em estudos *in vitro* que avaliam atividades antitumorais de determinadas substâncias, e por meio dele são obtidas as seletividades dos compostos entre culturas de células diferentes, relacionando as suas concentrações ativas. Nesse contexto, para um composto ser mais seletivo para a célula tumoral, seu IS deve ser maior que 1 (KANER et al., 2016). Se o IS de uma substância é 4, por exemplo, isso significa dizer que ela é 4 vezes mais seletiva para a célula tumoral. Assim, quanto maior o IS, mais seletivo para as células cancerígenas é o protótipo.

Neste trabalho os IS foram calculados por meio das razões entre as $CC_{50}$ (monócitos e linfócitos) e $CI_{50}$ (GBM02) dos derivados 2-*N,N'*-dialquilamino-1,4-naftoquinonas. Pode-se observar que os derivados 1e, 1f, 1g, 1k e 1n foram mais seletivos para GBM02 do que para monócitos e linfócitos, uma vez que os valores das razões entre as suas $CC_{50}$ e $CI_{50}$ deram maiores que 1. Em todos esses derivados não foi possível precisar o valor exato do IS, já que até a concentração máxima testada, 100 µM, não houve inibição de 50% da população de células mononucleares sanguíneas, indicando que a $CC_{50}$ está acima dessa concentração. Entre todos os derivados o que apresentou maior seletividade para GBM02 foi o 1e, seguido do 1n.

Como os derivados 1a, 1b, 1c e 1l, e a TMZ, não apresentaram $CC_{50}$ e $CI_{50}$, não foi possível se determinar seus IS (Tabela 7, página 57).

Araújo e cols. (2017) avaliaram a atividade leishmanicida destes mesmos derivados 2-*N,N'*-dialquilamino-1,4-naftoquinonas. Os autores observaram que os derivados 1d, 1e, 1f, 1h, 1k e 1n apresentaram efeito leishmanicida significativo sobre formas promastigotas de *Leishmania chagasi* e que os 1d, 1h, 1i e 1k foram os mais citotóxicos para macrófagos peritoneais obtidos de camundongos *swiss*. Ainda de acordo com o estudo, os 1e e 1n foram os que demonstraram os maiores IS. Estes resultados foram muito semelhantes aos encontrados neste trabalho, durante a avaliação do efeito dos derivados sobre as viabilidades celulares de GBM02 e monócitos e linfócitos.

A elevada capacidade migratória de GBM é uma das características que contribuem para sua agressividade (HAN et al., 2011). Essas células tumorais migram por todo o tecido cerebral por meio da degradação da matriz extracelular (MEC), e isso dificulta a remoção cirúrgica da massa tumoral em sua totalidade, o que contribui para um prognóstico ruim (DUAN et al., 2015).

As metaloproteinases da matriz (MMPs) são enzimas proteolíticas que contém zinco (Zn) e atuam na degradação dos componentes proteicos da MEC e das membranas basais, sendo, portanto, agentes importantes no processo de migração celular tumoral (CHETTY et al., 2012). As MMPs têm suas atividades reguladas por hormônios sistêmicos, proteínas da MEC, e outros fatores. É bem relatado na literatura o envolvimento das MMP-2 e -9 na migração de GBM (HAGEMANN et al., 2012; ROOMI et al., 2017).

Além disso, os processos celulares que ocorrem durante a transição epitélio-mesenquimal, como por exemplo, dissolução das junções entre as células, rearranjos citoesqueléticos e regulação negativa de moléculas adesivas, também estão diretamente associados ao aumento da mobilidade celular tumoral (KALLURI; WEINBERG, 2009). Alterações na composição da MEC e alguns fatores de crescimento, dentre eles, transformador β (TGF- β), epidermal (EGF), semelhante à insulina (IGF) e de fibroblastos (FGF), influenciam na indução dessa transição (HE et al., 2016).

Alguns estudos demonstram efeito antimigratório de algumas 1,4-naftoquinonas sobre diferentes linhagens tumorais. Jang e cols. (2014), por exemplo, mostraram que a Shikonina, uma 1,4-naftoquinona natural, inibiu cerca de 70% da

migração celular de duas linhagens de câncer de mama (MCF-7 e MDA-MB-231) e que esse efeito se deu por supressão da atividade da MMP-9. Liew e cols. (2014) observaram que a 2-metóxi-1,4-naftoquinona inibiu 46% da migração da linhagem de câncer de mama, MDA-MB-231, através da regulação negativa da atividade da MMP-9. Park e cols. (2005) demonstraram que uma 1,4-naftoquinona sintética com grupamento amino em sua estrutura inibiu a migração da linhagem HT1080, de fibrosarcoma, por meio da regulação das atividades das MMP-2 e -9.

Diante do exposto, decidiu-se avaliar o efeito dos derivados 2-*N,N'*-dialquilamino-1,4-naftoquinonas sobre a migração de GBM02, através do ensaio de *Scratch*. Para a realização desse protocolo experimental foram selecionados os derivados 1e, 1f, 1g, 1k e 1n, por terem apresentado as melhores eficácias em inibir a viabilidade celular de GBM02 e os IS mais satisfatórios nos ensaios iniciais de triagem farmacológica. As concentrações utilizadas foram escolhidas baseadas em testes preliminares que as isentaram do viés de morte celular.

Pode-se observar que entre os derivados selecionados, somente os 1e e 1n demonstraram atividade antimigratória significativa sobre GBM02, após 24 horas dos tratamentos. Os demais derivados apresentaram apenas uma tendência de diminuir o episódio de migração celular. A TMZ não inibiu a migração de GBM02 após transcorrido o mesmo período de tempo (Figura 10, página 58; Gráfico 1, página 60).

A presença do grupamento morfolina em 1e, que o torna diferente de 1f e 1g e que teve participação ativa na inibição da viabilidade de GBM02, também parece ser um fator determinante para sua atividade antimigratória. Já a amina de cadeia curta em C2, de 1n, faz com que ele seja o derivado de maior efeito inibitório sobre a migração de GBM02. Diante da participação das MMP-2 e -9 no processo de migração de GBM e do fato de algumas 1,4-naftoquinonas demonstrarem atividade antimigratória por inibirem a ação dessas MMPs, é possível sugerir que os derivados 1e e 1n podem estar agindo sobre as MMP-2 e/ou -9. Entretanto, para se confirmar essa hipótese torna-se necessária a realização de outros protocolos experimentais.

A análise dos aspectos morfológicos de células tumorais, após determinado período de contato com protótipos moleculares candidatos a fármacos anticancerígenos, é de fundamental importância para se conhecer as principais alterações morfológicas consequentes dos tratamentos, e se traçar uma possível linha de investigação do mecanismo de ação da molécula sobre à célula neoplásica.

Assim sendo, neste trabalho foram analisadas as mudanças na morfologia de GBM02, após 48 horas dos tratamentos com os derivados 1e e 1n. Estes, foram selecionados por terem apresentado os resultados mais satisfatórios nos ensaios experimentais antecedentes e as concentrações utilizadas foram as $CI_{50}$ e 50% das $CI_{50}$.

Os derivados 1e e 1n, em todas as concentrações testadas, reduziram o número de GBM02, o que confirma a capacidade deles de induzirem morte deste tumor. A propriedade de alterar o padrão morfológico de GBM02, de células alongadas para arredondadas ou amorfas, pode explicar em parte os efeitos antimigratórios de 1e e 1n, uma vez que o padrão alongado influencia no processo de migração celular. As perdas de conteúdo citoplasmático, que ocorreram em todas as concentrações de 1e e 1n, e de nuclear, nas maiores, são sugestivas de indução de apoptose celular (TAYLOR, CULLEN; MARTIN, 2008). A TMZ não provocou mudanças estruturais em GBM02. Pode-se constatar que os danos estruturais causados em GBM02 foram semelhantes em 1e e 1n, não havendo, portanto, diferença de influência dos grupamentos morfolina, em 1e, e amina alifática de cadeia curta, em 1n, nessa ação (Figura 11, página 61).

A malignidade dos tumores, incluindo GBM, está diretamente relacionada às suas capacidades de serem insensíveis aos sinais de inibição de crescimento e resistentes à apoptose celular, o que acarreta em um potencial replicativo ilimitado (HANAHAN; WEINBERG, 2000). Vários fármacos promovem o efeito anticancerígeno por induzirem apoptose em células tumorais, através de diferentes mecanismos (HERR; DEBATIN, 2001). Portanto, é importante que protótipos moleculares candidatos à fármacos antineoplásicos possam apresentar essa característica.

A apoptose celular consiste em um processo de morte programada das células e envolve duas vias principais de sinalização: extrínseca ou fisiológica, e intrínseca ou mitocondrial. Em ambas as vias há a participação de uma importante família de proteases, denominadas de caspases (CERELLA et al., 2014).

A ativação da via extrínseca ou fisiológica se dá pelas interações entre ligantes específicos e receptores de morte celular presentes na membrana plasmática, como por exemplo: fator estimulante de apoptose (Fas), fator de necrose tumoral (TNF) e seu receptor (TNFR). A cascata de eventos que ocorre dessas interações culmina na ativação da caspase 8 (FULDA, 2015).

Alterações mitocondriais que resultam em perda do potencial e na permeabilização da membrana externa da mitocôndria, são responsáveis pela ativação da via intrínseca do processo apoptótico. Nesta via, as interações entre os membros pró-apoptóticos constituintes da família de proteínas Bcl-2 resultam na liberação do citocromo C e na ativação da caspase 9 (HUANG; FRETER, 2015).

As caspases efetoras, 8 e 9, promovem a ativação das caspases executoras, 3, 6 e 7, que são as responsáveis, efetivamente, pelo processo de morte celular. As duas vias de sinalização são interconectadas, e esse fato garante o sucesso do processo apoptótico (LOPEZ; TAIT, 2015).

