



**UNIVERSIDADE FEDERAL DO AMAZONAS  
PRÓ-REITORIA DE PESQUISA E PÓS-GRADUAÇÃO  
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM INOVAÇÃO  
FARMACÊUTICA**

**KRÍSCIA MARIA ALBUQUERQUE PARENTE**

**COMPORTAMENTO DA 22- $\beta$  HIDROXITINGENONA EM MICROAMBIENTE  
TUMORAL TRIDIMENSIONAL EM CÉLULAS DE MELANOMA.**

Orientadora: Profa. Dra. Marne Carvalho de Vasconcellos  
Co-orientadora: Raquel Carvalho Montenegro

**MANAUS  
2023**

**UNIVERSIDADE FEDERAL DO AMAZONAS PRÓ-  
REITORIA DE PESQUISA E PÓS-GRADUAÇÃO  
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM INOVAÇÃO  
FARMACÊUTICA**

**Comportamento da 22- $\beta$  hidroxitingenona em microambiente tumoral tridimensional em células de melanoma**

Tese de doutorado apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Inovação Farmacêutica da Universidade Federal do Amazonas, como parte dos requisitos para obtenção do título de Doutor em Inovação Farmacêutica.

**KRISCIA MARIA ALBUQUERQUE PARENTE**

**Orientadora: Prof. Dra. Marne Carvalho de Vasconcellos  
Co-orientadora: Raquel Carvalho Montenegro**

**MANAUS  
2023**

## Ficha Catalográfica

Ficha catalográfica elaborada automaticamente de acordo com os dados fornecidos pelo(a) autor(a).

P228c Parente, Kríscia Maria Albuquerque  
Comportamento da 22-hidroxitengenona em microambiente tumoral tridimensional em células de melanoma / Kríscia Maria Albuquerque Parente . 2023  
127 f.: il.; 31 cm.

Orientador: Marne Carvalho de Vasconcelos  
Coorientador: Raquel Carvalho Montenegro  
Tese (Doutorado em Inovação Farmacêutica) - Universidade Federal do Amazonas.

1. Anticâncer. 2. Melanoma. 3. Salácia. 4. Esferoide. I. Vasconcelos, Marne Carvalho de. II. Universidade Federal do Amazonas III. Título

**“Estabelecimento de um modelo tridimensional e avaliação do comportamento da 22β-hidroxitigenona em células de melanoma”**

**DISCENTE: KRÍSCIA MARIA ALBUQUERQUE PARENTE**

**PARECER:**

Esta tese foi julgada adequada para a obtenção do título de Doutor em Inovação Farmacêutica em sua forma final e definitiva pelo Programa de Pós-Graduação em Inovação Farmacêutica da Universidade Federal do Amazonas.

Manaus - AM, 30/06/2023.

Documento assinado digitalmente  
 EMERSOM SILVA LIMA  
Data: 08/08/2023 10:50:16-0300  
Verifique em <https://validar.iti.gov.br>

**Prof. Dr. Emersom Silva Lima**  
Coordenador do PPGIF/ Membro

**A mesma foi apresentada perante a banca composta pelos seguintes professores:**

Documento assinado digitalmente  
 MARNE CARVALHO DE VASCONCELLOS  
Data: 03/08/2023 16:30:35-0300  
Verifique em <https://validar.iti.gov.br>

**Profa. Dra. Marne Carvalho de Vasconcellos**  
Orientadora e Presidente da banca

Documento assinado digitalmente  
 PATRICIA DANIELLE OLIVEIRA DE ALMEIDA  
Data: 07/08/2023 16:38:03-0300  
Verifique em <https://validar.iti.gov.br>

**Profa. Dra. Patrícia Danielle Oliveira de Almeida**  
Membro (UFAM)

ASSINADO DIGITALMENTE  
**ANA PAULA NEGREIROS NUNES ALVES**  
A conformidade com a assinatura pode ser verificada em:  
<http://serpro.gov.br/assinador-digital> 

**Profa. Dra. Ana Paula Negreiros Nunes Alves**  
Membro (UFC)

Documento assinado digitalmente  
 WALDIRENY ROCHA GOMES  
Data: 07/08/2023 21:38:30-0300  
Verifique em <https://validar.iti.gov.br>

**Profa. Dra. Waldireny Rocha Gomes**  
Membro (UFAM)

“Tu verás o fruto do teu penoso trabalho e ti alegrarás.” Isaías 53:11

## AGRADECIMENTOS

A Deus em primeiro lugar por ser meu refúgio e fortaleza e a intercessão da minha mãe do céu Nossa Senhora, sei que Eles sempre estão nos milagres que fazem tudo acontecer da melhor forma.

Ao meu esposo Matheus, por ser meu companheiro, amigo, protetor e incentivador em todos os momentos da minha vida.

Aos meus pais João e Meire, por tanta dedicação na minha criação, pelos bons conselhos, excelente educação que me proporcionaram e o apoio incondicional na fase final da pesquisa e em todos os meus projetos e sonhos.

Aos meus irmãos Andressa e Heitor, pelo acolhimento sempre que preciso, generosos sempre prontos a me ajudar.

Aos meus sogros Manuel e Armênia, e minha cunhada Manuelle por serem tão prestativos, carinhosos e grandes incentivadores.

As minhas primas Gêssica, Gabrielle e Letícia pelo cuidado e preocupação, por me ouvirem quando mais precisava, se prontificando, a todo momento, em me ajudar.

As tias Carolina, Conceição, Socorro, Hilça e Carla, que rezam sempre por mim, me acolhem como filha. Nelas tenho a certeza que nunca estarei sozinha.

As minhas amigas Mariana, Isabelle e Laíse que torceram tanto por mim para que esse momento tornar-se realidade.

A minha excelentíssima orientadora Profa. Dra. Marme Carvalho de Vasconcellos, que aqui poderia agradecer em um livro, todo aprendizado que me foi transferido, a oportunidade a me oferecida desde o momento que solicitei um vaga como sua aluna. A generosidade e prestatividade dessa mestre, as opiniões sábias, a inteligência, vontade sempre de ajudar seus alunos e a compreensão quando me apoiou a ir fazer parte dos testes em Fortaleza.

A disponibilidade em receber e oferecer toda estrutura da Cultura de Células, Imagem Molecular e laboratórios BIOPHAR aos seus alunos. Muito obrigada professora, orgulho em ter sido sua aluna, minha eterna gratidão.

Ao Prof. Dr. Emerson Lima pela disponibilidade e dedicação ao laboratório da BIOPHAR, sempre com ideias sábias e de grande valia para acrescentar em nossa pesquisa. Obrigada por sua generosidade e apoio.

A Profa. Dra. Raquel Montenegro que sempre quando precisei me apoiou e me acolheu, disponibilizando seu laboratório FARMAGEN para meus experimentos.

Agradeço ao Núcleo de Pesquisa e Desenvolvimento de Medicamentos da Universidade Federal do Ceará por sua valiosa contribuição nos experimentos. Quero expressar minha sincera gratidão a todos aqueles que colaboraram durante meses de pesquisa, em particular ao Emerson Lucena, que esteve presente em todos os experimentos. Minha eterna gratidão.

Aos amigos do Biophar, vocês fazem parte de uma etapa muito feliz em minha vida. Meus mais sinceros agradecimentos a Elenn, Leilane e Tallita, não tenho palavras para agradecer toda a ajuda que me deram, esse título eu devo muito a vocês que não mediram esforços para me ajudar. Em especial, minha amigas queridas que levarei por toda a minha vida Bárbara, Bianca e Lívia, agradeço a Deus pela amizade, apoio e incentivo em todos os momentos.

A Agência de Financiamento de Pesquisa Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado do Amazonas – FAPEAM pelo apoio financeiro ao longo desse doutoramento. Ao Programa de Pós Graduação em Inovação Farmacêutica - PPGIF e Faculdade de Ciências Farmacêuticas – FCF.

A Universidade Federal do Amazonas – UFAM lugar onde desenvolvi grande parte do projeto e que foi fundamental para o meu crescimento na vida acadêmica.

A todos aqueles que de alguma forma contribuíram para a realização deste trabalho, o meu muitíssimo obrigada.

## RESUMO

No estudo do câncer, modelos de cultura celular tridimensional aliadas a investigar propriedades farmacocinéticas e citotóxicas *in silico* têm se tornado ferramentas valiosas para explorar o microambiente tumoral, os avanços da doença e a busca por novos alvos terapêuticos. Avaliar o perfil metabólico celular em diferentes microambientes tumorais das linhagens de melanoma SKMEL-19, SKMEL-28 e SKMEL-103 frente a ação do 22-HTG foi o objetivo desse estudo. A triagem virtual da 22-HTG apontou interação da 22-HTG com o gene AKR1B10. Avaliando a geração e caracterização dos microtecidos de melanoma observou-se que as linhagens de células SKMEL-19 e SKMEL-103 quando cultivadas em esferoides se mantem mais regular no quinto dia de cultivo, na concentração  $100 \times 10^4$  e as linhagens SKMEL-28 e MRC5 quando cultivadas em esferoides se mantem mais regular no quinto dia de cultivo, na concentração  $50 \times 10^4$ . Para avaliação do perfil metabólico, foram realizados os ensaios de viabilidade, consumo de glicose e atividade de LDH em três condições de cultivo (25, 5,5 e 0,5 mM de glicose). Em relação a viabilidade celular, foi observado uma diminuição nas linhagens SKMEL28 e MRC5 quando cultivadas em 0,5 mM de glicose. Em relação ao consumo de glicose, todas as linhagens de melanoma demonstraram consumo significativo ( $p < 0,001$ ) quando comparada a linhagem normal nos dois meios de cultivo. Em meio com escassez de glicose (meio com 0,5 mM), as linhagens MRC-5, SKMEL 28 e SKMEL 103 apresentaram aumento significativo na atividade enzimática de LDH. De acordo com as análises, foi verificado que a substância 22-HTG leva a redução na atividade enzimática da enzima LDH e na captação de glicose de forma significativa nas linhagens SKMEL 28 e SKMEL 103 tanto cultivadas em monocamadas quando em modelo tridimensional. Este é o primeiro estudo a descrever a atividade da 22 $\beta$ -hidroxitingenona contra células de melanoma humano cultivadas em um modelo tridimensional, o que confere um aspecto inovador a este trabalho. A inclusão do microambiente tumoral em um modelo tridimensional utilizando células de melanoma mostrou-se eficaz e viável para o estudo da 22 $\beta$ -hidroxitingenona, revelando sua capacidade de agir de maneira distinta no metabolismo dessas linhagens. Essa abordagem é fundamental para melhor compreender a interação entre as substâncias naturais e o microambiente tumoral, permitindo o desenvolvimento de estratégias terapêuticas mais eficazes e direcionadas contra o câncer de melanoma.

**Palavras-Chaves:** Anticâncer; Melanoma; Salácia.

## ABSTRACT

In the study of cancer, three-dimensional cell culture models combined with investigating pharmacokinetic and cytotoxic properties *in silico* have become valuable tools for exploring the tumor microenvironment, disease advances and the search for new therapeutic targets. Evaluating the cellular metabolic profile in different tumor microenvironments of melanoma cell lines SKMEL-19, SKMEL-28 and AKMEL-103 against the action of 22-HTG was the objective of this study. Virtual 22-HTG screening showed interaction between 22-HTG and the AKR1B10 gene. Evaluating the generation and characterization of melanoma microtissues, it was observed that the SKMEL-19 and SKMEL-103 cell lines, when cultivated in spheroids, remained more regular on the fifth day of culture, at the  $100 \times 10^4$  concentration, and the SKMEL-28 and MRC5 cell lines, when grown in spheroids remains more regular on the fifth day of cultivation, at the  $50 \times 10^4$  concentration. To evaluate the metabolic profile, viability, glucose consumption and LDH activity assays were performed under three culture conditions (25, 5.5 and 0.5 mM of glucose). Regarding cell viability, a decrease was observed in SKMEL28 and MRC5 strains when cultured in 0.5 mM glucose. Regarding glucose consumption, all melanoma strains showed significant consumption ( $p < 0.001$ ) when compared to the normal strain in both culture media. In medium with scarce glucose (medium with 0.5 mM), strains MRC-5, SKMEL 28 and SKMEL 103 showed a significant increase in LDH enzymatic activity. According to the analyses, it was verified that the drug 22-HTG leads to a reduction in the enzymatic activity of the enzyme LDH and in the glucose uptake significantly in the SKMEL 28 and SKMEL 103 strains both grown in monolayers and in a three-dimensional model. This is the first study to describe the activity of 22 $\beta$ -hydroxytingenone against human melanoma cells grown in a three-dimensional model, which gives an innovative aspect to this work. The inclusion of the tumor microenvironment in a three-dimensional model using melanoma cells proved to be effective and feasible for the study of 22 $\beta$ -hydroxytingenone, revealing its ability to act differently in the metabolism of these cell lines. This approach is fundamental to better understand the interaction between natural substances and the tumor microenvironment, allowing the development of more effective and targeted therapeutic strategies against melanoma cancer.

**Keywords:** Anticancer; Melanoma; Salacia.

## SUMÁRIO

<b>INTRODUÇÃO</b> .....	<b>14</b>
<b>2. REVISÃO DA LITERTURA</b> .....	<b>17</b>
<b>2.1 Câncer</b> .....	<b>17</b>
<b>2.2 Melanoma</b> .....	<b>19</b>
<b>2.3 Produtos naturais e terapia anticâncer</b> .....	<b>22</b>
<b>2.4 Análise in silico</b> .....	<b>25</b>
<b>2.5 Avaliação de substâncias terapêuticas em diferentes linhagens celulares</b> .....	<b>27</b>
<b>2.6 Diferentes microambientes tumorais</b> .....	<b>28</b>
<b>2.7 Cultivo de esferoide tridimensional</b> .....	<b>30</b>
<b>2.8 Metabolismo da Célula Tumoral</b> .....	<b>31</b>
<b>3. OBJETIVOS</b> .....	<b>35</b>
<b>3.1 Objetivo Geral</b> .....	<b>35</b>
<b>3.2 Objetivos Específicos</b> .....	<b>35</b>
<b>4. METODOLOGIA</b> .....	<b>36</b>
<b>4.1 Obtenção da substância 22<math>\beta</math>-hidroxitingenona</b> .....	<b>36</b>
<b>4.2 Triagem virtual</b> .....	<b>36</b>
4.2.1 Predição do alvo biológico e dos parâmetros moleculares, farmacocinéticos e toxicológicos .....	<b>36</b>
4.2.2 Proteínas e preparação de moléculas de 22-HTG .....	<b>37</b>
4.2.3. Docking molecular .....	<b>37</b>
<b>4.3 Cultivo e cultura de células</b> .....	<b>39</b>
<b>4.4 Ensaio de viabilidade celular</b> .....	<b>39</b>
<b>4.5 Fabricação de hidrogéis e Formação dos esferoides tridimensionais</b> .....	<b>40</b>
<b>4.6 Plaqueamento de células nos chips de agarose</b> .....	<b>41</b>
<b>4.7 Monitoramento dos esferoides por fotomicroscopia</b> .....	<b>42</b>
<b>4.8 Coloração celular com laranja de acridina e brometo de etídio</b> .....	<b>43</b>
<b>4.9 Ensaio de viabilidade celular, absorção de glicose e atividade da lactato desidrogenase em meio com diferentes concentrações de glicose</b> .....	<b>44</b>
<b>4.10 Captação de glicose, ensaio de lactato desidrogenase e viabilidade de células de melanoma em matriz 2D e 3D e ATP em matriz 2D</b> .....	<b>44</b>
4.10.1 Cultivo das células .....	<b>44</b>
4.10.2 Captação de Glicose .....	<b>45</b>
4.10.3 Atividade da enzima Lactato Desidrogenase (LDH) .....	<b>45</b>
4.10.4 Ensaio de citotoxicidade por exclusão com azul de tripan.....	<b>46</b>
4.10.5 Quantificação dos níveis intracelulares de ATP .....	<b>47</b>
<b>4.11 Análise estatística</b> .....	<b>47</b>
<b>5 RESULTADOS</b> .....	<b>49</b>

<b>5.1 Triagem virtual.....</b>	<b>49</b>
5.1.1 Predição do alvo biológico e dos parâmetros moleculares, farmacocinéticos e toxicológicos. ....	49
5.1.2 Ancoragem molecular .....	51
<b>5.2 Análise de citotoxicidade por Alamar Blue .....</b>	<b>55</b>
<b>5.3 Formação dos esferoides tridimensionais .....</b>	<b>56</b>
5.3.1 Acompanhamento das culturas e análises morfológicas .....	56
5.3.2 Geração e caracterização dos microtecidos de melanoma e fibroblasto humano .....	56
<b>5.4 Metabolismo celular em esferoides .....</b>	<b>69</b>
5.4.1 A diferença na concentração de glicose altera a viabilidade, captação de glicose e a atividade da enzima LDH nas linhagens de melanoma 2D.....	69
5.4.2 Concentração de ATP em modelo 2D.....	70
5.4.3 Avaliação de viabilidade e morte celular em modelo 2D .....	71
5.4.4 Avaliação de viabilidade e morte celular em modelo 3D .....	72
5.4.5 Avaliação da atividade de LDH em modelo 2D .....	74
5.4.6 Avaliação da atividade de LDH em modelo 3D .....	74
5.4.8 Captação de glicose em modelo 2D .....	76
5.4.9 Avaliação da captação de glicose em modelo 3D .....	77
5.4.10 Glicose e 22-HTG In silico .....	78
<b>6. DISCUSSÃO .....</b>	<b>80</b>
<b>7. CONCLUSÕES .....</b>	<b>87</b>
<b>REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS .....</b>	<b>88</b>
<b>APÊNDICE .....</b>	<b>107</b>

## LISTA DE FIGURAS

<b>Figura 1</b> – Características fenotípicas associadas ao desenvolvimento do câncer.....	18
<b>Figura 2</b> - Principais células envolvidas no câncer de pele.....	20
<b>Figura 3</b> - Características visuais do melanoma maligno (ABCDE dos sinais). A) assimetria; B) bordas irregulares; C) cor não uniforme; D) diâmetro superior a 6 mm; E) evolução. ....	21
<b>Figura 4</b> - Modelo esquemático de reprogramação metabólica tumoral. (A) Metabolismo de uma célula normal na presença de oxigênio e teoria do efeito Warburg em células tumorais. (B) Teoria da simbiose metabólica e glutaminólise em células tumorais.....	23
<b>Figura 5</b> - Produtos naturais com atividade anticâncer. ....	33
<b>Figura 6</b> - Estrutura química da 22 $\beta$ -hidroxitingenona. ....	36
<b>Figura 7</b> - Fabricação de hidrogéis de agarose.....	41
<b>Figura 8</b> - Formação dos esferóides tridimensionais.....	43
<b>Figura 9</b> - Substância 22-THG demonstra elevada probabilidade de interação com a enzima AKR1B10. ....	53
<b>Figura 10</b> - Substância 22-THG demonstra ligações com a estrutura cristalina de AKR1B10 através de ligações semelhantes Tolrestat.....	54
<b>Figura 11A</b> - Linhagem de células SKMEL-19 quando cultivadas em esferóides se mantem mais regular no quinto dia de cultivo, na concentração 100x10 <sup>4</sup> . ....	57
<b>Figura 11 B, C, D, E</b> – Imagens de gráficos referentes ao diâmetro de faret, circularidade, esfericidade e solidez mostra que a linhagem de células SKMEL-19 quando cultivadas em esferóides mantem mais adequada no dia 5, na concentração 100x10 <sup>4</sup> . ....	58
<b>Figura 12 A</b> – A Linhagem de células SK-MEL28 quando cultivadas em esferóides se mantem mais regular no quinto dia de cultivo, na concentração 50x10 <sup>4</sup> . ....	60
<b>Figura 12 B, C, D, E</b> –Linhagem de células SKMEL-28 quando cultivadas em esferóides mantem diâmetro, circularidade, esfericidade e solidez mais adequada no dia 5, na concentração 50x10 <sup>4</sup> . ....	61
<b>Figura 13 A</b> – A Linhagem de células SKMEL-103 quando cultivadas em esferóides se mantem mais regular no quinto dia de cultivo, na concentração 100x10 <sup>4</sup> . ....	63
<b>Figura 13 B, C, D, E</b> – Linhagem de células SKMEL-103 quando cultivadas em esferóides mantem diâmetro, circularidade, esfericidade e solidez mais adequada no dia 5, na concentração 100x10 <sup>4</sup> . ....	64
<b>Figura 14 A</b> – A Linhagem de células MRC5 quando cultivadas em esferóides se mantem mais regular no quinto dia de cultivo, na concentração 50x10 <sup>4</sup> . ....	66
<b>Figura 14 B, C, D, E</b> – Linhagem de células SKMEL-103 quando cultivadas em esferóide mantem diâmetro, circularidade, esfericidade e solidez mais adequada no dia 5, na concentração 50x10 <sup>4</sup> . ....	67
<b>Figura 15</b> - Diferenças na concentração de glicose levam a alterações viabilidade celular, atividade de LDH e na captação de glicose em linhagens de melanoma. ....	70
<b>Figura 16</b> - 22-HTG diminui a concentrações de ATP nas linhagens de melanoma maligno SKMEL 28 e SKMEL 103. ....	71
<b>Figura 17</b> - 22-HTG não leva a redução na viabilidade celular em 24 horas de tratamento.....	72
<b>Figura 18</b> - 22-HTG diminui a viabilidade e leva a morte celular em modelo 3D de melanoma maligno. ....	73
<b>Figura 19</b> - 22-HTG altera a atividade enzimática de LDH em linhagens de melanoma. ....	74

<b>Figura 20</b> - 22-HTG altera a atividade enzimática de LDH em linhagens de melanoma no modelo 3D. ....	75
<b>Figura 21</b> - 22-HTG interage com a enzimática computacional de LDH. ....	76
<b>Figura 22</b> - 22-HTG altera a captação de glicose nas linhagens de melanoma SKMEL 28 e SKMEL 103. ....	77
<b>Figura 23</b> - 22-HTG altera a captação de glicose nas linhagens de melanoma SKMEL 28 e SKMEL 103. ....	78
<b>Figura 24</b> - 22-HTG interage com o modelo computacional da proteína tirosina fosfatase. ....	79

## LISTA DE QUADROS

Quadro 1 - Substância 22-THG apresenta elevado grau de sobreposição as estruturas cristalografada. ....	51
---	----

## LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - Substância 22-THG demonstra elevada probabilidade de interação com os genes AKR1B.....	49
Tabela 2 - Substância 22-THG demonstra baixa penetração na barreira hematoencefálica, elevada absorção intestinal e forte ligação com proteínas plasmáticas. ....	50
Tabela 3 - Substância 22-THG demonstra baixa probabilidade de causar efeitos tóxicos. ....	51
Tabela 4 - Substância 22-THG demonstra elevada probabilidade de interação com as enzimas AKR1B10 e AKR1B1.....	52
Tabela 5 - Fármaco 22-THG demonstra alto potencial citotóxico e seletivo em linhagens de melanoma. ....	55

## INTRODUÇÃO

Câncer é uma doença multifatorial e complexa que representa um dos maiores desafios da medicina atual (FRITSCHÉ et al., 2020). Dentre os diversos tipos de câncer, o melanoma é um dos mais agressivos e tem uma alta taxa de mortalidade (NAIK, 2021). O melanoma é originado das células produtoras de pigmento da pele, os melanócitos, e sua incidência tem aumentado significativamente nos últimos anos (GOWTHAMI & RAJAGURU, 2023).

O estudo dos microambientes tumorais é fundamental para compreender o desenvolvimento e a progressão do câncer, bem como para avaliar a eficácia de substâncias naturais com potencial terapêutico. Tradicionalmente, os modelos de cultura celular bidimensionais (2D) têm sido amplamente utilizados para investigar o comportamento das células cancerígenas e testar agentes antitumorais (HUANG et al., 2021). No entanto, esses modelos simplificados não conseguem replicar completamente os complexos celulares e o microambiente tridimensional (3D) encontrados nos tumores *in vivo* (JUBELIN et al., 2022)

Recentemente, os modelos 3D de cultura celular emergiram como alternativas promissoras para estudar o câncer de forma mais fisiologicamente relevante, incluindo seu metabolismo, que envolve alterações na captação de glicose, na enzima lactato desidrogenase (LDH) e na viabilidade das células (BADER et al., 2020). Esses modelos, permitem a formação de estruturas tridimensionais que mimetizam a arquitetura e as propriedades físicas dos tumores *in vivo*. Além disso, eles permitem a interação celular e a comunicação entre diferentes tipos de celulares presentes no tumor (HEREDIA-MENDEZ et al., 2023).

Ao avaliar a eficácia de substâncias naturais contra o câncer, é essencial considerar a influência do microambiente tumoral. Diferentes tipos de câncer podem apresentar características distintas em termos de composição celular, matriz extracelular, vascularização e inflamação (URBANCZYK et al., 2020). Portanto, modelos *in vitro* que se aproximam dessas características são cruciais para fornecer resultados mais representativos (MAZZOCCHI et al., 2019).

Uma das características diferenciais das células tumorais é o metabolismo alterado, conhecido como metabolismo da célula tumoral. Nesse contexto, a glicose desempenha um papel fundamental, uma vez que as células tumorais apresentam uma demanda energética aumentada para suportar seu crescimento rápido e descontrolado

(YAO ET AL., 2021; REN & SHEN ET AL., 2019). A geração de glicose pelas células tumorais é mediada por transportadores de glicose e sua utilização ocorre predominantemente por meio da via glicolítica (PLISZKA & SZABLEWSKI et al., 2021).

A enzima lactato desidrogenase (LDH) é uma peça-chave no metabolismo da glicose nas células tumorais. A LDH catalisa a conversão do piruvato em lactato, gerando energia e permitindo a sobrevivência das células tumorais em condições de hipóxia (SHARMA et al., 2022; MISHRA & BANERJEE, 2019). Além disso, a atividade da LDH tem sido correlacionada com a progressão tumoral e com os piores prognósticos em pacientes com câncer (AN et al., 2021; ZHOU et al., 2019).

Diante da necessidade de desenvolver terapias mais eficazes e menos tóxicas, os produtos naturais têm despertado grande interesse na pesquisa anticâncer. Os produtos naturais são derivados de plantas, animais e microrganismos, que apresentam uma ampla diversidade de estruturas químicas e atividades biológicas. Esses compostos têm o potencial de inibir o crescimento tumoral, induzir a apoptose e vias modulares de sinalização celular (DENG et al., 2019 ; DUTTA et al., 2019).

A análise *in silico*, baseada em técnicas computacionais, tem se mostrado uma ferramenta promissora na busca por novos agentes terapêuticos (GOMES et al 2021). O docking molecular é uma abordagem amplamente utilizada na análise *in silico*, permitindo a predição da interação entre pacientes e alvos terapêuticos, como proteínas e enzimas relacionadas ao câncer (HASAN et al., 2022; TOLIOS et al., 2020). Essa análise permite a identificação de compostos que apresentam alta resolução e são potencialmente inibidores dessas proteínas-alvo (LANKATILLAKE et al., 2019).

O cultivo de esferoides tridimensionais tem ganhado destaque como um modelo experimental relevante na pesquisa do câncer. Esses modelos mimetizam melhor as características do tumor *in vivo*, como o microambiente tumoral, a interação celular e a resistência à terapia convencional. Os esferoides tridimensionais fornecem uma plataforma para avaliar a resposta de células tumorais a diferentes tratamentos e para estudar a viabilidade celular de maneira mais representativa (FRANCHI-MENDES et al., 2021; PINTO et al. 2021; ZANONI et al., 2020).

Nesse contexto, o presente trabalho tem como objetivo investigar o efeito da 22 $\beta$ -hidroxitingenona, substância extraída de troncos e galhos de *S. impressifolia*, sobre o metabolismo da célula tumoral de melanoma, com foco na regulação da captação de glicose e na atividade da enzima LDH. Para isso, foi realizada uma análise *in silico* de

docking molecular para prever a interação desses compostos com as proteínas-alvo relevantes. Além disso, realizamos ensaios de cultivo de esferoides tridimensionais para avaliar a resposta celular aos compostos testados.

Espera-se que esse estudo possa contribuir para o desenvolvimento de novas estratégias terapêuticas para o tratamento do melanoma. A análise *in silico* e o cultivo de esferoides tridimensionais fornecem informações valiosas sobre a interação de novos candidatos a fármacos com o metabolismo tumoral e sua eficácia como agentes terapêuticos.

## **2. REVISÃO DA LITERTURA**

### **2.1 Câncer**

O câncer define-se cientificamente como uma neoplasia, exclusiva de tumores malignos, a palavra câncer tem origem latina e significa “caranguejo”, fazendo referência ao comportamento de crescimento infiltrante, tal como as pernas do crustáceo. O estudo das bases moleculares no desenvolvimento de tumores (tumorigênese) forneceu suporte para o conceito de que o câncer é uma doença genética causada pelo acúmulo progressivo de alterações moleculares. Este acúmulo de alterações genéticas confere à célula a propriedade de evasão dos mecanismos de controle homeostático, garantindo a sua própria sobrevivência e proliferação clonal (HANAHAN, 2022).

Todos os cânceres são originários de uma única célula que começa a se comportar de forma anormal, se dividir descontroladamente, para finalmente invadir tecidos adjacentes. O comportamento aberrante desta única célula é devido a mutações somáticas, alterações no DNA genômico produzidos pela atividade mutacional em diferentes processos. Dentre os processos de mutação estão inclusos a exposição aos agentes mutagênicos endógenos ou exógenos, a fidelidade incompleta de polimerases de DNA, e a falha de mecanismos de reparo do DNA (ALEXANDROV, 2015).

O câncer pode ser caracterizado e compreendido a partir de seis capacidades biológicas diferentes e complementares que são obtidas no período em que os tumores estão se desenvolvendo, tais características são: o nutrimento de sinais pró-proliferativos, resistência ao processo de morte celular, diminuição dos genes supressores de crescimento, imortalidade, ativação de invasão e capacidade metastática (HANAHAN AND WEINBER, 2000).

Em 2022, os mesmos autores adicionaram quatro novas características dentro de duas classes, na classe das características facilitadoras temos a instabilidade genômica e mutação e além disso a inflamação promovida pelo tumor, e dentre as características emergentes estão a desregulação energética celular e o mecanismo de escape do sistema imune, todas estando relacionadas ao processo de tumorigênese (Figura 1).



**Figura 1** – Características fenotípicas associadas ao desenvolvimento do câncer  
 Fonte: Adaptada de HANAHAN, 2022.

A metástase é um processo de múltiplos passos que necessita de células cancerosas para escapar a partir do tumor primário, sobreviver na circulação, colonizar locais distantes, e proliferar. É a causa de morte mais frequente em pacientes vítimas de câncer e é a característica que confere mau prognóstico a um tumor (SEGUIN et al., 2015).

A detecção precoce do tumor é um fator imprescindível para o sucesso da terapia e constitui-se também como fator determinante na sobrevivência do paciente. Por isso, nas duas últimas décadas, os estudos relacionados às causas do câncer ganharam grande notoriedade e as pesquisas envolvendo a participação dos genes no desenvolvimento da patologia avançaram significativamente. Todas essas iniciativas contribuem na descoberta de novas ferramentas de detecção e tratamento do câncer (WANG et al, 2023).

No Brasil, o Instituto Nacional de Câncer José Alencar Gomes da Silva (INCA) é o órgão ligado ao Ministério da Saúde que atua no planejamento das ações que visam prevenir e controlar o câncer. Dentre as ações executadas está a busca por oferecer cada vez mais estratégias de prevenção e detecção precoce, o Instituto também tem como missão prestar assistência, capacitar profissionais e desenvolver o ensino e a pesquisa voltada ao câncer (INCA, 2023).

Apesar de haver um grande esforço para a prevenção e tratamento do câncer em todo o mundo, esta doença ainda se apresenta como um grave problema de saúde pública. No ano de 2000, as estatísticas mundiais apontaram 5,3 milhões de casos novos de câncer em homens e 4,7 milhões em mulheres. Neste mesmo ano, estima-se que o câncer matou 6,2 milhões de pessoas (INCA, 2023).

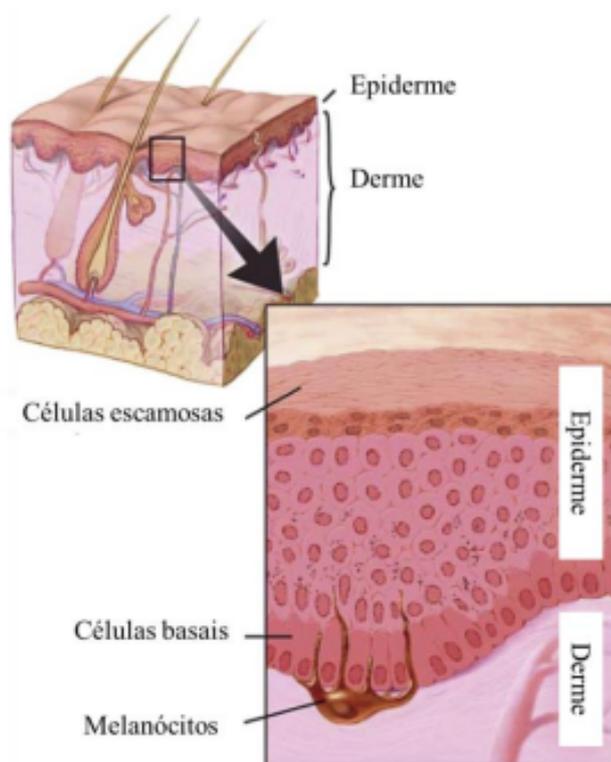
No ano de 2018 foi divulgada a mais recente estimativa mundial que revela um enorme salto de novos casos, esta estimativa aponta que neste ano 18 milhões de casos novos foram detectados e 9,6 milhões de pessoas morreram por esta causa. Dentre os mais incidentes estão o câncer de pulmão com 2,1 milhões de novos casos, seguido do câncer de mama com 2,1 milhões, cólon e reto com 1,8 milhão, próstata com 1,3 milhão (WHO, 2020).

## **2.2 Melanoma**

Os estudos relacionados ao desenvolvimento de tumores trazem o conceito de que o câncer é um conjunto de manifestações patológicas caracterizadas por uma proliferação celular descontrolada, alterações celulares e a capacidade de invasão nos tecidos próximos, bem como a possibilidade de metástase para tecidos mais afastados (HANAHAN; WEINBERG, 2011).

O câncer de pele é classificado de acordo com o tipo de célula de onde se origina. Existem três tipos principais de cancro da pele: o carcinoma basocelular, o carcinoma espinocelular (ambos denominados cancro da pele não melanoma) e o melanoma (que afeta os melanócitos) (SIMÕES; SOUSA; PAIS, 2015) (Figura 2). Os melanócitos são células derivadas da crista neural e residem na camada de células basais da epiderme (HUSSEIN, 2006). São responsáveis pela produção de melanina, que determina a cor da pele, olhos, cabelos e outras áreas pigmentadas (GRAY-SCHOPFER; WELLBROCK; MARAIS, 2007).

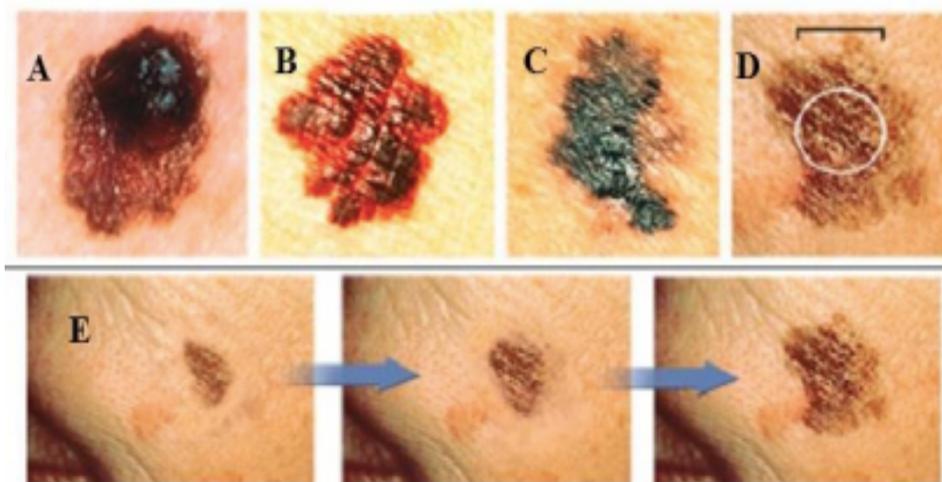
A incidência do câncer de pele vem aumentando a cada ano, estima-se um valor total (melanoma e não melanoma) de 3 milhões de novos casos por ano mundialmente (WHO, 2017). Segundo dados do Instituto Nacional de Câncer (INCA, 2022), no Brasil o câncer de pele não melanoma é o mais frequente, tendo como incidência anual um valor de 177 mil casos. Já o melanoma é bem menos frequente com uma incidência de 8,4 mil casos, porém apresenta um número de mortes elevado (INCA, 2022).



**Figura 2** - Principais células envolvidas no câncer de pele. Epiderme: Células escamosas, basais e melanócitos, que encontram-se adjacentes a camada de células basais. Fonte: adaptado de: National Cancer Institute (2017).

Devido a sua letalidade e elevado potencial de gerar metástases, o melanoma cutâneo (MC) está sendo a causa de quase 90% das mortes por câncer de pele, apesar de uma incidência relativamente baixa, correspondendo a apenas 7% dos cânceres cutâneos (que também incluem carcinoma basocelulares e epidermóides) sua prevalência vem aumentando continuamente, com estimativa de 116.000 novos casos até 2031 nos Estados Unidos (EUA) (WHITEMAN et al., 2016).

O MC surge na superfície da pele, as características clínicas do melanoma maligno podem variar significativamente e pode ser detectada por exame visual. A regra ABCDE descreve a apresentação clínica e os sinais de alerta para a maioria dos melanomas: A para assimetria; B para borda irregular; C para cor, pois a pigmentação não é uniforme; D para diâmetro maior que 6 mm; e E para evolução, elevação e/ou alargamento da lesão, conforme Figura 3 (GORDON, 2013).



**Figura 3** - Características visuais do melanoma maligno (ABCDE dos sinais). A) assimetria; B) bordas irregulares; C) cor não uniforme; D) diâmetro superior a 6 mm; E) evolução. Fonte: adaptado de Skin Cancer Foundation (2016).

O MC tem início quando os melanócitos acumulam mutações somáticas, devido ao excesso de luz ultravioleta incidindo sobre eles, afetando os genes envolvidos na proliferação (BRAF, NRAS), crescimento e metabolismo (fosfatase e PTEN), receptor proto-oncogênico tirosina quinase (KIT), resistência à apoptose e ciclo celular (p53, CDKNA2). e vida útil replicativa (TERT) (ELDER, 2016; CURTIN et al., 2005; HODIS et al., 2012; FILIMON et al., 2022).

O tratamento sistêmico com quimioterápico dacarbazina é o tratamento de primeira escolha, visando a diminuição da massa tumoral e de metástases, bem como, conter a mortalidade, já que só há vantagem em realizar cirurgia na fase inicial, pois uma vez que a fase metastática se desenvolve, aumenta o risco de morte entre os pacientes, principalmente quando detectado tardiamente (BAJETTA et al., 2001; STUEVEN et al., 2017).