A resistência à apoptose por parte das células cancerígenas é decorrente de uma série de alterações que ocorrem nos mediadores dessas duas vias de sinalização. Diminuição da expressão de receptores de morte celular nas membranas e aumento da atividade de proteínas anti-apoptóticas da família Bcl-2, são alguns exemplos de características das células tumorais que dificultam o processo de apoptose (PLACZEK et al., 2010; CERELLA et al., 2016).

Recentemente, têm sido desenvolvidos vários estudos que demonstram que alguns derivados sintéticos 1,4-naftoquinonas apresentam atividade antitumoral sobre diversos tipos de cânceres, através da indução do processo apoptótico nas células cancerígenas (HUANG et al., 2019; KARACAS et al., 2019; WELLINGTON et al., 2019).

Diante desses relatos encontrados na literatura e do fato dos derivados 1e e 1n terem ocasionado alterações morfológicas sugestivas de indução de apoptose em GBM02, decidiu-se avaliar se estes derivados 2-*N,N'*-dialquilamino-1,4-naftoquinonas teriam capacidade de induzirem o processo apoptótico nessas células tumorais. As concentrações utilizadas neste e nos outros ensaios experimentais de investigação de mecanismo de ação foram as correspondentes a 50% das $CI_{50}$.

Pode-se observar neste trabalho que os derivados 1e e 1n aumentaram a população de GBM02 em apoptose quando comparados ao grupo controle DMSO 0,1%, e a TMZ não foi capaz de induzir o processo apoptótico nessas células tumorais. Estes resultados são coerentes com os obtidos nas análises morfológicas de GBM02 após os tratamentos com 1e e 1n. Ao se comparar as atividades apoptóticas dos derivados, constata-se que o 1n apresentou maior indução de apoptose que 1e, (Gráfico 2, página 64). Desse modo, a presença do grupamento amina alifática de cadeia curta em C2 parece gerar um efeito maior do que o grupo morfolina, de 1e.

Ensaios complementares deverão ser realizados a fim de se descobrir sobre quais mediadores do processo apoptótico, os derivados 1e e 1n atuam.

Ao longo do desenvolvimento do câncer, as células cancerígenas acumulam mutações e adquirem uma instabilidade gênica que resulta em sinalização mitótica acelerada, o que contribui para a progressão rápida do tumor. As principais mutações envolvem genes codificadores das quinases dependentes de ciclina (CDKs), ciclinas, enzimas ativadoras das CDKs, inibidores das CDKs e as proteínas dos pontos de verificação do ciclo celular (MALUMBERS; BARBACID, 2009). Logo, tem sido constante a busca por novos fármacos que atuem em pontos específicos do ciclo de proliferação das células tumorais, e inibam o processo mitótico desordenado.

As transições entre as diferentes fases do ciclo celular são reguladas pelas CDKs, e estas são ativadas por proteínas denominadas de ciclinas. Os níveis das ciclinas variam ao longo do ciclo, o que culmina na ativação periódica das CDKs. As atividades destas, são inibidas por alguns mediadores, como por exemplo, a fosfoproteína p21, que quando ativada por p53, impede a formação dos complexos ciclinaE-CDK2 e ciclinaB-CDK1, e assim regula a progressão do ciclo nas fases G1 e G2/M, respectivamente; e em situações em que é ativada pelo fator de transcrição E2F-1, inibe o complexo ciclinaA-CDK2, regulando a fase S do ciclo. O final da fase G1 e início da S são extremamente importantes no câncer, pois nesse estágio ocorrem alterações que permitem o processo mitótico desordenado. A exacerbada proliferação, característica de diversos cânceres humanos, é resultado de, entre outros fatores, superexpressão de ciclinas e inativação dos inibidores das CDKs (RADHAKRISHNAN et al., 2004; LAPENNA; GIORDANO, 2009).

Assim que sofrem lesões na estrutura do DNA, por ação de agentes genotóxicos endógenos ou exógenos, as células ativam mecanismos de proteção da integridade do genoma. Dessa forma, há um retardo no desenvolvimento do ciclo, com a finalidade de se reparar o dano antes que ocorra a distribuição do material genético às células filhas. Caso o dano seja irreversível, a célula sofre processo apoptótico. Nesse contexto, p53 e E2F-1, desempenham um papel fundamental, de regular a parada e a continuação das fases do ciclo celular (CHEN, 2016).

Alguns estudos desenvolvidos nos últimos anos demonstram a capacidade de determinados derivados sintéticos 1,4-naftoquinonas promoverem alterações no ciclo celular de variados tipos de cânceres. Zhang e cols. (2019) observaram que duas 1,4-naftoquinonas sintéticas induziram apoptose na linhagem A549 de câncer de pulmão,

e pararam seu ciclo celular na fase G1. Gao e cols. (2018) mostraram que uma 1,4-naftoquinona sintética inibiu a viabilidade de 3 linhagens de carcinoma hepatocelular (HepG2, Hep3B e Huh7) e pararam seus ciclos na fase S.

O presente estudo demonstra que o derivado 1n diminuiu significativamente a população de GBM02 nas fases S e G2/M, e o 1e somente na fase G2/M. As lesões causadas ao DNA de GBM02 foram maiores após tratamento com 1n do que com 1e, o que corrobora, em parte, os níveis de indução de apoptose. Além disso o tratamento com 1n aumentou de maneira significativa o número de GBM02 na fase G0/G1, e com o 1e, na fase S, quando comparados ao controle. Estes resultados mostram que 1n promoveu uma parada do ciclo celular em G0/G1 e que 1e, em S, na tentativa de se reparar as lesões do DNA, ocorridas nas fases S e G2/M, respectivamente (Gráfico 3, página 65). Dessa forma, sugere-se que 1n possa agir modulando as atividades de p53 e/ou p21, e que 1e, modula E2F-1 e/ou p21. A realização de outros protocolos experimentais pode confirmar esta hipótese.

A TMZ aumentou significativamente o número de GBM02 na fase G2/M (Gráfico 3, página 65). Este resultado é compatível com o demonstrado por Hirose e cols. (2001), onde a TMZ ocasionou a parada do ciclo celular da linhagem U-87 de glioblastoma na fase G2/M, após 48 horas de tratamento. No presente trabalho, provavelmente, o tratamento com a TMZ promoveu danos brandos ao genoma de GBM02 na fase G2/M, que foram reparados pelo mecanismo de defesa da célula tumoral, e isso explica o fato da TMZ não ter induzido apoptose em GBM02.

O estresse oxidativo é um importante agente indutor de lesões no DNA que resultam em apoptose de células cancerígenas. A regulação dos níveis intracelulares de EROs ($O_2^-$, $OH^-$ e $H_2O_2$) é fundamental para a manutenção da homeostase das células tumorais, uma vez que níveis distintos geram respostas biológicas ambíguas. Em concentrações baixas, as EROS ajudam a manter o equilíbrio redox, estimulam a proliferação e invasão celular. Já quando são superexpressas contribuem para processos danosos, dentre eles, peroxidação lipídica, oxidação de proteínas, inativação de enzimas, lesões no DNA, que podem resultar em processo apoptótico (GORRINI; HARRIS; MAK, 2013; THANAN et al., 2015). Portanto, a capacidade de aumentar o estresse oxidativo de células tumorais é uma propriedade desejada em moléculas candidatas a fármacos anticancerígenos.

A p53, além de ter um papel importante na regulação das fases inicial e final do ciclo de proliferação de células cancerígenas, atua também na resposta celular ao

estresse oxidativo. Quando os níveis de EROs estão elevados, a p53 desempenha atividade pró-oxidante, ativando os fatores pró-oxidativos: gene 3 induzido por p53 (PIG3) e prolina oxidase. Além disso, inativa genes antioxidantes e aumenta a expressão de agentes indutores de apoptose celular, como a proteína X associada a Bcl-2 (BAX) e o modulador de apoptose regulado por p53 (PUMA) (LIU; XU, 2011).

Pesquisas realizadas recentemente mostram que algumas 1,4-naftoquinonas sintéticas detêm da capacidade de aumentar o estresse oxidativo de diferentes linhagens de células cancerígenas, e que este fato se relaciona diretamente com a indução de apoptose celular. Sadhukhan e cols. (2016) demonstraram que uma 1,4-naftoquinona sintética derivada da lausona, induziu estresse oxidativo em linhagem de células de glioma (CCF-4) e consequente processo apoptótico. Wang e cols. (2019) mostraram que duas 1,4-naftoquinonas sintéticas induziram estresse oxidativo na linhagem AGS de câncer gástrico, o que resultou em apoptose celular.

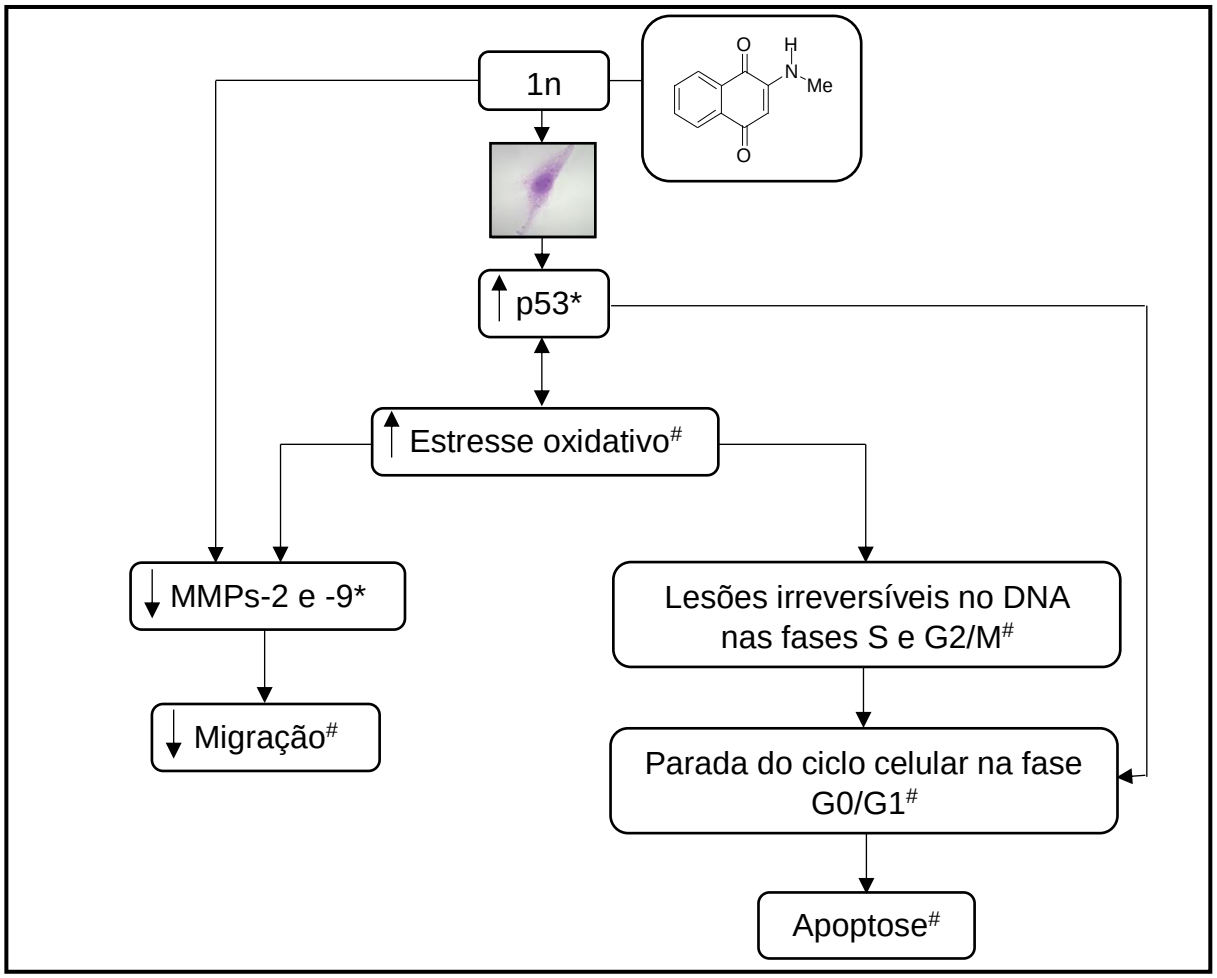
Os resultados do presente estudo mostram que somente o derivado 1n aumentou o estresse oxidativo de GBM02, quando comparado ao grupo controle (Gráfico 4, página 66). Este resultado em conjunto com o encontrado na avaliação dos efeitos dos derivados sobre o ciclo celular, torna ainda mais forte a hipótese de que 1n estaria agindo ativando p53, e que 1e não atua sobre esta proteína. Dessa forma, sugere-se que o aumento do estrese oxidativo de GBM02, promovido por 1n, pode ser o agente responsável pelos danos causados nas fases S e G2/M e consequente apoptose destas células tumorais (Figura 12). Outros testes devem ser realizados com o intuito de se descobrir o mecanismo exato pelo qual o derivado 1e promove a parada do ciclo celular e apoptose de GBM02, e confirmar se o 1n age realmente sobre p53.

Em resumo, foi observado neste trabalho que os derivados 2-*N,N'*-dialquilamino-1,4-naftoquinonas 1e, 1f, 1g, 1k e 1n inibiram de forma eficaz a viabilidade de GBM02 e foram mais seletivos para a célula tumoral do que para monócitos e linfócitos. Dentre eles, somente 1e e 1n apresentaram atividade antimigratória sobre GBM02. O derivado 1n induziu aumento de estresse oxidativo e esse parece ter sido o agente causador de lesões no DNA, que forçaram a parada do ciclo celular na fase G0/G1 e culminaram em processo apoptótico. O derivado 1e, por um mecanismo ainda desconhecido, promoveu danos ao DNA provocando a parada do ciclo na fase S, o que resultou em apoptose de GBM02.

Diante de todo o exposto, é possível afirmar que os derivados 2-*N,N'*-dialquilamino-1,4-naftoquinonas 1e e 1n são importantes protótipos moleculares

candidatos a fármacos antitumorais e especificamente sobre GBM humano, doença ainda sem tratamento capaz de gerar um aumento de sobrevida satisfatório.

**Figura 12 – Esquema representativo do possível mecanismo de ação antitumoral do derivado 2-*N,N'*-dialquilamino-1,4-naftoquinona 1n sobre GBM02**




Notas: Sugere-se que o derivado 1n entra na célula GBM02, ativa p53, e promove um desequilíbrio redox, levando ao aumento do estresse oxidativo. Essa via pode acontecer nos dois sentidos, já que o aumento do estresse oxidativo faz com que p53 desempenhe atividade pró-oxidante. O aumento das EROs resulta em lesões irreversíveis no DNA durante as fases S e G2/M do ciclo celular. p53 ativa p21 que promove a inibição do complexo ciclinaE-CDK2, regulando a progressão do ciclo celular na fase G0/G1, em uma tentativa de reparar os danos no genoma. Como as lesões no DNA são irreversíveis, 1n induz apoptose em GBM02. Além disso, é provável que a diminuição da migração de GBM02 seja consequência da inibição das atividades das MMPs -2 e -9, que pode ocorrer por meio de uma ação direta do derivado sobre as enzimas ou por influência do aumento do estresse oxidativo, ou ainda, das duas situações em conjunto. * Dados sugestivos, # Dados demonstrados experimentalmente.
Fonte: Autor (2019).

## 9 CONCLUSÃO

Com base nos resultados, é possível concluir que a maioria dos derivados 2-*N,N'*-dialquilamino-1,4-naftoquinonas apresentaram atividade antitumoral sobre GBM02, em modelos *in vitro*. Os derivados 1e e 1n foram os que mais se destacaram, ao induzirem apoptose da célula tumoral, inibirem a migração de GBM02 e serem menos tóxicos sobre células humanas saudáveis. Desse modo, sugere-se que esses protótipos participem de novos ensaios experimentais em etapas mais avançadas da cadeia de desenvolvimento de fármacos antitumorais, a fim de tornarem-se futuras opções terapêuticas para este tumor de elevada agressividade.

## 10 PERSPECTIVAS

No futuro, objetiva-se a realização de outros protocolos experimentais que respondam a algumas perguntas levantadas neste estudo. A participação das MMPs -2 e -9 nos efeitos antimigratórios dos derivados 1e e 1n poderá ser confirmada por imunocitoquímica. A identificação e quantificação de p53 poderá ser realizada por meio de western blotting, confirmando assim sua atuação na atividade antitumoral de 1n. A execução desta técnica também será importante para verificar se 1e atua inibindo as TOPO I e/ou II, e se esse é o agente causador de apoptose associada ao tratamento. Por fim, os mediadores das vias apoptóticas que sofrem ação destes dois derivados poderão ser demonstrados por citometria de fluxo.

## REFERÊNCIAS


AGNIHOTRI, S. et al. Glioblastoma, a brief review of history, molecular genetics, animal models and novel therapeutic strategies. **Archivum Immunologiae et Therapiae Experimentalis**, v. 61, p. 25 – 41, 2013.

ALEXANDER, B. M.; CLOUGHESY, T. F. Adult glioblastoma. **Journal of Clinical Oncology**, v. 35, n. 21, p. 2402 – 2410, 2017.

ALI, H. S. Impact of integration: Pharmaceutical medicinal chemistry and pharmacology. **Jounal of Pharmacology and Medicinal Chemistry**, v. 1, p. 1 – 11, 2017.

ALY, A. A. et al. Synthesis of novel 1,2-bis-quinolinyl-1,4-naphthoquinones: ERK2 inhibition, cytotoxicity and molecular docking studies. **Bioorganic Chemistry**, v. 81, p. 700 – 712, 2018.

ANJUM, K. et al. Current status and future therapeutic perspectives of glioblastoma multiforme (GBM) therapy: A review. **Biomedicine & Pharmacotherapy**, v. 92, p. 681 – 689, 2017.

ARAÚJO, M. V. et al. Evaluation on the leishmanicidal activity of 2-*N,N'*-dialkylamino-1,4-naphthoquinone derivatives. **Experimental Parasitology**, v. 176, p. 46 – 51, 2017.

ARJONA, D.; REY, J. A.; TAYLOR, S. M. Early genetic changes involved in low-grade astrocytic tumor development. **Current Molecular Medicine**, v. 6, p. 645 – 650, 2006.

AUM, D. J. et al. Molecular and cellular heterogeneity: the hallmark of glioblastoma. **Neurosurgical Focus**, v. 37, p. 1 – 11, 2017.

AWASTHI, B. P. et al. Plumbagin, a plant-derived naphthoquinone metabolite induces mitochondria mediated apoptosis-like cell death in *Leishmania donovani*: an ultrastructural and physiological study. **Apoptosis**, v. 21, p. 941 – 953, 2016.

BABULA, P. et al. Noteworthy secondary metabolites naphthoquinones – their occurrence, pharmacological properties and analysis. **Current Pharmaceutical Analysis**, v. 5, p. 47 – 68, 2009.

BADOLATO, M. et al. Discovery of 1,4-naphthoquinones as a new class of antiproliferative agents targeting GPR55. **ACS Medicinal Chemistry Letters**, v. 10, p. 402 – 406, 2019.