O alfa-interferona (IFN-a), estão sendo usados como tratamento na Europa e EUA para pacientes com melanoma ressecado com linfonodo positivo (estágio clínico III) e pode ser considerado para pacientes com linfonodos negativos, cujo risco de recorrência é estimada em 30% a 40% ou mais (estágio IIB e IIC) tem apresentado resultados promissores (Thompson et al., 2005; Tsao et al., 2004).

Há poucas opções de quimioterapia eficazes para esse tipo de tumor, o mesmo apresenta grande resistência a quimioterapia (PAK et al., 2004), além disso, pacientes com melanoma que não possuem mutações BRAF continuam sem opções de tratamento adequado e eficaz (PONTI et al., 2017), tornando-se necessário a busca por novo

tratamento eficaz, de baixo custo e toxicidade contra essas células cancerígenas e melhorar a qualidade de vida dos pacientes com essa doença (MENEZES et al., 2018).

Há a necessidade urgente de se buscar por novas terapias contra o câncer pois os esquemas terapêuticos disponíveis ainda não são suficientes, visto que a eficácia clínica destes medicamentos não é satisfatória em muitos portadores dos variados tipos desta patologia. Além de que a incorporação das novas tecnologias descobertas para o tratamento é pouco integrada às terapias utilizadas tradicionalmente (SHAN et al, 2020), tornando-se necessário a busca por novo tratamento eficaz, de baixo custo e toxicidade contra essas células cancerígenas (WU, 2019).

### **2.3 Produtos naturais e terapia anticâncer**

Os produtos naturais podem ser utilizados no tratamento de uma infinidade de doenças. Vários medicamentos vêm surgindo a partir de substâncias químicas naturais isolados que possuem determinadas estruturas e funcionam como uma base na química combinatória, que quando ligadas com outras moléculas dão origem a novas drogas com potencialidades terapêuticas (LIU et al, 2019).

Essas substâncias representam uma fonte promissora de princípios ativos para o tratamento de doenças, os quais podem inclusive ser utilizados em combinação na terapêutica já existente, a fim de potencializar o efeito farmacológico e reduzir a toxicidade (OPREAN et al., 2018).

Dentre as pesquisas que buscam estratégias terapêuticas, é crescente o interesse científico em novos agentes anticâncer de fontes naturais, principalmente plantas, por constituírem uma fonte de diversas moléculas, muitas dessas frequentemente identificadas com atividade antitumoral, o que é considerado de grande valor em atividades biológicas, principalmente como um recurso alternativo, buscando reduzir o efeito tóxico nas células não tumorais (SAMPATH et al., 2017; SECA; PINTO, 2018), já que os quimioterápicos disponíveis atualmente apresentam baixa seletividade para as células neoplásicas e altamente tóxicas em células normais (LIU et al, 2019).

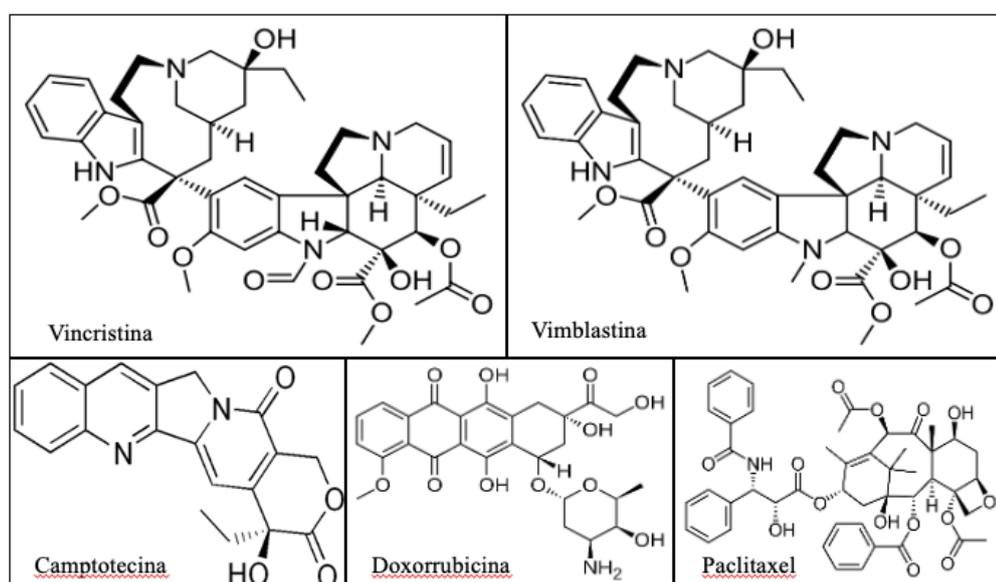
Os produtos naturais são uma alternativa para o desenvolvimento de novas drogas antitumorais, pois muitas pesquisas revelam o grande potencial citotóxico destes novos compostos (LIU et al, 2019). Mais de 3.000 espécies vegetais já foram utilizadas em terapêuticas modernas contra o câncer, com cerca de 85 moléculas derivadas de produtos

naturais já testadas e aprovadas pela Food and Drug Administration (FDA) nos Estados Unidos (CRAGG; PEZZUTO, 2016; NEWMAN; CRAGG, 2020).

Visando moléculas com potencial de ação anticâncer, muitos pesquisadores estão focando suas investigações sobre o atividade biológica de produtos naturais, mesmo que estas substâncias não sirvam diretamente como novas drogas, mas podem fornecer informações para o desenvolvimento de um importante agente contra o câncer (KHAZIR et al., 2014; SHAH et al., 2013), o qual pode ser de interesse clínico e chamar a atenção da indústria farmacêutica (SECA; PINTO, 2018), visto que grande parte dos medicamentos aprovados para o tratamento do câncer, foram obtidos de fontes naturais ou, estas, serviram como molde para o desenvolvimento (HUANG et al., 2012; LEE et al., 2007; SAMPATH et al., 2017).

Alguns quimioterápicos como a camptotecina, vimblastina, vincristina, paclitaxel e a doxorrubicina (figura 5) são exemplos de medicamentos provenientes de produtos naturais que foram isolados e hoje são amplamente utilizados na clínica. Há ainda uma série de drogas anticâncer em várias fases de desenvolvimento obtidos por meio de síntese ou semissíntese de produtos naturais que possibilitarão o tratamento de diversas formas de câncer (NEWMAN E CRAGG, 2007; CRAGG et al, 2009; SARKER et al, 2020).

Essas substâncias com atividade antitumoral são ricas em substâncias que possuem variedade na estrutura e função biológica, e isso se dá pelo fato da maioria deles apresentar uma vasta diversidade química, múltiplas propriedades e alta atividade citotóxica. (GALÚCIO et al, 2019; FERREIRA et al., 2018).



**Figura 4** - Produtos naturais com atividade anticâncer. Fonte: Elaborada pela autora.

Entre os diversos grupos de substâncias naturais, as espécies inseridas no gênero *Salacia* veem sendo estudadas profundamente para uma melhor compreensão de seus componentes químicos com efeitos terapêuticos, nos quais foram identificadas atividade decorrentes a presença de triterpenos, considerados promissores na investigação anticâncer, devido a presença de triterpenos com (esqueleto) estrutura quinonametídeo (COPPEDE et al., 2014; SHANMUGAM et al., 2012).

Há uma grande variedade de atividades biológicas nas espécies referentes ao gênero *Salacia*, pois são capazes de interferir em processos patológicos humanos, já que seus compostos químicos ativos podem trazer benefícios por apresentarem atividade antidiabética (STOHS; RAY, 2015), antioxidante (SAHAYAM et al., 2014), antiviral (FERREIRA et al., 2018), bem como, no combate a distúrbios metabólicos, como obesidade (SHIMADA et al., 2014) e citotóxica contra células tumorais (MUSINI; RAO; GIRI, 2015).

Os triterpenos quinonametídeos são encontrados exclusivamente em espécies da família Celastraceae, sendo considerados marcadores químicos desta família (COPPEDE et al., 2014) e correspondem a uma das classificações dos terpenóides, apresentam efeitos bem estabelecidos no organismo, principalmente atividade antitumoral, com supressão da iniciação, promoção e metástases em vários tipos de câncer (KIM et al., 2011; WANG et al., 2017; YADAV et al., 2010), inibição de processos como angiogênese, na inibição da proliferação e morte celular, bem como em vários estágios da formação de tumores (GALI-MUHTASIB et al., 2015).

A associação de drogas, utilizando triterpenóides nas combinações, é bastante vantajosa, melhorando a capacidade terapêutica e diminuindo a resistência celular à quimioterapia (HAJJ et al., 2015). Os terpenóides são considerados bons quimiosensibilizadores podendo agir na regulação na expressão de receptores que participam da resistência de células tumorais a múltiplas drogas (YAN et al., 2014), inclusive inibindo receptores de membrana envolvidos na resistência celular (YOSHIDA et al., 2008).

Nas análises químicas publicadas sobre a espécie de *Salacia impressifolia* há evidências de diferentes triterpenos em sua estrutura, sendo os triterpenos quinonametídeos substâncias biologicamente ativos (DA SILVA et al., 2016). Uma classe de substância com ação terapêutica promissora contra tumores malignos, os triterpenos quinonametídeos (SALMINEN et al., 2008), que podem gerar expectativas positivas

quanto ao seu efeito contra células de câncer gástrico, hepático e intestinal através da substância 22 $\beta$ -hidroxitingenona (22-HTG), que foi extraída de galhos e do tronco da espécie *Salacia impressifolia* (Miers) A. C. Smith. (DA SILVA et al., 2016).

A atividade antileucêmica *in vitro* e *in vivo* da casca do caule de *Salacia impressionifolia* (Miers) AC Smith (Celastraceae), já foi testada por Rodrigues e colaboradores (2019) mostrando que há propriedades citotóxicas contra diferentes linhagens celulares, inclusive atividade antileucêmica. O efeito da 22-HTG em células tumorais já foi mencionado em outros estudos, como Cevaterem e colaboradores (2016), onde os autores descreveram a indução de apoptose em células de câncer de mama e Aranha e colaboradores, 2020, 2021 descreveram a redução da proliferação, migração e invasão celular, com mecanismo inibitório de metaloproteinases e da via MAPK em células de melanoma humano.

Apesar do conhecimento científico quanto ao potencial anticâncer de 22-HTG, ainda não foram investigados esses efeitos no modelo de células tridimensional, seus efeitos farmacocinéticos e toxicológicos, e como o metabolismo das células se comporta frente a ação da substância.

#### **2.4 Análise in silico**

A triagem virtual e a predição *in silico* têm se tornado ferramentas essenciais na descoberta e no desenvolvimento de novos fármacos (Patel et al., 2021; Hou & Xu, 2004). Com o avanço da bioinformática e do poder computacional, tornou-se possível realizar análises analíticas e predições precisas dos alvos farmacológicos e farmacocinéticos de substâncias químicas (Tiwari & Singh, 2022). Além disso, a predição dos parâmetros toxicológicos *in silico* tem desempenhado um papel fundamental na avaliação dos riscos e na segurança dos compostos candidatos a fármacos (Mahapatra et al., 2022; Alqahtani, 2017).

Uma das técnicas mais utilizadas na triagem virtual e predição *in silico* é a ancoragem molecular, que consiste na simulação da interação entre um ligante e um receptor alvo (Lyne, 2002; Tripathi & Misra, 2017). Através de métodos computacionais, é possível identificar e analisar como as moléculas são fluidas entre os compostos químicos e as proteínas-alvo, avaliando sua vazão e seletividade (Schneider, 2018; Xie et al., 2012).

Essas abordagens *in silico* têm se mostrado eficientes na seleção e priorização de compostos com potencial atividade farmacológica, atendimento e tempo na etapa inicial do desenvolvimento de fármacos (Schaduangrat et al., 2020); Alam & Khan, 2019). Além disso, a predição dos parâmetros farmacocinéticos permite estimar a absorção, distribuição, metabolismo e excreção dos compostos, para a otimização das propriedades farmacocinéticas dos candidatos a fármacos (Honório et al., 2013; Caldwell et al., 2001).

O estudo da farmacocinética das substância promitentes é um campo de estudo importante para investigar o perfil de disposição do fármaco no organismo (FAN et al., 2014). A farmacocinética é uma ciência que utiliza modelos matemáticos para descrever a cinética, mostrando a evolução temporária do fármaco e/ou seus metabólitos no organismo (Ruiz-Garcia et al., 2007).

Mais precisamente, essa ciência estuda a evolução temporária da absorção, distribuição, metabolização e excreção (ADME) do fármaco (DiPiro et al., 2010). O principal objetivo da análise farmacocinética é obter uma série de parâmetros que descrevam o comportamento cinético de um fármaco/candidato a fármaco após a sua administração (Ruiz-Garcia et al., 2007).

Análises *in silico*, incluindo em linhagem de melanomas (SK-MEL) prevê alvos metabólicos que possam modular vias biológicas apontando genes presentes nas células (PARK et al., 2021; FATIMAH et al., 2023; LAXMIKESHAV et al., 2023; SHAUKAT et al., 2021) como o AKR1B1 e AKR1B10, que são associados a mal prognóstico (LAFFIN, PETRASH 2012; RUIZ et al., 2017; LI et al., 2023; ENDO et al., 2021).

A expressão do oncogene AKR1B10 está relacionada a eliminação de compostos químicos do organismo, o aumento da divisão celular, ao processo carcinogênico e a sua terapêutica (KO et al., 2018). O AKR1B1 tem um grande impacto na progressão do câncer e é contribuinte na tumorigênese (KHAYAMI et al., 2020; KANG et al., 2008; Lefrancois-Martínez et al., 2004).

Devido ao seu envolvimento no processo carcinogênico de melanomas, substâncias inibidoras de AKR1B10 e AKR1B1 (LAFFINS et al., 2012; RUIZ., 2017; LI et al., 2023; ENDO, 2021) podem ser vantajosas em ensaios contra esses cânceres, representando um novo alvo para suprir eventual lacuna que exista na terapia com quimioterápicos já existentes e base molecular teórica para o tratamento e prognóstico (KHAYAMI et al., 2020; ZHANG et al., 2018).

A continuidade pela busca de melhorias de protocolos clínicos terapêuticos para o câncer tem sido atualmente conduzida buscando por vantagem como melhor seletividade com eficácia satisfatória (MAGALHÃES et al., 2018).

No entanto, é importante ressaltar que as predições *in silico* devem ser confirmadas por experimentos *in vitro* e/ou *in vivo*, garantindo a confiabilidade dos resultados. A integração de abordagens computacionais e experimentais tem mostrado uma estratégia promissora no processo de descoberta e desenvolvimento de fármacos, permitindo uma triagem mais eficiente e uma seleção mais precisa dos candidatos a fármacos.

## **2.5 Avaliação de substâncias terapêuticas em diferentes linhagens celulares**

A avaliação da eficácia de substâncias terapêuticas em diferentes linhagens celulares é um aspecto fundamental no desenvolvimento de estratégias de tratamento mais personalizadas e eficientes contra o câncer (FURUBAYASHI et al., 2020). Cada tipo de câncer e mesmo subtipos diferentes dentro de um mesmo tipo podem apresentar respostas variadas a determinadas substâncias terapêuticas, devido a suas características genéticas e fenotípicas específicas (HU et al., 2021; JANUŠKEVIČIENĖ et al., 2019).

Nesse contexto, uma análise comparativa da ação de uma substância terapêutica em diferentes linhagens celulares em culturas *in vitro* é de grande importância para compreender suas propriedades e determinar sua eficácia em diferentes contextos (SALEHI et al., 2020). Essa abordagem permite investigar se a substância 22-HTG apresenta uma resposta diferencial em uma linhagem celular específica em comparação com outra linhagem.

Permitindo avaliar se a substância citotóxica causa morte celular em uma linhagem em cultura *in vitro* em comparação com outra linhagem (DE QUEIROZ et al., 2023). Utilizamos linhagens de células cancerígenas de melanoma previamente testadas, que apresentam características distintas em termos de origem tumoral, perfil genético e fenotípico, SKMEL-19, SKMEL-28, SKMEL103 (ROCHA-BRITO et al., 2021; FIGUEIREDO et al., 2019; NIESSNER et al., 2019; GIULIANO et al., 2011; PALMIERI et al., 2009).

Ao realizar experimentos em diferentes linhas celulares, é possível analisar se a substância citotóxica exercer um efeito mais pronunciado em uma linhagem específica, sugerindo uma maior sensibilidade ou resposta terapêutica (CAMPOCCIA et al., 2021).

Essa abordagem aponta linhagens celulares que são mais expressivas aos efeitos da substância e que podem se beneficiar significativamente de seu uso como agente terapêutico (SALEHI et al., 2020).

Além disso, a comparação entre linhagens celulares também fornece informações valiosas sobre a seletividade da substância (ABÁNADES LÁZARO et al., 2020). Essa seletividade é um fator crucial na minimização de efeitos adversos e na busca por terapias mais seguras e eficazes (OLIVERI et al., 2022).

Ao realizar uma avaliação comparativa entre diferentes linhagens celulares em cultura *in vitro*, é possível obter insights sobre a atividade e seletividade da substância testada, confiante para a seleção adequada de linhagens celulares e para a identificação de alvos terapêuticos potenciais (INDRAYANTO et al., 2021; KLOSE et al., 2021). Essas informações são essenciais para o desenvolvimento de abordagens mais personalizadas no tratamento do câncer e para melhorar a eficácia dos medicamentos terapêuticos.

## **2.6 Diferentes microambientes tumorais**

Compreender os fatores intrínsecos e ambientais que levam a progressão e metástases desses tipos de cânceres é importante para o desenvolvimento de métodos quimioterápicos mais eficazes, bem como, para melhorar as terapias já existentes (GOMES-CARNEIRO et al., 1997), para isso, o desenvolvimento de modelos experimentais confiáveis que simulem as estruturas complexas presentes em tecidos vivos, prevendo a funcionalidade global da célula próximas do *in vivo*, mas ao mesmo tempo ser de fácil utilização e reprodução são de alto valor (SHOVAL et al., 2017).

Comumente são usadas linhagens de células tumorais como ferramenta para testar novas opções de drogas quimioterápicas (CRAWFORD, 2014; WEIGELT, 2014). Esses testes baseiam-se principalmente em ensaios de citotoxicidade, aplicando essas drogas em linhagens celulares específicas cultivadas em culturas bidimensionais (2D). Entretanto essa abordagem possui algumas restrições, principalmente em relação as características fenotípicas celulares e ao microambiente que mimetizam o sistema fisiológico (XU et al., 2014) como simulação ideal ao ambiente tumoral, interações espaciais célula-célula, aumento da hipóxia e do metabolismo em decorrência do aumento do volume de massa (CAVO et al., 2016; LAMICHHANE et al., 2016; KLIMKIEWICZ et al., 2017).

Portanto, os modelos tridimensionais (3D) surgiram como alternativas promissoras, pois têm a capacidade de fornecer um ambiente mais fisiologicamente relevante para estudar o câncer e avaliar a eficácia de substâncias naturais como agentes anticancerígenos (RATHORE et al., 2022; JENSEN et al., 2022). Diferentes microambientes tumorais, como esferoides tumorais, têm sido apresentados para mimetizar as características dos tumores in vivo (DATTA et al., 2020; KAMATAR et al., 2020; ZAREBKOHAN et al., 2020).

Os diferentes microambientes tumorais, bidimensionais e tridimensionais, permitem a avaliação de substâncias naturais contra o câncer, permitindo avaliar e comparar a penetração das substâncias nos diferentes tecidos tumorais, a eficácia terapêutica (XIE et al., 2020). Além disso, eles podem fornecer informações sobre o metabolismo das células cancerígenas, como a captação de glicose e a atividade da enzima lactato desidrogenase (LDH), que desempenham um papel crucial no crescimento e sobrevivência das células tumorais (BALLAV et al., 2021; ITO et al., 2021).

A geração aumentada de glicose pelas células cancerígenas é uma característica bem conhecida do metabolismo tumoral, conhecida como o efeito Warburg (KOZAL et al., 2021). A avaliação da captação de glicose pode fornecer insights valiosos sobre a eficácia das substâncias naturais em inibir esse processo metabólico e, conseqüentemente, inibir o crescimento tumoral (WANG et al., 2020).

Além disso, a atividade da enzima LDH é um indicador importante do metabolismo tumoral, pois está relacionado à produção de lactato e acidificação do microambiente (WANG et al., 2021). A atividade da LDH pode influenciar o crescimento e a sobrevivência das células cancerígenas (SEMLALI et al., 2021). Portanto, a avaliação da atividade da LDH em modelos 2D e 3D pode fornecer informações sobre o potencial terapêutico das substâncias naturais no contexto do metabolismo tumoral (RIBEIRO et al., 2022).

Na pesquisa oncológica, vários estudos têm mostrado que tumores cultivados em monocamada são sensíveis a vários agentes quimioterápicos, enquanto as mesmas células cultivadas em forma esferoide são resistentes a eles (PATRA et al., 2020). Por outro lado, alguns medicamentos só são eficazes em um ambiente 3D. Além disso, os modelos esferoides 3D são ideais para avaliar os efeitos de drogas a longo prazo, pois as células tumorais podem permanecer funcionalmente estáveis por várias semanas, representando melhor a arquitetura e o microambiente do tumor (VERJANS et al., 2018).

## 2.7 Cultivo de esferoide tridimensional

A utilização de culturas tridimensionais (3D) está sendo bastante relevantes como estratégia para avaliação da eficácia terapêutica, principalmente nos métodos de intervenção as neoplasias, por somar positivamente as técnicas já existentes (FRIEDRICH et al., 2007).

Culturas de esferoides organotípicos 3D podem ser vistas como métodos alternativos para validar e melhorar as estratégias pré-clínicas (SMALLEY et al., 2008), por apresentarem a capacidade de manter elementos essenciais do ambiente fisiológico e do contato célula-célula (SANT, 2018). Geralmente os modelos de esferoides formados a partir de células cancerígenas utilizam células primárias de linhas celulares tumorais ou de explantes tumorais e, em algumas metodologias, são cultivados juntamente com outras células não cancerígenas, como fibroblastos (SUTHERLAND, 1988; KELM et al, 2003; NAGELKERKE, 2013).

Dando origem a cultura de esferoide, onde um pequeno agregado de células cresce livre de materiais estranhos, como um novo método de fabricação de microambientes que permite a criação de um grande número de tecidos complexos e altamente reprodutíveis, que pode ser utilizado para avaliação de substâncias com ação antitumoral, bem como para análise da biologia tumoral e do comportamento celular neste ambiente (FENNEMA et al., 2013; GUNTI et al., 2021; MEHTA et al., 2012).

Os esferoides celulares são estruturas tridimensionais que se formam quando células individuais se agregam e interagem entre si, desenvolvidas em uma massa celular esférica (ANTONI ET AL., 2015; LIN & CHANG, 2008). Diferentemente do crescimento celular em superfícies planas, em que as células se espalham e se proliferam de forma bidimensional, os esferóides celulares recriam condições mais próximas do ambiente tridimensional encontrado no tecido vivo (SHYAM ET AL., 2023; AGRAWAL ET AL., 2021).

Dentro dos esferoides celulares, as células interagem e estabelecem comunicações complexas através de vias de sinalização e emissão solúveis (THOMA ET AL., 2014; LIN & CHANG, 2008). Esses modelos tridimensionais podem levar à formação de uma estrutura mais organizada, com a presença de gradientes de oxigênio, nutrientes e fatores de crescimento (JUBELIN ET AL., 2022).

As células localizadas no núcleo do esferoide geralmente têm acesso limitado a nutrientes e oxigênio, gerados em um gradiente de concentração desses elementos do

centro para a periferia. Isso pode levar à formação de diferentes camadas celulares dentro do esferoide, em que as células mais externas podem ter um maior suprimento de nutrientes e oxigênio, enquanto as células mais internas podem estar em um estado de hipóxia (MITRAKAS ET AL., 2023; DESMAISON ET AL., 2018).

A estrutura tridimensional dos esferoides celulares permite a interação celular mais próxima, a formação de junções celulares e a expressão de genes e proteínas de maneira mais semelhante ao que ocorre no tecido vivo (TEVLEK ET AL., 2023; MA ET AL., 2023). Portanto, os esferoides celulares são frequentemente usados como modelos *in vitro* para estudar o comportamento celular, avaliar a eficácia de medicamentos e investigar processos biológicos complexos, como fronteiras, diferenciação e invasão celular (PAGNOTTA ET AL., 2022; BARBOSA ET AL., 2021).

Essas estruturas 3D têm se mostrado valiosas ferramentas no campo da pesquisa de novas substâncias farmacológicas, permitindo uma compreensão mais aprofundada dos processos celulares sob ação desses compostos (IPEK ET AL., 2022).

Diante deste cenário é essencial a persistência por contribuições científicas consistentes através de novas alternativas de tratamento para o câncer, incluindo os diferentes tipos de cânceres de pele. O presente trabalho visa, avaliar o potencial biológico e farmacocinético da substância 22-HTG em relação ao seu efeito em células de melanoma principalmente sua ação sobre os esferoides em relação ao comportamento das células frente a 22-HTG no modelo proposto.

Tendo como pressuposto que a subpopulação de células cultivadas em formato tridimensional quando comparada a monocamada mostra maior resistência ao tratamento ou capacidade de sobrevivência em nichos fisiopatológicos específicos, esta observação terá um impacto claro e importante em trabalhos futuro, incluindo o desenvolvimento de novos alvos-medicamentosos específicos. Contribuindo, assim, para o prosseguimento dos estudos na pesquisa e desenvolvimento do microambiente tumoral e de produtos promissores com atividade biológica.

## **2.8 Metabolismo da Célula Tumoral**

As células tumorais passam por uma reprogramação metabólica que as leva a utilizar predominantemente a glicólise aeróbica como fonte de energia, em vez da fosforilação oxidativa, mesmo quando há disponibilidade de oxigênio. (WARBURG, 1956). Os tumores dependem da glicose como principal fonte de ATP, mas essa

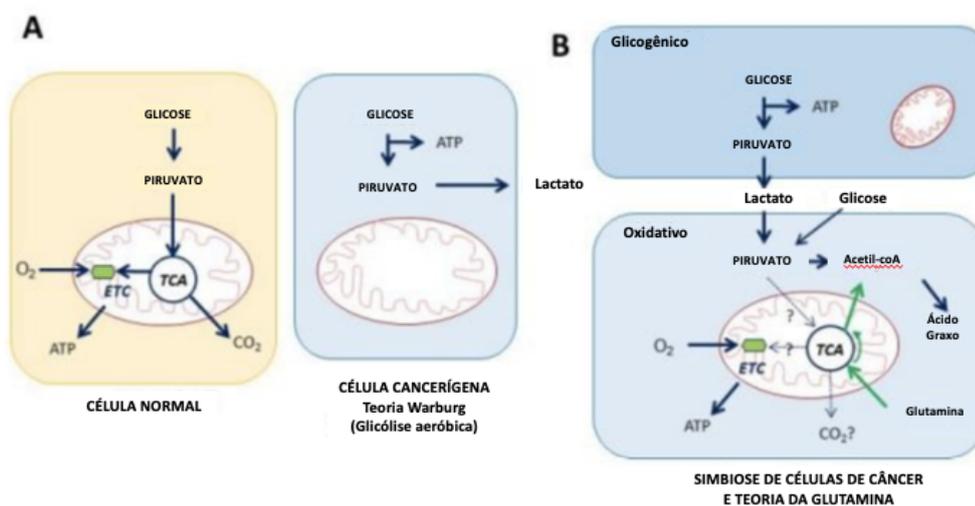
dependência ocorre principalmente em situações de hipóxia, quando a glicose é a única fonte de nutrientes disponíveis (KIM et al., 2018). No entanto, em algumas células tumorais, foi observado um aumento na fosforilação oxidativa (DAR et al., 2017; KIM et al., 2018).

Em condições aeróbicas, as células normais utilizam a glicose como substrato energético, convertendo-a inicialmente em piruvato através da via glicolítica no citosol celular, e em seguida em oxigênio de carbono (CO<sub>2</sub>) na mitocôndria pelo ciclo de Krebs/ciclo dos tricarboxílicos (TCA), culminando na produção de ATP pela fosforilação oxidativa (OXPHOS). Em condições anaeróbicas, a glicólise é priorizada, com redução da quantidade de piruvato direcionado para a mitocôndria (Figura 4A) (LIBERTI; LOCASALE, 2016).

As células tumorais apresentam uma reprogramação metabólica, havendo certas teorias que buscam explicar como ocorre o metabolismo energético no câncer. A primeira teoria resulta na preferência pela via glicolítica, mesmo em ambientes com oxigênio disponível. Essa produção de energia se dá pela fermentação da glicose, que resulta na formação de lactato. Esse fenômeno é conhecido como glicólise aeróbica ou efeito Warburg (Figura 4A) (LIBERTI; LOCASALE, 2016).

Uma outra teoria que busca explicar o metabolismo do câncer sugere que as células tumorais regulam mutuamente a produção de energia através de uma simbiose metabólica. Isso ocorre quando uma célula tumoral consome glicose para produzir lactato e ATP (fenômeno conhecido como efeito Warburg), enquanto uma célula vizinha utiliza o lactato secretado como fonte de energia para produzir ATP por meio do ciclo de Krebs e da fosforilação oxidativa (Figura 4B) (SONVEAUX et al., 2008; FAUBERT et al., 2017).

Certas células tumorais utilizam o lactato para gerar ATP e para intermediários do ciclo de Krebs (FAUBERT et al., 2017). Além disso, a lactato desidrogenase (LDH) pode converter o lactato em piruvato, que, por sua vez, pode ser convertido em acetil-CoA pela ATP-citrato liase para síntese de ácidos graxos (Figura B) (ZAIDI et al., 2012), o que demonstra que as mitocôndrias das células tumorais apresentam atividade de fosforilação oxidativa (KIM et al., 2018). Isso significa que as células tumorais exibem uma heterogeneidade no uso de glicólise ou fosforilação oxidativa como fonte de energia, e essa flexibilidade sugere uma adaptação para sobrevivência (DAR et al., 2017).



**Figura 5** - Modelo esquemático de reprogramação metabólica tumoral. (A) Metabolismo de uma célula normal na presença de oxigênio e teoria do efeito Warburg em células tumorais. (B) Teoria da simbiose metabólica e glutaminólise em células tumorais (Fonte: adaptada de KIM et al., 2018).

No ambiente tumoral, as células se multiplicam rapidamente e consomem grandes quantidades de nutrientes, o que leva à produção de um ambiente ácido e carente de oxigênio e glicose (YIN et al., 2019). Como resposta a essas alterações nutricionais, as células tumorais sofrem em vias bioquímicas, demonstrando a capacidade de reprogramação metabólica e adaptação celular, que é crucial para manter a antecipação do tumor. Essa plasticidade tumoral é um mecanismo importante para a sobrevivência das células e sua capacidade de adaptação para garantir sua proliferação (BISWAL et al., 2017).

Devido à importância crucial da reprogramação metabólica no desenvolvimento do câncer, com ênfase na via glicolítica aeróbica, pesquisas sobre novos medicamentos que coexistem diretamente o metabolismo celular têm se mostrado promissoras. A terapia visando a via glicolítica aeróbica é uma estratégia que visa aumentar a seleção de linhagens tumorais dependentes dessa via para a produção de energia, minimizando assim os efeitos colaterais no tratamento em células normais (XINTAROPOULOU et al., 2015).

Nesse contexto, um caminho bastante explorado pela comunidade científica para evitar a progressão tumoral é a identificação e desenvolvimento de novos fármacos através de investigações de recursos naturais, e informações a cerca da cinética, dinâmica, biodisponibilidade e os parâmetros toxicológicos de seus constituintes químicos (SORKIN et al., 2020).

Diante deste cenário é essencial a persistência por contribuições científicas consistentes através de novas alternativas de tratamento para o câncer. Neste trabalho, propomos avaliar diferentes microambientes tumorais tridimensionais *in vitro* e compará-los com os modelos bidimensionais convencionais para investigar a eficácia de substâncias 22-HTG contra linhagens de células de melanoma. Foi avaliada a ação da 22-HTG na captação de glicose, a atividade da LDH e a viabilidade celular das células SKMEL-19, SKMEL-28, SKMEL103 e MRC5 cultivadas nesses modelos.

Através da análise desses parâmetros metabólicos e funcionais, pretendemos identificar o modelo mais relevante e que melhor mimetizam as condições tumorais *in vivo*, permitindo uma avaliação mais precisa da eficácia terapêutica da 22-HTG, analisando a redução na atividade enzimática da enzima LDH e na captação de glicose de bem como, avaliar se a substância 22-HTG demonstrar uma maior atividade terapêutica em uma linhagem celular de melanoma em comparação com outra linhagem.

Espera-se que os resultados obtidos nesse estudo contribuam para o avanço do conhecimento sobre a ação de naturais contra o câncer e forneçam insights importantes para o desenvolvimento de estratégias terapêuticas mais eficazes na modulação do metabolismo tumoral.

### **3. OBJETIVOS**

#### **3.1 Objetivo Geral**

Avaliar o perfil metabólico celular em diferentes microambientes tumorais das linhagens de melanoma SKMEL-19, SKMEL-28 e AKMEL-103 frente a ação do 22-HTG.

#### **3.2 Objetivos Específicos**

- Predizer alvos farmacológicos e caracterizar parâmetros farmacocinéticos e toxicológicos in silico da 22-HTG;
- Determinar o efeito citotóxico da 22-HTG sobre as células tumorais em monocamada e no microambiente tridimensional;
- Acompanhar o crescimento dos esferoides formados com diferentes quantidades de células;
- Realizar análises morfométricas avaliando os parâmetros: solidez, esfericidade e diâmetro de Feret dos esferoides;
- Investigar o comportamento da 22-HTG sobre a viabilidade das células tumorais de melanoma nos diferentes microambientes, monocamada e tridimensional in vitro;
- Avaliar a influência de diferentes concentrações de glicose no perfil metabólico celular bidimensional;
- Determinar a influência do 22-HTG no consumo de glicose e no perfil da atividade da enzima LDH em diferentes microambientes tumorais nas linhagens de melanoma;
- Avaliar se a substância 22-HTG tem atividade terapêutica nas linhagens celulares de melanoma cultivadas.

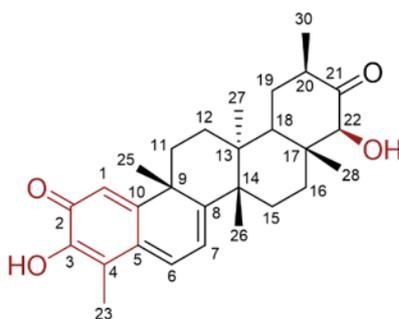
## 4. METODOLOGIA

### 4.1 Obtenção da substância 22 $\beta$ -hidroxitingenona

A espécie *S. impressifolia* foi coletada na Reserva Adolpho Ducke (localizada no Km 26 da rodovia AM-010, município de Manaus, estado do Amazonas, Brasil. Um exemplar (#4699) foi levado ao herbário do Instituto Nacional de Pesquisas da Amazônia (INPA), Brasil para confirmação da espécie.

Para obtenção da substância 22 $\beta$ -hidroxitingenona (Figura 6), foram utilizados troncos e galhos de *S. impressionifolia* e os procedimentos de extração, purificação e confirmação estrutural estão descritos por da Silva et al., 2016; Aranha; 2020.

O acesso foi registrado sob o número: A715C2F no SisGen - Sistema Nacional de Gestão de Recursos Genéticos e Conhecimento Tradicional Associado do Brasil. Todo o processo de obtenção da 22-HTG foi descrito anteriormente (ARANHA et al., 2020, 2021; DA SILVA et al., 2016)



**Figura 6** - Estrutura química da 22 $\beta$ -hidroxitingenona. Fonte: Elaborada pela autora

Para utilização da 22-HTG nos testes biológicos *in vitro*, a substância foi dissolvida em DMSO. A concentração final do solvente nunca ultrapassou 0,2% (v/v). Essa concentração de DMSO não interfere na proliferação celular (DA SILVA et al., 2016).

### 4.2 Triagem virtual

#### 4.2.1 Predição do alvo biológico e dos parâmetros moleculares, farmacocinéticos e toxicológicos

A predição dos alvos biológicos para a 22-HTG foi realizada utilizando o software online SwissTargetPrediction® (<http://www.swisstargetprediction.ch/>) (D GFELLER et al., 2014). Os parâmetros moleculares, farmacocinéticos e toxicológicos foram avaliados na plataforma online SwissADME® (<http://www.swissadme.ch/>) (DAINA et al., 2017) e admetSAR® (<http://lmmd.ecust.edu.cn/admetSar2/>) (YANG et al., 2019), que empregam bancos de dados de compostos que já passaram por testes pré-clínicos in vitro e/ou in vivo associados à absorção, distribuição, metabolismo e excreção, sendo fundamentados por meio de comparação estrutural mistos e descrição de estrutura e atividade (*Quantitative structure-activity relationship*, QSAR) (LEE et al., 2012).

#### 4.2.2 Proteínas e preparação de moléculas de 22-HTG

O PDB (Protein Data Bank – <https://www.rcsb.org/>) foi usado para baixar o “pdb”. arquivos de estruturas tridimensionais (3D) para as proteínas HK1 (PDB ID: 1CZA) e LDH (PDB ID: 5W8J). Como critério de escolha das melhores estruturas, foram observadas aquelas com resolução de raios-X inferior a 2 Angstroms (Å). A estrutura bidimensional (2D) da 22-Beta Hydroxytingenone foi projetada usando o software MarvinSketch® para obter o código SMILE (Simplified Molecular Input Line Entry Specification). Em seguida, a estrutura foi convertida em um esqueleto tridimensional (3D) usando o programa Avogadro® e otimizada geometricamente.

As proteínas e estruturas de 22-Beta Hydroxytingenone foram processadas usando o software PyMol para remover ligantes e moléculas de água. Em seguida, o estado de protonação ajustado dos resíduos de aminoácidos de todas as moléculas testadas nas simulações foi em pH 7,4 usando o servidor PDB2PQR-PropKa (<https://server.poissonboltzmann.org/>).

#### 4.2.3. Docking molecular

A análise de docking molecular foi realizada utilizando o software Autodock Vina® e no servidor DockThor (<https://dockthor.lncc.br/v2/>), que utiliza como metodologia ligantes flexíveis e receptores rígidos, utilizando um algoritmo genético e o campo de força molecular MMFF94S para prever a pontuação de cada pose (TROOT et al., 2010; DE MAGALHÃES et al., 2014; HALGREN, 2004). Os alvos avaliados foram

obtidos no formato (.pdb) do banco RCSB Protein Data Bank (PDB): AKR1B1 (PDB: 5OU0) e AKR1B10 (PDB: 1ZUA).

A análise das poses e melhor interação foram realizadas nos softwares PyMol e Discovery tools. O cálculo do desvio quadrado médio da raiz foi feito usando o programa Pymol. Moléculas de água e outras moléculas usadas na cristalização de proteínas não necessárias para a atividade catalítica foram removidas utilizando também o software Pymol©, e todos os ligantes foram preparados e a geometria, assim como a energia, foram minimizadas utilizando o campo de força molecular da Merck (MMFF94) por meio do programa ChemBioDraw©.

Durante a análise, os receptores foram mantidos rígidos e os ligantes foram flexíveis para girar e explorar as poses mais prováveis. As dimensões do grid box adotadas durante a análise foram de 8x11x9 Å e 12x20x18 Å, com espaçamento de grade de 1,0 Å para AKR1B1 e AKR1B10, respectivamente.