BATASH, R. et al. Glioblastoma Multiforme, diagnosis and treatment; recent literature review. **Current Medicinal Chemistry**, v. 24, p. 3002 – 3009, 2017.

BERETTA, G. L. et al. Synthesis and evaluation of new naphthalene and naphthoquinone derivatives as anticancer agents. **Archiv der Pharmazie**, v. 350, p. 1 – 15, 2017.

BERGO, E. et al. Neurocognitive functions and health-related quality of life in glioblastoma patients: a concise review of the literature. **European Journal of Cancer Care,** v. 28, p. 1 – 13, 2019.

BISWAS, S. K. Metabolic reprogramming of immune cells in cancer progression. **Immunity**, v. 43, p. 435 – 449, 2015.

BORTOLOTTO, L. F. B. Citotoxicity of *trans*-chalcone and licochalcone A against breast cancer cells is due to apoptosis induction and cell cycle arrest. **Biomedicine & Pharmacotherapy**, v. 85, p. 425 – 433, 2017.

BRANDÃO, G. C. et al. Antimalarial naphthoquinones. Synthesis via click chemistry, in vitro activity, docking to PfDHODH and SAR of lapachol-based compounds. **European Journal of Medicinal Chemistry**, v. 145, p. 191 – 205, 2018.

BRANDES, A. A. et al. Practical management of bevacizumab-related toxicities in glioblastoma. **The Oncologist**, v. 20, p. 166 – 175, 2015.

BRASIL. Ministério da Saúde. Departamento de Informática do SUS. **Sistema de informações sobre mortalidade**. Brasília, DF, 2017. Disponível em: http://www.datasus. gov.br. Acesso em 24 de setembro de 2019.

BRAY et al. Global cancer statistics 2018: GLOBOCAN estimates of incidence and mortality worldwide for 36 cancers in 185 countries. **CA: A cancer journal for clinicians**, v. 68, p. 394 – 424, 2018.

BRENNAN, C. W. et al. TCGA Research network: the somatic genomic landscape of glioblastoma. **Cell**, v. 155, p. 462 – 477, 2013.

BROWN, T. J. et al. Association of the extent of resection with survival in glioblastoma: a systematic review and meta-analysis. **The Journal of the American Medical Association Oncology**, v. 2, p. 1460 – 1469, 2016.

CAI, Y. et al. Recent advances in anticancer activities and drug delivery systems of tannins. **Medicianl Research Reviews**, v. 37, n. 4, p. 665 – 701, 2017.

CARLSSON, S. K.; BROTHERS, S. P.; WAHLESTEDT, C. Emerging treatment strategies for glioblastoma multiforme. **EMBO Molecular Medicine**, v. 6, n. 11, p. 1359 – 1370, 2014.

CACHÓN, A. H. U. et al. Naphthoquinones isolated from *Diospyros anisandra* exhibit potent activity against pan-resistant first-line drugs Mycobacterium tuberculosis strains. **Pulmonary Pharmacology & Terapeutics**, v. 27, p. 114 – 120, 2014.

CERELLA, C. et al. From nature to bedside: Pro-survival and cell death mechanisms as therapeutic targets in cancer treatment. **Biotechnology Advances**, v. 32, p. 1111 – 1122, 2014.

CERELLA, C. et al. Roles of apoptosis and cellular senescence in cancer and aging. **Current Drug Targets**, v. 17, p. 405 – 415, 2016.

CHANG, L. et al. Treating malignant glioma in Chinese patients: update on temozolomide. **OncoTargets and Therapy**, v. 7, p. 235 – 244, 2014.

CHEN, J. The cell-cycle arrest and apoptotic functions of p53 in tumor initiation and progression. **Cold Spring Harbor Perspectives in Medicine**, v. 6, p. 1 – 15, 2016.

CHETTY, C. et al. MMP-9 induces CD44 cleavage and CD44 mediated cell migration in glioblastoma xenograft cells. **Cellular Signalling**, v. 24, p. 549 – 559, 2012.

CHIEN, C. M. Naphtho[1,2-b]furan-4,5-dione induces apoptosis of oral squamous cell carcinoma: involvement of EGF receptor/PI3K/Akt signaling pathway. **European journal of pharmacology**, v. 636, p. 52 – 58, 2010.

CHRISTMANN, M. et al. O(6)-Methylguanine-DNA methyltransferase (MGMT) in normal tissues and tumors: enzyme activity, promoter methylation and immunohistochemistry. **Biochimica et Biophysica Acta**, v. 1816, n. 2, p. 179 – 190, 2011.

COHEN, M. H.; JOHNSON, J. R.; PAZDUR, R. Food and Drug Administration Drug approval summary: temozolomide plus radiation therapy for the treatment of newly diagnosed glioblastoma multiforme. **Clinical Cancer Research**, v. 11, p. 6767 – 6771, 2005.

COHEN, M. H. et al. FDA drug approval summary: bevacizumab (Avastin) as treatment of recurrent glioblastoma multiforme. **The Oncologist**, v. 14, p. 1131 – 1138, 2009.

CRAGG, G. M.; PEZUTTO, J. M. Natural products as a vital source for the discovery of cancer chemotherapeutic and chemopreventive agents. Medical Princples and practice, v. 25, n.2, p. 41 – 59, 2016.

CRESPO I. et al. Detailed characterization of alterations of chromosomes 7, 9, and 10 in glioblastomas as assessed by single-nucleotide polymorphism arrays. **The Journal of Molecular Diagnostics**, v. 13, p. 634 – 647, 2011.

CRETU, F. M. et al. Biological evaluation of two 1,4-naphthoquinone derivatives against a breast human adenocarcinoma cell line. **Current Health Sciences Journal**, v. 43, n. 4, p. 335 – 339, 2017.

CROCETTI, E. et al. Epidemiology of glial and non-glial brain tumours in Europe. **European Journal of Cancer**, v. 48, p. 1532 – 1542, 2012.

DARBAND, S. G. et al. Quercetin: a functional dietary flavonoid with potential chemo-preventive properties in colorectal cancer. **Journal of Cellular Physiology**, v. 233, p. 6544 – 6560, 2018.

DAS, S. et al. Highly functionalized piperidines: free radical scavenging, anticancer activity, DNA interaction and correlation with biological activity. **Journal of Advanced Research**, v. 9, p. 51 – 61, 2018.

DAVID, C. C. et al. Synthesis of new 2-*N,N'*-dialkylamino-1,4-naphthoquinone derivatives: concerning the reactivity of lapachol with secondary amines. **Revista Virtual de Química**, v. 7, n. 2, p. 752 – 764, 2015.

DAVIS, M. E. Glioblastoma: Overview of disease and treatment. **Clinical Journal of Oncology Nursing**, v. 20, n. 5, p. 1 – 14, 2016.

DIAO, P. C. et al. Synthesis and biological evaluation of novel indole-pyrimidine hybrids bearing morpholine and thiomorpholine moieties. **European Journal of Medicinal Chemistry**, v. 134, p. 110 – 118, 2017.

DONG, M. et al. Naphthoquinones from *Onosma paniculatum* with potential anti-inflammatory activity. **Planta Médica**, v. 83, p. 631 – 635, 2017.

DUAN, R. et al. HOXA13 is a potencial GBM diagnostic marker and promotes glioma invasion by activating the Wnt and TGF-β pathways. **Oncotarget**, v. 6, n. 29, p. 27778 – 27793, 2015.

ELLOR, S. V.; PAGANO-YOUNG, T. A.; AVGEROPOULOS, N. G. Glioblastoma: Background, standard treatment paradigms, and supportive care considerations. **The Journal of Law, Medicine, & Ethics**, v. 42, p. 171 – 182, 2014.

ERAYESS, R.; EL-HAK, H. N. G. Anticancer natural products: a review. **Cancer Studies and Molecular Medicine**, v. 5, p. 14 – 25, 2019.

FAKHOURY, M. Drug delivery approaches for the treatment of glioblastoma multiforme. **Artificial Cells, Nanomedicine and Biotechnology**, v. 44, p. 1365 – 1373, 2016.

FERREIRA, L. G.; OLIVA, G.; ANDRICOPULO, A. D. From medicinal chemistry to human health: current approaches to drug discovery for cancer and neglected tropical diseases. **Anais da Academia Brasileira de Ciências**, v. 90, p. 645 – 661, 2018.

FRANCESCHI, E.; MINICHILLO, S.; BRANDES, A. A. Pharmacotherapy of glioblastoma: established treatments and emerging concepts. **CNS Drugs**, v. 31, n. 8, p. 675 – 684, 2017.

FREITAS, T. A. **Análise de processos celulares em linhagens de GBM tratadas com complexos de rutênio associados a AINEs e seu impacto na via de eicosanoides.** Tese de Doutorado em Biologia Celular e Tecidual do Instituto de Ciências Biomédicas da Universidade de São Paulo, 2017.

FRIEDMAN, H. S. et al. Bevacizumab alone and in combination with irinotecan in recurrent glioblastoma. **Journal of Clinical Oncology**, v. 27, n. 28, p. 4733 – 4740, 2009.

FRIEDMANN-MORVINSKI D. et al. Dedifferentiation of neurons and astrocytes by oncogenes can induce gliomas in mice. **Science**, v. 338, n. 6110, p. 1080 – 1084, 2012.

FUEYO, J. et al. Preclinical characterization of the antiglioma activity of a tropism-enhanced adenovirus targeted to the retinoblastoma pathway. **Journal of the National Cancer Institute**, v. 95, p. 652 – 660, 2003.

FULDA, S. Targeting extrinsic apoptosis in cancer: challenges and opportunities. **Seminars in Cell & Developmental Biology**, v. 39, p. 20 – 25, 2015.

FURNARI, F. B. et al. Malignant astrocyticglioma: Genetics, biology, and paths to treatment. **Genes & Development**, v. 21, p. 683 – 710, 2007.

FUTURO, D. O. et al. The Antifungal Activity of Naphthoquinones: An Integrative Review. **Anais da Academia Brasileira de Ciências**, v. 90, p. 1187 – 1214, 2018.

GALLEGO, O. Nonsurgical treatment of recurrent glioblastoma. **Current Oncology**, v. 22, n. 4, p. 273 – 281, 2015.

GAO, X. et al. Anti-malarial atovaquone exhibits anti-tumor effects by inducing DNA damage in hepatocellular carcinoma. **American Journal of Cancer Reasearch**, v. 8, n. 9, p. 1697 – 1711, 2018.

GEIGER, H. et al. Mutagenic potential of temozolomide in bone marrow cells in vivo. **Blood Journal**, v. 107, p. 3010 – 3011, 2006.

GERSEY, Z. C. et al. Curcumin decreases malignant characteristics of glioblastoma stem cells via induction of reactive oxygen species. **Biomed Central Cancer**, v. 17, n. 99, p. 1 – 11, 2017.

GENOTYPE-TISSUE EXPRESSION (GTEX). **GTEX histology viewer**. Disponível em: https://www.gtexportal.org/home/histologyPage. Acesso em: 04 de dezembro de 2019.

GIL-GIL, M. J. et al. Bevacizumabe for the treatment of glioblastoma. **Clinical Medicine Insights: Oncology**, v. 7, p. 123 – 135, 2013.

GLASER, T. et al. Targeted nanotechnology in glioblastoma multiforme. **Frontiers in Pharmacology**, v. 8, p. 1 – 14, 2017.

GOKMEN, Z. et al. Synthesis and investigation of cytotoxicity of new N- and S,S-substituted-1,4-naphthoquinone (1,4-NQ) derivatives on selected cancer lines. **Synthetic Communications**, v. 49, p. 3008 – 3016, 2019.

GOLDBECKER, A. et al. Hepatic encephalopathy after treatment with temozolomide. **Journal of Neuro-Oncology**, v. 103, p. 163 – 166, 2011.

GOLDEN, E. B.; APETOH, L. Radiotherapy and immunogenic cell detah. **Seminars in Radiation Oncology**, v. 25, p. 11 – 17, 2015.

GOLMAKANIYOON, S. et al. Synthesis, characterization and *in-vitro* evaluation of novel naphthoquinone derivatives and related imines: identification of new anticancer leads. **Iranian Journal Pharmaceutical Research**, v. 18, n. 1, p. 16 – 29, 2019.

GORRINI, C.; HARRIS, I. S.; MAK, T. W. Modulation of oxidative stress as an anticancer strategy. **Nature Reviews Drug Discovery**, v. 12, p. 931 – 947, 2013.

GOULART, M.O.F. et al. Electrochemical studies of isolapachol with emphasis on oxygen interaction with its radical anions. **Journal of Electroanalytical Chemistry**, v. 566, p. 25 – 29, 2004.

GREWAL, J. et al. Fatal reactivation of hepatitis B with temozolomide. **The New England Journal of Medicine**, v. 356, p. 1591 – 1592, 2007.

GUAN, X. et al. Reactive astrocytes in glioblastoma multiforme. **Molecular Neurobiology**, v. 58, n. 8, p. 6927 – 6938, 2018.

HAGEMANN, C. et al. A complete compilation of matrix metalloproteinase expression in human malignant gliomas. **World Journal of Clinical Oncology**, v. 3, n. 5, p. 67 – 79, 2012.

HAN, S. P. et al. SNAI1 is involved in the proliferation and migration of glioblastoma cells. **Cellular and Molecular Neurobiology**, v. 31, p. 489 – 496, 2011.

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

HANIF, F. et al. Glioblastoma multiforme: A review of its epidemiology and pathogenesis through clinical presentation and treatment. **Asian Pacific Journal of Cancer Prevention**, v. 18, n. 1, p. 3 – 9, 2018.

HARDER, B. G. et al. Developments in blood-brain barrier penetrance and drug repurposing for improved treatment of glioblastoma. **Frontiers in Oncology**, v. 8, p. 1 – 10, 2018

HE, X. et al. MicroRNA-181c inhibits glioblastoma cell invasion, migration and mesenchymal transition by targeting TGF-β pathway. **Biochemical and Biophysical Research Communications**, v. 469, p. 1041 – 1048, 2016.

HERR, I.; DEBATIN, K. M. Cellular stress response and apoptosis in cancer therapy. **Blood**, v. 98, n. 9, p. 2603 – 2614, 2001.

HIROSE, Y.; BERGER, M. S.; PIEPER, R. O. p53 effects both the duration of G2/M arrest and the fate of temozolomide-treated human glioblastoma cells. **Cancer Research**, v. 61, p. 1957 – 1963, 2001.

HOUBEN, M. P. et al. Gliomas: the role of environmental risk factors and genetic predisposition. **Nederlands Tijdschrift voor Geneeskunde**, v. 149, p. 2268 – 2272, 2005.

HUANG, C.; FRETER, C. Lipid metabolismo, apoptosis and cancer therapy. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 16, p. 924 – 949, 2015.

HUANG, G. et al. Cerium (IV) ammonium nitrate (CAN)-mediated regioselective synthesis and anticancer activity of 6-substituted 5,8-dimethoxy-1,4-naphthoquinone. **Chinese Chemical Letters**, v. 28, p. 1553 – 1558, 2017.

HUANG, G. et al. Discovery and synthesis of sulfur-containing 6-substitued-5,8-dimethoxy-1,4-naphthoquinone oxime derivatives as new and potential anti-MDR cancer agents. **European Journal of Medicinal Chemistry**, v. 165, p. 160 – 171, 2019.

IBIS, C. et al. Synthesis, antibacterial nad antifungal evaluation of thio-or piperazinyl-substituted1,4-naphthoquinone derivatives. **Journal of Sulfur Chemistry**, v. 37, n. 5, p. 477 – 487, 2016.

INSTITUTO NACIONAL DO CÂNCER (INCA). **Estimativa 2018: incidência de câncer no Brasil**. Informações da Coordenação de prevenção e vigilância, Rio de Janeiro, 2017. Disponível em: http://www1.inca.gov.br/estimativa/2018/estimativa-2018. Acesso em: 25 de setembro de 2019.

JANG, S. Y. et al. Shikonin blocks migration and invasion of human breast cancer cells through inhibition of matrix metalloproteinase-9 activation. **Oncology Reports**, v. 31, p. 2827 – 2833, 2014.

JIGISHA, P. et al. Epidemiologic and molecular prognostic review of glioblastoma. **Cancer Epidemiology, Biomarkers & Prevention**, v. 23, p. 1985 – 1986, 2014.

JOSHI, P.; VISKWAKARMA, R. A.; BHARATE, S. B. Natural alkaloids as P-gp inhibitors for multidrug resistance reversal in cancer. **European Journal of Medicinal Chemistry**, v. 138, p. 273 – 292, 2017.

KALLURI, R.; WEINBERG, R. A. The basics of epithelial-mesenchymal transition. **The Journal of Clinical Investigation**, v. 119, n. 6, p. 1420 – 1428, 2009.

KALOSHI, G. et al. Bevacizumab alone at 5 mg/kg in an every-3-week schedule for patients with recurrent glioblastomas: a single center experience. **Tumori Journal**, v. 99, n. 5, p. 601 – 603, 2013.

KAMEI, H. et al. Inhibition of cell growth in culture by quinones. **Cancer biotherapy & radiopharmaceuticals**, v. 13, p. 185 – 188, 1998.

KANER, R. A. et al. Anticancer metallohelices: nanomolar potency and high selectivity. **Chemical Science**, v. 7, p. 951 – 958, 2016.

KARACAS, D. et al. A novel 1,4-naphthoquinone-derived compound induces apoptotic cell death in breast cancer human. **Turkish Journal of Biology**, v. 43, p. 256 – 263, 2019.

KIEVIT, F. M. et al. Nanoparticle-mediated knockdown of DNA repair sensitizes cells to radiotherapy and extends survival in a genetic mouse model of glioblastoma. **Nanomedicine**, v. 13, p. 2131 – 2139, 2017.

KIM, S. S. et al. A nanoparticle carrying the p53 gene targets tumors including cancer stem cells, sensitizes glioblastoma to chemotherapy and improves survival. **American Chemical Society Nano**, v. 8, p. 5494 – 5514, 2014.

KIM, S. S. et al. Effective treatment of glioblastoma requires crossing the blood-brain barrier and targeting tumors including cancer stem cells: The promise of nanomedicine. **Biochemical and Biophysical Research Communication**. v. 468, p. 485 – 489, 2015.

KINGHORN, A. D.; CHIN, Y. W.; SWANSON, S. M. Discovery of natural product anticancer agents from biodiverse organisms. **Current Opinion in Drug Discovery and Development**, v. 12, p. 189 – 196, 2009.

KISHORE, N. et al. Citotoxicity of synthesized 1,4-naphthoquinone analogues on selected human cancer cells lines. **Bioorganic & Medicinal Chemistry**, v. 22, p. 5013 – 5019, 2014.

KRISHNAN, P.; BASTOW, K. F. Novel mechanism of cellular DNA topoisomerase II inhibition by the pyranonaphthoquinone derivatives alpha-lapachone and beta-lapachone. **Cancer Chemotherapy and Pharmacology**, v. 47, p. 187 – 198, 2001.

KUMAGAI, Y. et al. The chemical biology of naphthoquinones and Its environmental implications. **Annual Review of Pharmacology and Toxicology**, v. 52, p. 221 – 247, 2012.

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

LACHANCE, D. H. et al. Associations of high-grade glioma with glioma risk alleles and histories of allergy and smoking. **American Journal of Epidemiology**, v. 174, p. 574 – 581, 2011.