As propriedades farmacocinéticas e as classificações druglikeness dos quassinoides foram realizadas usando SwissADME (DAINA et al, 2017). As previsões os seguintes parâmetros: Regra de Lipinski de cinco (peso molecular - MW; aceptor de ligação de hidrogênio - HBA; doador de ligação de hidrogênio - HBD; e coeficiente de partição octanol/água - LogP) e vários outros parâmetros/propriedades como área de superfície polar molecular (TPSA), logaritmo de solubilidade (LogS), absorção gastrointestinal (GI) e permeabilidade da barreira hematoencefálica (BHE). Os mesmos cálculos foram feitos com X77 e teaflavina.

A avaliação toxicológica dos compostos foi realizada com as plataformas pKCSM (PIRES et al., 2015), AdmetSAR (CHENG et al., 2012), Pred-hERG (BRAGA et al., 2015) e Pred-Skin (BRAGA et al., 2017) ferramentas computacionais baseadas no SMILES da estrutura. Para tal, foram considerados vários parâmetros toxicológicos, nomeadamente toxicidade de Ames, carcinogenicidade, inibição de hERG, sensibilização cutânea e hepatotoxicidade. Os resultados foram expressos como "-" para não detectado ou "+" para risco detectado.

Os resultados foram visualizados no AutoDock Tools© e as interações foram avaliadas em termos de energia de afinidade de ligação (Kcal/mol), número de ligações de hidrogênio e outras interações formadas entre os resíduos do sítio ativo da macromolécula e o ligante. As imagens 2D e 3D dos resultados moleculares de acoplamento foram obtidas usando o software Discovery Studio Visualizer 4.0©.

### 4.3 Cultivo e cultura de células

As células SKMEL19, SKMEL28, SKMEL103 (melanoma humano), MRC5 (fibroblasto humano) foram cultivadas em meio Dulbecco's Modified Eagle's Medium (DMEM) suplementado com 10% de soro fetal bovino, estreptomicina 100 µg/ml e 100 U/ml penicilina.

O manuseio das células foi realizado em condições estéreis, em uma câmara de fluxo laminar vertical e a cultura foi mantida em incubadora de gás carbônico a 37°C com 5% de CO<sub>2</sub> atmosfera.

O crescimento das culturas foi observado periodicamente com o auxílio de um microscópio invertido (Leica DMIL LED) até a confluência de, no máximo, 85%. Foi verificado o consumo de nutrientes contidos no meio de cultura, que altera o seu pH, através da alteração da coloração do meio, de rosado para amarelado. No momento em que as células apresentavam confluência, era realizada uma manutenção da cultura, que seguia os seguintes passos: Inicialmente, o meio contido nas garrafas era descartado e as células lavadas com tampão fosfato-salino (PBS) 1x (NaCl 137 mM, Fosfato 10 mM e KCl 2,7 mM e pH 7.4), em seguida a adição de tripsina-EDTA (0,25% v/v em PBS 1x) durante 5 minutos em estufa de CO<sub>2</sub> a 37°C para que as células perdessem sua aderência. Após isso, a tripsina era inativada com meio de cultura acrescido de 10% de SFB. A solução era então homogeneizada e uma parte descartada, por fim, era adicionado meio de cultura novo à garrafa para que se pudesse manter a cultura até que fosse necessário repetir esse ciclo. Os experimentos foram realizados em parceria com o Laboratório de Farmacogenética, da Universidade Federal do Ceará, coordenado pela professora Dra. Raquel Montenegro.

### 4.4 Ensaio de viabilidade celular

A concentração inibitória de 50% (CI50) das linhagens celulares SK-MEL-19, SK-MEL-28, SK-MEL-103 e MRC5 foi determinada pelo ensaio Alamar blue (resazurin 7-Hydroxy-3H-phenoxazin-3-one 10-oxide) (AHMED et al., 1994), que é um método fluorométrico para a detecção da viabilidade celular com base na redução da resazurina (forma oxidada) para resofurina (forma reduzida) (ZACHARI et al., 2014). Para o ensaio, um total de  $0,5 \times 10^4$  células foi semeado em uma placa de 96 poços e deixado em contato por 24 horas. 22-HTG (46-0,71 µM) foi então adicionado a cada poço com um volume

de 100  $\mu\text{L}$ /poço e após 24, 48 e 72 h de exposição ao 22-HTG, 10  $\mu\text{L}$  de solução de azul de Alamar a 0,02% em DMEM foram adicionados a cada poço. A fluorescência foi medida usando excitação de 465 nm e emissão de 540 nm no leitor de microplacas (DTX 800 Detector Multimodo Beckman Coulter).

A viabilidade celular também foi avaliada pelo ensaio de exclusão de azul de tripan (STROBER, 2001), para realização do teste de viabilidade celular em que foi usado meios de cultivo com diferentes concentrações de glicose. Na placa de 24 poços, um total de  $0,5 \times 10^5$  células foi semeado por um período de fixação de 24 h. Essa etapa foi seguida pela adição de 1,0, 2,0 e 2,5  $\mu\text{M}$  de 22-HTG com um volume de 1,0 mL/poço. Após incubação por 24 e 48 h, as células SK-MEL-28 foram colhidas para contar células vivas versus células mortas em uma câmara de hemocitômetro usando solução de azul de tripano a 0,4%.

#### **4.5 Fabricação de hidrogéis e Formação dos esferoides tridimensionais**

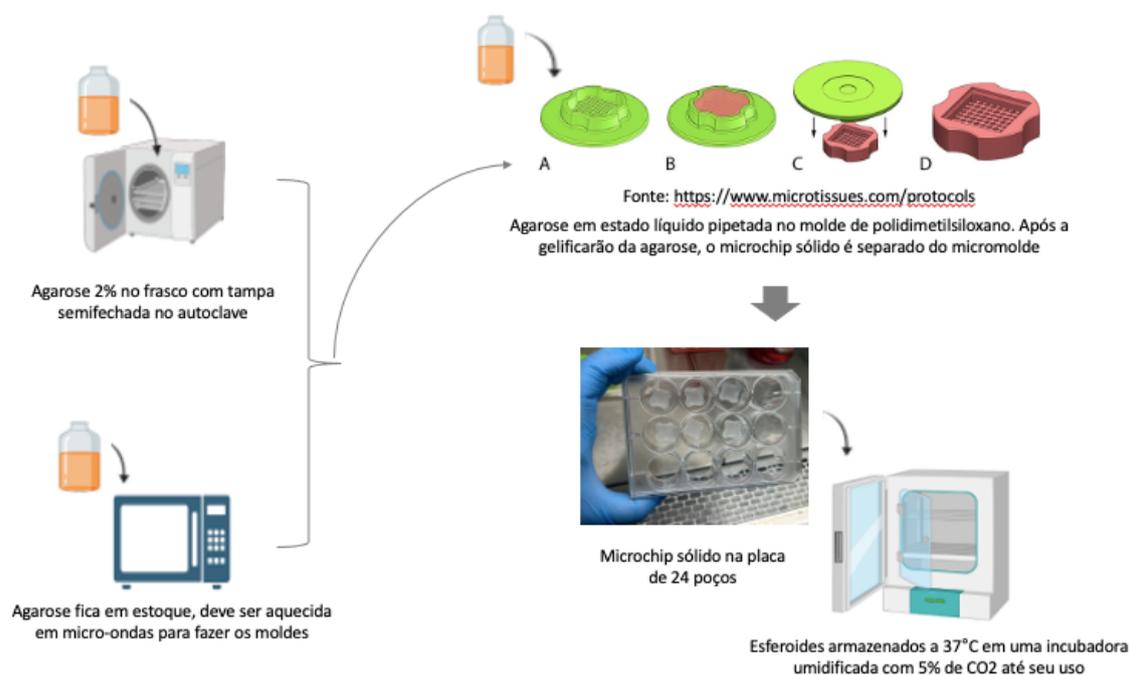
A preparação dos microchips de agarose foi realizada utilizando agarose tipo I, diluída em PBS em uma concentração de 2,0%, sendo em seguida autoclavada. Foi calculado o volume necessário para preencher os moldes de modo a se obter todos os chips desejados para cada etapa dos experimentos.

O cálculo de tampão e de agarose foi feito por uma regra de três simples (se o preparo de solução de 200 mL, seriam necessários 4g de agarose). A agarose foi adicionada em torno de 90% do volume final de tampão PBS em um erlenmeyer e a solução foi aquecida em forno microondas até que a agarose se dissolvesse completamente. Após isso, a solução foi transferida para uma proveta e foi adicionado o volume de tampão PBS necessário para atingir o volume final desejado e, por fim, a solução foi esterilizada em autoclave.

Depois de autoclavada, a solução foi manipulada apenas em condições estéreis, na câmara de fluxo laminar. Um parte da solução de agarose fica em estoque, que deve ser aquecida em forno de microondas para voltar ao estado líquido antes da sua utilização para fazer os moldes.

Para produzir os microchips 550 $\mu\text{L}$  da solução de agarose ainda em estado líquido foi pipetada no molde de polidimetilsiloxano (PDMS) disponível para comercialização (MicroTissues® 3D Petri Dish® micro-mold spheroids - Sigma-Aldrich) com um padrão de microesferas. Cada chip contém 256 micropoços com diâmetro de 400 $\mu\text{L}$  e

profundidade de 800 $\mu$ L. Uma vez que a agarose foi despejada no molde, deixou-se gelificar à temperatura ambiente. Após a gelificação da agarose, o microchip sólido foi separado do micromolde, transferido para um único poço de uma placa transparente de 12 poços e armazenado em 1000 $\mu$ L de PBS estéril a 37°C em uma incubadora umidificada com 5% de CO<sub>2</sub> até seu uso (Figura 7) (KIM et al., 2018).



**Figura 7** - Fabricação de hidrogéis de agarose. Fonte: Elaborada pela autora

#### 4.6 Plaqueamento de células nos chips de agarose

Para a geração dos esferoides 3D que foram gerados a partir das células de melanoma (SKMEL19, SKMEL28, SKMEL103) e a célula não tumoral de fibroblasto humano (MRC5). O frasco de cultivo com as células em monocamadas foi colocado no microscópio para observar a morfologia das células, o meio das garrafas foi removido e adicionado tripsina para que as células perdessem a aderência e fosse realizada a sua contagem em câmara de Neubauer. Foram calculados os volumes que fossem suficientes para o número de placas/poços desejados em cada etapa da dos experimentos.

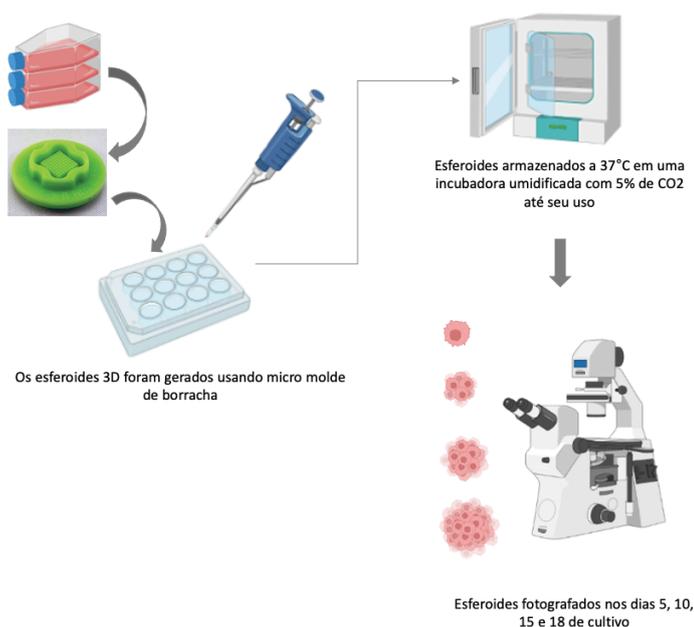
O PBS foi removido da placa contendo o micromolde sólido e as células cultivadas nas garrafas de cultura, que foram tripsinizados e semeados no microchip (50x10<sup>4</sup>, 100x10<sup>4</sup> e 150x10<sup>4</sup> células/microchip). Para o plaqueamento a quantidade de células suficiente após a contagem foram suspensas em 190 $\mu$ L de meio de cultura e então

esses 190 $\mu$ L de suspensão de células foi colocado no micromolde sólido que já estava na placa de 24 poços.

As células foram deixadas assentar por gravidade, pois se agregam espontaneamente para formar massas microtumoriais chamadas esferoides nos poços dos microchips e, após 30 minutos, em cada poço da placa contendo o molde foi adicionado 500 $\mu$ L de meio DMEM ao redor do molde. Os esferoides foram mantidos em cultivo (37°C a 5% de CO<sub>2</sub>) durante 18 dias (DURAND-HERRERA et al., 2018; CALABRETTA et al., 2022). O meio de cultivo foi trocado a cada 2 dias.

#### **4.7 Monitoramento dos esferoides por fotomicroscopia**

O crescimento dos microtecidos esféricos foram monitorados, realizando a troca do meio de cultura a cada três dias e o estudo da imagem da formação do esferoides fotografados nos dias 5, 10, 15 e 18 de cultivo (Figura 8), usando o microscópio óptico invertido (Leica DMIL LED). As imagens foram processadas usando o software de imagens ImageJ para registrar os dados em fotomicroscopia (SCHINDELIN et al., 2012), e analisadas em software GraphPad Prism para definição da concentração de células ideal para a formação de esferoides de cada linhagem.



**Figura 8** - Formação dos esferoides tridimensionais. Fonte: Elaborada pela autora.

#### 4.8 Coloração celular com laranja de acridina e brometo de etídio

A coloração com laranja de acridina (AO) e brometo de etídio (EB) foi usada para distinguir células viáveis de apoptóticas e necróticas (RALPH et al., 2016). Os esferoides de SK-MEL-19 ( $100 \times 10^4$  células/poço), SK-MEL-28 ( $50 \times 10^4$  células/poço), SK-MEL-103 ( $100 \times 10^4$  células/poço) e MRC5 ( $50 \times 10^4$  células/poço), foram plaqueadas nos moldes de agarose em placas de 24 poços. Em seguida, os esferoides foram tratados com 22-HTG (0,6 e 1,0  $\mu\text{M}$ ). Após 24h de tratamento, todo o meio dos chips e poços foi removido, e foram adicionados 190  $\mu\text{L}$  de solução contendo brometo de etídio e laranja de acridina, ambos na concentração de 10  $\mu\text{g}/\text{mL}$  dentro de cada um dos chips. Os chips foram colocados em estufa incubadora a 37°C e atmosfera de 5% de CO<sub>2</sub> por cerca de 30 minutos. Após isso, o protocolo de recuperação dos microtecidos foi realizado o meio foi retirado dos chips e foram adicionados 190  $\mu\text{L}$  de PBS no chip e mais 210  $\mu\text{L}$  de PBS no poço. Os chips foram virados invertidos, as placas levadas para centrifuga a 500rpm por 5 minutos. Os chips foram retirados da placa e descartados. Os esferoides foram ressuspensos em 300  $\mu\text{L}$  de tampão PBS e 50  $\mu\text{L}$  foram adicionados em uma placa de 96 poços, adicionando-se mais 50  $\mu\text{L}$  de tampão PBS em cada poço, posteriormente. As placas foram então levadas para as análises de fluorescência no equipamento Cytation 3, da fabricante BD Biosciences.

#### **4.9 Ensaio de viabilidade celular, absorção de glicose e atividade da lactato desidrogenase em meio com diferentes concentrações de glicose**

A fim de avaliar a viabilidade de linhagens, a absorção de glicose e atividade da lactato desidrogenase em diferentes concentrações de glicose, foi realizada nas células Skmel19, Skmel28, Skmel103 e a célula não tumoral de fibroblasto humano (MRC5) foram cultivadas em monocamada em uma placa de 12 poços ( $6 \times 10^4$  células/poço) em meio DMEM alta glicose (AG), após 24 h o meio foi substituído por meio alta glicose (AG), baixa glicose (BG) e meio sem glicose (SG).

No dia seguinte, 50 $\mu$ L do sobrenadante das células cultivadas em diferentes meios de cultura (AG, BG, SG) foi removido, e a concentração de glicose (mg/dL) foi determinada por meio de ensaio enzimático-colorimétrico (Labtest®, Brasil), seguindo o manual do fabricante, utilizando leitor de microplacas Beckman Coulter DTX 880 a uma absorbância de 450 nm (YAMAMOTO et al., 2015; YONAMINE et al., 2016).

A viabilidade das células em monocamadas em diferentes meios de cultura, foram colhidas com Tripsina-EDTA (0,5%) e centrifugadas. O concentrado celular foi ressuspensão e foi adicionado 0,4% de azul de tripano (STROBER, 2001). As células em monocamadas foram contadas em uma câmara de Neubauer e a viabilidade celular foi estimada.

Com o objetivo de avaliar a atividade da lactato desidrogenase (LDH), as células cultivadas em diferentes meios de cultura (AG, BG, SG) foram ressuspensas em 100  $\mu$ L de Triton X-100 (1 $\times$ ) por 30 min a 37 °C para romper a membrana e liberar a enzima. Em seguida, a atividade da LDH foi medida por um teste bioquímico comercial (Labtest®, Brasil) seguindo o manual do fabricante. Para estimar a atividade enzimática (U/L), a absorbância foi medida usando Beckman Coulter Microplate Reader DTX 880 (340 nm) (LANDI-LIBRANDI et al., 2012).

#### **4.10 Captação de glicose, ensaio de lactato desidrogenase e viabilidade de células de melanoma em matriz 2D e 3D e ATP em matriz 2D**

##### **4.10.1 Cultivo das células**

Para determinar o consumo de glicose, o ensaio de lactato desidrogenase e viabilidade de células as células Skmel19, Skmel28, Skmel103 e MRC5 foram semeadas

em monocamada ( $6 \times 10^4$  células/poço) e em cultivo tridimensional (Skamel19 e MRC5  $50 \times 10^4$  células/poço e Skmel28 e Skmel103  $100 \times 10^4$  células/poço) em moldes de agarose em placa 12 poços, após 24 horas de tratamento. Para esses testes, as células cultivadas em monocamadas foram tradas após 24h de cultivo e as células tridimensionais foram tradas após 5 dias de cultivo, com 22-HTG (0,6 $\mu$ L e 1,0 $\mu$ L) e rotenona (1,0 $\mu$ L).

#### **4.10.2 Captação de Glicose**

Após 24 horas, o meio foi retirado e os poços foram lavados com PBS 1x e então um novo meio com diferentes concentrações de glicose (25, 5,5, e 0,5 mM) foram adicionados. Após o consumo de glicose (tempo de 24 horas) uma alíquota de 100  $\mu$ L do sobrenadante foi retirada e centrifugada a 1.500 rpm por 5 minutos. Para determinação da concentração de glicose presente foi utilizado o kit bioquímico Glicose Liquiform® (Labtest, Brasil), e as recomendações do fabricante foram seguidas. Foi adicionado 195  $\mu$ L do reagente 1 em placa de 96 poços e 5  $\mu$ L do sobrenadante retirado dos grupos avaliados foram acrescentados, o padrão de calibração do teste foi realizado nas mesmas condições. Em seguida as amostras foram colocadas em banho maria a 37°C por 10 minutos e então lidas em espectrofotômetro (Beckman Coulter Microplate Reader DTX 880) em absorbância de 450 nm.

Os dados foram analisados a partir da média  $\pm$  desvio padrão da média de 3 experimentos independentes. Para verificar a ocorrência de diferença significativa entre os grupos, os dados foram comparados por 2way ANOVA seguida por pós-teste de Bonferroni, com nível de significância de 95% ( $p < 0,05$ ) utilizando o programa estatístico GraphPad Prism® 5.1.

#### **4.10.3 Atividade da enzima Lactato Desidrogenase (LDH)**

Para averiguar a atividade da lactato desidrogenase (LDH), após 24 horas de aderência celular das linhagens celulares em monocamadas e em esferas tridimensionais, o meio foi retirado e os poços foram lavados com PBS 1x, posteriormente, foi acrescentado aos poços meios DMEM com diferentes concentrações de glicose (25, 5,5, e 0,5 mM) e a placa foi incubada por 24 horas. Em seguida, os meios foram retirados e as células lavadas com PBS 1x, ocorreu então a desagregação celular com auxílio de tripsina-EDTA (0,25%) por 5 minutos. Então, a atividade enzimática foi inativada com a adição de meio completo e a suspensão celular foi centrifugada (Universal 320 R) a 1.500

rpm/5 minutos. O pellet foi ressuspensionado em 100  $\mu$ L de PBS 1x e a concentração de células viáveis foi mensurada com auxílio do corante azul de tripan (0,4%), como descrito anteriormente. Um total estimado em  $2 \times 10^4$  células viáveis foi transferida para outro tubo e centrifugada, o pellet foi então ressuspensionado em 80  $\mu$ L de uma solução com PBS 1x/Triton X-100 durante 45 minutos em estufa de CO<sub>2</sub> a 37°C para permeabilização celular. Em sequência, as amostras foram centrifugadas e 20  $\mu$ L do sobrenadante foi retirado para mensurar a atividade enzimática utilizando o kit bioquímico LDH Liquiform® (Labtest, Brasil), seguindo as recomendações do fabricante. Em placa de 96 poços foram acrescentados 200  $\mu$ L da solução trabalho, formada por reagente 1 e reagente 2 (4:1), e em seguida 20  $\mu$ L de amostra foi adicionado aos poços e a placa foi então incubada em estufa de CO<sub>2</sub> por 1 minuto. Posteriormente, a absorbância (340 nm) foi mensurada em leitor de placas (Beckman Coulter Microplate Reader DTX 880), leitura 1 (A1), e após dois minutos a leitura foi realizada novamente, leitura 2 (A2), utilizando os mesmos parâmetros.

Os resultados de atividade enzimática de LDH (U/L) foram então normalizados por transformação em percentual, tendo as amostras correspondentes a alta concentração de glicose (25 mM) como 100%. Assim, os dados foram analisados a partir da média  $\pm$  desvio padrão da média de 3 experimentos independentes. Para verificar a ocorrência de diferença significativa entre os grupos, os dados foram comparados por 2way ANOVA seguida por pós-teste de Bonferroni, com nível de significância de 95% ( $p < 0,05$ ) utilizando o programa estatístico GraphPad Prism® 5.1.

#### **4.10.4 Ensaio de citotoxicidade por exclusão com azul de tripan**

Após a aderência celular, o meio foi retirado e as células foram lavadas com PBS 1x, em seguida, o meio DMEM com diferentes concentrações de glicose (25, 5,5 e 0,5 mM) foram adicionados por 24 horas. Após, os meios foram retirados, as células foram lavadas com PBS 1x e tripsinizadas com tripsina-EDTA (0,25%) por 5 minutos. Em seguida, na suspensão celular foi adicionado meio suplementado para inativação da tripsina e a solução foi transferida para eppendorfs estéreis e centrifugados (Universal 320 R) a 1.500 rpm por 5 minutos. As células foram ressuspensionadas em 100  $\mu$ L de PBS 1x e uma alíquota de 20  $\mu$ L foi transferida para um novo tubo e o corante azul de tripan (0,4%) foi adicionado a suspensão, em seguida as células viáveis foram contadas com o

auxílio de uma câmara de Neubauer em microscópio óptico invertido (Leica DMIL LED) e a viabilidade celular foi estimada.

As células foram diferenciadas em viáveis e não viáveis, as viáveis com citoplasma límpido e as não viáveis/mortas com citoplasma corado em azul.

Os dados foram analisados a partir da média  $\pm$  desvio padrão da média de 3 experimentos independentes. Para verificar a ocorrência de diferença significativa entre os grupos, os dados foram comparados por 2way ANOVA seguida por pós-teste de Bonferroni, com nível de significância de 95% ( $p < 0,05$ ) utilizando o programa estatístico GraphPad Prism® 5.1.

#### **4.10.5 Quantificação dos níveis intracelulares de ATP**

As linhagens SKMEL-19, SKMEL-28, SKMEL-203 e MRC5 foram tratada com 22-HTG (0,6 $\mu$ M) e ROT (1 $\mu$ M) por 24 horas. Em seguida, os meios foram retirados e as células lavadas com PBS 1x, ocorreu então a desagregação celular com auxílio de tripsina-EDTA (0,25%) por 5 minutos. Então, a atividade enzimática foi inativada com a adição de meio completo e a suspensão celular foi centrifugada (Universal 320 R) a 1.500 rpm/5 minutos. O concentrado de células foi ressuspensionado em 100 $\mu$ L de PBS 1x e a concentração de células viáveis foi mensurada com auxílio do corante azul de tripan (0,4%). Um total estimado em  $2 \times 10^4$  células viáveis foi transferida para outro tubo e centrifugada, o pellet foi então ressuspensionado em 80 $\mu$ L de uma solução com PBS 1x/Triton X-100 durante 45 minutos em estufa de CO<sub>2</sub> a 37°C para permeabilização celular. Em sequência, as amostras foram centrifugadas e 20  $\mu$ L do sobrenadante foi retirado para mensurar a atividade enzimática utilizando o kit bioquímico LDH Liquiform® (Labtest, Brasil), seguindo as recomendações do fabricante. Em placa de 96 poços foram acrescentados 200  $\mu$ L da solução trabalho, formada por reagente 1 e reagente 2 (4:1), e em seguida 20  $\mu$ L de amostra foi adicionado aos poços e a placa foi então incubada em estufa de CO<sub>2</sub> por 1 minuto. Posteriormente, a absorbância (340 nm) foi mensurada em leitor de placas (Beckman Coulter Microplate Reader DTX 880), leitura 1 (A1), e após dois minutos a leitura foi realizada novamente, leitura 2 (A2), utilizando os mesmos parâmetros (XIE et al., 2019).

#### **4.11 Análise estatística**

Os resultados de todos os ensaios foram expressos como média  $\pm$  desvio padrão de três experimentos independentes e analisados estatisticamente, usando o software GraphPad Prism 6. Teste t student ou Análise de Variância One-Way (ANOVA) seguido pelo teste de Tukey (Multiple Comparison Test) ou ANOVA 2way seguido de Bonferroni posttest serão utilizados. Serão considerados estatisticamente significativos os resultados com  $*p < 0,05$ , frente aos controles.

## 5 RESULTADOS

### 5.1 Triagem virtual

#### 5.1.1 Predição do alvo biológico e dos parâmetros moleculares, farmacocinéticos e toxicológicos.

Os alvos biológicos de 22-HTG, definidos pela predição *in silico* estão demonstrados na tabela 1. Destaca-se a probabilidade elevada de interação com AKR1B10, alcançando 98%. Esse é um alvo molecular relevante, considerando o tipo celular estudado. Os demais alvos moleculares preditos para 22-HTG são HSF1, PTPN11, TLR9 e PTPN6, com probabilidade de interação de 58%.

Tabela 1 - Substância 22-HTG demonstra elevada probabilidade de interação com os genes AKR1B. Ensaio de predição *in silico* dos alvos farmacológicos que sugere os possíveis genes que a substância 22-HTG pode ter como alvo terapêutico.

Alvo	Código genético	Por homologia	Probabilidade (%)
Família Aldo-ceto redutase 1 membro B10	AKR1B10	Sim	98
Família Aldo-ceto redutase 1 membro B15	AKR1B15	Sim	98
Aldose redutase	AKR1B1	Sim	98
Proteína 1 do fator de choque térmico	HSF1	Não	58
Receptor não tirosina-proteína fosfatase tipo 11	PTPN11	Não	58
Receptor tipo toll 9	TLR9	Não	58
Receptor não tirosina-proteína fosfatase tipo 6	PTPN6	Sim	58
Proteína não caracterizada	-	Sim	58

Considerando os parâmetros farmacocinéticos estabelecidos para a substância 22-HTG (Tabela 2), foram analisados a penetração na barreira hematoencefálica, taxa de absorção em células Caco-2, absorção intestinal humana, ligação às proteínas plasmáticas e inibição de enzimas da família CYP.

No estudo das propriedades farmacocinéticas, realizada através da triagem virtual SwissADME, identificou que a 22-HTG apresenta baixo potencial de penetração na barreira hematoencefálica (0,2598%). A absorção intestinal de 99,07% sugere que a mesma pode ser absorvida adequadamente através das células intestinais.

Os valores previstos para a permeabilidade da 22HTG na Caco-2 apresentam absorção moderada, 65,08nm/seg. E demonstram haver fortemente ligação as proteínas plasmáticas, com valor de 95,40% de ligação.

Tabela 2 - Substância 22-THG demonstra baixa penetração na barreira hematoencefálica, elevada absorção intestinal e forte ligação com proteínas plasmáticas. Ensaio de predição in silico dos parâmetros farmacocinéticos que sugere a capacidade de estimar e prever características importantes dos compostos candidatos a fármacos relacionados à sua absorção, distribuição, metabolismo e excreção no organismo.

<b>Parâmetros Avaliados</b>	<b>AdmetSAR</b>	<b>SwissADME</b>
Penetração na barreira hematoencefálica	0,2598%	Não
Permeabilidade em Caco-2	65,08 nm/seg	-
Absorção intestinal	99,07%	Alta
Ligação as proteínas plasmáticas	95,40%	Sim
Inibidor da OATP1B1	Sim	-
Inibidor da OATP1B3	Sim	-
Inibidor da OCT2	Sim	-
Inibidor da BSEP	Sim	-
Inibidor da CYP2C19	Não	Não
Inibidor da CYP2C9	Não	Sim
Inibidor da CYP2D6	Não	Não
Inibidor da CYP3A4	Não	Sim
Substrato da CYP3A4	Sim	-
Substrato da CYP2C9	Não	-
Substrato da CYP2D6	Não	-

Análise de parâmetros toxicológicos in silico estão demonstrados na tabela 3. A 22-HTG não apresenta efeitos tóxicos indesejáveis, sendo sugerido como não mutagênico, corroborando com o parâmetro de carcinogenicidade que foi de baixa probabilidade. A toxicidade oral aguda foi III sugerindo que seja um composto considerado não tóxico em absorção oral.

Tabela 3 - Substância 22-THG demonstra baixa probabilidade de causar efeitos tóxicos. Ensaio de predição in silico dos parâmetros toxicológicos in silico previstos no ADMET sugere a capacidade de estimar e prever os efeitos tóxicos de compostos candidatos a fármacos ou produtos químicos. Fonte: A autoria própria (2023).

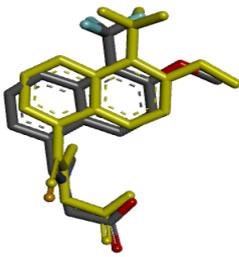
Perfil previsto ADMET - Classificação	Valor	Probabilidade
Carcinogenicidade (binária)	-	1,0000
Carcinogenicidade (trinária)	Não obrigatório	0,6183
Mutagênese de ames	-	0,61
Hepatotoxicidade	-	0,7
Toxicidade Oral Aguda (c)	III	0,5297
Ligação de aromatase	+	0,7963

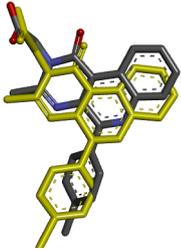
### 5.1.2 Ancoragem molecular

Foi construído para cada uma das enzimas, o *grid box*, para a realização da ancoragem molecular de acordo com as dimensões dispostas no quadro 1, e por meio da análise do *redocking* utilizando o *grid box* elaborado.

Observou-se, através da análise do *redocking*, que o valor do RMSD, desvio entre a posição da molécula cocrystalizada e a posição do ligante, nos métodos desenvolvido foi inferior a 2 Å, levando em consideração a pose mais estável do cluster mais populoso e com menor energia de ligação, certificando, assim, um elevado grau de superposição e orientação relativa da conformação na estrutura cristalográfica, corroborando com as disposições utilizadas para as análises de ancoragem molecular.

**Quadro 1** Substância 22-THG apresenta elevado grau de sobreposição as estruturas cristalografada. A análise pelo método de redocking utilizando o grid box elaborado in silico em triagem virtual sugere uma avaliação mais precisa e confiável da interação entre um composto candidato a fármaco e seu alvo molecular.

Enzimas	Código PDB	Dimensões do grid box	RMSA (Å)	Redocking
AKR1B10	1ZUA	12 x 20 x 18	0,8	

AKR1B1	5OU0	8 x 11 x 9	1,2	
--------	------	------------	-----	---

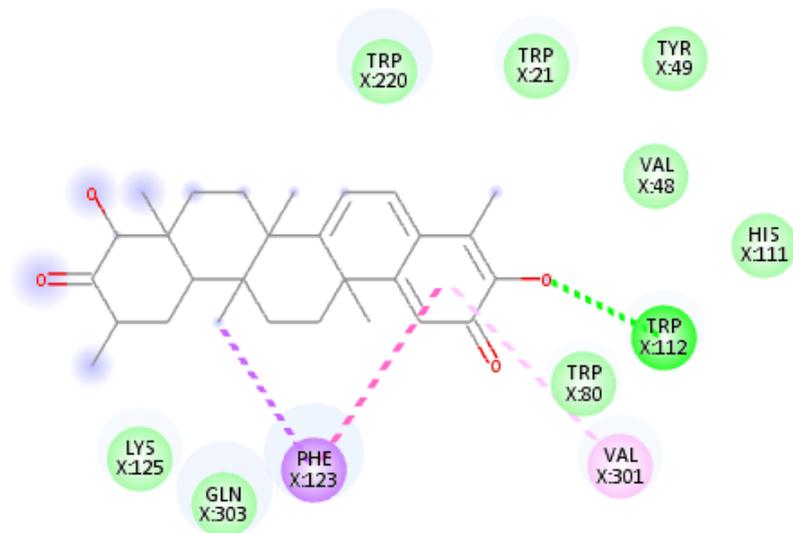
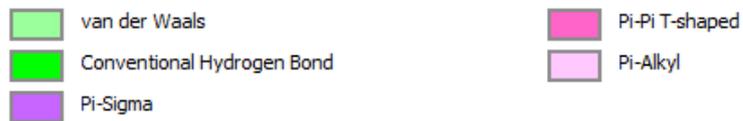
A 22-HTG apresentou uma energia de afinidade semelhante ao ligante original da AKR1B10, o Tolrestate, porém não apresentou uma energia de afinidade favorável e nem perfil de complementariedade em relação ao AKR1B1. Os resultados dos valores de energia de afinidade de ligação, tanto dos ligantes cristalizados quanto da 22-HTG, estão dispostos na tabela 4.

Tabela 4 - Substância 22-THG demonstra elevada probabilidade de interação com as enzimas AKR1B10 e AKR1B1. Ensaio de energia de interação (Kcal/mol) entre compostos e enzimas avaliadas in silico sugere uma avaliação do potencial de interação entre os compostos e as enzimas-alvo. Essa avaliação é baseada na energia de interação, que mede a estabilidade e a força da ligação entre o composto e a enzima.

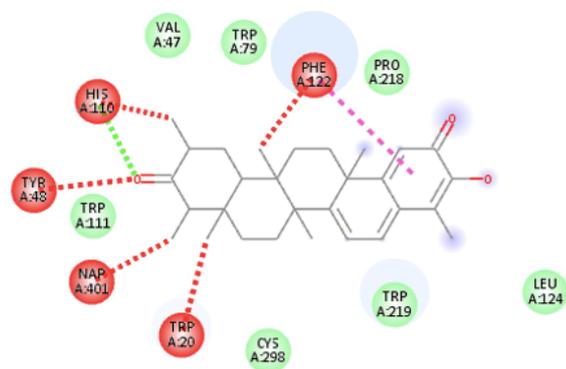
<b>Compostos</b>	<b>AKR1B1 (PDB 5OU0)</b>	<b>AKR1B10 (PDB 1ZUA)</b>
22-HTG	17,6	-9,4
2-[5-(4-chlorophenyl)-3-methyl-1-oxidanylidene-pyrimido[4,5-c]quinolin-2-yl]ethanoic acid	-9,5	-
Tolrestat	-	-9,4

A 22-HTG apresentou um perfil de complementariedade, baixa energia de ligação e formação de ligação de hidrogênio com os resíduos de aminoácidos no sítio ativo, dos seguintes alvos: AKR1B10 e AKR1B1. Na investigação da ancoragem molecular aponta elevada probabilidade de interação da 22-HTG com as enzimas AKR1B10 e observou-se que não há uma interação favorável entre a substância e os aminoácidos de AKR1B1 (Figura 9A e 9B).

A

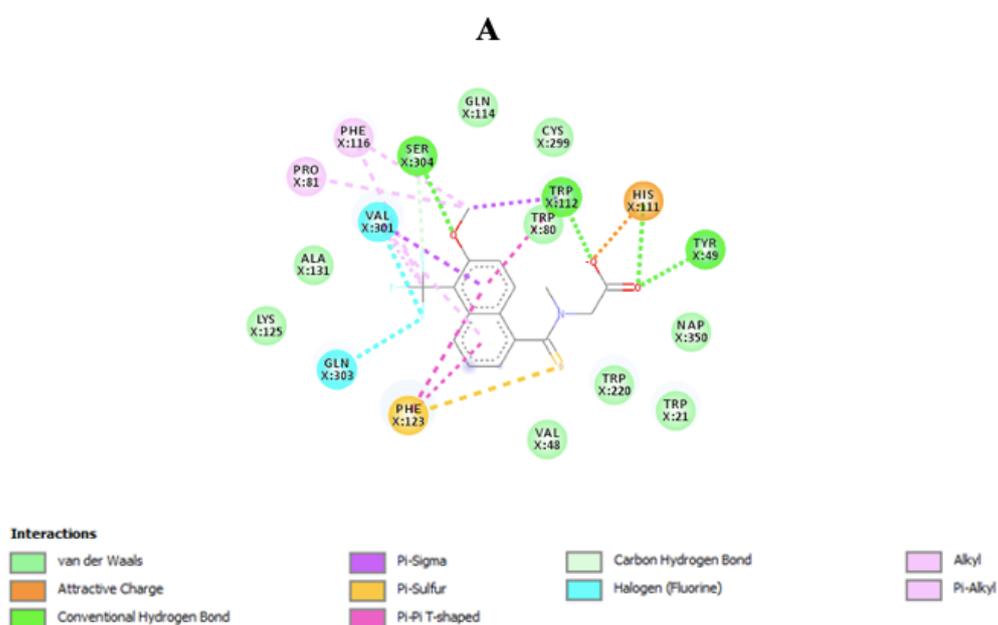
**Interactions**

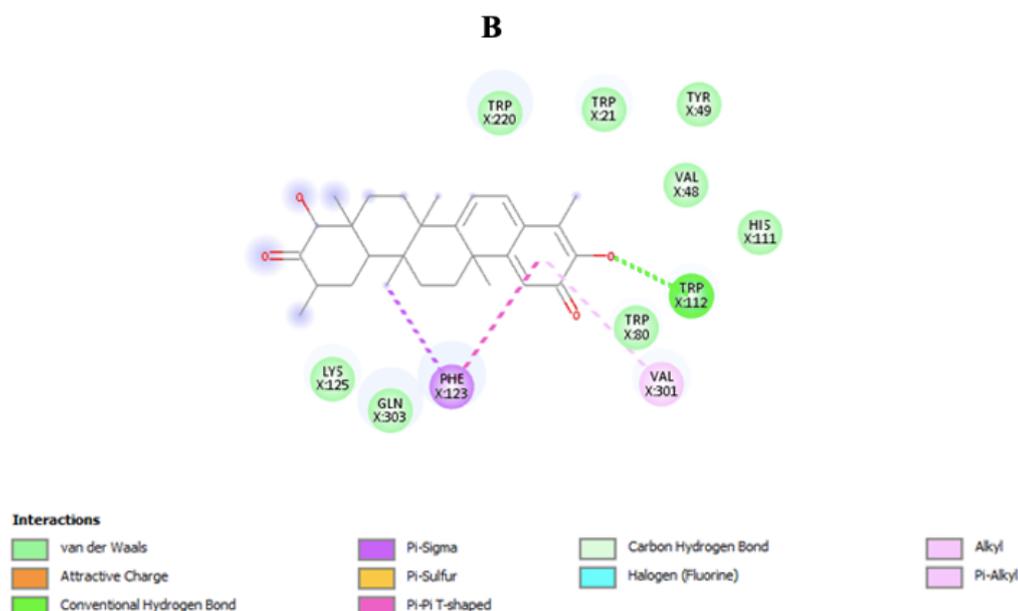
B

**Interactions**

**Figura 9** - Substância 22-HTG demonstra elevada probabilidade de interação com a enzima AKR1B10. Análise de ancoragem molecular da 22-HTG com os alvos biológicos (A) AKR1B10 e (B) AKR1B1. Ensaio de investigação da ancoragem molecular avalia a probabilidade de interação entre compostos e alvo, sugere uma análise detalhada da forma como essas inscrições se encaixam e interagem entre si.