LAI, S. W. et al. Differential caracterization of temozolomide-resistant human glioma cells. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 127, p. 1 – 14, 2018.

LAPENNA, S.; GIORDANO, A. Cell cycle kinases as therapeutic targets for cancer. **Nature Reviews Drug Discovery**, v. 8, p. 547 – 566, 2009.

LATHIA, D. et al. Cancer stem Cells in glioblastoma. **Genes & Development**, v. 29, p. 1203 – 1217, 2015.

LAU, D.; MAGILL, S. T.; AGHI, M. K. Molecularly targeted therapies for recurrent glioblastoma: current and future targets. **Neurosurgical Focus**, v. 37, n. 6, p. 1- 16, 2014.

LEE, B. S. et al. Reactive oxygen species responsive nanoprodrug to treat intracranial glioblastoma. **American Chemical Society Nano**, v. 7, p. 3061 – 3077, 2013.

LEE, C. Y. Strategies of temozolomide in future glioblastoma treatment. **OncoTargets and Therapy**, v. 10, p. 265 – 270, 2017.

LEE, J. H. et al. Down-regulation of cyclooxygenase-2 and telomerase activity by beta-lapachone in human prostate carcinoma cells. **Pharmacological Research**, v. 51, p. 553 – 560, 2005.

LEE, S. Y. Temozolomide resistance in glioblastoma multiforme. **Genes and Diseases**, v. 3, p. 198 – 210, 2016

LEE, D. H. et al. Advances in epigenetic glioblastoma therapy. **Oncotarget**, v. 8, n. 11, p. 18577 – 18589, 2017.

LEYVA, E. et al. Synthesis and studies of the antifungal activity of 2anilino-/2,3-dianilino-/2-phenoxy- and 2,3-diphenoxy1,4-naphthoquinones. **Research on Chemichal Intermediates**, v. 43, p. 1813 – 1827, 2017.

LI, B. et al. Landscape of tumor infiltrating T cell repertoire of human cancers. **Nature Genetics**, v. 48 p. 725 – 732, 2016.

LI, C. J.; AVERBOUKH, L.; PARDEE, A. B. Beta-Lapachone, a novel DNA topoisomerase I inhibitor with a mode of action different from camptothecin. **The Journal of Biological Chemistry**, v. 268, p. 22463 – 22468, 1993.

LI, D. et al. Health benefits of anthocyanins and molecular mechanisms: Update from recent decade. **Critical Reviews in Food Science and Nutrition**, v. 57, n. 8, p. 1729 – 1741, 2017.

LI, G. et al. Extended use of temozolomide for glioma patients based on MGMT expression pattern: experience of 32 cases. **Chinese Journal of Neuro-Oncology**, v. 10, p. 158 – 165, 2012.

LI, G.; LOU, H. X. Strategies to diversify natural products for drug discovery. **Medicinal Research Reviews**, v. 38, p. 1255 – 1294, 2018.

LI, K. et al. Target ROS to induce apoptosis and cell cycle arrest by 5,7-dimethoxy1,4-naphthoquinone derivative. **Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters**, v. 28, p. 273 – 277, 2018.

LIEBERHERR, C. et al. The plant-derived naphthoquinone Droserone inhibits *in vitro* measles virus infection. **Planta Medica**, v. 83, p. 232 – 238, 2017.

LIEW, K. et al. 2-Methoxy-1,4-Naphthoquinone (MNQ) suppresses the invasion and migration of a human metastatic breast cancer cell line (MDA-MB-231). **Toxicology in Vitro**, v. 28, p. 335 – 339, 2014.

LIM, M. et al. Current state of immunotherapy for glioblastoma. **Nature Reviews Clinical Oncology**, v. 15, p. 422 – 444, 2018.

LIMA, F. R. S. et al. Glioblastoma: Therapeutic challenges, what lies ahead. **Biochimica et Biophysica Acta**, v. 1826, p. 338 – 349, 2012.

LIU, C. et al. Novel 1,4-naphthoquinone derivatives induce apoptosis via ROS-mediated p38/MAPK, Akt and STAT3 signaling in human hepatoma Hep3B cells. **The International Journal of Biochemistry & Cell Biology**, v. 96, p. 9 – 19, 2018.

LIU, D.; XU, Y. p53, oxidative stress, and aging. **Antioxidants & Redox Signaling**, v. 15, n. 6, p. 1669 – 1678, 2011.

LOHMANN, P. et al. Combined Amino Acid Positron Emission Tomography and Advanced Magnetic Resonance Imaging in Glioma Patients. **Cancers**, v. 11, n. 153, p. 1 – 13, 2019.

LOMBA, L. A. A naphthoquinone from *Sinningia canescens* inhibits inflammation and fever in mice. **Inflammation**, v. 40, n. 3, p. 1051 – 1061, 2017.

LOMBARDI, M. Y.; ASSEM, M. Glioblastoma genomics: a very complicated story. In: VLESCHHOUWER, S. **Glioblastoma**. Brisbane, Australia: Codon Publications. 2017. p. 3 – 25.

LOPEZ, J.; TAIT, S. W. G. Mitochondrial apoptosis: killing cancer using the enemy within. **British Journal of Cancer**, v. 112, p. 957 – 962, 2015.

LOUIS, D. N. et al. The 2007 WHO classification of tumours of the central nervous system. **Acta Neuropathologica**, v. 114, n. 2, p. 97 – 109, 2007.

LOUIS, D. N. et al. The 2016 World Health Organization classification of tumors of the central nervous system: a summary. **Acta Neuropathologica**, v. 131, n. 6, p. 803 – 820, 2016.

LYANG, C. C.; PARK, A. Y.; GUAN, J. L. In vitro scratch assay: a convenient and inexpensive method for analysis of cell migration in vitro. **Nature Protocols**, v. 2, n. 2, p. 329 – 333, 2007.

MA, J. et al. Deep neural nets as a method for quantitative structure−activity relationships. **Journal of Chemical Information and Modeling**, v. 55, p. 263 – 274, 2015.

MAJIENE, D. et al. Comparison of the effect of native 1,4-naphthoquinones Plumbagin, Menadione, and Lawsone on viability, redox Status, and mitochondrial functions of C6 glioblastoma cells. **Nutrients**, v. 11, p. 1 – 12, 2019.

MALUMBERS, M.; BARBACID, M. Cell cycle, CDKs and cancer: a changing paradigma. **Nature Reviews Cancer**, v. 9, p. 153 – 166, 2009.

MANN, J. et al. Advances in radiotherapy for glioblastoma. **Frontiers in Neurology**, v. 8, p. 1 – 11, 2018.

MANSOURI, A.; KARAMCHANDANI, J.; DAS, S. Molecular genetics of secondary glioblastoma. In: VLESCHHOUWER, S. **Glioblastoma**. Brisbane, Australia: Codon Publications. 2017. p. 27 – 42.

MARTINS, A. et al. Marketed marine natural products in the pharmaceutical and cosmeceutical industries: tips for success. **Marine Drugs**, v. 12, p. 1066 – 1101, 2014.

MAUGERI, R. et al. Aquaporins and brain tumors. **International Journal of Molecular Sciences**, v.17, n. 1029, p. 1 – 18, 2016.

MELLO, C. P. P. et al. Aminomethylnaphthoquinones and HSV-1: in vitro and in silico evaluations of potencial antivirals. **Antiviral Therapy**, v. 21, p. 507 – 515, 2016.

MENDONÇA, D. V. C. Antileishmanial activity of a naphthoquinone derivate against promastigote and amastigote stages of *Leishmania infantum* and *Leishmania amazonensis* and its mechanism of action against *L. amazonensis* species. **Parasitology Research**, v. 117, p. 391 – 403, 2018.

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

MOTON, S. et al. Imaging genomics of glioblastoma: biology, biomarkers, and breakthroughs. **Topics in Magnetic Resonance Imaging**, v. 24, p. 155 – 163, 2015.

MRUGALA, M. M. Advances and challenges in the treatment of glioblastoma: a clinician's perspective. **Discovery Medicine**, v. 15, p. 221 – 230, 2013.

MU, Q. et al. Gemcitabine and Chlorotoxin Conjugated Iron Oxide Nanoparticles for Glioblastoma Therapy. **Journal of Materials Chemistry B**, v. 4, p. 32 – 36, 2016.

MURAKAMI, K. et al. Effect of hydroxy substituent on the prooxidant action of naphthoquinone compounds. **Toxicology in Vitro**, v. 24, 905 – 909, 2010.

NAM, J. Y.; GROOT, J. F. Treatment of glioblastoma. **Journal of Oncology Partice**, v. 13, n. 10, p. 629 – 639, 2017.

NARITA, Y. Bevacizumab for glioblastoma. **Therapeutics and Clinical Risk Management**, v. 11, p. 1759 – 1765, 2015.

NEUMAN, J. E. et al. Distinct Histomorphology in Molecular Subgroups of Glioblastomas in Young Patients. **Journal of Neuropathology & Experimental Neurology**, v. 75, n. 5, p. 408 – 414, 2016.

NEWMAN, D. J.; CRAGG, G. M. Natural products as sources of new drugs from 1981 to 2014. **Journal of Natural Products**, v. 79, n. 3, p. 629 – 661, 2016.

NGOC, T. M. et al. A new naphthoquinone analogue and antiviral constituents from the root of *Rhinacanthus nasutus*. **Natural Product Research**, v. 33, n. 3, p. 360 – 366, 2019.

NIEDER, C. et al. Treatment of unresectable glioblastoma multiforme. **Anticancer Research**. V. 1, n. 25, p. 4605 – 4610, 2005.

NIEDER, C. et al. Therapeutic options for recurrent high-grade glioma in adult patients: recente advances. **Critical Reviews in Oncology/Hematology**, v. 60, p. 181 – 193, 2006.