Na análise da 22-HTG ancorada ao AKR1B10, observou-se uma ligação de hidrogênio com o resíduo de aminoácido triptofano-112, bem como interações hidrofóbicas com os aminoácidos triptofano-220, glutamina-303 e valina-301, comportamento similar ao observado com o Tolrestat, inibidor cocristalizado (Figura 10 A e B).





**Figura 10** - Substância 22-THG demonstra ligações com a estrutura cristalina de AKR1B10 através de ligações semelhantes Tolrestat. Posição de ancoragem 2D dos ligantes e suas interações de aminoácidos no sítio ativo. Estrutura cristalina de AKR1B10 (PDB: 1ZUA) em complexo com (A) Tolrestat e (B) 22-HTG.

## 5.2 Análise de citotoxicidade por Alamar Blue

Para análise de citotoxicidade foi utilizado o método do Alamar Blue, após 72 horas de tratamento com o fármaco 22-HTG foi observado alto potencial antitumoral contra as células de melanoma SKMEL 19 ( $IC_{50}$  1,17  $\mu$ M), SKMEL 28 ( $IC_{50}$  1,90  $\mu$ M) e SKMEL 103 ( $IC_{50}$  1,24  $\mu$ M). O fármaco apresentou citotoxicidade na concentração de 2,24  $\mu$ M na linhagem normal MRC-5, apresentando um índice de seletividade variando de 1,18 até 1,91 quando comparado a sua ação nas células tumorais, ou seja, sendo duas vezes mais seletivo na linhagem mais sensível ao tratamento SKMEL 19. O quimioterápico Doxorubicina, apresentou concentrações citotóxicas menores que o 22-HTG, entretanto apresenta alta toxicidade na célula normal, com baixo índice de seletividade, como apresentado na tabela 5 abaixo.

**Tabela 5** - Fármaco 22-THG demonstra alto potencial citotóxico e seletivo em linhagens de melanoma. As linhagens de melanoma SKMEL 19, SKMEL 28 e SKMEL 103, assim como, a linhagem normal MRC-5 foram tratadas com o fármaco 22-HTG e Doxorubicina por 72 horas, após isso, foi adicionado o composto Alamar blue e a concentração de inibição de 50% do crescimento celular ( $CI_{50}$ ) foi mensurada por fluorescência.

Linhagem	22-HTG $IC_{50}$ ( $\mu$ M) (IC 95%)	Índice de seletividade 22- HTG/MRC-5	Doxorubicina $IC_{50}$ ( $\mu$ M) (IC 95%)	Índice de seletividade Doxorubicina/MRC-5
----------	--	--	--	--

SKMEL 19	1,17 (0,84 - 1,61)	1,91	0,33 (0,26 - 0,40)	0,88
SKMEL 28	1,90 (1,49 - 2,44)	1,18	0,36 (0,32 - 0,40)	0,81
SKMEL 103	1,24 (1,02 - 1,50)	1,82	0,54 (0,36 - 0,80)	0,54
MRC-5	2,24 (1,63 - 3,06)	-	0,29 (0,23 - 0,36)	-

### 5.3 Formação dos esferóides tridimensionais

#### 5.3.1 Acompanhamento das culturas e análises morfológicas

Inicialmente, as células estavam espalhadas pelo fundo dos micropoços. No entanto, houve uma tendência dessas células se agregarem em direção ao centro, resultando em uma área reduzida de ocupação inicial. No dia 5, tanto as células de melanoma quanto de fibroblastos exibiram a formação de agregados celulares bem estabelecidos dentro dos micropoços. Uma vez formados esses agregados, a redução inicial de área começou a se inverter e os esferóides bem definidos começaram a aumentar de tamanho, conforme ilustrado (Figuras 11A, 12A, 13A, 14A) categorizados por tipos de células.

#### 5.3.2 Geração e caracterização dos microtecidos de melanoma e fibroblasto humano

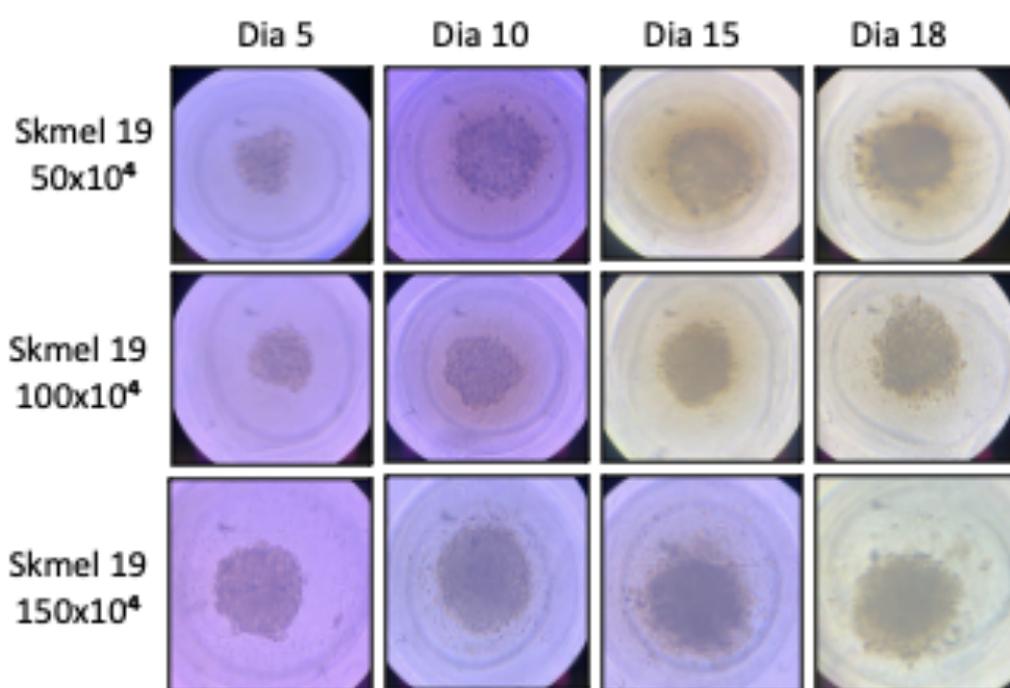
As células de melanoma (SK-MEL-19, SK-MEL-28, SK-MEL-103) e fibroblasto humano (MRC5) foram tripsinizadas na garrafa de cultivo e inseridas no micromolde. As figuras 11A, 12A e 13A mostram uma imagem representativa dos microtecidos no micromolde em diferentes dias: 5, 10, 15 e 18 de crescimento celular após a semeadura de células, nas concentrações  $50 \times 10^4$ ,  $100 \times 10^4$  e  $150 \times 10^4$ , evidenciando no dia 5 esferóides claramente delineados. Os esferóides de células cancerígenas possuem a mesma aparência geral e tamanho que os esferóides produzidos a partir de células não cancerígenas (Figura 14A).

As figuras 11 (B, C, D e E), 12 (B, C, D e E), 13 (B, C, D e E) e 14 (B, C, D e E) mostram gráficos referentes ao diâmetro, esfericidade, circularidade e solidez das linhagens quando cultivada em esferóides. O eixo X é referente aos dias de cultivo dos

esferóides e o eixo Y ao parâmetro avaliado. O diâmetro de feret foi obtido através da comparação dos tamanhos dos esferóides pelas imagens obtidas em microscópio invertido. A Esfericidade e a Circularidade são a representação do quanto o esferóide medido se aproxima de uma estrutura circular, em valores próximos de 1, ou de uma estrutura em elipse, valores mais distantes de um. A solidez representa o quão regular é a estrutura do perímetro dos esferóides, sendo valores mais próximos de 1 considerados regulares e mais distantes de 1 mais irregulares.

Os melanomas da linhagem SK-MEL19 (figura 11A) formaram agregados que se mantiveram regulares no dia 5 e 10 de cultivo na concentração  $100 \times 10^4$  sendo possível observar que nessa concentração de células até mesmo nos dias 15 e 18 o formato esférico está mais regular que nas demais concentrações.

A

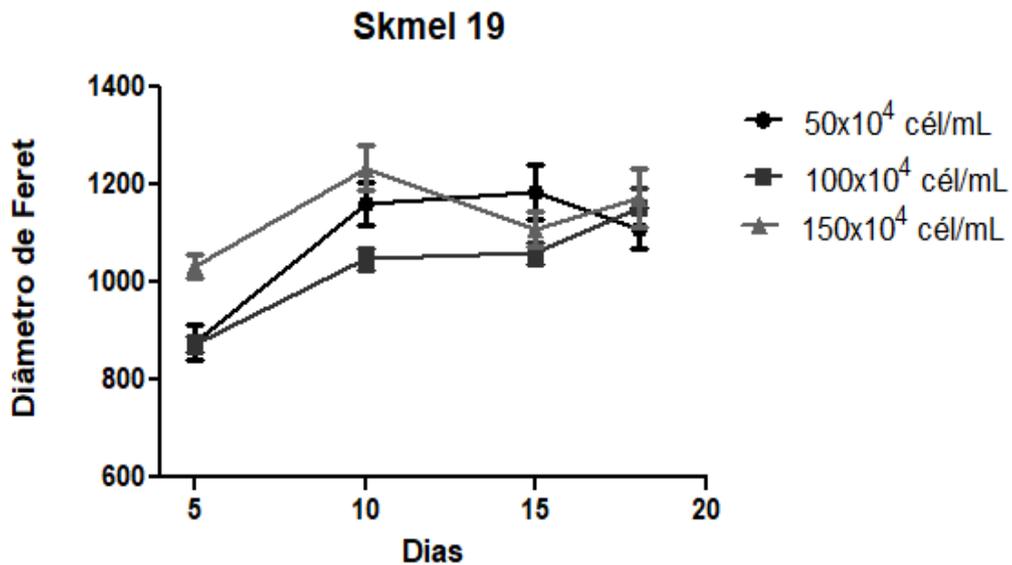


**Figura 11A** - Linhagem de células SKMEL-19 quando cultivadas em esferóides se mantem mais regular no quinto dia de cultivo, na concentração  $100 \times 10^4$ . Fotografia representativa da proliferação dos microtecidos nas concentrações  $50 \times 10^4$  células por chip,  $100 \times 10^4$  células por chip e  $150 \times 10^4$  células por chip, nos dias 5, 10, 15 e 18 de cultivo respectivamente. As imagens foram obtidas através do uso de um microscópio de contraste de fase invertido. Fonte: Imagem elaborada pelo autor.

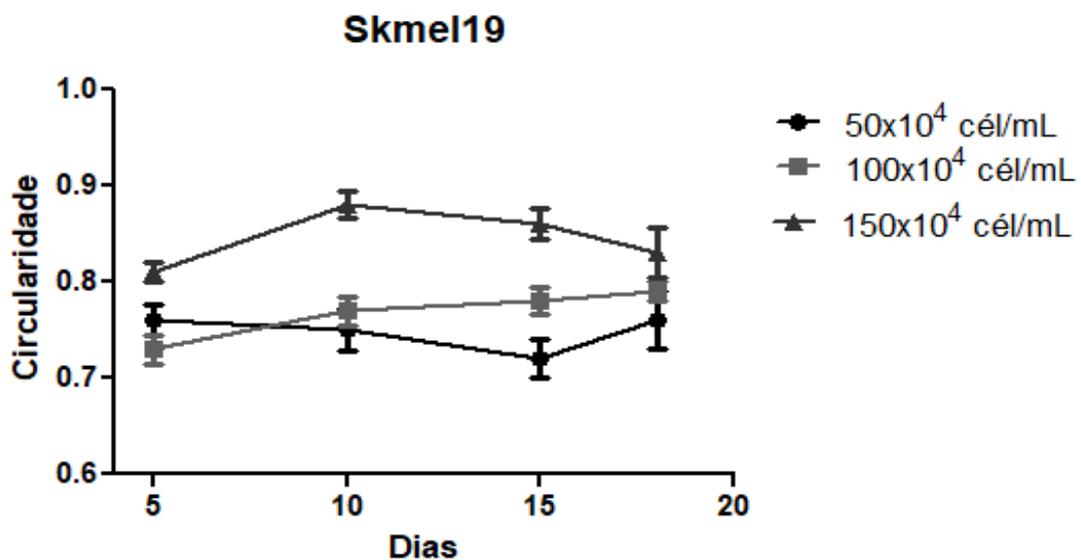
Além disso, a caracterização morfológica do cultivo dessa linhagem mostrou o que pode ser percebido visualmente, isto é, que, de forma geral, seu crescimento foi

regular e o formato de esfera se manteve mais homogêneo e prolongado no dia 5, na concentração  $100 \times 10^4$  células por chip. A análise em relação ao diâmetro de Feret mostrou, que seu crescimento foi crescente nessa concentração de células, como mostram os gráficos da figura 11 B, C, D, E, abaixo.

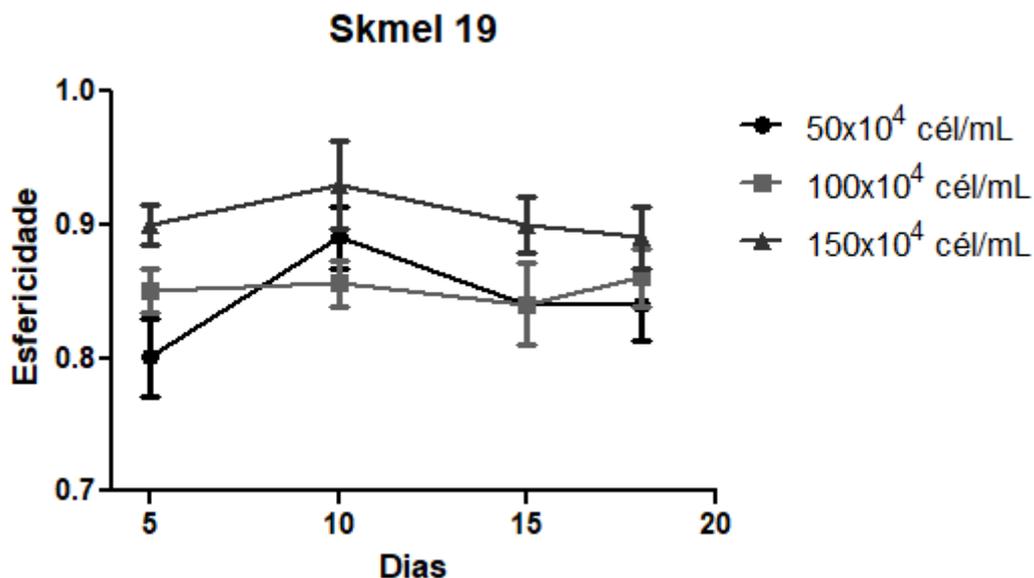
**B**



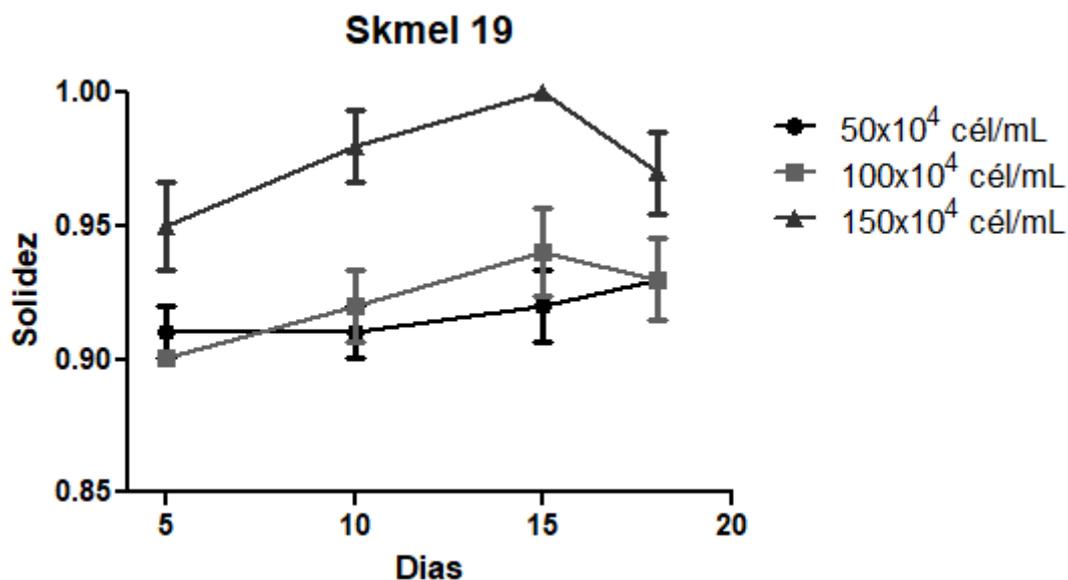
**C**



D



E

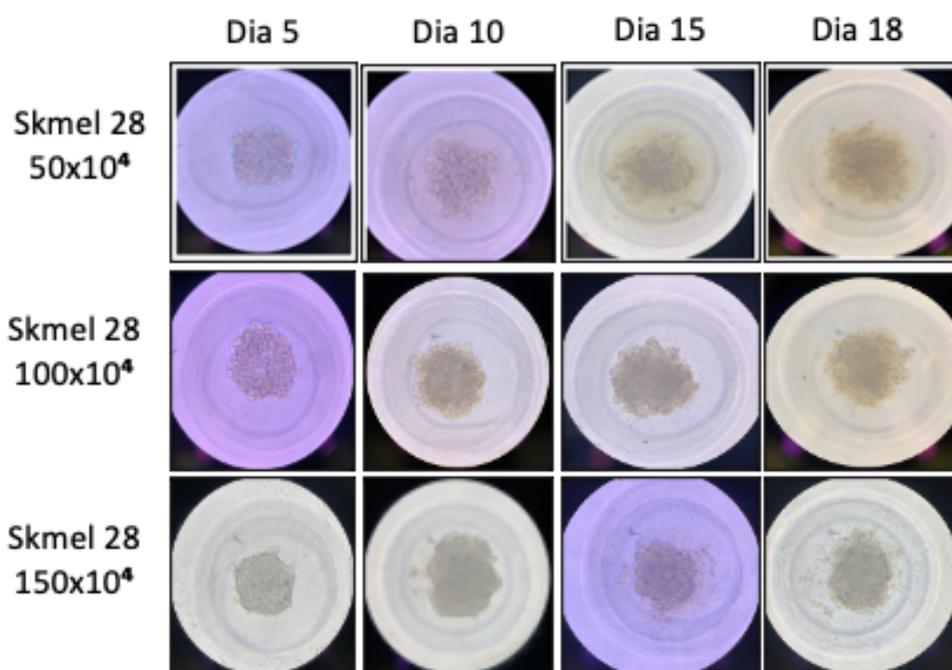


**Figura 11 B, C, D, E** – Imagens de gráficos referentes ao diâmetro de faret, circularidade, esfericidade e solidez mostra que a linhagem de células SKMEL-19 quando cultivadas em esferóides mantém mais adequada no dia 5, na concentração 100x10<sup>4</sup>. Fotografia representativa da proliferação dos microtecidos nas concentrações 50x10<sup>4</sup> células por chip, 100x10<sup>4</sup> células por chip e 150x10<sup>4</sup> células por chip, nos dias 5, 10 e 15 de cultivo respectivamente. As imagens foram obtidas através do uso de um microscópio de contraste de fase invertido.

As imagens da figura 12A, abaixo, mostram a progressão do cultivo dos esferoides de SK-MEL-28 nos dias 5, 10, 15 e 18 de cultivo nas concentrações de  $50 \times 10^4$ ,  $100 \times 10^4$  e  $150 \times 10^4$  células/chip. Foram encontradas evidentes diferenças entre os dias de cultivo e as concentrações utilizadas, de modo que os agregados celulares se mantiveram regulares no dia 5 de cultivo na concentração  $100 \times 10^4$  sendo possível observar que nessa concentração de células que nos dias 15 e 18m diferente do que acontece na SK-MEL19 nenhuma das concentrações apresenta formato esférico mais regular.

No dia 10 de cultivo nas três concentrações células/chip testadas observa-se que as microesferas já apresentam bordas irregulares, sendo portanto, escolhido o quinto dia de cultivo pra a realização dos próximos testes.

A

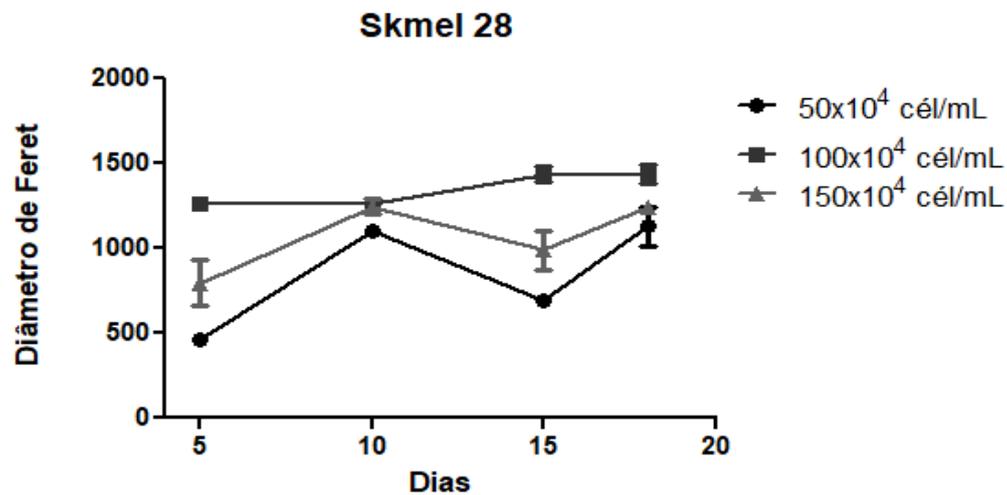


**Figura 12 A** – A Linhagem de células SK-MEL28 quando cultivadas em esferóides se mantem mais regular no quinto dia de cultivo, na concentração  $50 \times 10^4$ . Fotografia representativa da proliferação dos microtecidos nas concentrações  $50 \times 10^4$  células por chip,  $100 \times 10^4$  células por chip e  $150 \times 10^4$  células por chip, nos dias 5, 10, 15 e 18 de cultivo respectivamente. As imagens foram obtidas através do uso de um microscópio de contraste de fase invertido.

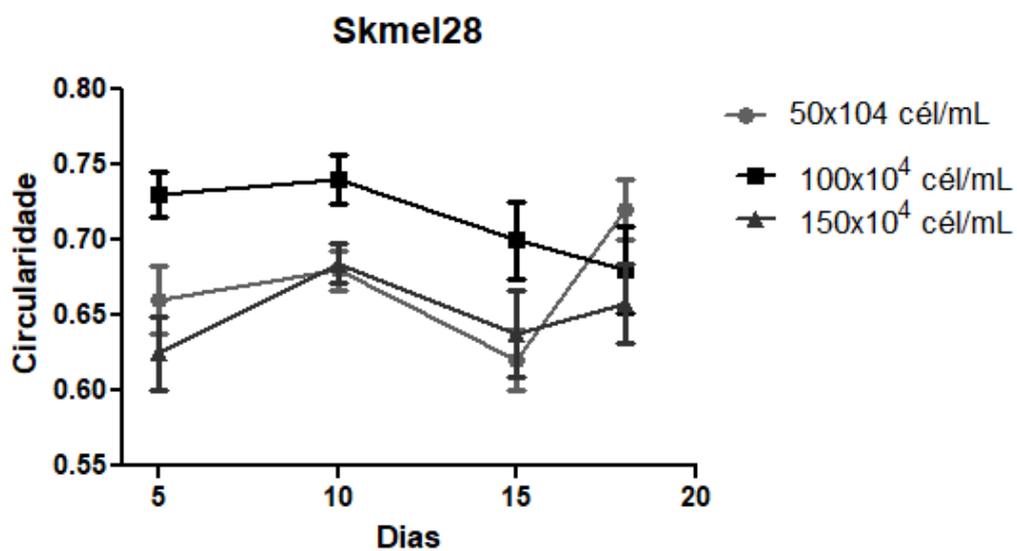
O resultado da caracterização morfológica do cultivo dessa linhagem corrobora com o que pode ser percebido visualmente, isto é, que, de forma geral, seu crescimento

foi irregular e o formato de esfera não se manteve homogêneo e prolongado nos demais dias, apenas no dia 5, na concentração e de forma mais esférica na concentração  $50 \times 10^4$  células por chip. A análise em relação ao diâmetro de Feret mostrou, que seu crescimento foi bastante variável na concentração  $150 \times 10^4$  e muito linear na concentração  $100 \times 10^4$  de células, como mostram os gráficos da figura 12 B, C, D, E, abaixo.

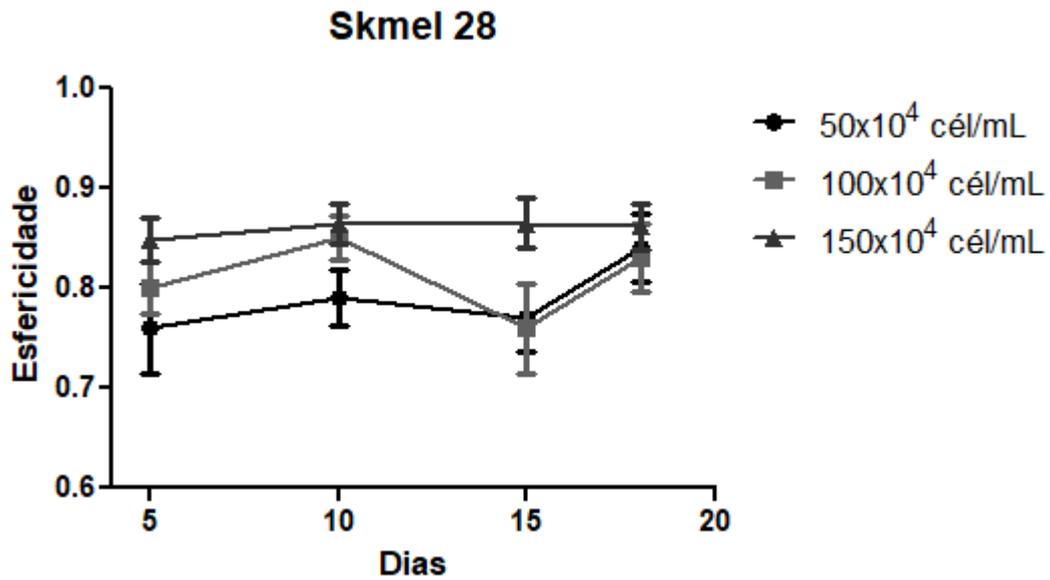
B



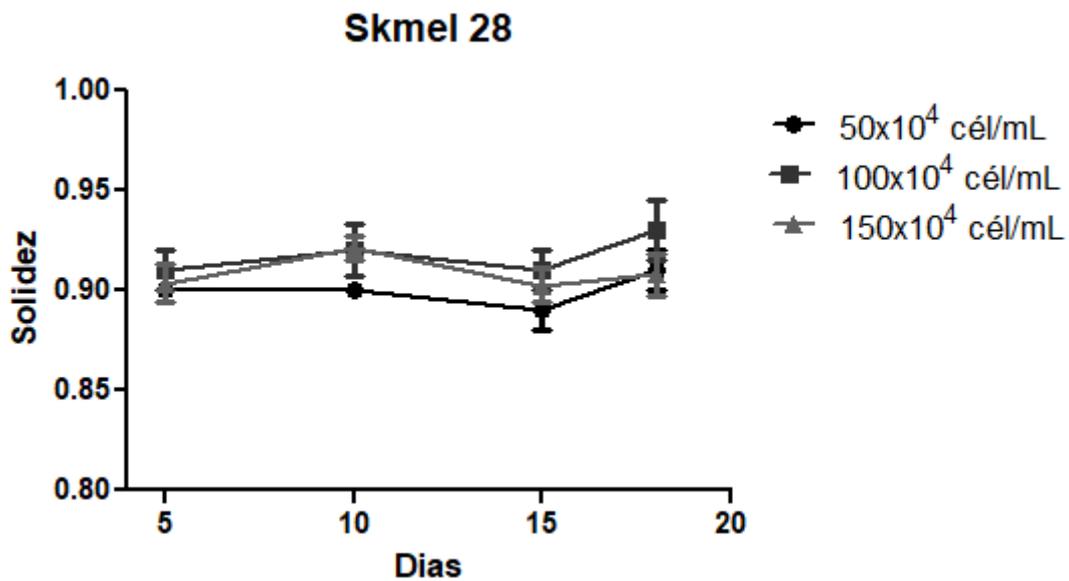
C



D



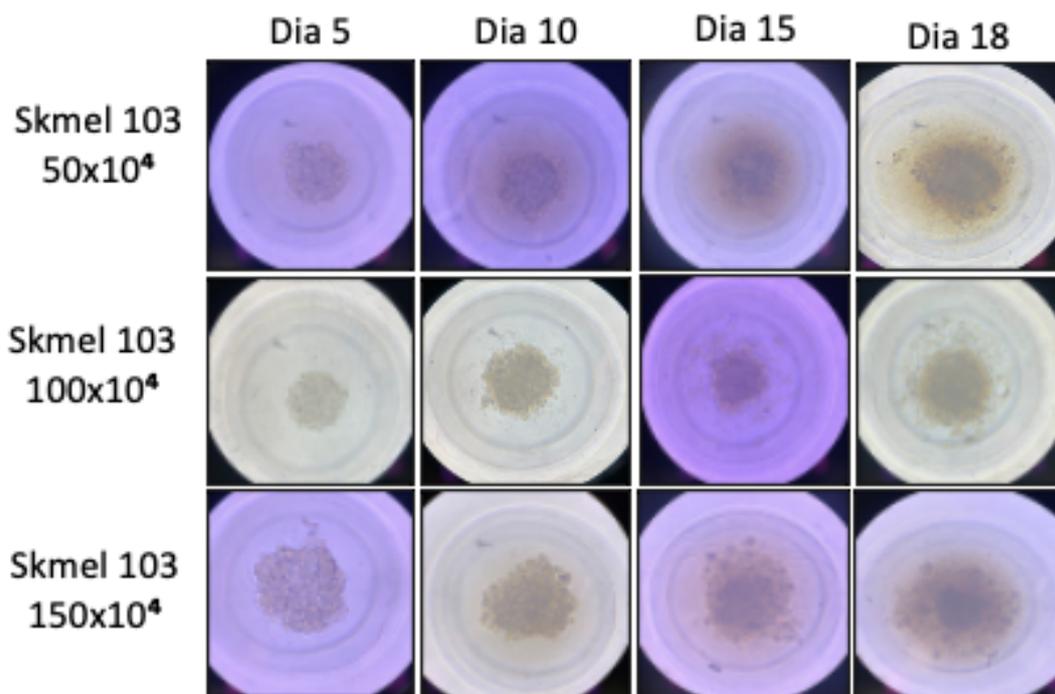
E



**Figura 12 B, C, D, E** –Linhagem de células SKMEL-28 quando cultivadas em esferóides mantem diâmetro, circularidade, esfericidade e solidez mais adequada no dia 5, na concentração 50x10<sup>4</sup>. Fotografia representativa da proliferação dos microtecidos nas concentrações 50x10<sup>4</sup> células por chip, 100x10<sup>4</sup> células por chip e 150x10<sup>4</sup> células por chip, nos dias 5, 10 e 15 de cultivo respectivamente. As imagens foram obtidas através do uso de um microscópio de contraste de fase invertido.

Os melanomas da linhagem SK-MEL103, figura 13A, formaram agregados que se mantiveram regulares no dia 5 na concentração  $100 \times 10^4$  sendo possível observar que em todas as concentrações de células a partir do dia 10 as células das bordas dos esferóides já começam a se desagregar do centro do microtecido, nos dias 15 e 18 o formato já não está mais esférico nas concentrações  $50 \times 10^4$  e  $150 \times 10^4$ .

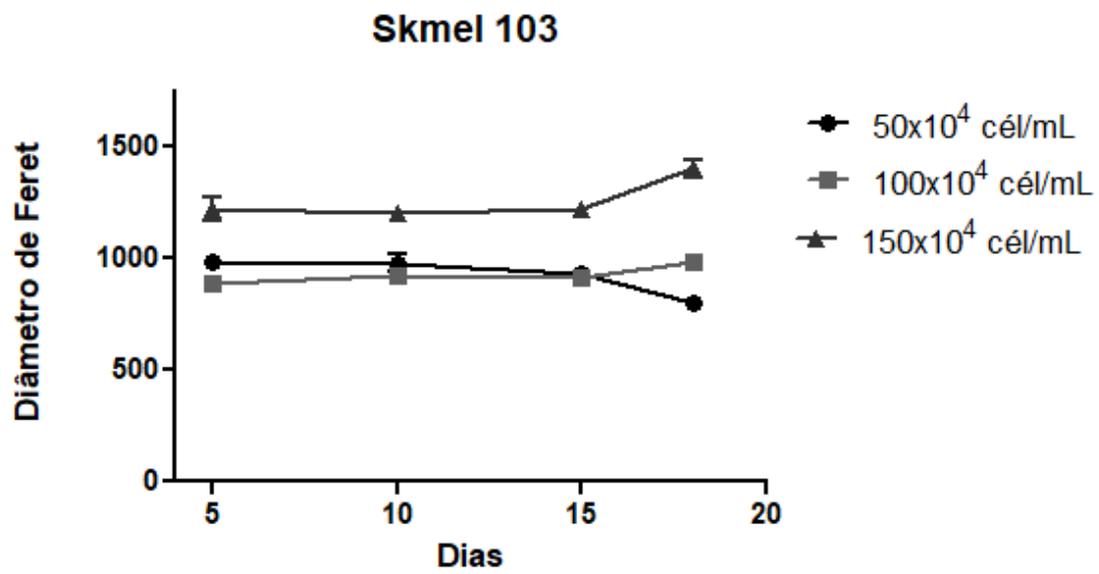
A



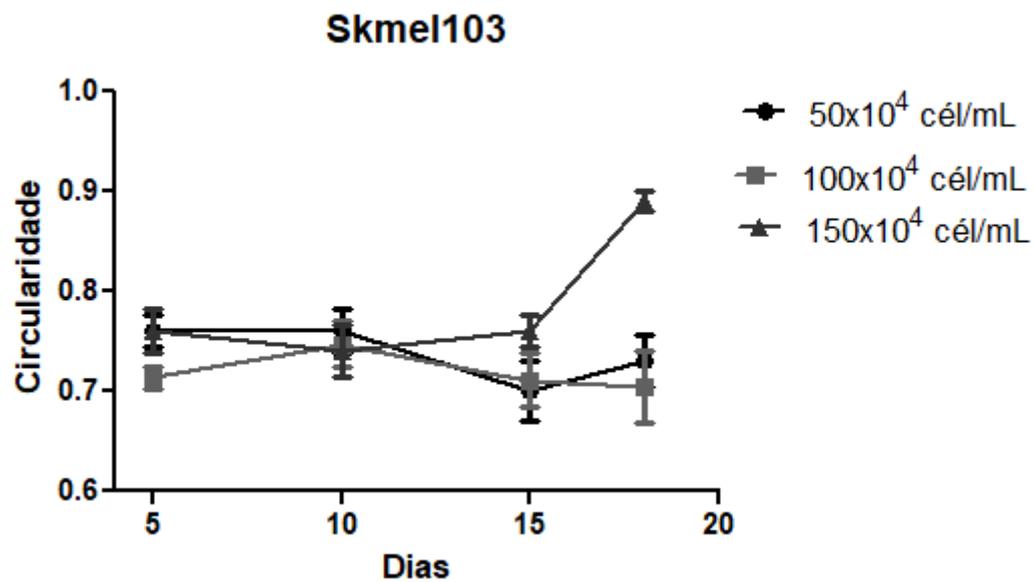
**Figura 13 A** – A Linhagem de células SKMEL-103 quando cultivadas em esferóides se mantém mais regular no quinto dia de cultivo, na concentração  $100 \times 10^4$ . Fotografia representativa da proliferação dos microtecidos nas concentrações  $50 \times 10^4$  células por chip,  $100 \times 10^4$  células por chip e  $150 \times 10^4$  células por chip, nos dias 5, 10, 15 e 18 de cultivo respectivamente. As imagens foram obtidas através do uso de um microscópio de contraste de fase invertido.

A análise morfológica do cultivo dessa linhagem evidencia a concordância com a observação visual, indicando que, de maneira geral, nos dias 5 e 10 houve um crescimento regular e a forma esférica se manteve de maneira uniforme. No dia 5, na concentração  $100 \times 10^4$  células por chip os gráficos apontam maior uniformidade entre os parâmetros analisados. A análise em relação a circularidade e esfericidade mostrou que seu crescimento foi bastante variável na concentração  $50 \times 10^4$  e  $150 \times 10^4$  e linear na concentração  $100 \times 10^4$  de células, como mostram os gráficos da figura 13 B, C, D, E, abaixo.

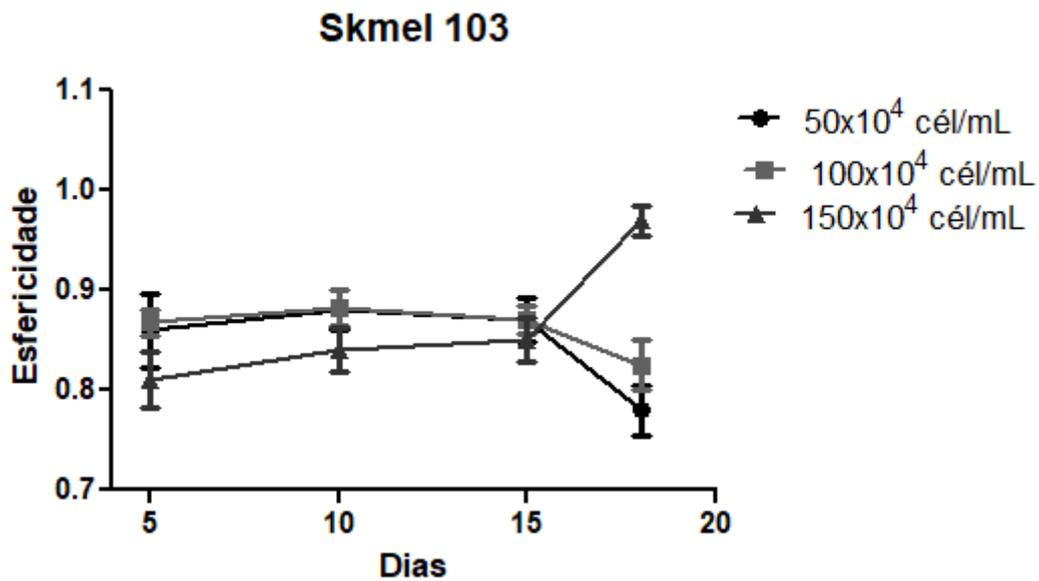
B



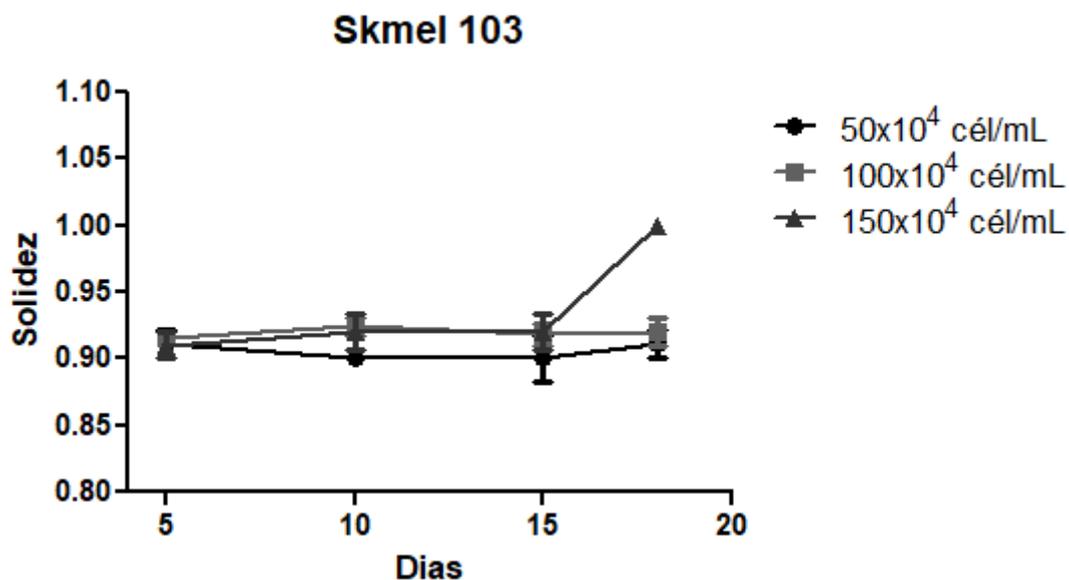
C



D



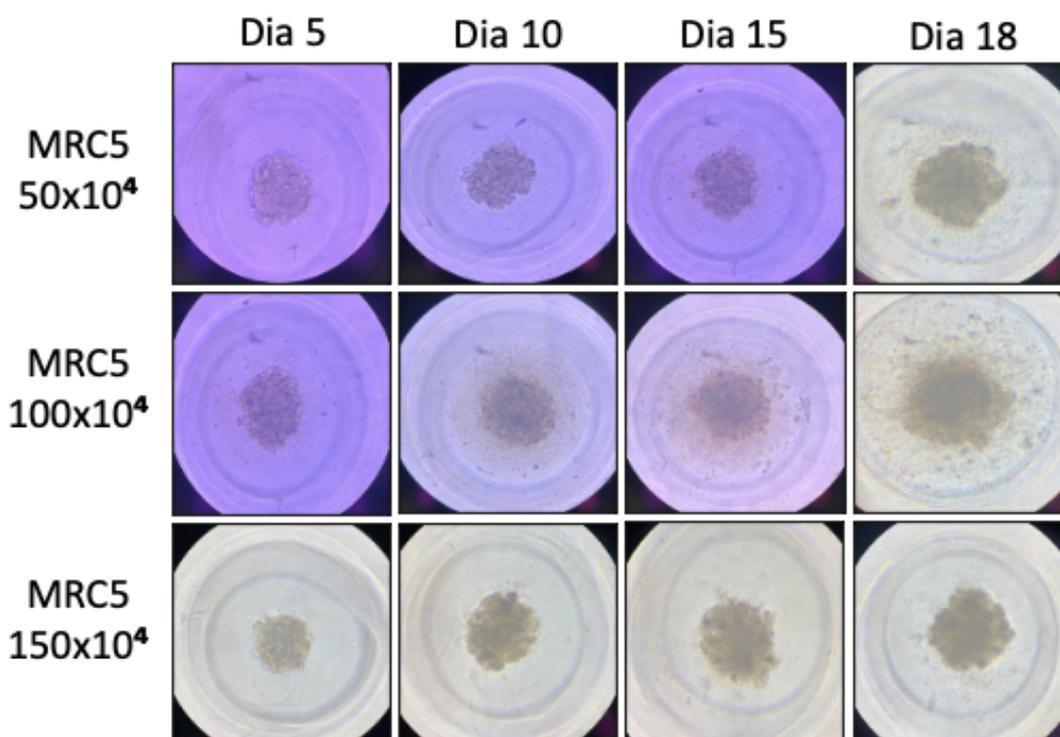
E



**Figura 13 B, C, D, E** – Linhagem de células SKMEL-103 quando cultivadas em esferóides mantem diâmetro, circularidade, esfericidade e solidez mais adequada no dia 5, na concentração 100x10<sup>4</sup>. Fotografia representativa da proliferação dos microtecidos nas concentrações 50x10<sup>4</sup> células por chip, 100x10<sup>4</sup> células por chip e 150x10<sup>4</sup> células por chip, nos dias 5, 10 e 15 de cultivo respectivamente. As imagens foram obtidas através do uso de um microscópio de contraste de fase invertido.

Os fibroblastos da linhagem MRC-5 formaram agregados que se mantiveram irregulares durante todo o período de cultivo nas concentrações  $100 \times 10^4$  e  $150 \times 10^4$ , se mantendo com formato esférico e mais regular na concentração  $50 \times 10^4$ , principalmente no dia 5 de cultivo. A figura 14 A mostra o acompanhamento do cultivo nas concentrações de  $50 \times 10^4$ ,  $100 \times 10^4$  e  $150 \times 10^4$  células/chip nos dias 5, 10, 15 e 18 de crescimento celular.

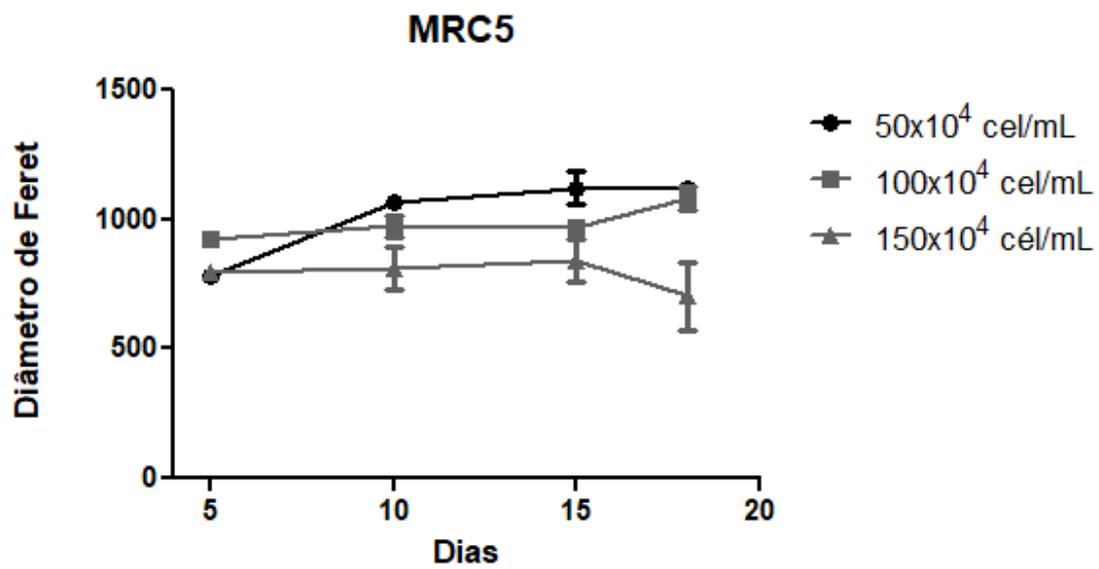
A



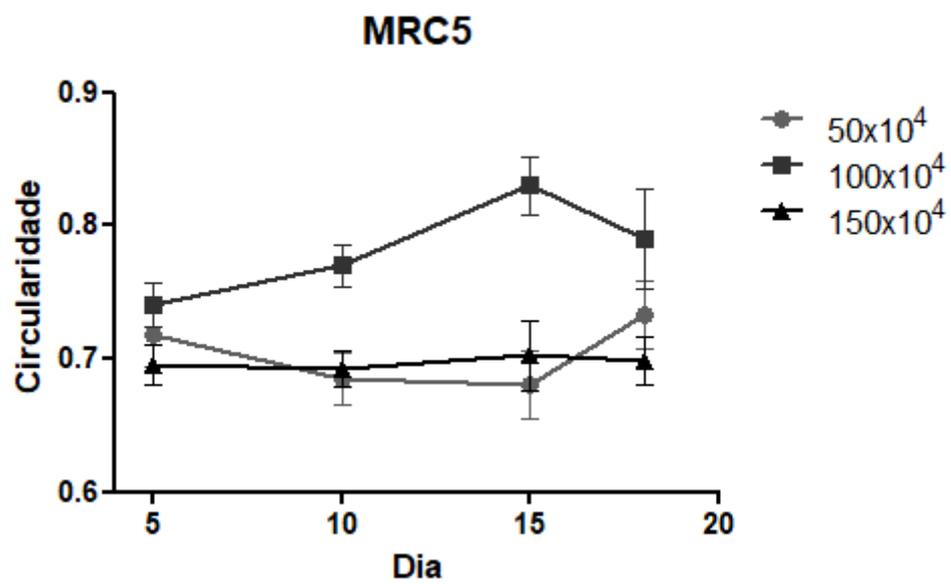
**Figura 14 A** – A Linhagem de células MRC5 quando cultivadas em esferóides se mantém mais regular no quinto dia de cultivo, na concentração  $50 \times 10^4$ . Fotografia representativa da proliferação dos microtecidos nas concentrações  $50 \times 10^4$  células por chip,  $100 \times 10^4$  células por chip e  $150 \times 10^4$  células por chip, nos dias 5, 10, 15 e 18 de cultivo respectivamente. As imagens foram obtidas através do uso de um microscópio de contraste de fase invertido.

A análise morfológica do cultivo dessa linhagem revelou o que pode ser observado visualmente, ou seja, que, de maneira geral, houve um crescimento irregular nas concentrações  $100 \times 10^4$  e  $150 \times 10^4$ . Os gráficos (figura 14 B, C, D, E) apontam maior regularidade e linearidade no crescimento dos esferóides na concentração  $50 \times 10^4$  células/chip.

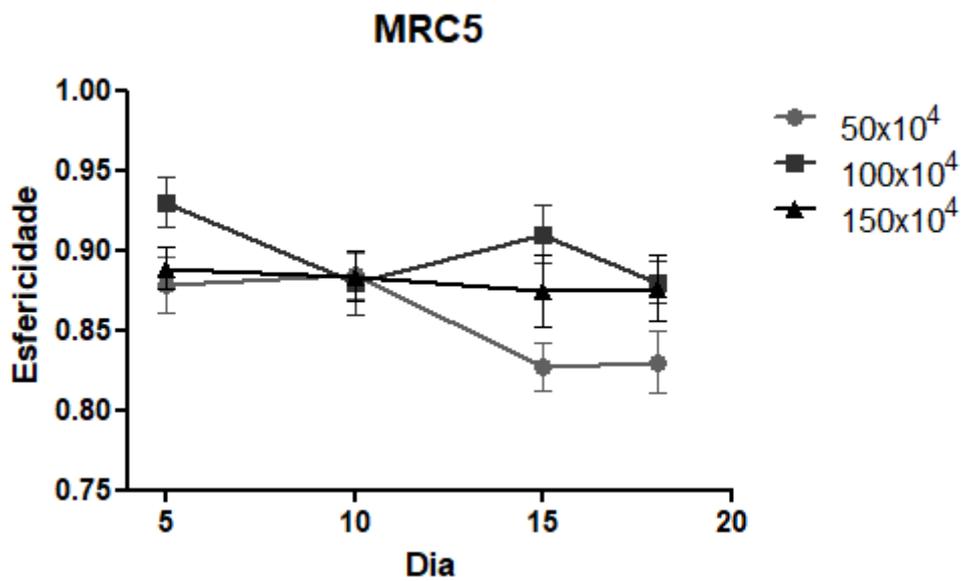
B



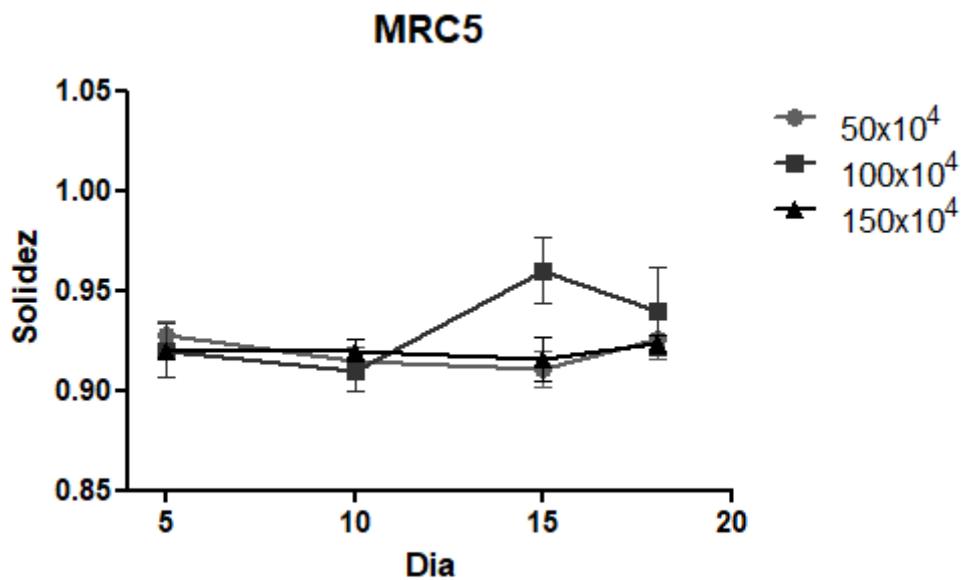
C



D



E



**Figura 14 B, C, D, E** – Linhagem de células MRC5 quando cultivadas em esferóide mantem diâmetro, circularidade, esfericidade e solidez mais adequada no dia 5, na concentração  $50 \times 10^4$ . Fotografia representativa da proliferação dos microtecidos nas concentrações  $50 \times 10^4$  células por chip,  $100 \times 10^4$  células por chip e  $150 \times 10^4$  células por chip, nos dias 5, 10 e 15 de cultivo respectivamente. As imagens foram obtidas através do uso de um microscópio de contraste de fase invertido.

Dadas as melhores características de cultivo, foi a escolhida para seguir com o restante dos experimentos, isto é, análises de viabilidade e os testes de metabolismo sob ação do 22-HTG a concentração  $100 \times 10^4$  células por chip para célula SKMEL-19,  $50 \times 10^4$  células por chip para célula SKMEL-28,  $100 \times 10^4$  células por chip para célula SKMEL-103 e  $50 \times 10^4$  células por chip para célula MRC5. O dia 5 foi considerado como limite para o cultivo, tendo em vista que à partir do dia 10, as bordas dos esferoides já começam a se desagregar do centro do microtecido, e nos dias 15 e 18 seria inviável pois os microtecidos já crescem de forma exacerbada e perdem a esfericidade nas bordas, sendo caracterizada pela irregularidade no formato e aumento de tamanho.

## **5.4 Metabolismo celular em esferoides**

### **5.4.1 A diferença na concentração de glicose altera a viabilidade, captação de glicose e a atividade da enzima LDH nas linhagens de melanoma 2D**

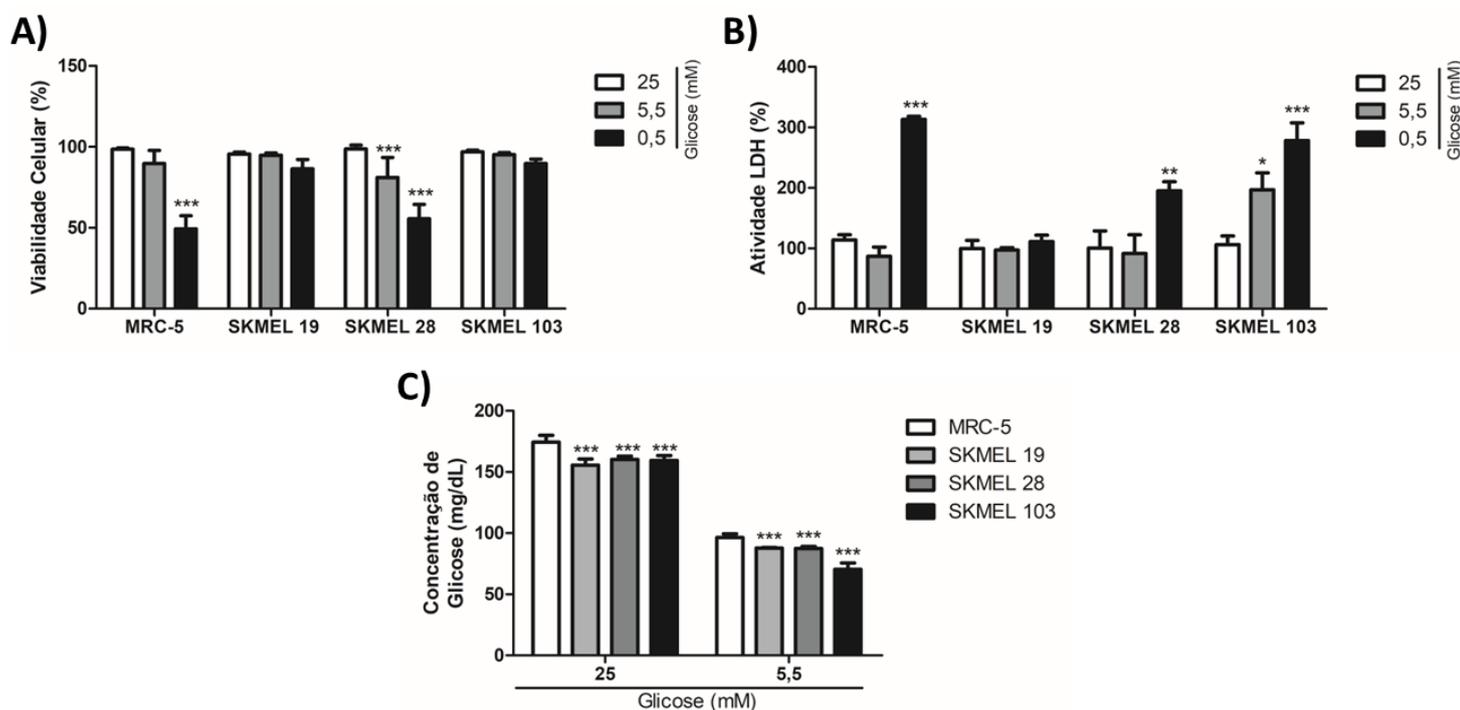
Com o objetivo de avaliar as diferenças no fenótipo tumoral entre as linhagens estudadas, as mesmas foram cultivadas em meio com diferentes concentrações de glicose (25, 5,5 e 0,5 mM) e os parâmetros de viabilidade, atividade da enzima LDH e consumo de glicose (para os meios com 25 e 5,5 mM de glicose) foram avaliados (Figura 15).

Como visualizado na figura 15, quando comparado as linhagens cultivadas em meio padrão de glicose (25 mM), apenas a linhagem de melanoma SKMEL 28 demonstrou diminuição na viabilidade quando cultivada a 5,5 mM ( $p < 0,0001$ ). Entretanto, quando cultivado em meio com escassez de glicose (0,5 mM), tanto a linhagem normal MRC-5 e a linhagem de melanoma SKMEL 28 demonstraram sensibilidade a falta do nutriente, com redução de aproximadamente 51% e 45% na viabilidade, respectivamente (Figura 15A).

Também foi mensurada a atividade da enzima LDH nas diferentes linhagens quando cultivadas em meios com diferentes concentrações de glicose (Figura 15B). Apenas a linhagem SKMEL 103 apresentou aumento significativo na atividade da enzima quando cultivada em meio a 5,5 mM quando comparada as linhagens cultivadas em meio padrão de glicose (25m M) ( $p < 0,05$ ). Em meio com escassez de glicose (meio com 0,5 mM), as linhagens MRC-5, SKMEL 28 e SKMEL 103 apresentaram aumento significativo na atividade enzimática.

Em relação ao perfil de consumo de glicose, a captação do nutriente pelas linhagens de melanoma foi comparada com o perfil da linhagem normal MRC-5 quando

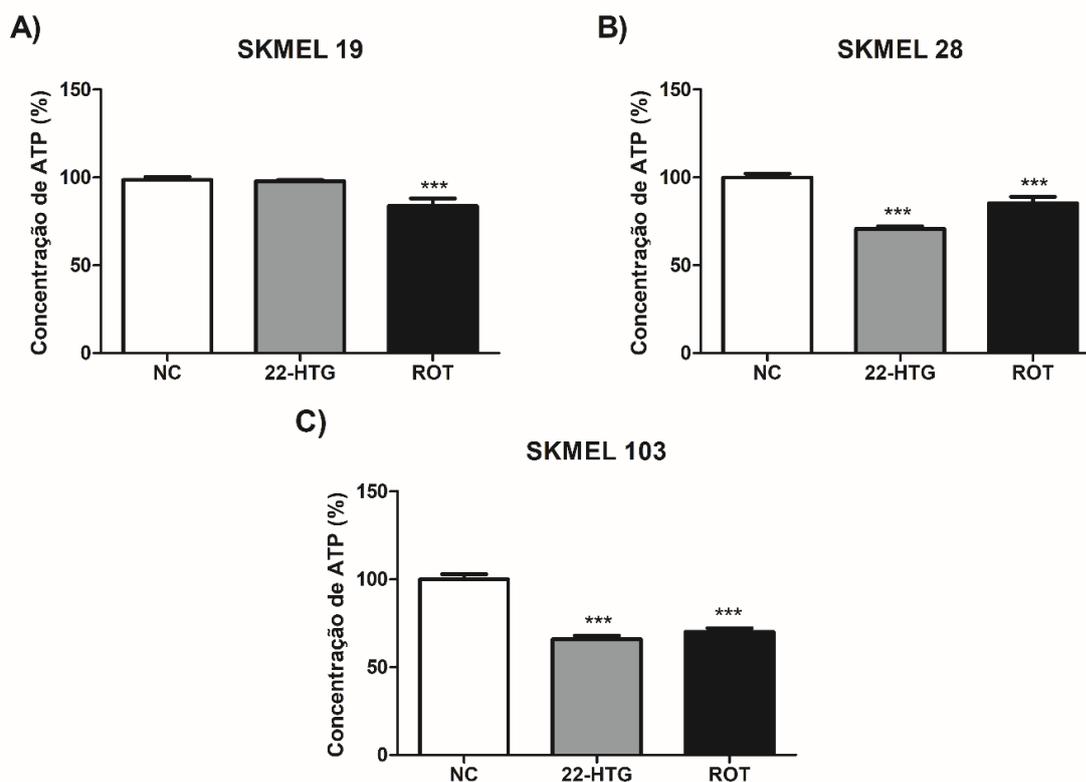
cultivadas em 25 e 5,5 mM de glicose. Todas as linhagens de melanoma demonstraram consumo significativo ( $p < 0,001$ ) quando comparada a linhagem normal nos dois meios de cultivo, tendo a linhagem SKMEL 103 um maior consumo no meio com 5,5 mM de glicose (Figura 15C).



**Figura 15** - Diferenças na concentração de glicose levam a alterações viabilidade celular, atividade de LDH e na captação de glicose em linhagens de melanoma. A) Média de viabilidade celular em diferentes condições de cultivo pelo método de exclusão por azul de Tripán. B) A captação de glicose foi estimada pela concentração de glicose (mg/dL) que permaneceu no meio de cultura. C) A atividade de LDH foi determinada após 24 h de exposição aos diferentes meios de cultivo. A atividade enzimática das células cultivadas em meio com 25 mM de glicose foi definida como 100%. Os dados são apresentados como a média  $\pm$  SD de três experimentos independentes, a análise estatística foi realizada com 2way ANOVA seguida pelo pós-teste de Bonferroni. Diferenças significativas: \* $p < 0,05$ , \*\* $p < 0,001$ , \*\*\* $p < 0,0001$ .

#### 5.4.2 Concentração de ATP em modelo 2D

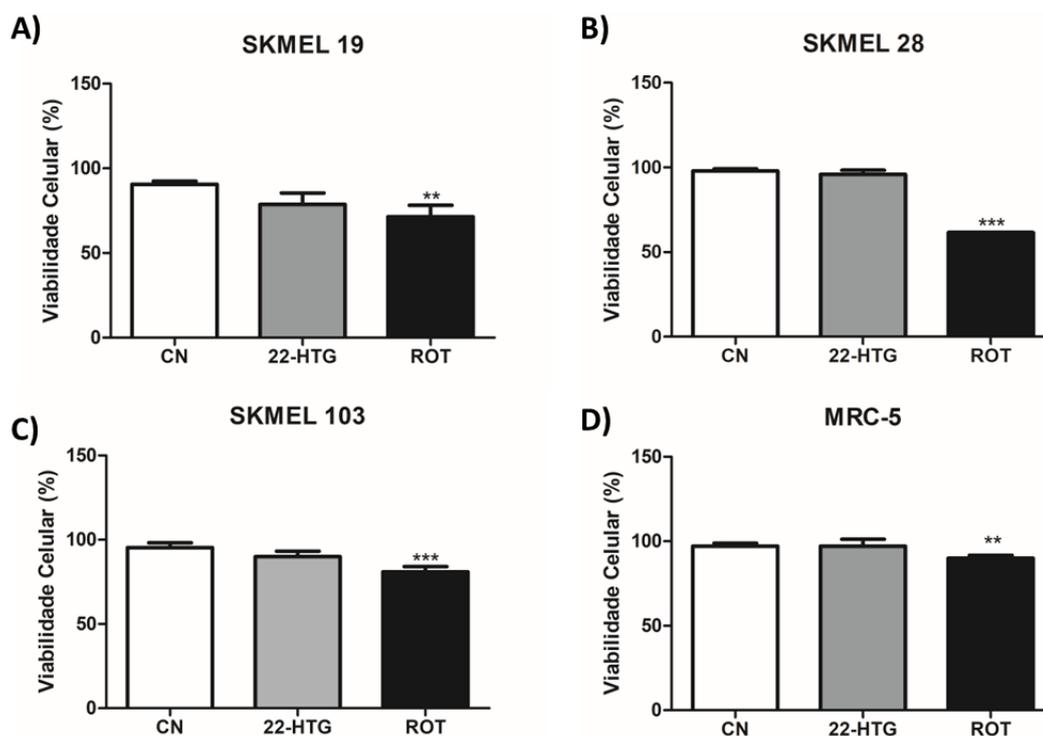
Para verificar se o tratamento com o fármaco 22-HTG levava alteração na produção de ATP nas linhagens tumorais, foi analisado a concentração de ATP intracelular após 24 horas de tratamento. Os resultados demonstraram que houve diminuição significativa na concentração de ATP nas linhagens tumorais SKMEL 28 e SKMEL103 (Figura 16).



**Figura 16** - 22-HTG diminui a concentrações de ATP nas linhagens de melanoma maligno SKMEL 28 e SKMEL 103. As linhagens de melanoma A) SKMEL 19 e B) SKMEL 28 e C) SKMEL 103 foram tratadas com 22-HTG por 24 horas e depois a concentração intracelular de ATP foi mensurada. As barras representam a média  $\pm$  desvio padrão da média de 3 experimentos independentes. \*\*\* $p < 0,0001$  comparado com células sem tratamento (CN) por 1way ANOVA seguida de teste de Bonferroni, com nível de significância de 95% ( $p < 0,05$ ). 22-HTG= 22 $\beta$ -Hidroxitingenona; CN= Controle Negativo; ROT= Rotenona.

### 5.4.3 Avaliação de viabilidade e morte celular em modelo 2D

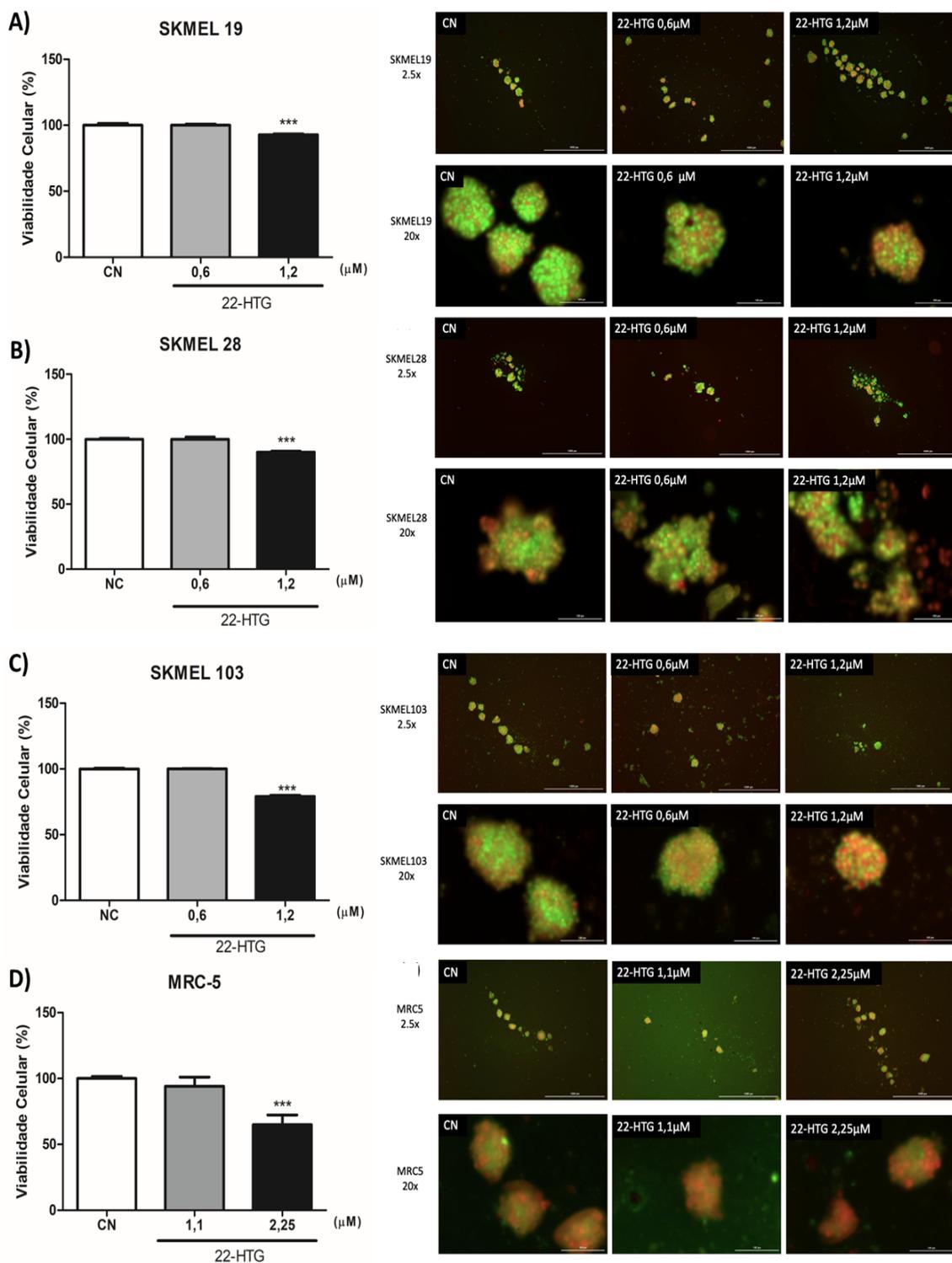
Para visualizar os efeitos do 22-HTG no metabolismo celular das linhagens de melanoma seria necessário avaliar a ação em um tempo não citotóxico, dessa forma as linhagens foram tratadas com 22-HTG com suas respectivas  $CI_{50}$  durante 24 horas, e então foi utilizado o corante intracelular Azul de Tripán. Baseado nos achados, foi verificado que em 24 horas a substância 22-HTG não alterava a viabilidade celular das linhagens quando comparado ao grupo não tratado, o controle negativo (CN), como visualizado na figura 17, dessa forma para os posteriores estudos metabólicos as linhagens foram tratadas com as suas respectivas  $CI_{50}$  durante 24 horas.



**Figura 17** - 22-HTG não leva a redução na viabilidade celular em 24 horas de tratamento. As linhagens de melanoma A) SKMEL 19, B) SKMEL 28 e C) SKMEL 103, assim como a linhagem normal D) MRC-5 foram tratadas com 22-HTG por 24 horas e depois a viabilidade celular foi avaliada pelo método Azul de Tripán. As barras representam a média  $\pm$  desvio padrão da média de 3 experimentos independentes. \*\* $p < 0,001$ , \*\*\* $p < 0,0001$  comparado com células sem tratamento (CN) por 1 way ANOVA seguida de teste de Bonferroni, com nível de significância de 95% ( $p < 0,05$ ). 22-HTG= 22 $\beta$ - Hidroxitingenona; CN= Controle Negativo; ROT= Rotenona.

#### 5.4.4 Avaliação de viabilidade e morte celular em modelo 3D

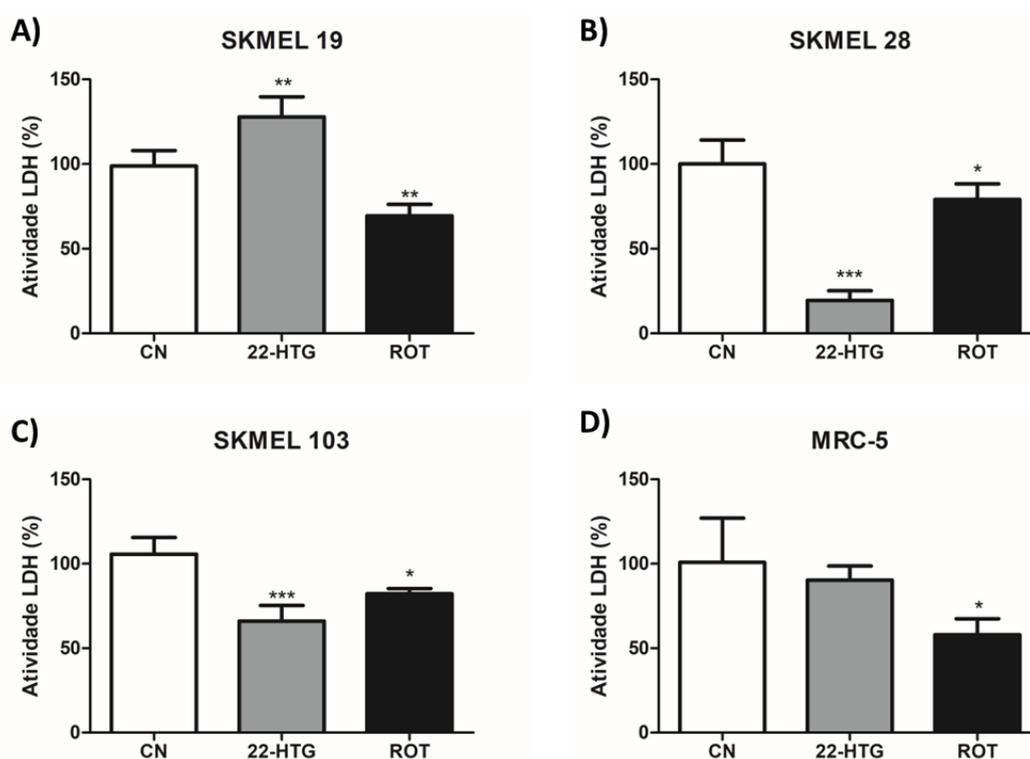
Após a padronização do número de células e do tempo de cultivo, seguiram as análises utilizando o 22-HTG para verificar seu potencial citotóxico no modelo 3D. Dessa forma, foram avaliadas as concentrações de 0,6 e 1,2  $\mu\text{M}$  nas linhagens de melanoma e de 1,1 e 2,25  $\mu\text{M}$  na linhagem normal. Como visualizado na figura 18, apenas as maiores concentrações de 22-HTG levaram a redução significativa na viabilidade e a morte celular de forma acentuada, caracterizada pela marcação com iodeto de propídio.



**Figura 18** - 22-HTG diminui a viabilidade e leva a morte celular em modelo 3D de melanoma maligno. As linhagens de melanoma A) SKMEL 19 e B) SKMEL 28, C) SKMEL 103 e D) MRC-5 foram cultivadas em forma de esféroides após a padronização do modelo 3D, e então tratadas com 22-HTG por 24 horas. Após o tratamento, foram realizados os ensaios de Alamar Blue para definição da citotoxicidade e também foi realizada a análise por microscopia de fluorescência com Brometo de Etídio e Laranja de Acridina (BE/LA) para análise de morte celular. As barras representam a média  $\pm$  desvio padrão da média de 3 experimentos independentes. \*\*\* $p < 0,0001$  comparado com células sem tratamento (CN) por 1way ANOVA seguida de teste de Bonferroni, com nível de significância de 95% ( $p < 0,05$ ). 22-HTG= 22 $\beta$ -Hidroxitigenona; CN= Controle Negativo.

### 5.4.5 Avaliação da atividade de LDH em modelo 2D

Para verificar o efeito na modulação do metabolismo ocasionada pelo 22-HTG foi realizada a avaliação da atividade intrínseca da enzima LDH após 24 horas de tratamento com o fármaco. De acordo com as análises, foi verificado que a substância 22-HTG leva a redução na atividade enzimática da enzima LDH de forma significativa nas linhagens SKMEL 28 e SKMEL 103, sem levar a alterações na atividade intrínseca da enzima nas linhagens SKMEL 19 e MRC-5 (Figura 19).