NIEDER, C.; ANDRATSCHKE, N. H.; GROSU, A. L. Re-irradiation for recurrent primary brain tumors. **Anticancer Research**, v. 36, p. 4985 – 4996, 2016.

NIKOLOV, V. et al. Factors affecting the survival of patients with glioblastoma multiforme. **Jounal of BUON**, v. 23, n. 1, p. 173 – 178, 2018.

NING, X. et al. Synthesis and antitumor activity of novel 2, 3didithiocarbamate substituted naphthoquinones as inhibitors of pyruvate kinase M2 isoform. **Journal of Enzyme Inhibition and Medicinal Chemistry**, v. 33, n. 1, p. 126 – 129, 2018.

NIRMALA, M. J.; SAMUNDEESWARI, A.; SANKAR, P. D. Natural plant resources in anti-cancer therapy - A review. **Research in Plant Biology**, v. 1, n. 3, p. 1 – 14, 2011.

NISHIJIMA, T. F. et al. Prognostic value of lymphocyte-to-monocyte ratio in patients with solid tumors: A systematic review and meta-analysis. **Cancer Treatment Reviews**, v. 41, p. 971 – 978, 2015.

NIZAMUTDINOV, D. et al. Prognostication of survival outcomes in patients diagnosed with glioblastoma. **World Neurosurgery**, v. 109, p. 67 – 74, 2018.

NURGALI, K.; JAGOE, R. T.; ABALO, R. Adverse effects of cancer chemotherapy: anything new to improve tolerance and reduce sequelae?. **Frontiers in Pharmacology**, v. 9, n. 245, p. 1 – 3, 2018.

OBERMEIER, B.; DANEMAN, R.; RANSOHFF, R. M. Development, maintenance and disruption of the blood-brain barrier. **Nature Medicine**, v. 19, p. 1584 – 1596, 2013.

OHGAKI, H. et al. Genetic pathways to glioblastoma: A population-based study. **Cancer Research**, v. 64, p. 6892 – 6899, 2004.

OHGAKI H, KLEIHUES P. The definition of primary and secondary glioblastoma. **Clinical Cancer Research**, v. 19, p. 764 – 772, 2013.

OLIVEIRA, A. S. et al. Antioxidant and antifungal activity of naphthoquinones dimeric derived from Lawsone. **Journal of Biosciences and Medicines**, v. 5, p. 39 – 48, 2017.

OMURO, A.; DEANGELIS, L. M. Glioblastoma and other malignant gliomas: a clinical review. **The Journal of the American Medical Association**, v. 310, p. 1842 – 1850, 2013.

OSTROM, Q. T. et al. CBTRUS Statistical Report: Primary brain and other central nervous system tumors diagnosed in the United States in 2010 – 2014. **Neuro-Oncology**, v. 19, n. 5, p. 1 – 88, 2017.

OSUKA, S.; VAN MEIER, E. G. Overcoming therapeutic resistance in glioblastoma: the way forward. **The Journal of Clinical Investigation**, v. 127, n. 2, p. 415 – 426, 2017.

PARK, H. J. et al. Inhibitory effects of a benz[f]indole-4,9-dione analog on cancer cell metastasis mediated by the down-regulation of matrix metalloproteinase expression in human HT1080 fibrosarcoma cells. **European Journal of Pharmacology**, v. 527, p. 31 – 36, 2005.

PATEL, A. P. et al: Single cell RNA-seq high lights intratumoral heterogeneity in primary glioblastoma. **Science**, v. 344, p. 1396 – 1401, 2014.

PAW, I. et al. Mechanisms regulating glioma invasion. **Cancer Letters**, v. 362, p. 1 – 7, 2015.

PEGG, A. E. Multifaceted roles of alkyltransferase and related proteins in DNA repair, DNA damage, resistance to chemotherapy, and research tools. **Chemical Research in Toxicology**, v. 24, n. 5, p. 618 – 639, 2011.

PEÑARANDA-FAJARDO, N. M.; MEIJER, C.; KRUYT, F. A. The endoplasmic reticulum stress/unfolded protein response in gliomagenesis, tumor progression and as a therapeutic target in glioblastoma. **Biochemical Pharmacology**, v. 118, p. 1 – 8, 2016.

PEREYRA, C. E. et al. The diverse mechanisms and anticancer potential of naphthoquinones. **Cancer Cell International**, v. 19, n. 207, p. 1 – 20, 2019.

PINGAEW, R. et al. Novel 1,4-naphthoquinone-based sulfonamides: synthesis, QSAR, anticancer and antimalarial studies. **European Journal Medicinal Chemistry**, v. 103, p. 446 – 459, 2015.

PLACZEK, W. J. et al. A Survey of the anti-apoptotic Bcl-2 subfamily expression in cancer types provides a platform to predict the efficacy of Bcl-2 antagonists in cancer therapy. **Cell Death & Desease**, v. 1, n. 5, p. 1 – 24, 2010.

POLIVKA, J. et al. Advances in experimental targeted therapy and immunotherapy for patients with glioblastoma multiforme. **Anticancer Research**, v. 37, p. 21 – 34, 2017.

QIU, H. Y. et al. Naphthoquinones: a continuing source for discovery of therapeutic antineoplastic agents. **Chemical Biology & Drug Design**, v. 91, p. 681 – 690, 2018.

RADHAKRISHNAN, S. K. et al. Constitutive expression of E2F-1 leads to p21-dependent cell cycle arrest in Sphase of the cell cycle. **Oncogene**, v. 23, p. 4173 – 4176, 2004.

RAVICHANDIRAN, P. et al. Synthesis and anticancer evaluation of 1,4-naphthoquinone derivatives containing a phenylaminosulfanyl moiety. **ChemMedChem**, v. 14, p. 532 – 544, 2019.

REDAELLI, M. et al. New naphthoquinone derivates against glioma cells. **European Journal of Medicinal Chemistry**, v. 96, p. 458 – 466, 2015.

REUSS, D. E. et al. Adult IDH wild type astrocytomas biologically and clinically resolve into other tumor entities. **Acta Neuropathologica**, v. 130, n. 3, p. 407 – 417, 2015.

RODER, C. et al. Maximizing the extent of resection and survival benefit of patients in glioblastoma surgery: High-field iMRI versus conventional and 5-ALA-assisted surgery. **European Journal of Surgical Oncology**, v. 40, p. 297 – 304, 2014.

ROOMI, M. W. et al. Modulation of MMP-2 and MMP-9 secretion by cytokines, inducers and inhibitors in human glioblastoma T-98G cells. **Oncology Reports**, v. 37, p. 1907 – 1913, 2017.

RYKEN, T. C. et al. The role of cytoreductive surgery in the management of progressive glioblastoma: a systematic review and evidence-based clinical practice guideline. **Journal of Neuro-Oncology**. v. 118, n. 3, p. 479 – 488, 2014.

SADANANDA, T. S. et al. Antimicrobial and antioxidant activities of endophytes from *Tabebuia argentea* and identification of anticancer agent (lapachol). **Journal of Medicinal Plants Research**, v. 5, n. 16, p. 3643 – 3652, 2011.

SADHUKHAN, P. et al. Selective pro-Apoptotic activity of novel 3,3'-(aryl/alkyl-methylene)bis(2hydroxynaphthalene-1,4-dione) derivatives on human cancer cells via the induction reactive oxygen species. **Plos One**, v. 11, n. 7, p. 1 – 22, 2016.

SALAH-UDDIN, A. B. M.; JARMI, T. **Neurologic manifestations of glioblastoma multiforme clinical presentation**. 2015. Disponível em: http://emedicine.medscape.com/ article/1156220-clinical. Acesso em: 27 de setembro de 2019.

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

SAMPSON, J. H.; MAUS, M. V.; JUNE, C. H. Immunotherapy for brain tumors. **Journal of Clinical Oncology**, v. 35, p. 1 – 7, 2017.

SANAL, N.; BERGER, M. S. Surgical oncology for gliomas: the state of the art. **Nature Reviews Clinical Oncology**, v. 15, p. 112 – 125, 2018.

SÁNCHEZ-CALVO, J. M. et al. Synthesis, antibacterial and antifungal activities of naphthoquinone derivatives: a structure–activity relationship study. **Medicinal Chemistry Research**, v. 25, p. 1274 – 1285, 2016.

SÁNCHEZ, L. M. Glioblastoma: Multidisciplinary treatment approaches. **Applied Radiation Oncoloy**, p. 17 – 25, 2016.

SCHEPETKIN, I. A. et al. Synthesis, anticancer activity, and molecular modeling of 1,4-naphthoquinones that inhibit MKK7 and Cdc25. **European Journal of Medicinal Chemistry**, v. 183, p. 1 – 13, 2019.

SCHWARTZBAUM, J. A. et al. An international case-control study of interleukin-4Ralpha, interleukin-13, and cyclooxygenase-2 polymorphisms and glioblastoma risk. **Cancer Epidemiology, Biomarkers & Prevention**, v. 16, p. 2448 – 2454, 2007.

SCHWARTZBAUM, J. A. et al. Inherited variation in immune genes and pathways and glioblastoma risk. **Carcinogenesis**, v. 31, p. 1770 – 1777, 2010.

SHEN, B. A new Golden age of natural products drug discovery. **Cell**, v. 163, p. 1297 – 1300, 2015.

SHIN, S. et al. Anticancer activity of 2-amino-substituted-1,4-naphthoquinone derivatives in ovarian cancer cells. **Bulletin of the Korean Chemical Society**, v. 38, p. 1411 – 1414, 2017.

SILVA, F. C.; FERREIRA, V. F. Natural naphthoquinones with great importance in medicinal chemistry. **Current Organic Synthesis**, v. 13, p. 334 – 371, 2016.