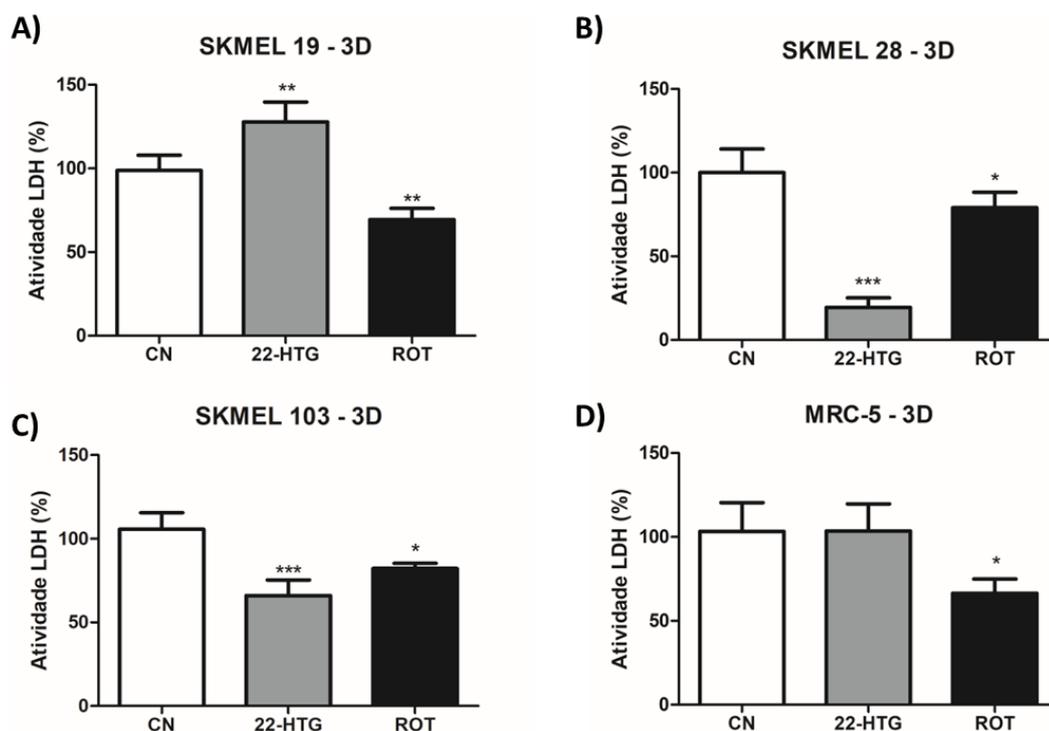


**Figura 19** - 22-HTG altera a atividade enzimática de LDH em linhagens de melanoma. As linhagens de melanoma A) SKMEL 19, B) SKMEL 28 e C) SKMEL 103, assim como a linhagem normal D) MRC-5 foram tratadas com 22-HTG por 24 horas e depois a atividade da enzima LDH foi mensurada. As barras representam a média  $\pm$  desvio padrão da média de 3 experimentos independentes. \* $p < 0,05$ , \*\* $p < 0,001$ , \*\*\* $p < 0,0001$  comparado com células sem tratamento (CN) por 1way ANOVA seguida de teste de Bonferroni, com nível de significância de 95% ( $p < 0,05$ ). 22-HTG= 22 $\beta$ -Hidroxitingenona; CN= Controle Negativo; ROT= Rotenona.

### 5.4.6 Avaliação da atividade de LDH em modelo 3D

A partir dos dados de citotoxicidade, foi buscado avaliar o potencial modulador do metabolismo no modelo 3D, para isso foi utilizada uma concentração não citotóxica de 22-HTG nos modelos avaliados. Em relação a atividade de LDH, foi observado que a substância 22-HTG levou a diminuição na atividade da enzima nas linhagem SKMEL

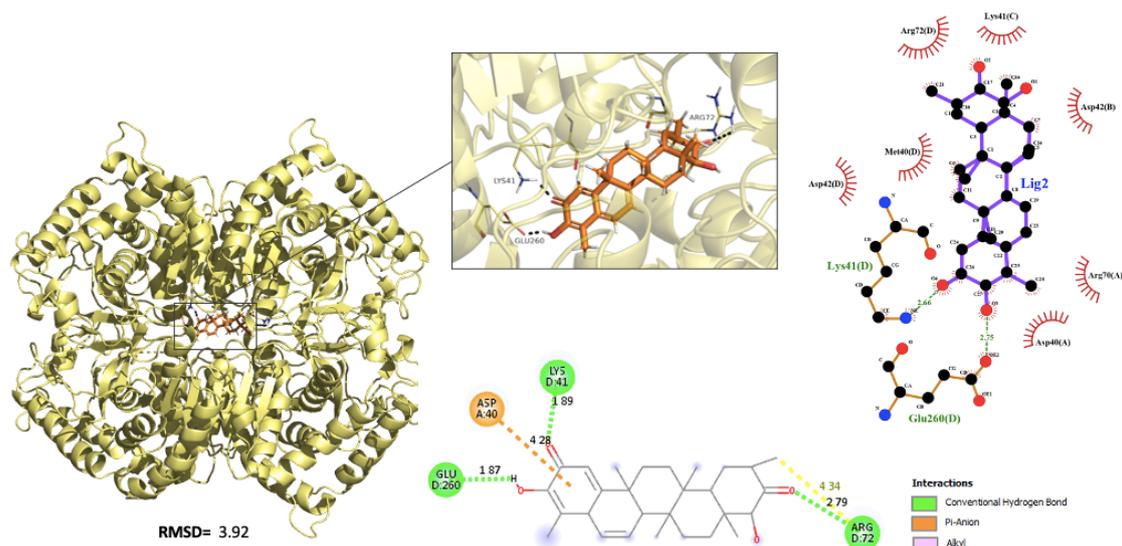
28 e SKMEL 103, enquanto levou aumento na atividade na linhagem SKMEL 19 e não alterou o perfil de atividade da enzima na linhagem MRC-5 (Figura 20).



**Figura 20** - 22-HTG altera a atividade enzimática de LDH em linhagens de melanoma no modelo 3D. As linhagens de melanoma A) SKMEL 19, B) SKMEL 28 e C) SKMEL 103, assim como a linhagem normal D) MRC-5 foram tratadas com 22-HTG por 24 horas em concentrações não citotóxicas e depois a atividade da enzima LDH foi mensurada. As barras representam a média  $\pm$  desvio padrão da média de 3 experimentos independentes. \* $p < 0,05$ , \*\* $p < 0,001$ , \*\*\* $p < 0,0001$  comparado com o controle negativo (CN) por 1way ANOVA seguida de teste de Bonferroni, com nível de significância de 95% ( $p < 0,05$ ). 22-HTG= 22 $\beta$ -Hidroxitigenona; CN= Controle Negativo; ROT= Rotenona.

#### 5.4.7 LDH e 22-HTG In silico

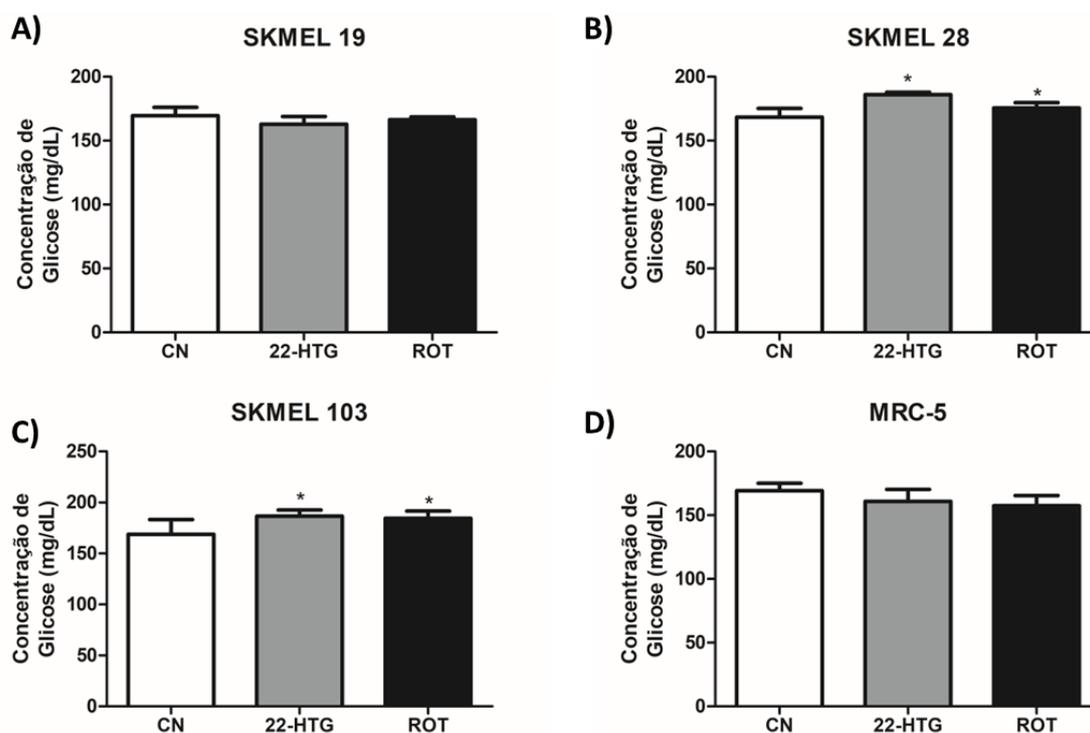
Foi realizado um estudo de Dockin molecular para avaliar a interação entre 22-HTG e o modelo computacional do LDH. Os resultados revelaram uma forte interação entre o composto 22-HTG e o sítio ativo do LDH, indicando um potencial efeito inibitório do 22-HTG sobre a atividade enzimática do LDH. Sugerem que o 22-HTG pode ser um candidato promissor para o desenvolvimento e novos agentes inibidores da LDH com potencial aplicação terapêutica contra o câncer.



**Figura 21** - 22-HTG interage com a enzimática computacional de LDH. A análise pelo método de docking molecular utilizando o grid box elaborado in silico em triagem virtual sugere uma avaliação mais precisa e confiável da interação entre um composto candidato a fármaco e seu alvo molecular.

#### 5.4.8 Captação de glicose em modelo 2D

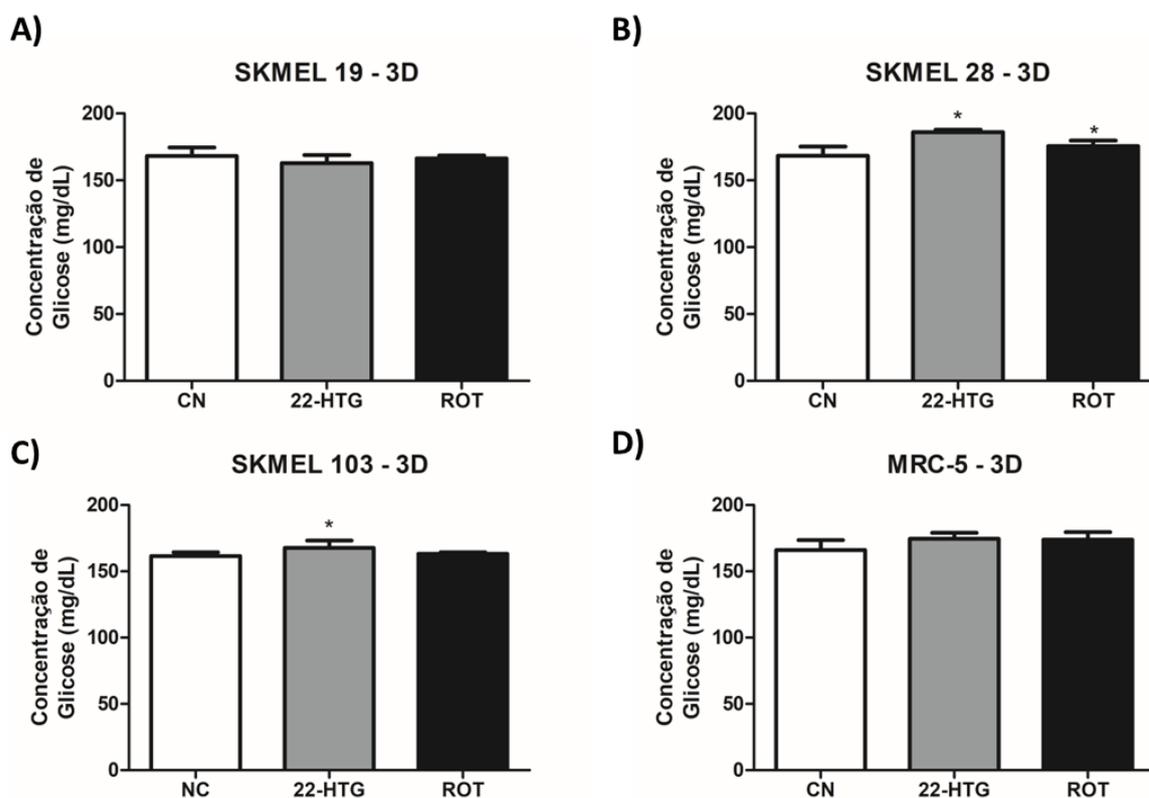
Em seguida foi realizada a mensuração da glicose restante no sobrenadante após o tratamento com o fármaco 22-HTG por 24 horas. Como visualizado na figura 22, a substância 22-HTG só levou a diminuição de forma significativa na captação de glicose, ou seja, aumentou a glicose presente no meio após o tratamento, nas linhagens tumorais SKMEL 28 e SKMEL 103. Os níveis de glicose nas linhagens SKMEL 19 e MRC-5 permaneceu constante mesmo após o tratamento com o fármaco.



**Figura 22** - 22-HTG altera a captação de glicose nas linhagens de melanoma SKMEL 28 e SKMEL 103. As linhagens de melanoma A) SKMEL 19, B) SKMEL 28 e C) SKMEL 103, assim como a linhagem normal D) MRC-5 foram tratadas com 22-HTG por 24 horas e depois a concentração de glicose remanescente no sobrenadante foi mensurada por absorbância. As barras representam a média  $\pm$  desvio padrão da média de 3 experimentos independentes. \*\* $p < 0,001$ , \*\*\* $p < 0,0001$  comparado com células sem tratamento (CN) por 1way ANOVA seguida de teste de Bonferroni, com nível de significância de 95% ( $p < 0,05$ ). 22-HTG= 22 $\beta$ -Hidroxitingenona; CN= Controle Negativo; ROT= Rotenona.

#### 5.4.9 Avaliação da captação de glicose em modelo 3D

Em seguida foi avaliado a capacidade da substância 22-HTG alterar o perfil de captação de glicose das linhagens estudadas também no modelo 3D. Como visualizado na figura 23, a substância levou aumento na concentração de glicose presente no meio extracelular apenas nas linhagens SKMEL 28 e SKMEL 103, indicando que houve uma diminuição na captação de glicose por essas linhagens após 24 horas de tratamento com a substância.

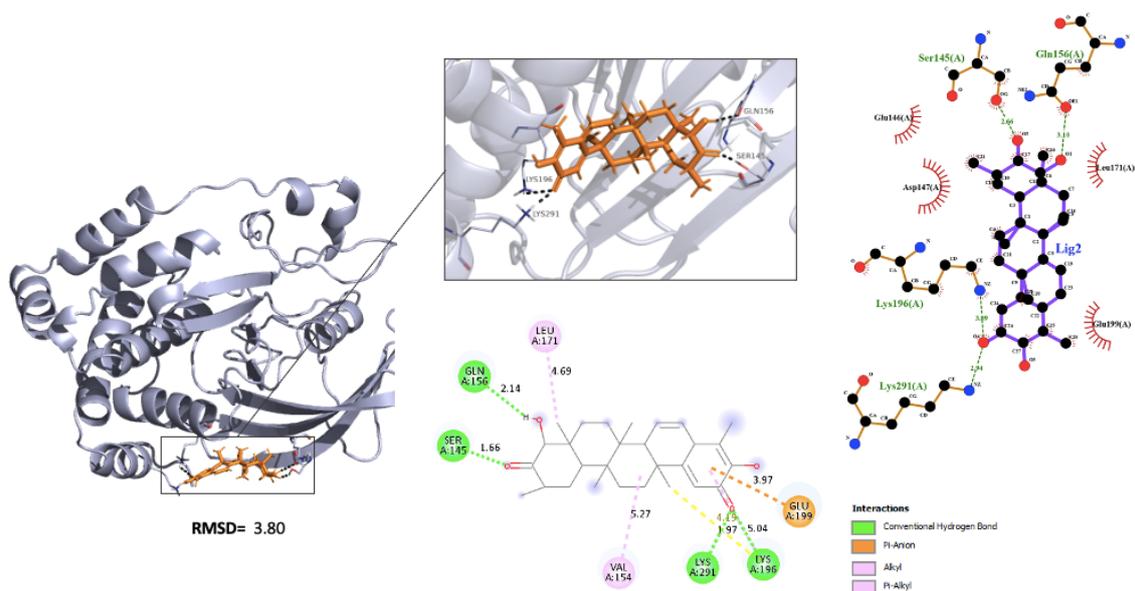


**Figura 23** - 22-HTG altera a captação de glicose nas linhagens de melanoma SKMEL 28 e SKMEL 103. As linhagens de melanoma A) SKMEL 19, B) SKMEL 28 e C) SKMEL 103, assim como a linhagem normal D) MRC-5 foram cultivadas em modelo de esferoide 3D e depois tratadas com 22-HTG por 24 horas, sem seguida foi mensurada a concentração de glicose remanescente no sobrenadante por absorbância. As barras representam a média  $\pm$  desvio padrão da média de 3 experimentos independentes. \* $p < 0,05$  comparado com células sem tratamento (CN) por 1way ANOVA seguida de teste de Bonferroni, com nível de significância de 95% ( $p < 0,05$ ). 22-HTG= 22 $\beta$ -Hidroxitigenona; CN= Controle Negativo; ROT= Rotenona.

#### 5.4.10 Glicose e 22-HTG In silico

Foi realizado um estudo de Dockin molecular para avaliar a interação entre 22-HTG e o modelo computacional da Glicose, mostrando interação da substância com a proteína tirosina fosfatase, que pode atuar como um regulador negativo dessa via, inibindo a sinalização de glicose.

A proteína tirosina fosfatase desempenha um papel crucial na regulação do metabolismo da glicose e na sinalização intracelular relacionada à glicose. A compreensão dessa relação é importante para o desenvolvimento de terapias e intervenções direcionadas ao metabolismo da glicose em condições como diabetes e câncer.



**Figura 24** - 22-HTG interage com o modelo computacional da proteína tirosina fosfatase. A análise pelo método de docking molecular utilizando o grid box elaborado in silico em triagem virtual sugere uma avaliação mais precisa e confiável da interação entre um composto candidato a fármaco e seu alvo molecular.

## 6. DISCUSSÃO

A descoberta e o desenvolvimento de produtos naturais com propriedades anticâncer têm despertado grande interesse na comunidade científica. Entre esses produtos, os triterpenos do gênero *Salacia* têm sido amplamente estudados devido às suas atividades biológicas promissoras (KIM et al., 2011; WANG et al., 2016; YADAV et al., 2010). Entre os triterpenos, destaca-se a 22 $\beta$ -Hidroxitengenona, um composto encontrado em algumas espécies de plantas do gênero *Salacia* (RODRIGUES, et al., 2019).

O uso de técnicas computacionais, como o dockin molecular in silico, tem se mostrado promissor para prever a interação entre moléculas candidatas a fármacos e seus alvos terapêuticos (BULTUM et al., 2022; KATSILA et al., 2016). Vários estudos têm explorado o dockin molecular in silico para prever a farmacocinética de compostos e otimizar o design de fármacos (WU et al., 2020). Por exemplo, KUMAR et al. (2018) utilizaram o dockin molecular in silico para avaliar a afinidade de ligação de um composto candidato a inibidores enzimáticos.

Outro estudo realizado por El-Saadi e colaboradores em 2015 aplicou o dockin molecular in silico para prever a farmacocinética de um candidato a fármaco, levando em consideração parâmetros como a solubilidade, a permeabilidade celular e o metabolismo hepático. A análise de docking molecular realizada em nosso estudo também abrangeu todos esses parâmetros, revelando que há afinidade de ligação com composto candidatos a inibidores enzimáticos AKR1B1 e AKR1B10. Além disso, foram testadas propriedades farmacocinéticas do 22-HTG, indicando baixa capacidade de atravessar a barreira hematoencefálica, alta absorção intestinal com boa permeabilidade em células Caco-2 e alta proteína de ligação a proteínas plasmáticas.

A abordagem de docking molecular in silico tem sido amplamente utilizada para prever interações entre moléculas e alvos metabólicos, como as enzimas AKR1B1 e AKR1B10. Essas enzimas estão envolvidas em processos metabólicos e têm sido alvo de interesse na busca por compostos que possam modular sua atividade (BANERJEE, 2021; RUIZ et al., 2017). Um exemplo promissor nesse contexto é a 22 $\beta$ -Hidroxitengenona, uma substância que em nosso estudo aparece como possível inibidor dessas enzimas.

Um estudo realizado por Khan e colaboradores (2018) e outro realizado por Dwivedi e colaboradores (2021) utilizou técnicas de docking molecular in silico para identificar compostos que apresentam afinidade e interação de forma seletiva com a enzima AKR1B1. Através dessa abordagem, foram identificados potenciais inibidores da

AKR1B1, que poderiam ter aplicações terapêuticas no tratamento do diabetes e de complicações associadas, como retinopatia e neuropatia diabéticas. Os resultados obtidos sugeriram que o docking molecular pode ser uma estratégia eficiente para a identificação de compostos com potencial atividade inibitória contra alvos metabólicos, como a AKR1B1.

Outro estudo conduzido por Ruiz e colaboradores (2017) investigou os possíveis inibidores da enzima AKR1B10 usando a abordagem de docking molecular. A AKR1B10 tem sido associada ao desenvolvimento e progressão de vários tipos de câncer, tornando-a um alvo potencial para terapias anticâncer. Os resultados mostraram que certos compostos demonstraram uma forte interação com a AKR1B10, sugerindo sua potencial atividade inibitória. Esses achados destacam a importância do docking molecular na identificação de compostos que possam modular a atividade metabólica da AKR1B10 como estratégia para o desenvolvimento de terapias direcionadas ao câncer.

O docking molecular *in silico* tem se mostrado uma abordagem promissora na identificação e predição de alvos metabólicos, como as enzimas AKR1B1 e AKR1B10. Nossos resultados corroboram com os estudos mencionados que demonstram a aplicação bem-sucedida dessa técnica na identificação de potenciais inibidores e na seleção de compostos com atividade farmacológica direcionada a esses alvos. Essa abordagem auxilia no desenvolvimento de estratégias terapêuticas mais eficazes para o tratamento de doenças metabólicas e câncer, fornecendo informações valiosas para a descoberta de novos compostos e terapias direcionadas. Vale ressaltar que nosso estudo apresentou uma abordagem inovadora, uma vez que nenhum outro trabalho prévio analisou a 22-HTG utilizando técnicas computacionais.

Ainda há poucos estudos investigando o potencial anticâncer da 22 $\beta$ -Hidroxitingenona e seus efeitos sobre diferentes tipos de câncer (CEVATEREM et al., 2016). Um estudo realizado por Aranha e colaboradores, 2020, 2021 descreveram a redução da proliferação, migração e invasão celular, com mecanismo inibitório de metaloproteinases e da via MAPK em células de melanoma humano.

As linhagens SKMEL19, SKMEL28 e SKMEL103 de células de melanoma são valiosas ferramentas de pesquisa para o estudo do melanoma. Através dessas linhagens celulares, tem sido possível investigar características genéticas, fenotípicas e de resposta terapêutica do melanoma, proporcionando avanços no desenvolvimento de novas abordagens terapêuticas (ROCHA-BRITO et al., 2022; NIESSNER et al., 2019; GIULIANO et al., 2011; PALMIERI et al., 2009).

Em nosso estudo, observamos a variabilidade na sensibilidade das linhagens de melanoma SKMEL19, SKMEL28 e SKMEL103 ao agente natural 22-HTG. O ensaio de citotoxicidade em monocamada revelou uma dose de 1,90  $\mu\text{g}$  de 22-HTG como necessária para inibir 50% do crescimento celular da linhagem SKMEL-28, em contraste com as linhagens SKMEL19 e SKMEL-103, 1,17  $\mu\text{g}$  e 1,24 $\mu\text{g}$ , respectivamente. Além disso, constatou-se que uma concentração ainda maior de 22-HTG, 2,23 $\mu\text{g}$ , é necessária para inibir 50% do crescimento celular da linhagem MRC5, um fibroblasto humano não maligno. Esses achados mostram uma vantagem potencial da substância, uma vez que doses menores podem ser empregadas sem induzir citotoxicidade em células não cancerígenas.

A cultura de esferoides celulares tridimensionais tem sido amplamente utilizada como uma abordagem *in vitro* para estudar o comportamento celular em um ambiente mais fisiologicamente relevante (SURYAPRAKASH et al., 2020; LEE et al., 2017; TAKAGI et al., 2007). Esses modelos têm se mostrado valiosos para entender melhor a biologia celular e para a pesquisa de novas terapias anticâncer (DONGLAI et al., 2017). Vários estudos têm explorado os benefícios e as aplicações dos esferoides celulares, fornecendo insights valiosos para o campo da farmacologia (JENSEN & TENG et al., 2020).

Estudo conduzido por Azizipour e colaboradores (2022) investigou a aplicação dos esferoides celulares como modelos para o estudo da resposta a drogas anticâncer. Eles demonstraram que os esferoides celulares têm uma maior resistência a agentes terapêuticos em comparação com as células cultivadas em monocamada. Essa resistência é atribuída as células estarem dispostas em multicamadas e a droga precisa se difundir através das camadas de células para atingir seu alvo, hipóxia dentro dos esferóides e regulação positiva de genes que conferem resistência a drogas, mimetizando as condições do tumor *in vivo*. Esses resultados destacam a importância dos esferoides celulares como modelos mais relevantes para a avaliação da eficácia de terapias anticâncer.

No presente estudo foi observado que a quantidade de células necessárias para formação adequada dos esferoides também diverge, enquanto a linhagem SKMEL28 apresentava maior capacidade de formação de esferoides *in vitro* com concentração de células  $50 \times 10^4$  células/chip, as linhagens SKMEL19 e SKMEL103 exibem maior capacidade de formação de tumores *in vitro* com concentração de células  $100 \times 10^4$  células/chip, esses resultados fornecem informações valiosas para a

compreensão da heterogeneidade do melanoma e o desenvolvimento de estratégias terapêuticas mais eficazes.

Devido à sua alta capacidade de sobrevivência, as células cancerígenas têm uma demanda energética intensa, levando ao aumento no consumo de glicose e glutamina e alterações metabólicas em vias de biossíntese de lipídios, aminoácidos e outras macromoléculas em diferentes locais tumorais. Essas alterações metabólicas desempenham um papel crucial no desenvolvimento do câncer (CHOI & PARK, 2018; JIN & ZHOU, 2019; POPE et al., 2019).

Compreender a interrupção da reprogramação metabólica é fundamental para o desenvolvimento de novos compostos terapêuticos direcionados ao metabolismo tumoral. Diversos estudos têm se concentrado nesse campo, buscando identificar alvos metabólicos promissores para terapias terapêuticas. Por exemplo, Intlekofer & Finley (2019) destacam a importância de compreender as vias metabólicas específicas utilizadas pelas células cancerígenas para o desenvolvimento de agentes terapêuticos eficazes.

A abordagem do direcionamento do metabolismo tumoral vem ganhando destaque como uma estratégia promissora para combater o câncer. Ao identificar e modular as vias metabólicas críticas para a sobrevivência das células tumorais, é possível direcionar terapêuticamente essas vias e inibir o crescimento do tumor. Isso pode ser alcançado por meio do desenvolvimento de compostos específicos que acompanham as enzimas ou vias metabólicas relevantes (LUNT & VANDER HEIDEN, 2011).

Portanto, a compreensão das alterações metabólicas nas células tumorais e a identificação de alvos metabólicos específicos abrem novas perspectivas para o desenvolvimento de terapias anticancerígenas mais eficazes. O direcionamento do metabolismo tumoral representa uma abordagem promissora e em constante evolução, que pode levar ao desenvolvimento de tratamentos mais eficazes e com menor toxicidade para os pacientes com câncer.

No presente estudo, foram analisadas as diferenças nos parâmetros metabólicos das linhagens SKMEL-19, SKMEL-28, SKMEL-103 derivadas de tumores de câncer de pele melanoma e da linhagem normal de fibroblasto humano MRC5 em diferentes condições de glicose para simular diferentes ambientes glicêmicos, a concentração padrão nos meios de cultivo é 25 mM, simulada um ambiente hipoglicêmico as concentrações 5,5mM e 0,5mM são comumente utilizadas nos estudos de cultura celular in vitro (HAN et al., 2011; ZHUANG et al., 2014).

Han e colaboradores (2015) mostraram um aumento no crescimento de duas linhagens de câncer endometrial (ECC-1 e Ishikawa) em meio com alta concentração de glicose (25 mM), quando comparado com células em meio com baixa glicose (5,5 mM) e sem adicional de glicose (0,0 mM). As linhagens de SKMEL-19, SKMEL-28 e SKMEL-103 são modelos *in vitro* de melanoma utilizados em estudos de novas drogas com potencial antitumoral (RALPH et al., 2016), entretanto, os parâmetros metabólicos dessas células e sua influência na progressão tumoral permanecem pouco compreendidos.

Fortalecendo a importância de uma análise comparativa da ação de uma substância terapêutica em diferentes linhagens celulares em culturas *in vitro*, constatamos que subtipos distintos dentro de um mesmo tipo de câncer podem exibir respostas variáveis a determinadas substâncias terapêuticas. Ao examinar a influência da concentração de glicose nos meios de cultura das linhagens em estudo em uma configuração de monocamada, observamos que cada linhagem apresentou modificações distintas em termos de viabilidade celular, captação de glicose e atividade da enzima LDH.

Ao compararmos com o meio de glicose padrão (25mM), observamos que apenas a linhagem SKMEL-28 apresentou menor viabilidade celular quando cultivada em meios com concentrações reduzidas de glicose (5,5mM e 0,5mM). Nessa última concentração, a linhagem MRC5 também apresentou menor viabilidade celular. Apenas a linhagem SKMEL-103 apresentou uma maior atividade da enzima LDH quando cultivada em meio com concentração de glicose de 5,5mM a 0,5mM de glicose as linhagens SKMEL-28, SKMEL-103 e MRC5 mostram maior atividade de LDH. Em relação ao consumo de glicose, a linhagem SKMEL-103 apresentou um maior consumo em meio com concentração de 5,5mM. Esses achados indicam que, embora a glicose seja um nutriente essencial para o crescimento celular, algumas linhagens de células malignas de melanoma são menos dependentes de uma alta concentração de substrato para proliferar.

Ao medir os níveis de ATP nas células cultivadas em monocamadas tumorais tratados com o 22-HTG, é possível determinar se esse composto afeta a produção de ATP pelas células tumorais. Nosso estudo apontou uma redução significativa na concentração de ATP nas linhagens SKMEL 28 e SKMEL103 tratadas com 22-HTG, isso indicar que o 22-HTG está interferindo na capacidade das células tumorais em produzir energia, o que pode afetar a viabilidade e a sobrevivência das células tumorais.

Estudos têm mostrado que a inibição de vias metabólicas específicas, como a via glicolítica ou a fosforilação oxidativa, pode afetar as concentrações de ATP em células

de melanoma e ter implicações terapêuticas (WU et al., 2022; INDINI et al., 2021). Além disso, a manipulação de vias metabólicas por meio de terapias direcionadas ou modificação do ambiente tumoral pode influenciar as concentrações de ATP e a viabilidade das células de melanoma (NEGRI et al., 2019)

O metabolismo das células tumorais é caracterizado por alterações significativas em comparação com células normais. A atividade da LDH nas células tumorais desempenha um papel crucial na produção de ATP e no metabolismo do lactato (CLAPS et al., 2022; MCCLELAND et al., 2013). A LDH é uma enzima responsável pela conversão do piruvato em lactato durante a glicólise (PÉREZ-TOMÁS & PÉREZ-GUILLÉN, 2020). Em células tumorais, a atividade da LDH é frequentemente aumentada, promovendo a produção de lactato mesmo na presença de oxigênio. Isso ocorre devido à necessidade das células tumorais de produzir energia rapidamente para suportar sua alta taxa de proliferação (ALTINOZ & OZPINAR, 2022). Vários estudos relataram níveis elevados de LDH em diferentes tipos de câncer (BONONI et al., 2022).

Nosso estudo aponta que a 22-HTG tem a capacidade de redução na atividade enzimática da enzima LDH de forma significativa nas linhagens SKMEL 28 e SKMEL 103, cultivadas em monocamadas e no modelo tridimensional. Se o 22-HTG pode modular a atividade da LDH, isso pode interferir no metabolismo energético das células tumorais e potencialmente inibir seu crescimento descontrolado.

A captação de glicose também é aumentada nas células tumorais devido às suas demandas energéticas aumentadas. As células cancerosas expressam níveis elevados de transportadores de glicose, como o transportador de glicose tipo 1 (GLUT1), permitindo a entrada eficiente de glicose na célula (PAUL et al., 2022). Esse aumento na captação de glicose é uma estratégia adaptativa para suprir as necessidades energéticas e biossintéticas das células tumorais (PAVLOVA et al., 2022). Além disso, a glicose também serve como precursor para a síntese de macromoléculas, como ácidos nucleicos e lipídios, que são essenciais para a proliferação celular (BHADRA et al., 2022).

Avaliar capacidade do 22-HTG de interferir na captação de glicose é de particular interesse, uma vez que as células tumorais têm uma demanda aumentada por glicose para sustentar seu metabolismo energético acelerado. No nosso experimento mostramos que a 22-HTG leva a diminuição de forma significativa na captação de glicose, nas linhagens de melanoma SKMEL 28 e SKMEL 103, cultivadas em monocamadas e no modelo tridimensional, resultando em privação de energia.

Células malignas exibem maior suscetibilidade à privação de glicose em comparação com células normais, no entanto, o mecanismo subjacente à morte celular na ausência desse nutriente ainda não é completamente compreendido. Pesquisas revelaram diferentes controles de morte celular em diferentes tipos de tumores, os quais variaram conforme a duração da privação de glicose (LEÓN-ANNICCHIARICO et al., 2015; LOWMAN et al., 2010).

Essa avaliação cinética dos níveis de atividade enzimática da enzima LDH, captação de glicose, concentração de ATP fornece informações valiosas sobre o impacto do 22-HTG no metabolismo energético das células tumorais. A redução dos níveis desses parâmetros sugere que o 22-HTG está direcionando as células tumorais a uma condição de estresse energético, prejudicando seu crescimento e avanço. Essa trajetória do metabolismo energético pode representar uma estratégia promissora para o desenvolvimento de terapia antitumoral eficaz.

O metabolismo das células tumorais é caracterizado por um redirecionamento do metabolismo da glicose, com aumento da atividade da LDH, captação de glicose aumentada e concentrações de ATP variáveis. Essas alterações metabólicas são cruciais para suprir as necessidades energéticas e biossintéticas das células tumorais em proliferação. Compreender esses processos metabólicos é fundamental para o desenvolvimento de estratégias terapêuticas direcionadas ao metabolismo tumoral. Estudos futuros são necessários para aprofundar a compreensão das complexidades metabólicas do melanoma.

## 7. CONCLUSÕES

- Esse estudo ressalta a importância da avaliação de produtos naturais, como a 22-HTG, em diferentes modelos in vitro, incluindo a cultura tridimensional.
- Há interação entre a molécula de 22-HTG e o alvo metabólico AKR1B10, sugerindo seu potencial como um inibidor eficaz;
- O estudo apresentou uma abordagem inovadora, uma vez que nenhum outro trabalho prévio analisou a 22-HTG utilizando técnicas computacionais;
- Observou-se que o tratamento com 22-HTG foi capaz de reduzir a viabilidade e induzir a morte celular nas três linhagens de melanoma malignos experimentadas;
- A inclusão do microambiente tumoral em um modelo bidimensional e tridimensional utilizando células de melanoma das linhagens SKMEL-19, SKMEL28, SKMEL-103 e de fibroblasto humano (MRC5) mostrou-se eficaz e viável para o estudo da 22-HTG, revelando sua capacidade de agir de maneira distinta no metabolismo dessas linhagens;
- A utilização do modelo tridimensional revelou-se crucial para simular um ambiente mais complexo e representativo do microambiente tumoral;
- Este é o primeiro estudo a descrever a atividade da 22-HTG contra células de melanoma humano cultivadas em um modelo tridimensional, o que confere um aspecto inovador a este trabalho;
- A exposição à 22-HTG resultou em redução significativa da atividade enzimática da LDH e da captação de glicose nas linhagens SKMEL 28 e SKMEL 103, tanto em cultura bidimensional quanto no modelo tridimensional.
- Os resultados obtidos neste estudo fornecem uma base sólida para pesquisas futuras sobre o potencial terapêutico da 22-HTG no tratamento do melanoma.

## REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ABÁNADES LÁZARO, Isabel; WELLS, Connor JR; FORGAN, Ross S. Multivariate modulation of the Zr MOF UiO-66 for defect-controlled combination anticancer drug delivery. **Angewandte Chemie**, v. 132, n. 13, p. 5249-5255, 2020.

AGRAWAL, G., RAMESH, A., AISHWARYA, P., SALLY, J., & RAVI, M. Dispositivos e técnicas usadas para obter e analisar culturas celulares tridimensionais. **Biotechnology Progress**, 37 (3), e3126, 2021.

AHMED, S. Ansar; GOGAL JR, Robert M.; WALSH, Jane E. A new rapid and simple non-radioactive assay to monitor and determine the proliferation of lymphocytes: an alternative to [3H] thymidine incorporation assay. *Journal of immunological methods*, v. 170, n. 2, p. 211-224, 1994.

ALAM, S., & KHAN, F. 3D-QSAR, Docking, ADME/Tox studies on flavone analogues reveal anticancer activity through Tankyrase inhibition. **Scientific Reports**, 9 (1), 1-15, 2019

ALQAHTANI, S. Modeling in silico ADME-Tox: advances and perspectives. **Expert opinion on drug metabolism and toxicology**, 13 (11), 1147-1158, 2017.

ALEXANDROV, L.B. Understanding the origins of human cancer, **Science & Scilifelab Prize**, 2015.

ALTINOZ, MA, & OZPINAR, A. Oxamate targeting aggressive cancers with special emphasis on brain tumors. **Biomedicine & Pharmacotherapy**, 147, 112686, 2022.

AN, Lanfen et al. KIF2C is a novel prognostic biomarker and correlated with immune infiltration in endometrial cancer. **Stem Cells International**, v. 2021, p. 1-13, 2021.

ANTONI, D., BURCKEL, H., JOSSET, E., & NOEL, G. Three-dimensional cell culture: an in vivo advance. **International journal of molecular sciences**, 16 (3), 5517-5527, 2015.

ARANHA ESP, DA SILVA EL, MESQUITA FP, DE SOUSA LB, DA SILVA FMA, ROCHA WC, LIMA ES, KOOLEN HHF, DE MORAIS MEA, MONTENEGRO RC, DE VASCONCELLOS, MC. 22 $\beta$ -hydroxytingenone reduces proliferation and invasion of human melanoma cells. **Toxicology in vitro**, 66, 104879, 2020.

ARANHA, ESP, DE SOUSA PORTILHO AJ, DE SOUSA LB, DA SILVA EL, MESQUITA FP, ROCHA WC, DA SILVA FMA, LIMA ES, ALVES APNN, KOOLEN HHF, MONTENEGRO RC, DE VASCONCELLOS MC. 22 $\beta$ -hydroxytingenone induces apoptosis and suppresses invasiveness of melanoma cells by inhibiting MMP-9 activity and MAPK signaling. **Journal of Ethnopharmacology** 267, 113605, 2021.

AZIZIPOUR N, AVAZPOUR R, WEBER MH, SAWAN M, AJJI A, ROSENZWEIG DH. Uniform Tumor Spheroids on Surface-Optimized Microfluidic Biochips for Reproducible Drug Screening and Personalized Medicine. **Micromachines** 13(4):587, 2022.

BADER, Jackie E.; VOSS, Kelsey; RATHMELL, Jeffrey C. Targeting metabolism to improve the tumor microenvironment for cancer immunotherapy. **Molecular cell**, v. 78, n. 6, p. 1019-1033, 2020.

BAJETTA E, DEL VECCHIO M, VITALI M, ET AL. A feasibility study using polychemotherapy (cisplatin + vindesine + dacarbazine) plus interferon-alpha or monochemotherapy with dacarbazine plus interferon-alpha in metastatic melanoma. **Tumori**; 87:219-22, 2021.