SINGH, D. K.; LUQMAN, S. *Lawsonia inermis* (L.): A perspective on anticancer potential of Mehndi/Henna. **Biomedical Research and Therapy**, v. 1, n. 4, p. 112 – 120, 2014.

SINGH, M.; JADHAV, H. R.; KUMAR, A. Design, synthesis and in vitro evaluation of piperazine incorporated novel anticancer agentes. **Letters in Drug Design & Discovery**, v. 15, p. 866 – 874, 2018.

SMOLL, N. R.; SCHALLER, K.; GAUTSCHI, O. P. Long-term survival of patients with glioblastoma multiforme (GBM). **Journal of Clinical Neuroscience**, v. 20, p. 670 – 675, 2013.

SPENCER, K. et al. Palliative radiotherapy. **British Medical Journal**, v. 360, p. 1 – 12, 2018.

SPRATT, D. E. et al. Temporal relationship of post-operative radiotherapy with temozolomide and oncologic outcome for glioblastoma. **Journal of Neuro-oncology**, v. 116, p. 357 – 363, 2014.

STEWART, B. W.; WILD, C. P. (Ed.). **World Cancer Report: 2014**. Lyon: IARC, 2014.

STOYANOV, G. S. et al. Correlation between Ki-67 index, World Health Organization grade and patient survival in glial tumors with astrocytic differentiation. **Cureus**, v. 9, n. 6, p. 1 – 14, 2017.

STUPP, R. et al. Radiotherapy plus concomitant and adjuvant temozolomide for glioblastoma. **The New England Journal of Medicine**, v. 352, p. 987 – 996, 2005.

STURM, D. et al. Pediatric and adult glioblastoma: Multiform (epi) genomic culprits emerge. **Nature Reviews Cancer**, v. 14, n. 2, p. 92 – 107, 2014.

SUCHORSKA, B. Complete resection of contrast-enhancing tumor volume is associated with improved survival in recurrent glioblastoma-results from the DIRECTOR trial. **Neuro-Oncology**, v. 18, p. 549 – 556, 2016.

SUNDAR, S. J. et al. The role of cancer stem cells in glioblastoma. **Neurosurgical Focus**, v. 37, p. 1 – 9, 2014.

TABRIZI, L.; CHINIFOROSHAN, H. Designing new iridium (III) arene complexes of naphthoquinone derivatives as anticancer agents: a structure–activity relationship study. **The Royal Society of Chemistry**, v. 46, p. 2339 – 2349, 2017.

TAHA, M. et al. Morpholine hydrazone scaffold: synthesis, anticâncer activity and docking studies. **Chinese Chemical Letters**, v. 28, p. 607 – 611, 2017.

TAMIMI, A. F. et al. Epidemiology of malignant and non-malignant primary brain tumors in Jordan. **Neuroepidemiology**, v. 45, p. 100 – 108, 2015.

TANG, D. et al. Pharmacokinetic properties and drug interactions of apigenin, a natural flavone. **Expert Opinion on Drug Metabolism & Toxicology**, v. 13, p. 323 – 330, 2017.

TAYLOR, R. C.; CULLEN, S. P.; MARTIN, S. J. Apoptosis: controlled demolition at the cellular level. **Molecular Cell Biology**, v. 9, p. 231 – 241, 2008.

THAKKAR, J. P. et al. Epidemiologic and molecular prognostic review of Glioblastoma. **Cancer Epidemiology, Biomarkers & Prevention**, v. 23, p. 1985 – 1996, 2014.

THANAN, R. et al. Oxidative stress and its significant roles in neurodegenerative diseases and cancer. **International Journal of Molecular Science**, v. 16, p. 193 – 217, 2015.

THOMAS, A. et al. Temozolamide in the era of precisison medicine. **Cancer Research**, v. 77, p. 823 – 826, 2017.

THOMAS, R. P.; RECHT, L.; NAGPAL, S. Advances in the management of glioblastoma: the role of temozolomide and MGMT testing. **Clinical Pharmacology: Advances and Applications**, v. 5, p. 1 – 9, 2013.

TONGE, P. J. Drug−target kinetics in drug discovery. **ACS Chemical Neuroscience**, v. 9, p. 29 – 39, 2018.

TYAGI, V. et al. Traumatic brain injury and subsequent glioblastoma development: Review of the literature and case reports. **Surgical Neurology Internantional**, v. 7, n. 78, p. 1 – 19, 2016.

UHLEN, M. et al. A pathology atlas of cancer transcriptome. **Science**, v. 357, n.660, p. 1 – 11, 2017.

ULMER, A. J. et al. Isolation and subfractionation of human peripheral blood mononuclear cells (PBMC) by density gradient centrifugation on percoll. **Immunobiology**, v. 166, p. 238 – 250, 1984.

VALENÇA, W. O. et al. Synthesis of quinone-based N-sulfonyl-1,2,3-triazoles: chemical reactivity of Rh (II) azavinyl carbenes and antitumor activity. **Medicinal Chemistry & Drug Discovery**, v. 2, p. 4301 – 4308, 2017.

VERHAAK, R. G. et al. Integrated genomic analysis identifies clinically relevant subtypes of glioblastoma characterized by abnormalities in PDGFRA, IDH1, EGFR, and NF1. **Cancer Cell**, v. 17, p. 98 – 110, 2010.

VIANA, M. D. M. **Atividade imunomoduladora de derivado sintético**. Tese de doutorado em ciências da saúde. Universidade Federal de Alagoas, 2019.

VILLANO, J. L.; SEERY, T. E.; BRESSLER, L. R. Temozolomide in malignant gliomas: current use and future targets. **Cancer Chemotherapy and Pharmacology**, v. 64, p. 647 – 55, 2009.

VUKIC, M. D. et al. Antibacterial and cytotoxic activities of naphthoquinone pigments from *Onosma visianii* Clem. **Experimental and Clinical Sciences**, v. 16, p. 73 – 88, 2017.

XU, H. et al. Inhibitory effects of lapachol on rat C6 glioma in vitro and in vivo by targeting DNA topoisomerase I and topoisomerase II. **Journal of Experimental & Clinical Cancer Research**, v. 35, n. 178, p. 1 – 10, 2016.

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. **Molecular Medicine Reports**, v. 20, p. 2571 – 2582, 2019.

WANG, S. H. et al. Synthesis and biological evaluation of lipophilic 1,4-naphthoquinone derivatives against human cancer cell lines. **Molecules**, v. 20, p. 11994 – 12015, 2015.

WANG, Y. et al. Polychlorinated biphenyl quinones promotes breast cancer metastasis through reactive oxygen species-mediated nuclear factor κB-Matrix metalloproteinase signaling. **Chemical Research in Toxicology**, v. 31, p. 954 – 963, 2018.

WELLER, M. et al. Standards of care for treatment of recurrent glioblastoma--are we there yet? **Neuro-Oncology**, v. 15, p. 4 – 27, 2013.

WELLER, M. et al. EANO guideline for the diagnosis and treatment of anaplastic gliomas and glioblastoma. **The Lancet Oncology**, v. 15, n. 9, p. 395 – 403, 2014.

WELLINGTON, K. W. Understanding cancer and the anticancer activities of naphthoquinones – a review. **The Royal Society of Chemistry**, v. 5, p. 20309 – 20338, 2015.

WELLINGTON, K. W. et al. Anticancer activity, apoptosis and a structure-activity analysis of a series of 1,4-naphthoquinone-2,3-bis-sulfides. **Investigational New Drugs**, p. 1 – 13, 2019.

WESOLOWSKI, J. R.; RAJDEV, P.; MUKHERJI, S. K. Temozolamide (temodar). American Journal of Neuroradiology, v. 31, p. 1383 – 1384, 2010.

WICK, W. et al. Treatment of glioblastoma in adults. **Neuro-Oncology**, v. 11, p. 1 – 13, 2018.

WRENSCH, M. et al. Variants in the CDKN2B and RTEL1 regions are associated with highgrade glioma susceptibility. **Nature Genetics**, v.41, p. 905 – 908, 2009.

YAO, C. X. et al. Clinical effect of intensity modulated radiation therapy combined with concomitant and adjuvant temozolomide in the treatment for malignant glioma. **China Cancer Journal**, v. 22, p. 238 – 240, 2013.

YAN, H. et al. IDH1 and IDH2 mutations in gliomas. **The New England Journal of medicine**, v. 360, p. 765 – 773, 2009.

YAN, Y. et al. Targeting autophagy to sensitive glioma to temozolomide treatment. **Journal of Experimental & Clinical Cancer Research**, v. 35, n. 23, p. 1 – 14, 2016.

YANG, C. et al. Shikonin exerts anti-inflammatory effects in LPS-induced mastitis by inhibiting NF-kB signaling pathway. **Biochemical and Biophysical Research Comunications**, v. 505, p. 1 – 6, 2018.

YOUNG, R. M. et al. Current trends in the surgical management and treatment of adult glioblastoma. **Annals of Translational Medicine**, v. 3, n. 9, p. 1 – 15, 2015.

YUNG, W. K. et al. Multicenter phase II trial of temozolomide in patients with anaplastic astrocytoma or anaplastic oligoastrocytoma at first relapse. Temodal Brain Tumor Group. **Journal of Clinical Oncology**, v. 17, n. 9, p. 2762 – 2771, 1999.

ZHANG, Y. et al. The design of 1,4-naphthoquinone derivatives and mechanisms underlying apoptosis induction through ROS-dependent MAPK/Akt/STAT3 pathways in human lung cancer cells. **Bioorganic & Medicinal Chemistry**, v. 27, p. 1577 – 1587, 2019

ZHEN, L. et al. Multiple extracranial metastases from secondary glioblastoma multiforme: a case report and review of the literature. **Journal of Neuro-oncology**, v. 99, p. 165 – 176, 2010.