BALLAV, Sangeeta et al. Two-dimensional and three-dimensional cell culture and their applications. **Cell Culture—Advanced Technology and Applications in Medical and Life Sciences**, 2021.

BANERJEE S. Aldo Keto Reductases AKR1B1 and AKR1B10 in Cancer: Molecular Mechanisms and Signaling Networks. *Cell Biology Translational Medicine*, 14, 1347:65-82, 2021.

BARBOSA MAG, XAVIER CPR, PEREIRA RF, PETRIKAITÈ V, VASCONCELOS MH. 3D Cell Culture Models as Recapitulators of the Tumor Microenvironment for the Screening of Anti-Cancer Drugs. *Cancers (Basel)*, Dec 31;14(1):190, 2021.

BHADRA, M.P., RAUT, G.K., CHAKRABARTI, M. Metabolic Oxidative Stress. In: Chakraborti, S. (eds) *Handbook of Oxidative Stress in Cancer: Therapeutic Aspects*. Springer, Singapore pp 3363–3382, 2022.

BISWAL, BIRANCHI NARAYAN; DAS, SURYA NARAYAN; DAS, BIJOY KUMAR; et al. Alteration of cellular metabolism in cancer cells and its therapeutic prospects. *Journal of Oral and Maxillofacial Pathology : JOMFP*, v. 21, n. 2, p. 244–251, 2017.

BONONI, G., MASONI, S., DI BUSSOLO, V., TUCCINARDI, T., GRANCHI, C., & MINUTOLO, F. Historical perspective of tumor glycolysis: a century with Otto Warburg. *Seminars in cancer biology*. Academic Press, 86, 2, 325-222, 2022.

BULTUM, Lemessa Etana; TOLOSSA, Gemechu Bekele; LEE, Doheon. Combining empirical knowledge, in silico molecular docking and ADMET profiling to identify therapeutic phytochemicals from *Brucea antidysentrica* for acute myeloid leukemia. *PLoS One*, v. 17, n. 7, p. e0270050, 2022.

BRAGA RC, ALVES VM, SILVA MFB, MURATOV E, FOURCHES D, LIAO LM, TROPSHA A, ANDRADE CH. Pred-hERG: A novel web-accessible computational tool for predicting cardiac toxicity. **Mol. Inf.** v. 34, p. 698-701, 2015.

BRAGA RC, ALVES VM, MURATOV EN, STRICKLAND J, KLEINSTREUER N, TROPSHA A, ANDRADE CHJ. Pred-Skin: A Fast and Reliable Web Application to Assess Skin Sensitization Effect of Chemicals. **Chem. Inf. Model.** v. 57, n. 5, p. 1013–1017, 2017.

CALABRETTA, Maria Maddalena et al. Bioluminescence Sensing in 3D Spherical Microtissues for Multiple Bioactivity Analysis of Environmental Samples. *Sensors*, v. 22, n. 12, p. 4568, 2022.

CALDWELL, GW, RITCHIE, DM, MASUCCI, JA, HAGEMAN, W., & YAN, Z. The new pre-preclinical paradigm: compound optimization in early and late phase drug discovery. *Current topics in medicinal chemistry*, v. 1, n. 5, p. 353-366, 2001.

CAMPOCCIA, Davide et al. Exploring the anticancer effects of standardized extracts of poplar-type propolis: In vitro cytotoxicity toward cancer and normal cell lines. ***Biomedicine & Pharmacotherapy***, v. 141, p. 111895, 2021.

CAVO M, FATO M, PEÑUELA L, BELTRAME F, RAITERI R, SCAGLIONE S. Microenvironment complexity and matrix stiffness regulate breast cancer cell activity in a 3D in vitro model, *Scientific Reports* 6:35367, 2016.

CEVATEMRE B, BOTTA B, MORI M, BERARDOZZI S, INGALLINA C, ULUKAYA E. The plant-derived triterpenoid tingenin B is a potent anticancer agent due to its cytotoxic activity on cancer stem cells of breast cancer in vitro. *Chemico-Biological Interactions* 260, 248-255, 2016.

CHENG F, LI W, ZHOU Y, SHEN J, WU Z, LIU G, LEE PW, TANG Y. admetSAR: a comprehensive source and free tool for assessment of chemical ADMET properties. ***J.Chem.Inf.Model***, v. 52, p. 3099–3105, 2012.

CHOI, YEON-KYUNG; PARK, KEUN-GYU. Targeting Glutamine Metabolism for Cancer Treatment. *Biomolecules & Therapeutics*, v. 26, n. 1, p. 19–28, 2018.

CLAPS, G., FAOUZI, S., QUIDVILLE, V. et al. The multiple roles of LDH in cancer. ***Nat Rev Clin Oncol*** 19, 749–762, 2022.

COPPEDE, J. S. et al. Cell cultures of *Maytenus ilicifolia* Mart. are richer sources of quinone-methide triterpenoids than plant roots in natura. ***Plant Cell, Tissue and Organ Culture***, v. 118, n. 1, p. 33–43, 2014.

CRAGG, GM; GROTHAUS, PAUL G.; NEWMAN, DAVID J. Impact of natural products on developing new anti-cancer agents. ***Chemical reviews***, v. 109, n. 7, p. 3012-3043, 2009.

CRAGG, G. M.; PEZZUTO, J. M. Natural Products as a Vital Source for the Discovery of Cancer Chemotherapeutic and Chemopreventive Agents. ***Medical Principles and Practice***, v. 25, n. 2, p. 41–59, 2016.

CURTIN JA, FRIDLYAND J, KAGESHITA, T, PATEL HN, BUSAM KJ, KUTZNER H, CHO KH, AIBA S, BRÖCKER EB, LÉBOIT PE, PINKEL D, BASTIAN BC. Distinct Sets of Genetic Alterations in Melanoma. ***New England Journal of Medicine***, 353 (20), 2135-2147, 2005.

SURYAPRAKASH C, TEJA R, KUJAN O, SHEARSTON K, FARAH CS. "Three-Dimensional Cell Culture Models to Investigate Oral Carcinogenesis: A Scoping Review" **International Journal of Molecular Sciences** 21, no. 24: 9520, 2020.

CRAWFORD NF, LEBLANC RM. Serum albumin in 2D: A Langmuir monolayer approach, **Advances in Colloid and Interface Science** 207, 131–138, 2014.

DA SILVA, F. M. A. et al. Chemical constituents from *Salacia impressifolia* (Miers) A. C. Smith collected at the Amazon rainforest. **Biochemical Systematics and Ecology**, v. 68, p. 77–80, 2016.

DAINA, A; MICHELIN, O; ZOETE, Z. SwissADME: a free web tool to evaluate pharmacokinetics, drug-likeness and medicinal chemistry friendliness of small molecules. **Sci. Rep.** v. 7, p. 42717, 2017.

DAR, S; CHHINA, J; MERT, I; CHITALE, D; BUEKERS, T; KAUR, H; GIRI, S; MUNKARAH, A; RATTAN, R. Bioenergetic adaptations in chemoresistant ovarian cancer cells, **Scientific reports**, v. 7, n. 1, p. 1-17, 2017.

DATTA, Pallab et al. 3D bioprinting for reconstituting the cancer microenvironment. **NPJ precision oncology**, v. 4, n. 1, p. 18, 2020.

DE MAGALHÃES, Camila Silva et al. A dynamic niching genetic algorithm strategy for docking highly flexible ligands. **Information Sciences**, v. 289, p. 206-224, 2014.

DENG, Shuo et al. Targeting Autophagy Using Natural Compounds for Cancer Prevention and Therapy. **Cancer**, v. 125, n. 8, p. 1228-1246, 2019.

DE QUEIROZ, Lucas Nicolau et al. New substances of *Equisetum hyemale* L. extracts and their in vivo antitumoral effect against oral squamous cell carcinoma. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 303, p. 116043, 2023.

DESMAYSON A, GUILLAUME L, TRICLIN S, WEISS P, DUCOMMUN B, LOBJOIS V. Impact of physical confinement on nuclei geometry and cell division dynamics in 3D spheroids. **Sci. Rep.**, 8, 8785, 2018.

DIPIRO, J. T. et al. Concepts in clinical pharmacokinetics. 5 ed. **Bethesda: American Society of Health-System Pharmacists, Inc.**, 250, 2010.

DONGLAI LV, ZONGTAO HU, LIN LU, HUSHENG LU, XIULI XU. Three-dimensional cell culture: A powerful tool in tumor research and drug discovery (Review). **Oncology Letters** 14: 6999-7010, 2017.

DURAND-HERRERA, D. et al. Wharton's jelly-derived mesenchymal cells as a new source for the generation of microtissues for tissue engineering applications. **Histochemistry and Cell Biology**, v. 150, p. 379-393, 2018.

DWIVEDI, PS, PATIL, R., KHANAL, P., GURAV, NS, MURADE, VD, HASE, DP, ... & GURAV, SS. Exploring the therapeutic mechanisms of *Cassia glauca* in diabetes

mellitus through network pharmacology, molecular docking and molecular dynamics. **RSC advances**, v. 11, n. 62, p. 39362-39375, 2021.

DUTTA S, SUSHWETA MAHALANOBISH, SUKANYA SAHA, SHATADAL GHOSH, PARAMES C. Sil, Natural products: An upcoming therapeutic approach to cancer, *Food and Chemical Toxicology*, V. 128, 240-255, 2019.

ELDER DE. Melanoma Progression. **Pathology**, 48, 2, 147-154, 2016.

EL-SAADY, MADISON WYNNE et al. Use of in-silico assays to characterize the ADMET profile and identify potential therapeutic targets of fusarochromanone, a novel anti-cancer agent. *In silico pharmacology*, v. 3, p. 1-20, 2015.

FAN, J.; LANNON, I. A. M. Pharmacokinetics. **Biochem Pharmacol**, v. 87, n. 1, p. 93-120, Jan. 2014.

FATIMAH, F., MARTHA, R. D., DANAR, D., ZUMMAH, A., ANGGRAINI, I. M. D., & KUSUMAWATI, A. Identification of anticancer potential compounds and its in silico prediction of the cytotoxic activity in majapahit (*Crescentia cujete* L.) stem bark. **AIP Conference Proceedings**, 2569, 1, 070005, 2023.

FAUBERT, B; LI, K. Y; CAI, L. et al. Lactate metabolism in human lung tumors. **Cell** 171, 358-371.e9, 2017.

FENNEMA E., RIVRON N., ROUWKEMA J., VAN BLITTERSWIJK C., DE BOER J. Spheroid culture as a tool for creating 3D complex tissues. **Trends in biotechnology** ; 31(2):108-15, 2013.

FERREIRA, P. G. et al. Detection of the antiviral activity of epicatechin isolated from *Salacia crassifolia* (Celastraceae) against Mayaro virus based on protein C homology modelling and virtual screening. **Archives of Virology**, 2018.

FILIMON A, PREDA I A, BOLOCA AF & NEGROIU G. Interleukin-8 in melanoma pathogenesis, prognosis and therapy—An integrated view into other neoplasms and chemokine networks. **Cells**, 11(1), 120, 2022.

FRANCHI-MENDES, Teresa et al. 3D cancer models: Depicting cellular crosstalk within the tumour microenvironment. **Cancers**, v. 13, n. 18, p. 4610, 2021.

FRIEDRICH J, EBNER R, KUNZ-SCHUGHART LA. Experimental anti-tumor therapy in 3-D: Spheroids – old hat or new challenge? **Int. J. Radiat. Biol.**, Vol. 83, N. 11 – 12, p. 849 – 871, 2007.

FRITSCH LG, PATIL S, BEESLEY LJ, VANDEHAAR P, SALVATORE M, MA Y, PENG RB, TALIUN D, ZHOU X, MUKHERJEE B. Cancer PRSweb: An Online Repository with Polygenic Risk Scores for Major Cancer Traits and Their Evaluation in Two Independent Biobanks, *The American Journal of Human Genetics*, 107, 5, 815-836, 2020.

FURUBAYASHI, Tomoyuki et al. Comparison of various cell lines and three-dimensional mucociliary tissue model systems to estimate drug permeability using an in vitro transport study to predict nasal drug absorption in rats. **Pharmaceutics**, v. 12, n. 1, p. 79, 2020.

GALI-MUHTASIB, H. et al. Cell death mechanisms of plant-derived anticancer drugs: Beyond apoptosis. **Apoptosis**, 2015.

GALÚCIO, JM et al. In silico identification of natural products with anticancer activity using a chemo-structural database of Brazilian biodiversity. **Computational biology and chemistry**, v. 83, p. 107102, 2019.

GIULIANO, Sandy et al. Advances in melanoma senescence and potential clinical application. **Pigment Cell & melanoma research**, v. 24, n. 2, p. 295-308, 2011.

GOMES, Diana et al. In silico approaches: A way to unveil novel therapeutic drugs for cervical cancer management. **Pharmaceutics**, v. 14, n. 8, p. 741, 2021.

GOMES-CARNEIRO, M. R.; RIBEIRO-PINTO, L. F. & PAUMGARTTEN, F. J. R. **Cad. Saúde Públ.**, Rio de Janeiro, 13(Supl. 1):27-38, 1997.

GORDON, R. Skin cancer: An overview of epidemiology and risk factors. **Seminars in Oncology Nursing**, v. 29, n. 3, p. 160–169, 2013.

GOWTHAMI, S.; RAJAGURU, Harikumar. Performance analysis of melanoma classifiers with CNN-based segmentation framework, AIP Conference Proceedings 2725, 020006, 2023.

GRAY-SCHOPFER, V.; WELLBROCK, C.; MARAIS, R. Melanoma biology and new targeted therapy. **Nature**, v. 445, n. 7130, p. 851–857, 2007.

GUNTI, S. et al. Organoid and spheroid tumor models: Techniques and applications. **Cancers**, v. 13, n. 4, p. 1-18, 2 fev. 2021.

HAJJ, R. et al. Combination of acamprosate and baclofen as a promising therapeutic approach for Parkinson's disease. **Scientific Reports**, v. 5, 2015.

HALGREN, Thomas A. et al. Glide: A new approach to fast, accurate seating and scoring. 2. Enrichment factors in database screening. **Journal of Medicinal Chemistry**, v. 47, no. 7, pg. 1750-1759, 2004.

HAN, Jianjun; ZHANG, Lu; GUO, Hui; et al. Glucose promotes cell proliferation, glucose uptake and invasion in endometrial cancer cells via AMPK/mTOR/S6 and MAPK signaling. **Gynecologic oncology**, v. 138, n. 3, p. 668–675, 2015.

HAN, Liang; MA, Qingyong; LI, Junhui; et al. High Glucose Promotes Pancreatic Cancer Cell Proliferation via the Induction of EGF Expression and Transactivation of EGFR. **PLoS ONE**, v. 6, n. 11, 2011.

HANAHAN, Douglas. Hallmarks of cancer: new dimensions. *Cancer discovery*, v. 12, n. 1, p. 31-46, 2022.

HASAN, Md Mahmudul et al. In silico molecular docking and ADME/T analysis of Quercetin compound with its evaluation of broad-spectrum therapeutic potential against particular diseases. **Informatics in Medicine Unlocked**, v. 29, p. 100894, 2022.

HEREDIA-MENDEZ, Alma Jaqueline; SÁNCHEZ-SÁNCHEZ, Gricelda; LÓPEZ-CAMARILLO, César. Reprogramming of the Genome-Wide DNA Methylation Landscape in Three-Dimensional Cancer Cell Cultures. **Cancers**, v. 15, n. 7, p. 1991, 2023.

HODIS, E., WATSON, I. R., KRYUKOV, G. V., AROLD, S. T., IMIELINSKI, M., THEURILLAT, J. P., CHIN, L. et al. A landscape of driver mutations in melanoma. *Cell*, 150(2), 251-263, 2012.

HONÓRIO KM, MODA, TL, ANDRICOPULO, AD. Pharmacokinetic properties and in silico ADME modeling in drug discovery. **Medicinal Chemistry**, 9(2), 163-176., 9 (2), 163-176, 2013.

HOU, T., & XU, X. Recent development and application of virtual screening in drug discovery: an overview. **Current pharmaceutical design** , 10 (9), 1011-1033, 2004.

HU, Jinwei et al. Thyroid carcinoma: phenotypic features, underlying biology and potential relevance for targeting therapy. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 22, n. 4, p. 1950, 2021.

HUANG, M. et al. Terpenoids: natural products for cancer therapy. **Expert Opinion on Investigational Drugs**, v. 21, n. 12, p. 1801–1818, 2012.

HUANG, Jiacheng et al. Extracellular matrix and its therapeutic potential for cancer treatment. **Signal Transduction and Targeted Therapy**, v. 6, n. 1, p. 153, 2021.

INDINI, ALICE, FRANCESCO GROSSI, MARIO MANDALÀ, DANIELA TAVERNA, AND VALENTINA AUDRITO. "Metabolic Interplay between the Immune System and Melanoma Cells: Therapeutic Implications" **Biomedicines** 9, no. 6: 607, 2021.

INCA (ED.). Estimativa 2022: incidência de câncer no Brasil / Instituto Nacional de Câncer José Alencar Gomes da Silva. Rio de Janeiro: [s.n.]. 2022.

INCA, Instituto Nacional de Câncer (Brasil). Relatório de gestão INCA 2022 / Instituto Nacional de Câncer. – Rio de Janeiro : INCA, 2023.

INDRAYANTO, Gunawan; PUTRA, Galih Satrio; SUHUD, Farida. Validation of in-vitro bioassay methods: Application in herbal drug research. **Profiles of Drug Substances, Excipients and Related Methodology**, v. 46, p. 273-307, 2021.

INTLEKOFER, Andrew M.; FINLEY, Lydia WS. Metabolic signatures of cancer cells and stem cells. **Nature metabolism**, v. 1, n. 2, p. 177-188, 2019.

ITO, Ayaka et al. Elevation of chemosensitivity of lung adenocarcinoma A549 spheroid cells by Claudin-2 knockdown through activation of glucose transport and inhibition of Nrf2 signal. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 22, n. 12, p. 6582, 2021.

JANUŠKEVIČIENĖ, Indrė; PETRIKAITĖ, Vilma. Heterogeneity of breast cancer: The importance of interaction between different tumor cell populations. **Life sciences**, v. 239, p. 117009, 2019.

Jensen C & Teng Y. Is It Time to Start Transitioning From 2D to 3D Cell Culture? **Frontiers in Molecular Biosciences**, 7, 33, 2020.

JENSEN C; SHAY C; TENG Y. The new frontier of three-dimensional culture models to scale-up cancer research. **Physical Exercise and Natural and Synthetic Products in Health and Disease**, p. 3-18, 2022.

JIN, Lin; ZHOU, Yanhong. Crucial role of the pentose phosphate pathway in malignant tumors (Review). **Oncology Letters**, 2019.

JUBELIN, Camille et al. Three-dimensional in vitro culture models in oncology research. **Cell & Bioscience**, v. 12, n. 1, p. 155, 2022.

KAMATAR, Advika; GUNAY, Gokhan; ACAR, Handan. Natural and synthetic biomaterials for engineering multicellular tumor spheroids. **Polymers**, v. 12, n. 11, p. 2506, 2020.

KATSIKA, T., SPYROULIAS, GA, PATRINOS, GP, & MATSOUKAS, MT. Computational approaches in target identification and drug Discovery. **Jornal de biotecnologia computacional e estrutural**, 14, 177-184, 2016.

KHAZIR, J. et al. Role of plants in anticancer drug discovery. **Phytochemistry Letters**, 2014.

KELM JM, TIMMINS NE, BROWN CJ, FUSSENEGGER M, NIELSEN LK. Method for generation of homogeneous multicellular tumor spheroids applicable to a wide variety of cell types. **Biotechnol Bioeng**, 83(2):173–80, 2003.

KHAN S, BHARDWAJ T, SOMVANSI P, MANDAL RK, DAR SA, JAWED A, HAQUE S. Inhibition of C298S mutant of human aldose reductase for antidiabetic applications: Evidence from in silico elementary mode analysis of biological network model. **Journal of cellular Biochemistry**, v. 119, n. 8, p. 6961-6973, 2018.

KIM, S. Y. Cancer Energy Metabolism: Shutting Power off Cancer Factory. **Biomol Ther** 26(1), 39-44, 2018.

Kim TY, Kofron CM, King ME, Markes AR, Okundaye AO, Qu Z, et al. Directed fusion of cardiac spheroids into larger heterocellular microtissues enables investigation of cardiac action potential propagation via cardiac fibroblasts. *Plos One* 13(5), 2018.

KIM, Y. et al. Celastrol inhibits breast cancer cell invasion via suppression of NF- $\kappa$ B - mediated matrix metalloproteinase-9 expression. **Cell Physiol Biochem**, v. 701, p. 175–184, 2011.

KLIMKIEWICZ K, WEGLARCZYK K, COLLET G, PAPROCKA M, GUICHARD A, SARNA M, JOZKOWICZ A, DULAK J, SARNA T, GRILLON C, KIEDA C. A 3D model of tumour angiogenic microenvironment to monitor hypoxia effects on cell interactions and cancer stem cell selection, **Cancer Letters** v. 396, n. 28, p. 10-20, 2017.

KLOSE, Katharina et al. Metformin and sodium dichloroacetate effects on proliferation, apoptosis, and metabolic activity tested alone and in combination in a canine prostate and a bladder cancer cell line. **PLoS One**, v. 16, n. 9, p. e0257403, 2021.

KOZAL, Karolina; JÓZWIAK, Paweł; KRZEŚLAK, Anna. Contemporary perspectives on the Warburg effect inhibition in cancer therapy. **Cancer Control**, v. 28, p. 10732748211041243, 2021.

KUMAR N, TOMAR R, PANDEY A, TOMAR V, SINGH VK, CHANDRA R (2018) Preclinical evaluation and molecular docking of 1,3-benzodioxole propargyl ether derivatives as novel inhibitor for combating the histone deacetylase enzyme in cancer, **Artificial Cells, Nanomedicine, and Biotechnology**, 46:6, 1288-1299, 2018.

LAFFIN B, & PETRASH JM. Expression of the aldo-ketoreductases AKR1B1 and AKR1B10 in human cancers. **Frontiers in pharmacology**, 3, 104, 2012.

LAMICHHANE SP, ARYA N, KOHLER E, XIANG S, CHRISTENSEN J, SHASTRI VP. Recapitulating epithelial tumor microenvironment in vitro using three dimensional tri-culture of human epithelial, endothelial, and mesenchymal cells, **BMC Cancer**, 16:581, 2016.

Landi-Librandi, A.P., Caleiro Seixas Azzolini, A.E., De Oliveira, C.A., Lucisano-Valim, Y.M. Inhibitory activity of liposomal flavonoids during oxidative metabolism of human neutrophils upon stimulation with immune complexes and phorbol ester. **Drug Deliv**. 19, 177–187, 2012.

LANKATILLAKE, Chintha; HUYNH, Tien; DIAS, Daniel A. Understanding glycaemic control and current approaches for screening antidiabetic natural products from evidence-based medicinal plants. **Plant Methods**, v. 15, n. 1, p. 1-35, 2019.

LAXMIKESHAV, K., SHARMA, P., PALEPU, M., SHARMA, P., MAHALE, A., GEORGE, J., ... & SHANKARAIHAH, N. Benzimidazole based bis-carboxamide derivatives as promising cytotoxic agents: Design, synthesis, in silico and tubulin polymerization inhibition. **Journal of Molecular Structure**, 1271, 134078, 2023.

LEE, SH, SHIM, KY, KIM, B., & SUNG, JH. Hydrogel-based three-dimensional cell culture for organ-on-a-chip applications. **Biotechnology progress**, v. 33, n. 3, p. 580-589, 2017.

LEE, S. K. et al. Inhibitory effect of obovatal on the migration and invasion of HT1080 cells via the inhibition of MMP-2. **Bioorganic and Medicinal Chemistry**, v. 15, n. 12, p. 4085–4090, 2007.

LEE, Yunho; VON GUNTEN, Urs. Quantitative structure–activity relationships (QSARs) for the transformation of organic micropollutants during oxidative water treatment. **water research**, v. 46, n. 19, p. 6177-6195, 2012.

LEÓN-ANNICCHIARICO, Clara Lucía; RAMÍREZ-PEINADO, Silvia; DOMÍNGUEZ-VILLANUEVA, Dídac; et al. ATF4 mediates necrosis induced by glucose deprivation and apoptosis induced by 2-deoxyglucose in the same cells. **The FEBS journal**, v. 282, n. 18, p. 3647–3658, 2015.

LIBERTI, M; LOCASALE, J. The Warburg effect: Hoe does it benefit cancer cells?. **Trends Biochem**, 2016.

LIN, RZ E CHANG, HY. Recent advances in three-dimensional multicellular spheroid culture for biomedical research.. **Biotechnology Journal: Healthcare Nutrition Technology**, 3 (9-10), 1172-1184, 2008.

LOWMAN, Xazmin H.; MCDONNELL, Maureen A.; KOSLOSKE, Ashley; et al. The proapoptotic function of Noxa in human leukemia cells is regulated by the kinase Cdk5 and by glucose. **Molecular Cell**, v. 40, n. 5, p. 823–833, 2010.

LUNT, SOPHIA Y.; VANDER HEIDEN, MATTHEW G. Aerobic Glycolysis: Meeting the Metabolic Requirements of Cell Proliferation. *Annual Review of Cell and Developmental Biology*, v. 27, n. 1, p. 441–464, 2011.

LYNE, PD. Structure-based virtual screening: an overview. **Drug discovery today**, 7 (20), 1047-1055, 2002.

MA, Y., HU, L., TANG, J., GUO, W., FENG, Y., LIU, Y., & TANG, F. Three-Dimensional Cell Co-Culture Liver Models and Their Applications in Pharmaceutical Research. **International Journal of Molecular Sciences**, 24 (7), 6248, 2023.

MAHAPATRA, SR, DEY, J., RAJ, TK, KUMAR, V., GHOSH, M., VERMA, KK, KAUR T, KESAWAT MS, MISRA N, SUAR, M. MAHAPATRA, Soumya Ranjan et al. The potential of plant-derived secondary metabolites as novel drug candidates against *Klebsiella pneumoniae*: Molecular docking and simulation investigation. **South African Journal of Botany**, 149 , 789-797, 2022.

MAGALHÃES, LG, FERREIRA, LL, & ANDRICOPULO, AD. Recent Advances and Perspectives in Cancer Drug Design. **An Acad Bras Ciênc**, 90 , 1233-1250, 2018.

MAZZOCCHI, Andrea; SOKER, Shay; SKARDAL, Aleksander. 3D bioprinting for high-throughput screening: Drug screening, disease modeling, and precision medicine applications. **Applied Physics Reviews**, v. 6, n. 1, 2019.

MCCLELAND ML, ADLER AS, DEMING L, COSINO E, LEE L, BLACKWOOD EM, SOLON M, TAO J, LI L, SHAMES D, JACKSON E, FORREST WF, FIRESTEIN R.

Lactate dehydrogenase B is required for the growth of KRAS-dependent lung adenocarcinomas. **Clin Cancer Res.**15;19(4):773-84, 2013.

MEHTA, G. et al. Opportunities and challenges for use of tumor spheroids as models to test drug delivery and efficacy. **Journal of Controlled Release**, v. 164, n. 2, p. 192–204, 10 dez. 2012.

MENEZES, AC, CARVALHEIRO, M., DE OLIVEIRA, JMPF, ASCENSO, A., & OLIVEIRA, H. Cytotoxic effect of the serotonergic drug 1-(1-Naphthyl) piperazine against melanoma cells. **Toxicology in Vitro**, 47 , 72-78, 2018.

MENEZES, M. E., TALUKDAR, S., WECHMAN, S. L., DAS, S. K., EMDAD, L., SARKAR, D., & FISHER, P. B. Prospects of gene therapy to treat melanoma. **Advances in cancer research**, 138, 213-237, 2018.

MISHRA, Deepshikha; BANERJEE, Debabrata. Lactate dehydrogenases as metabolic links between tumor and stroma in the tumor microenvironment. **Cancers**, v. 11, n. 6, p. 750, 2019.

MITRAKAS AG, TSOLOU A, DIDASKALOU S, KARKALETSOU L, EFSTATHIOU C, EFTALITSIDIS E, KOFFA, M. Applications and Advances of Spheroids from Multicellular Tumors: Challenges in Its Development and Analysis. **International Journal of Molecular Sciences**, 24 (8), 6949, 2023.

MUSINI, A.; RAO, J. P.; GIRI, A. Phytochemicals of Salacia oblonga responsible for free radical scavenging and antiproliferative activity against breast cancer cell lines (MDA-MB-231). **Physiology and Molecular Biology of Plants**, v. 21, n. 4, p. 583–590, 2015.

NAGELKERKE A, BUSSINK J, SWEEP FCGJ, SPAN PN. Generation of multicellular tumor spheroids of breast cancer cells: How to go three-dimensional, **Analytical Biochemistry** 437, 17–19. 2013.

NAIK, Piyu Parth. Cutaneous malignant melanoma: A review of early diagnosis and management. **World journal of oncology**, v. 12, n. 1, p. 7, 2021.

NEGRI, Laisa Bonafim et al. Photobiomodulation combined with photodynamic therapy using ruthenium phthalocyanine complexes in A375 melanoma cells: Effects of nitric oxide generation and ATP production. **Journal of Photochemistry and Photobiology B: Biology**, v. 198, p. 111564, 2019.

NEWMAN, DJ; CRAGG, GM. Natural products as sources of new drugs over the last 25 years. **Journal of natural products**, v. 70, n. 3, p. 461-477, 2007.

NEWMAN, D. J.; CRAGG, G. M. Natural Products as Sources of New Drugs over the Nearly Four Decades from 01/1981 to 09/2019. **Journal of Natural Products**, v. 83, n. 3, p. 770-803, 27 mar. 2020.

OLIVERI, Valentina. Selective targeting of cancer cells by copper ionophores: an overview. **Frontiers in molecular biosciences**, v. 9, 2022.

PALMIERI, Giuseppe et al. Main roads to melanoma. **Journal of translational medicine**, v. 7, n. 1, p. 1-17, 2009.

PAGNOTTA, G., KALIA, S., DI LISA, L., CICERO, AF, BORGHI, C., & FOCARETE, ML. Progress towards 3D bioprinting of tissue models for advanced drug screening: in vitro assessment of drug toxicity and metabolism. **Bioprinting**, e00218, 2022.

PAK, BRIAN J. et al. Radiation resistance of human melanoma analysed by retroviral insertional mutagenesis reveals a possible role for dopachrome tautomerase. **Oncogene**, v. 23, n. 1, p. 30-38, 2004.

PARK, JY, CHOI, HJ, PARK, T., LEE, MJ, LIM, HS, YANG, WS, KIM, CH. Inhibitory effect of avenanthramides (Avn) on tyrosinase activity and melanogenesis in  $\alpha$ -MSH activated SK-MEL-2 cells: in vitro and in silico analysis. **International Journal of Molecular Sciences**, 22 (15), 7814, 2021.

PATRA, Bishnubrata et al. Carboplatin sensitivity in epithelial ovarian cancer cell lines: The impact of model systems. **PLoS One**, v. 15, n. 12, p. e0244549, 2020.

PINTO, Bárbara et al. Three-dimensional spheroids as in vitro preclinical models for cancer research. **Pharmaceutics**, v. 12, n. 12, p. 1186, 2020.

PIRES DE, BLUNDELL TL, ASCHER DB. pkCSM: predicting small-molecule pharmacokinetic and toxicity properties using graph-based signatures. **J. Med. Chem.** v. 58, p. 4066–4072, 2015.

PLISZKA, Monika; SZABLEWSKI, Leszek. Glucose transporters as a target for anticancer therapy. **Cancers**, v. 13, n. 16, p. 4184, 2021.

PONTI, GIOVANNI et al. BRAF, NRAS and C-KIT advanced melanoma: clinico-pathological features, targeted-therapy strategies and survival. **Anticancer research**, v. 37, n. 12, p. 7043-7048, 2017.

POPE, Evans D.; KIMBROUGH, Erinmarie O.; VEMIREDDY, Lalitha Padmanabha; et al. Aberrant lipid metabolism as a therapeutic target in liver cancer. **Expert Opinion on Therapeutic Targets**, v. 23, n. 6, p. 473–483, 2019.

OPREAN, C. et al. Selective in vitro anti-melanoma activity of ursolic and oleanolic acids. **Toxicology Mechanisms and Methods**, v. 28, n. 2, p. 148–156, 2018.

PATEL, AR, PATEL, HB, MODY, SK, SINGH, RD, SARVAIYA, VN, VAGHELA, SH E TUKRA, S. Triagem virtual na descoberta de medicamentos. **Journal Of Veterinary Pharmacology And Toxicology**, 20 (2), 1-9, 2021.

PAUL, SUMANA; GHOSH, SAIKAT; KUMAR, SUSHIL. Tumor glycolysis, an essential sweet tooth of tumor cells. In: **Seminars in Cancer Biology**. Academic Press, 2022.

PAVLOVA, NN, ZHU, J., & THOMPSON, CB. The hallmarks of cancer metabolism: Still emerging. **Cell Metabolism**, 34, 1, 2022.

PÉREZ-TOMÁS R, PÉREZ-GUILLÉN I. Lactate in the Tumor Microenvironment: An Essential Molecule in Cancer Progression and Treatment. **Cancers (Basel)**, 3;12(11):3244, 2020.

RATHORE, Rahul S.; R AYYANNAN, Senthil; MAHTO, Sanjeev K. Emerging three-dimensional neuronal culture assays for neurotherapeutics drug discovery. **Expert Opinion on Drug Discovery**, v. 17, n. 6, p. 619-628, 2022.

RIBEIRO, Nádia et al. Liposomal Formulations of a New Zinc (II) Complex Exhibiting High Therapeutic Potential in a Murine Colon Cancer Model. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 23, n. 12, p. 6728, 2022.

SAHAYAM S, C.; BRINDHA, P.; LOGAMANIAN, M. Antioxidant and anti diabetic potentials of salacia species. **International Journal of Pharmacy and Pharmaceutical Sciences**, v. 6, n. SUPPL 1, p. 85–87, 2014.

SALEHI, Bahare et al. Therapeutic Potential of Quercetin: New Insights and Perspectives for Human Health. **ACS Omega**, v. 5, n. 20, p. 11849-11872, 2020.

SAMPATH, S. et al. Evaluation of in vitro anticancer activity of 1,8-Cineole–containing n-hexane extract of *Callistemon citrinus* (Curtis) Skeels plant and its apoptotic potential. **Biomedicine and Pharmacotherapy**, v. 93, p. 296–307, 2017.

SCHINDELIN, Johannes et al. Fiji: an open-source platform for biological-image analysis. **Nature methods**, v. 9, n. 7, p. 676-682, 2012.

SECA, A.; PINTO, D. Plant Secondary Metabolites as Anticancer Agents: Successes in Clinical Trials and Therapeutic Application. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 19, n. 1, p. 263, 2018.

SEGUIN, L.; et al. Integrins and câncer: regulators of câncer stemness, metastasis, and drug resistance. **University of California San Diego**, 2015.

SEMLALI, Abdelhabib et al. The curcumin analog (PAC) suppressed cell survival and induced apoptosis and autophagy in oral cancer cells. **Scientific Reports**, v. 11, n. 1, p. 1-15, 2021.

SHIMADA, T. et al. *Salacia reticulata* has therapeutic effects on obesity. **Journal of Natural Medicines**, v. 68, n. 4, p. 668–676, 2014.

STOHS, S. J.; RAY, S. Anti-diabetic and Anti-hyperlipidemic Effects and Safety of *Salacia reticulata* and Related Species. **Phytotherapy Research**, v. 29, n. 7, p. 986–995, 2015.

THOMA, CR, ZIMMERMANN, M., AGARKOVA, I., KELM, JM E KREK, W. 3D cell culture systems modeling tumor growth determinants in cancer target discovery. **Advanced drug delivery reviews**, 69, 29-41, 2014.

THOMPSON JF, SCOLYER RA, KEFFORD RF. Cutaneous melanoma. **Lancet** 365(9460), 687-701, 2005.

TIWARI, Anshul; SINGH, Sakshi. Computational approaches in drug designing. In: *Bioinformatics*. **Academic Press**, p. 207-217., 2022.

TSAO H, ATKINS MB, SOBER AJ: Management of cutaneous melanoma. **N Engl J Med** 351(10), 998-1012, 2004.

RALPH, A. C. L., CALCAGNO, D. Q., DA SILVA SOUZA, L. G., DE LEMOS, T. L. G., MONTENEGRO, R. C., DE ARRUDA CARDOSO SMITH, M., & DE VASCONCELLOS, M. C. Biflorin induces cytotoxicity by DNA interaction in genetically different human melanoma cell lines. **Toxicology in Vitro**, 34, 237–245, 2016.

REN Yi; SHEN Han-Ming. Critical role of AMPK in redox regulation under glucose starvation. *Redox biology*, v. 25, p. 101154, 2019.

ROCHA-BRITO, KARIN J. P., CLERICI, STEFANO PIATTO, CORDEIRO, HELON GUIMARÃES, SCOTÁ FERREIRA, AMANDA PETRINA, BARRETO FONSECA, EMANUELLA MARIA, GONÇALVES, PAOLA R., ABRANTES, JÚLIA LAURA F., MILANI, RENATO, MASSARO, RENATO RAMOS, MARIA-ENGLER, SILVYA STUCHI AND FERREIRA-HALDER, CARMEN V. "Quercetin increases mitochondrial proteins (VDAC and SDH) and downmodulates AXL and PIM-1 tyrosine kinase receptors in NRAS melanoma cells" **Biological Chemistry**, vol. 403, no. 3, pp. 293-303, 2022.

RODRIGUES ACBDC, DE OLIVEIRA FP, DIAS RB, SALES CB, ROCHA CA, SOARES MB, COSTA EV, DA SILVA FMA, ROCHA WC, KOOLEN HHF, BEZERRA DP. In vitro and in vivo anti-leukemia activity of the stem bark of *Salacia impressifolia* (Miers) AC Smith (Celastraceae). **Journal of ethnopharmacology** 231, 516-524, 2019.

RUIZ, Francesc X. et al. Structural basis for the inhibition of AKR1B10 by the C3 brominated TTNPB derivative UVI2008. **Chemico-Biological Interactions**, v. 276, p. 174-181, 2017.

RUIZ-GARCIA, A. et al. Pharmacokinetics in drug discovery. *J Pharma Sci*, v. 97, n. 8, p. 654-90, Mar. 2007.

SALMINEN, A. et al. Terpenoids: Natural inhibitors of NF-Kappa $\beta$  signaling with anti-inflammatory and anticancer potential. **Cellular and Molecular Life Sciences**, 2008.

SAMPATH, S. et al. Evaluation of in vitro anticancer activity of 1,8-Cineole-containing n-hexane extract of *Callistemon citrinus* (Curtis) Skeels plant and its apoptotic potential. **Biomedicine and Pharmacotherapy**, v. 93, p. 296–307, 2017.

SANT S, PAUL A. JOHNSTON PA. The Production of 3D Tumor Spheroids for Cancer Drug Discovery, **Drug Discov Today Technol.**, 23: 27-36, 2018.

SARKER, SD et al. Chapter Two - Anticancer natural products, **Annual reports in medicinal chemistry**, v. 55, p. 45-75, 2020.

SCHADUANGRAT, N., LAMPA, S., SIMEON, S., GLEESON, MP, SPJUTH, O., & NANTASENAMAT, C. Rumo à descoberta computacional reprodutível de medicamentos. **Journal of cheminformatics** , 12 , 1-30, 2020.

SCHNEIDER, G. Automating drug discovery. **Nature reviews drug discovery**, 17 (2), 97-113, 2018.

SHAH, UK. et al. Novel anticancer agents from plant sources. **Chinese Journal of Natural Medicines**, v. 11, n. 1, p. 16–23, 2013.

SHAN, X. et al. Ferroptosis-driven nanotherapeutics for cancer treatment. **Journal of Controlled Release**, 2020.

SHARMA, Dolly; SINGH, Mamta; RANI, Reshma. Role of LDH in tumor glycolysis: Regulation of LDHA by small molecules for cancer therapeutics. In: **Seminars in Cancer Biology**. Academic Press, 2022.

SHAUKAT, U., AHMAD, S., WANG, M., KHAN, S. I., ALI, Z., TOUSIF, M. I., ... & MAHOMOODALLY, M. F. Phenolic contents, chemical profiling, in silico and in vitro anti-inflammatory and anticancer properties of *Alnus nitida* (Spach) Endl. **South African Journal of Botany**, 138, 148-155, 2021.

SHYAM, R., REDDY, LVK, & PALANIAPPAN, A. Técnicas de Fabricação e Caracterização de Modelos de Tecidos 3D In Vitro. **International Journal of Molecular Sciences**, 24 (3), 1912, 2023.

SHOVAL H, KARSCH-BLUMAN A, BRILL-KARNIELY Y<sup>1</sup>, STERN T, ZAMIR G, HUBERT A, BENNY O. Tumor cells and their crosstalk with endothelial cells in 3D spheroids, **Scientific Reports**, 7:10428, p. 1-11, 2017.

SIMÕES, M. C. F.; SOUSA, J. J. S.; PAIS, A. A. C. C. Skin cancer and new treatment perspectives: A review. **Cancer Letters**, v. 357, n. 1, p. 8–42, 2015.

SMALLEY KSM, LIONI M, NOMA K, HAASS NK, HERLYN M. In vitro three-dimensional tumor microenvironment models for anticancer drug discovery, **Expert Opin. Drug Discov.** 3(1), 2008.

SONVEAUX, P; VEGRAN, F; SCHROEDER, T; et al. Targeting lactate-fueled respiration selectively kills hypoxic tumor cells in mice. **J. Clin. Invest.** 118, 3930- 3942, 2008.

SORKIN BC, KUSZAK AJ, BLOSS G, FUKAGAWA NK, HOFFMAN FA, JAFARI M, BARRETT B, BROWN PN, BUSHMAN FD, CASPER SJ, CHILTON FH, COFFEY CS, FERRUZZI MG, HOPP DC, KIELY M, LAKENS D, MACMILLAN JB, MELTZER DO, PAHOR M, PAUL J, PRITCHETT-CORNING K, QUINNEY SK, REHERMANN B, SETCHELL KDR, SIPES NS, STEPHENS JM, TAYLOR DL,

TIRIAC H, WALTERS MA, XI D, ZAPPALÁ G, PAULI GF. Improving natural product research translation: From source to clinical trial. **Faseb j**, 34(1):41-65, 2020.

SUTHERLAND RM. Cell and environment interactions in tumor microregions: the multicell spheroid model, **Science**, v. 240 (4849), p. 177-184, 1988.

Strober, W. Trypan blue exclusion test of cell viability. *Curr Protoc Immunol Appendix 3, Appendix 3B*, 2001.

STUEVEN, N. A. et al. A novel stilbene-like compound that inhibits melanoma growth by regulating melanocyte differentiation and proliferation. **Toxicology and Applied Pharmacology**, 2017.

TAKAGI, A., WATANABE, M., ISHII, Y., MORITA, J., HIROKAWA, Y., MATSUZAKI, T., & SHIRAISHI, T. A formação de esferoides celulares tridimensionais fornece às células tumorais da próstata humanas características semelhantes a tecidos. *Anticancer research*, 27 (1A), 45-53, 2007.

TEVLEK, A., KECILI, S., OZCELIK, OS, KULAH, H., & TEKIN, HC. Spheroid Engineering in Microfluidic Devices. **Acs Ômega**, 8 (4), 3630-3649, 2023.

TOLIOS, Alexander et al. Computational approaches in cancer multidrug resistance research: Identification of potential biomarkers, drug targets and drug-target interactions. *Drug Resistance Updates*, v. 48, p. 100662, 2020.

TRIPATHI, A., & MISRA, K. Molecular Docking: A Structure-Based Approach to Drug Design. **JSM Chem**, 5 (2), 1042-1047, 2017.

TROTT, Oleg; OLSON, Arthur J. AutoDock Vina: improving the speed and accuracy of docking with a new scoring function, efficient optimization, and multithreading. *Journal of computational chemistry*, v. 31, n. 2, p. 455-461, 2010.

URBANCZYK, Max; LAYLAND, Shannon L.; SCHENKE-LAYLAND, Katja. The role of extracellular matrix in biomechanics and its impact on bioengineering of cells and 3D tissues. *Matrix Biology*, v. 85, p. 1-14, 2020.

VERJANS, E. T. et al. Three-dimensional cell culture models for anticancer drug screening: Worth the effort? **Journal of Cellular Physiology**, v. 233, n. 4, p. 2993–3003, 2018.

XIE, Ping; GUO, Si-Kao; CHEN, Hong. A generalized kinetic model for coupling between stepping and ATP hydrolysis of kinesin molecular motors. *International Journal of Molecular Sciences*, v. 20, n. 19, p. 4911, 2019.

XIE, Bailu; TEUSCH, Nicole; MRSNY, Randall. Comparison of two-and three-dimensional cancer models for assessing potential cancer therapeutics. In: **Biomaterials for Cancer Therapeutics**. Woodhead Publishing, p. 399-422, 2020.

XIE, L., XIE, L., KINNINGS, SLEBOURNE, PE. Novel computational approaches to polypharmacology as a means to define responses to individual drugs. **Annual review of pharmacology and toxicology**, v. 52, p. 361-379, 2012.

XINTAROPOULOU, Chrysi; WARD, Carol; WISE, Alan; et al. A comparative analysis of inhibitors of the glycolysis pathway in breast and ovarian cancer cell line models. **Oncotarget**, v. 6, n. 28, p. 25677–25695, 2015.

XU XM, FARACH-CARSON MC, JIA X. Three-dimensional in vitro tumor models for cancer research and drug evaluation, **Biotechnology Advances**, 32(7), 1256-1268, 2014.

WANG, Xiao-Tong et al. MUC1 immunohistochemical expression as a prognostic factor in gastric cancer: meta-analysis. *Disease markers*, v. 2016, 2016.

WANG, Z.; ZHAI, Z.; DU, X. Celastrol inhibits migration and invasion through blocking the NF- $\kappa$ B pathway in ovarian cancer cells. **Experimental and Therapeutic Medicine**, v. 14, n. 1, p. 819–824, 2017.

WANG, Zhefang et al. Targeting glutaminolysis: new perspectives to understand cancer development and novel strategies for potential target therapies. *Frontiers in oncology*, v. 10, p. 589508, 2020.

WANG, Zi-Hao et al. Lactate in the tumour microenvironment: From immune modulation to therapy. **EBioMedicine**, v. 73, p. 103627, 2021.

WANG, Zhe; LIU, Yang; NIU, Xing. Application of artificial intelligence for improving early detection and prediction of therapeutic outcomes for gastric cancer in the era of precision oncology. In: **Seminars in Cancer Biology**. Academic Press, 2023.

WARBURG, O. On the origin of cancer cells, **Science**, 1956.

Warburg, O. On respiratory impairment in cancer cells. **Science** 124, 269-270, 1956.

WEIGELT, B., GHAJAR, CME BISSELL, MJ. The need for complex 3D culture models to unravel novel pathways and identify accurate biomarkers in breast cancer. **Advanced drug delivery reviews**, v. 69, p. 42-51, 2014.

WHITEMAN DC, GREEN AC, OLSEN CM. The Growing Burden of Invasive Melanoma: Projections of Incidence Rates and Numbers of New Cases in Six Susceptible Populations through 2031. **J Invest Dermatol**, 136(6):1161-1171, 2016.

WHO report on cancer: setting priorities, investing wisely and providing care for all. **Geneva: World Health Organization**, 2020.

WU, F., ZHOU, Y., LI, L., SHEN, X., CHEN, G., WANG, X., HUANG, Z. Computational Approaches in Preclinical Studies on Drug Discovery and Development. **Frontiers in Chemistry** 8 , 726, 2020.

WU Y, WANG J, ZHAO J, ZHANG Y, SUN Y, CHEN J, WANG J. Gene regulation analysis of the effects of evodiamine on tongue squamous cell carcinoma. *Journal of Cell Biochem*, 120:15933-15940, 2019.

WU, S., ZHANG, K., LIANG, Y., WEI, Y., AN, J., WANG, Y., SHI, J. Tumor ativado por nano Exaustão energética sistemática via zinco (II) Nano-enabled tumor Systematic energy exhaustion via zinc (II) Interference mediated glycolysis inhibition and specific GLUT1 depletion. **Advanced Science**, v. 9, n. 7, p. 2103534, 2022.

YADAV, V.R., SUNG, B., PRASAD, S., KANNAPPAN, R., CHO, S.G., LIU, M., CHATURVEDI, M.M., AGGARWAL, B.B. Celastrol suppresses invasion of colon and pancreatic cancer cells through the downregulation of expression of CXCR4 chemokine receptor, **Celastrol Journal of Molecular Medicine**, v. 88, n. 12, p. 1243–1253, 2010.

YAO, Xuemei et al. Emerging roles of energy metabolism in ferroptosis regulation of tumor cells. *Advanced Science*, v. 8, n. 22, p. 2100997, 2021.

Yamamoto, N., Ueda-Wakagi, M., Sato, T., Kawasaki, K., Sawada, K., Kawabata, K., Akagawa, M., Ashida, H. Measurement of glucose uptake in cultured cells. *Curr. Protoc. Pharmacol.* 71, 1-26, 2015.

YAN, X. J. et al. Triterpenoids as reversal agents for anticancer drug resistance treatment. **Drug Discovery Today**, 2014

Yang H, Lou C, Sun L, Li J, Cai Y, Wang Z, Li W, Liu G, Tang Y. admetSAR 2.0: web-service for prediction and optimization of chemical ADMET properties. **Bioinformatics**, 15;35(6):1067-1069, 2019.

YIN, ZHONGPING; BAI, LING; LI, WEI; et al. Targeting T cell metabolism in the tumor microenvironment: an anti-cancer therapeutic strategy. **Journal of Experimental & Clinical Cancer Research**, v. 38, n. 1, p. 403, 2019.

Yonamine, C.Y., Pinheiro-Machado, E., Michalani, M.L., Freitas, H.S., Okamoto, M.M., Corrêa-Giannella, M.L., Machado, U.F. Resveratrol improves glycemic control in insulin-treated diabetic rats: participation of the hepatic territory. *Nutr. Metab. (Lond.)* 13, 44, 2016.

YOSHIDA, N. et al. Inhibitory effects of terpenoids on multidrug resistance-associated protein 2-and breast cancer resistance protein-mediated transport. **Drug Metabolism and Disposition**, v. 36, n. 7, p. 1206–1211, 2008.

ZACHARI MA, CHONDROU PS, POULILIOU SE, MITRAKAS AG, ABATZOGLOU I, CHRISTOS E, ZOIS CE, KOUKOURAKIS MI. Evaluation of the Alamarblue assay for adherent cell irradiation experiments. *Dose-Response* 12, 246–258, 2014.

ZAIDI, N; SWINNEN, J. V; SMANS, K. ATP-citrate lyase: a key player in cancer metabolism. **Cancer Res.** 72, 3709-3714, 2012.

ZANONI, Michele et al. Modeling neoplastic disease with spheroids and organoids. **Journal of hematology & oncology**, v. 13, n. 1, p. 1-15, 2020.

ZAREBKOHAN, Amir et al. 3D scaffold materials for skin cancer modeling. *Biomaterials for 3D Tumor Modeling*, pág. 305-328, 2020.

ZHOU Y et al. p53/Lactate dehydrogenase A axis negatively regulates aerobic glycolysis and tumor progression in breast cancer expressing wild-type p53. *Cancer science*, v. 110, n. 3, p. 939-949, 2019.

ZHUANG, Yongxian; CHAN, Daniel K.; HAUGRUD, Allison B.; et al. Mechanisms by Which Low Glucose Enhances the Cytotoxicity of Metformin to Cancer Cells Both In Vitro and In Vivo. *PLOS ONE*, v. 9, n. 9, p. e108444, 2014.

**APÉNDICE**

---

**Expressão de AKR1B10 e os efeitos citotóxicos da 22β-hidroxitengenona em carcinoma de células escamosas**  
**AKR1B10 expression and the cytotoxic effects of 22β-hydroxytyngenone in squamous cell carcinoma**

---

**Primeira Autoria****Krísicia Maria Albuquerque Parente**ORCID: <https://orcid.org/0009-0006-5582-5044>

Universidade Federal do Amazonas, Brasil

E-mail: [krisciaparente@gmail.com](mailto:krisciaparente@gmail.com)

CPF: 041.858.803-16

**Segunda Autoria****Leilane de Sousa Mendonça**ORCID: <https://orcid.org/0000-0001-7827-6056>

Universidade Federal do Amazonas, Brasil

E-mail: [leilane.bentes@gmail.com](mailto:leilane.bentes@gmail.com)

CPF: 000.697.512-77

**Terceira Autoria****Tallita Marques Machado**ORCID: <https://orcid.org/0000-0003-3452-5756>

Universidade Federal do Amazonas, Brasil

E-mail: [tallita.machado@yahoo.com.br](mailto:tallita.machado@yahoo.com.br)

CPF: 799.428.732-87

**Quarta Autoria****Élenn Suzany Pereira Aranha**ORCID: <https://orcid.org/0000-0002-8758-5464>

Universidade Federal do Amazonas, Brasil

E-mail: [elenn\\_suzany@yahoo.com.br](mailto:elenn_suzany@yahoo.com.br)

CPF: 892.373.582-53

**Quinta Autoria****Héctor Henrique Ferreira Koolen**ORCID: <https://orcid.org/0000-0002-0181-348X>

Universidade do Estado do Amazonas, Brasil

E-mail: [hectorkoolen@gmail.com](mailto:hectorkoolen@gmail.com)

CPF: 855.411.332-20

**Sexta Autoria****Raquel Carvalho Montenegro**ORCID: <https://orcid.org/0000-0002-3861-293X>

Universidade Federal do Ceará, Brasil

E-mail: [rcm.montenegro@gmail.com](mailto:rcm.montenegro@gmail.com)

CPF: 456.333.123-68

**Sétima Autoria – Autora Correspondente****Marne Carvalho de Vasconcellos**ORCID: <https://orcid.org/0000-0001-7785-4029>

Universidade Federal do Amazonas, Brasil

E-mail: [marne@ufam.edu.br](mailto:marne@ufam.edu.br)

CPF: 652.753.902-97

---

**RESUMO**

O câncer de língua provocado por carcinoma de células escamosas é um tipo de tumor de alta letalidade. Análises in silico demonstraram que genes como o AKR1B10 estão associados a mal prognóstico, portanto, substâncias inibidoras de AKR1B10 podem ser vantajosas. As espécies do gênero *Salacia* apresentam

potencial ação anticâncer, diante disto, o objetivo desse estudo foi avaliar a ação da 22 $\beta$ -hidroxitingenona (22-HTG) contra as células cancerosas da língua e sua capacidade de inibir a expressão de AKR1B10. A triagem virtual da 22-HTG apontou interação da 22-HTG com o gene AKR1B10. O ensaio Alamar blue avaliou o efeito citotóxico contra CAL-27, o valor de IC50 foi de 5,15, 3,01 e 1,69  $\mu$ M após 24, 48 e 72 h de incubação, respectivamente. Assim, 2,5 $\mu$ M de 22-HTG foi usada para avaliar alterações na morfologia celular. Após o tratamento de CAL-27 com 22-HTG, foi observado a redução ( $p < 0.05$ ) de células viáveis e o aumento ( $p < 0.05$ ) de células em apoptose. Os dados sugerem que a 22-HTG é possível inibidor do gene AKR1B10, servindo como agente terapêutico ou como um modelo para o desenvolvimento de novas estruturas químicas que sejam úteis no tratamento de câncer da cavidade oral.

**Palavras-chaves:** Anticâncer 1; Câncer de língua 2; Salácia 3.

---

### ABSTRACT

Tongue cancer caused by squamous cell carcinoma is a highly lethal type of tumor. In silico analyzes demonstrated that genes such as AKR1B10 are associated with poor prognosis, therefore, AKR1B10 inhibitory substances may be advantageous. Species of the genus Salacia have potential anticancer action, in view of this, the objective of this study was to evaluate the action of 22 $\beta$ -hydroxytingenone (22-HTG) against cancer cells of the tongue and its ability to inhibit the expression of AKR1B10. Virtual 22-HTG screening showed interaction between 22-HTG and the AKR1B10 gene. The Alamar blue assay evaluated the cytotoxic effect against CAL-27, the IC50 value was 5.15, 3.01 and 1.69  $\mu$ M after 24, 48 and 72 h of incubation, respectively. Thus, 2.5 $\mu$ M of 22-HTG was used to assess changes in cell morphology. After treatment of CAL-27 with 22-HTG, a reduction ( $p < 0.05$ ) of viable cells and an increase ( $p < 0.05$ ) of cells in apoptosis was observed. The data suggest that 22-HTG is a possible inhibitor of the AKR1B10 gene, serving as a therapeutic agent or as a model for the development of new chemical structures that are useful in the treatment of oral cavity cancer.

**Keywords:** Anticancer 1; Tongue cancer 2; Salacia 3

---

### INTRODUÇÃO

O câncer de língua corresponde ao oitavo tipo de câncer que mais surge no mundo, com incidência de 4% de todas as malignidades por ano (WARNAKULASURIYA, 2010). Causa 380.000 mortes a cada ano, acometendo cerca de 5,5 milhões de indivíduos (JANK et al., 2022). É o tipo mais comum de tumor maligno na região oral e maxilofacial, comumente provocado por carcinoma de células escamosas (CAMPBELL et al., 2018), podendo acarretar distúrbios da fala, deglutição e mastigação (GU, 2018).

O tratamento sistêmico com quimioterápico cisplatina é o tratamento de primeira escolha, visando a diminuição da massa tumoral e de metástases, bem como, preservar o órgão e conter a mortalidade, já que não há grande vantagem em realizar radioterapia e cirurgia. Contudo, nesse tipo de tumor apresenta grande resistência a quimioterapia (GU,

2018; WU, 2019), tornando-se necessário a busca por novo tratamento eficaz, de baixo custo e toxicidade contra essas células cancerígenas (WU, 2019).

Análises *in silico*, incluindo em linhagem de carcinoma de células escamosas de língua (CAL27) (CHANG et al., 2019; SHEVKAR et al., 2022; FANG et al., 2020) prevê alvos metabólicos que possam modular vias biológicas apontando genes presentes nas células (SORKIN et al., 2020; THOMFORD et al., 2018), como o AKR1B10, que é associado a mal prognóstico (LAFFIN, PETRASH 2012; KO et al., 2018; LIU et al., 2021).

A expressão do oncogene AKR1B10 está relacionada a eliminação de compostos químicos do organismo, o aumento da divisão celular, ao processo carcinogênico e a sua terapêutica (KO et al., 2018). Devido ao seu envolvimento no processo carcinogênico de tumores orais humanos, substâncias inibidoras de AKR1B10 podem ser vantajosas em ensaios contra esses cânceres, representando um novo alvo para suprir eventual lacuna que exista na terapia com quimioterápicos já existentes e base molecular teórica para o tratamento e prognóstico (CHANG et al., 2019; KO et al., 2018; LIU et al., 2021).

Nesse contexto, um caminho bastante explorado pela comunidade científica para evitar a progressão tumoral é a identificação e desenvolvimento de novos fármacos através das investigações de recursos naturais, e informações a cerca da cinética, dinâmica, biodisponibilidade e os parâmetros toxicológicos de seus constituintes químicos (SORKIN et al., 2020).

Espécies botânicas pertencentes ao gênero *Salacia* são conhecidas por apresentarem uma variedade de atividades biológicas, incluindo efeitos inibitórios em tumores, supressão da iniciação, promoção e metástases em vários tipos de câncer (KIM et al., 2011; WANG et al., 2016; YADAV et al., 2010), inibição de processos como angiogênese, inibição da proliferação e indução de morte celular (GALI-MUHTASIB et al., 2015). Esses efeitos são atribuídos a presença de constituintes químicos pertencentes a classe dos triterpenos quinonametídeos, a partir de extratos e frações da espécie *Salacia impressifolia* e atribuíram o efeito a presença de quinonametídeos, como tingenona, pristimerina e 22 $\beta$ -hidroxitingenona (22-HTG) (RODRIGUES, et al., 2019).

O efeito da 22-HTG em células tumorais já foi mencionado em outros estudos, como Cevaterem e colaboradores (2016), onde os autores descreveram a indução de apoptose em células de câncer de mama. Aranha e colaboradores, 2020, 2021 descreveram a redução da proliferação, migração e invasão celular, com mecanismo inibitório de metaloproteinases e da via MAPK em células de melanoma humano. Apesar

do conhecimento científico quanto ao potencial anticancer de 22-HTG, ainda não foi investigado o efeito dessa substância contra carcinoma de células escamosas (CAL27) e são ausentes na literatura parâmetros farmacocinéticos e toxicológicos para 22-HTG.

Dessa forma, o objetivo desse estudo é utilizar ferramentas in silico para descrever as propriedades farmacocinéticas e toxicológicas, assim como a identificação de alvos moleculares de 22 $\beta$ -hidroxitingenona e avaliar o efeito in vitro da substância em células de câncer de língua (CAL-27). Essas informações irão contribuir com novas perspectivas quanto ao uso de 22 $\beta$ -hidroxitingenona como droga anticâncer.

## MÉTODOS

### Triagem virtual

#### **Predição do alvo biológico e dos parâmetros moleculares, farmacocinéticos e toxicológicos**

A predição dos alvos biológicos para a 22-HTG foi realizada utilizando o software online SwissTargetPrediction® (<http://www.swisstargetprediction.ch/>) (GFELLER et al., 2014). Os parâmetros moleculares, farmacocinéticos e toxicológicos foram avaliados na plataforma online SwissADME® (<http://www.swissadme.ch/>) (DAINA, MICHIELIN, ZOETE, 2017) e admetSAR® (<http://lmm.d.ecust.edu.cn/admetSar2/>) (YANG et al., 2019) que empregam bancos de dados de compostos que já passaram por testes pré-clínicos in vitro e/ou in vivo associados à absorção, distribuição, metabolismo e excreção, sendo fundamentados por meio de comparação estrutural mistos e descrição de estrutura e atividade (*Quantitative structure-activity relationship*, QSAR) (LEE et al., 2004).

### Docking molecular

A análise de docking molecular foi realizada utilizando o software Autodock Vina® (TROTT; OLSON, 2010). Os alvos avaliados foram obtidos no formato (.pdb) do banco RCSB Protein Data Bank (PDB): AKR1B1 (PDB: 5OU0) e AKR1B10 (PDB: 1ZUA). Moléculas de água e outras moléculas usadas na cristalização de proteínas não necessárias para a atividade catalítica foram removidas utilizando o software Pymol©, e todos os ligantes foram preparados e a geometria, assim como a energia, foram minimizadas utilizando o campo de força molecular da Merck (MMFF94) por meio do programa ChemBioDraw©.

Durante a análise, os receptores foram mantidos rígidos e os ligantes foram flexíveis para girar e explorar as poses mais prováveis. As dimensões do grid box

adotadas durante a análise foram de  $8 \times 11 \times 9 \text{ \AA}$  e  $12 \times 20 \times 18 \text{ \AA}$ , com espaçamento de grade de  $1,0 \text{ \AA}$  para AKR1B1 e AKR1B10, respectivamente.

Os resultados foram visualizados no AutoDock Tools© e as interações foram avaliadas em termos de energia de afinidade de ligação (Kcal/mol), número de ligações de hidrogênio e outras interações formadas entre os resíduos do sítio ativo da macromolécula e o ligante. As imagens 2D e 3D dos resultados moleculares de acoplamento foram obtidas usando o software Discovery Studio Visualizer 4.0©.

### **Cultivo e cultura de células**

As células MRC5 (fibroblastos humanos), HACAT (queratinócitos humanos) e CAL27 (linhagem de carcinoma de células escamosas da língua) foram cultivadas em meio Dulbecco's Modified Eagle's Medium (DMEM) suplementado com 10% de soro fetal bovino, estreptomicina  $100 \mu\text{g/ml}$  e  $100 \text{ U/ml}$  penicilina, e incubado a  $37^\circ\text{C}$  com 5% de  $\text{CO}_2$  atmosfera.

### **Citotoxicidade usando o ensaio do Alamar Blue**

O ensaio de citotoxicidade foi realizado pelo método Alamar blue, utilizando sal sódico de resazurina (Sigma-Aldrich, EUA) conforme método descrito por AHMED et al. (1994). As células foram plaqueadas na concentração de  $0,5 \times 10^4$  células por poço em microplacas de 96 poços. Após 24 horas de incubação e adesão celular, as células foram tratadas com doxorrubicina e 22-HTG nas mesmas concentrações ( $10 \mu\text{M}$ ,  $8 \mu\text{M}$ ,  $6 \mu\text{M}$ ,  $4 \mu\text{M}$ ,  $2 \mu\text{M}$ ,  $1 \mu\text{M}$ ,  $0,5 \mu\text{M}$ ,  $0,0 \mu\text{M}$ ). O experimento foi conduzido em triplicata para cada período de tratamento. Como controle negativo foi utilizado o meio de cultura DMSO a 0,01%. Após o período de tratamento (24, 48 e 72h) foram adicionados  $10 \mu\text{L}$  de resazurina 0,4% (diluição 1:20).

O período de incubação padronizado para a linha celular utilizada foi de 3h, tempo necessário para a metabolização da resazurina. Após 3h de incubação, as microplacas foram analisadas usando o modo de fluorescência (filtro de troca de  $540\text{nm}$  e filtro de emissão de  $585\text{nm}$ ) no leitor de microplacas (DTX 800, Beckman Coulter, CA, EUA).

### **Análise da morfologia celular**

CAL27 ( $0,5 \times 10^5$  células/poço) foram semeadas em placa de 24 poços e após 24h foram tratadas com 22-HTG ( $2,5$  e  $5,0 \mu\text{M}$ ), durante 48 horas. Após o período, as células

foram coradas com um kit de corante panóptico rápido LaborClin® (MONSMANN, 1983).

As células foram analisadas e as alterações morfológicas no citoplasma e no núcleo foram fotografadas usando microscopia de luz (Nikon Eclipse).

### **Análise morfológica usando microscópio de fluorescência**

Células de carcinoma de células escamosas da língua (CAL27) foram tratadas com 22-HTG por 48h. Em seguida, as células foram sedimentadas e ressuspensas em 25 ml solução salina tamponada com fosfato (PBS). Depois disso, 1ml de solução aquosa de laranja de acridina/brometo de etídio (AO/EB, 100 mg/ml) foi adicionado e os tipos de células foram observadas sob um microscópio de fluorescência (Zeiss Microscopy) (RIBBLE, et al., 2005).

Trezentas células foram contadas por amostra e foram classificados da seguinte forma: células viáveis, células apoptóticas e células necróticas.

## **RESULTADOS**

### **Triagem virtual**

#### **Predição do alvo biológico e dos parâmetros moleculares, farmacocinéticos e toxicológicos.**

Os alvos biológicos de 22-HTG, definidos pela predição *in silico* estão demonstrados na tabela 1. Destaca-se a probabilidade elevada de interação com AKR1B10, alcançando 98%. Esse é um alvo molecular relevante, considerando o tipo celular estudado. Os demais alvos moleculares preditos para 22-HTG são HSF1, PTPN11, TLR9 e PTPN6, com probabilidade de interação de 58%.

**Tabela 1.** Predição *in silico* dos alvos farmacológicos da 22-HTG.

<b>Alvo</b>	<b>Código genético</b>	<b>Por homologia</b>	<b>Probabilidade (%)</b>
Família Aldo-ceto redutase 1 membro B10	AKR1B10	Sim	98
Família Aldo-ceto redutase 1 membro B15	AKR1B15	Sim	98
Aldose redutase	AKR1B1	Sim	98
Proteína 1 do fator de choque térmico	HSF1	Não	58
Receptor não tirosina-proteína fosfatase tipo 11	PTPN11	Não	58
Receptor tipo toll 9	TLR9	Não	58

Receptor não tirosina-proteína fosfatase tipo 6	PTPN6	Sim	58
Proteína não caracterizada	-	Sim	58

Fonte: Aatoria Própria (2023)

Considerando os parâmetros farmacocinéticos estabelecidos para a substância 22-HTG (Tabela 2), foram analisados a penetração na barreira hematoencefálica, taxa de absorção em células Caco-2, absorção intestinal humana, ligação às proteínas plasmáticas e inibição de enzimas da família CYP.

No estudo das propriedades farmacocinéticas, realizada através da triagem virtual SwissADME, identificou que a 22-HTG apresenta baixo potencial de penetração na barreira hematoencefálica (0,2598%). A absorção intestinal de 99,07% sugere que a mesma pode ser absorvida adequadamente através das células intestinais.

Os valores previstos para a permeabilidade da 22HTG na Caco-2 apresentam absorção moderada, 65,08nm/seg. E demonstram haver fortemente ligação as proteínas plasmáticas, com valor de 95,40% de ligação.

**Tabela 2.** Predição dos parâmetros farmacocinéticos in silico da 22-HTG

Parâmetros Avaliados	AdmetSAR	SwissADME
Penetração na barreira hematoencefálica	0,2598%	Não
Permeabilidade em Caco-2	65,08 nm/seg	-
Absorção intestinal	99,07%	Alta
Ligação as proteínas plasmáticas	95,40%	Sim
Inibidor da OATP1B1	Sim	-
Inibidor da OATP1B3	Sim	-
Inibidor da OCT2	Sim	-
Inibidor da BSEP	Sim	-
Inibidor da CYP2C19	Não	Não
Inibidor da CYP2C9	Não	Sim
Inibidor da CYP2D6	Não	Não
Inibidor da CYP3A4	Não	Sim
Substrato da CYP3A4	Sim	-

Substrato da CYP2C9	Não	-
Substrato da CYP2D6	Não	-

Fonte: Aatoria Própria (2023)

Análise de parâmetros toxicológicos in silico estão demonstrados na tabela 3. A 22-HTG não apresenta efeitos tóxicos indesejáveis, sendo sugerido como não mutagênico, corroborando com o parâmetro de carcinogenicidade que foi de baixa probabilidade. A toxicidade oral aguda foi III sugerindo que seja um composto considerado não tóxico em absorção oral.

**Tabela 3.** Predição dos parâmetros toxicológicos in silico da 22-HTG

<b>Perfil previsto ADMET - Classificação</b>	<b>Valor</b>	<b>Probabilidade</b>
Carcinogenicidade (binária)	-	1,0000
Carcinogenicidade (trinária)	Não obrigatório	0,6183
Mutagênese de ames	-	0,61
Hepatotoxicidade	-	0,7
Toxicidade Oral Aguda (c)	III	0,5297
Ligação de aromatase	+	0,7963

Fonte: Aatoria Própria (2023)

### Ancoragem molecular

A 22-HTG apresentou uma energia de afinidade semelhante ao ligante original da AKR1B10, porém não apresentou uma energia de afinidade favorável e nem perfil de complementariedade em relação ao AKR1B1 (RUIZ et al., 2015). Os resultados dos valores de energia de afinidade de ligação, tanto dos ligantes cocristalizados quanto da 22-HTG, estão dispostos na tabela 4.

**Tabela 4.** Energia de interação (Kcal/mol) entre compostos e enzimas avaliadas in silico.

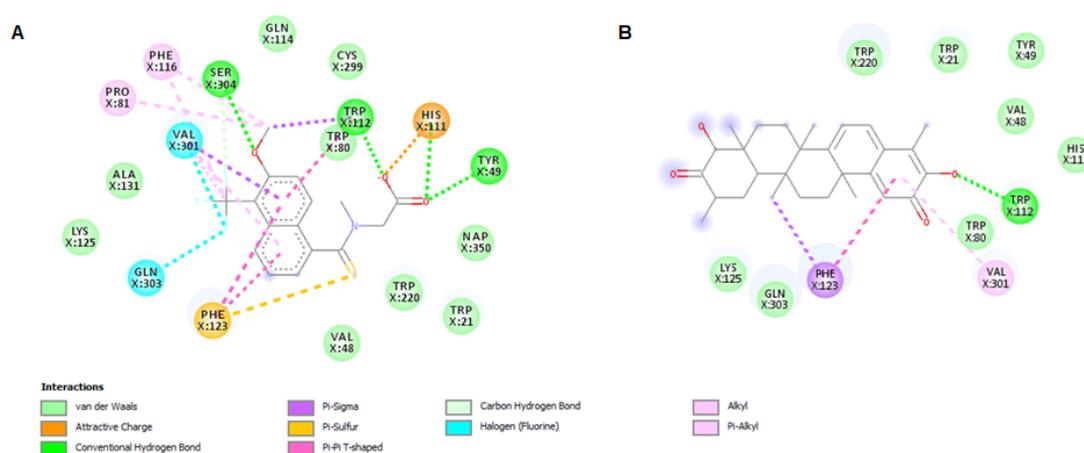
<b>Compostos</b>	<b>AKR1B1 (PDB 5OU0)</b>	<b>AKR1B10 (PDB 1ZUA)</b>
22-HTG	17,6	-9,4
2-[5-(4-chlorophenyl)-3-methyl-1-oxidanylidene-pyrimido[4,5-c]quinolin-2-yl]ethanoic acid	-9,5	-

Tolrestat	-	-9,4
-----------	---	------

Fonte: Aatoria Própria (2023)

Na análise da 22-HTG ancorada ao AKR1B10, observou-se uma ligação de hidrogênio com o resíduo de aminoácido triptofano-122, bem como interações hidrofóbicas com os aminoácidos triptofano-220, glutamina-303 e valina-301, comportamento similar ao observado com o Tolrestat, inibidor cocristalizado (Figura 1).

**Figura 1.** Posição de ancoragem 2D dos ligantes e suas interações de aminoácidos no sítio ativo. Estrutura cristalina de AKR1B10 (PDB: 1ZUA) em complexo com tolrestat (A) e 22-HTG (B).



Fonte: Aatoria Própria (2023)

### Citotoxicidade in vitro

Apesar de 22-HTG ter reduzido a viabilidade celular nas linhagens não neoplásicas MRC5 e HACAT, considerando o maior tempo de exposição avaliado (72h), o valor de CI50 na linhagem tumoral foi menor, destacando o potencial citotóxico de 22-HTG frente as células CAL27.

Para avaliar se a citotoxicidade de 22-HTG na linhagem CAL27 era tempo-dependente foram avaliados os tempos 24, 48 e 72h, com valores de CI50 5,15  $\mu$ M; 3,01  $\mu$ M e 1,69  $\mu$ M, respectivamente, evidenciando a maior sensibilidade de células CAL27 a 22-HTG em relação ao tempo. Partindo dessa análise, com base em valores de CI50 de 22-HTG após 48h de exposição nas três linhagens, foi definido o valor de 2,5 $\mu$ M de 22-HTG para os testes in vitro subsequentes.

Apesar de 22-HTG ter reduzido a viabilidade celular em MRC-5 e HACAT, os valores de CI50 foram maiores nesses linhagens quanto comparado a célula tumoral no tempo de 72h (1,92 para MRC5 e 3,75 para HACAT). A doxorrubicina, um medicamento quimioterápico anticâncer eficaz, exibiu maior citotoxicidade para células não cancerosas do que o 22-HTG, em MRC5 os valores de CI50 foram 3,903 $\mu$ M, 0,4323 $\mu$ M e 0,340 $\mu$ M tempos 24, 48 e 72h, e nos mesmos tempos em HACAT a doxorrubicina apresentou como resultado de CI50 0,314  $\mu$ M, 0,025 $\mu$ M, 0,049 $\mu$ M (Tabela 5).

**Tabela 5.** Valores de IC50 em células CAL27 após exposição a 22-HTG usando o ensaio Alamar blue. A doxorrubicina foi usada como controle positivo. Os dados são apresentados como metade do valor da concentração inibitória máxima (IC50) e intervalos de confiança de 95% (CI 95%) de três experiências independentes realizadas em triplicata.

	MRC5			HACAT			CAL27		
	24h	48h	72h	24h	48h	72h	24h	48h	72h
<b>22-HTG</b>	2,448 (2,1-2,8)	2,088 (1,9-2,3)	1,921 (1,8-2,1)	6,536 (0,5-8,8)	2,258 (1,8-2,8)	3,757 (3,6-3,9)	5,154 (4,4-5,9)	3,014 (2,8-3,3)	1,698 (1,5-1,9)
<b>DOX</b>	3,903 (3,2-4,8)	0,4323 (0,4-4,8)	0,34 (0,3-0,4)	0,3140 (0,3-0,4)	0,0257 (0,1-0,5)	0,0498 (0,01-0,05)	3,020 (2,1-4,3)	0,031 (0,01-0,05)	0,006 (0,002-0,02)

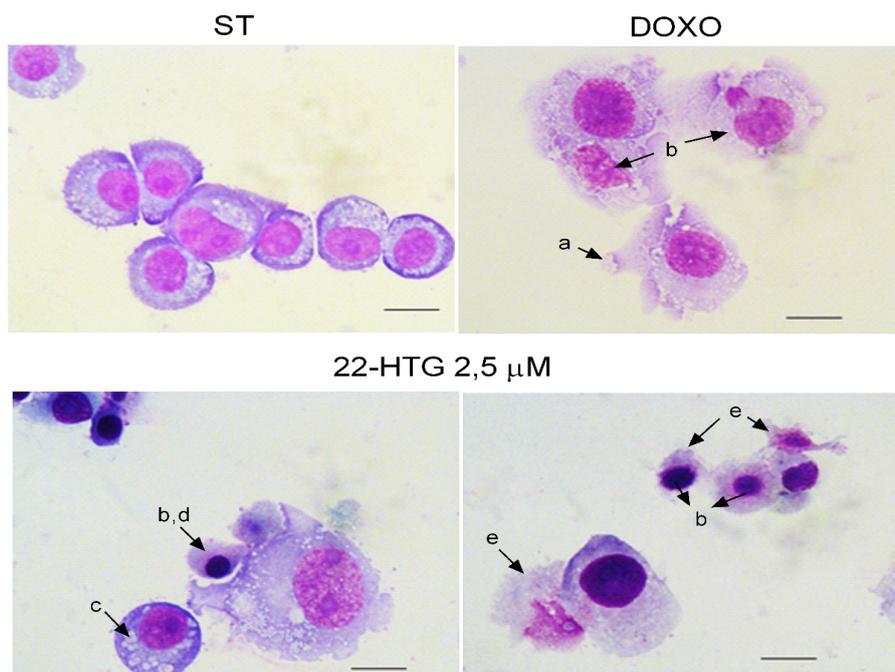
Fonte: Autoria Própria (2023)

### Morfologia celular

Os sinais de alterações morfológicas, inicialmente, foram avaliados por meio da análise da morfologia celular com coloração panótico. O tratamento com 22-HTG causou alterações na morfologia das células CAL27, apresentando limites celulares e nucleares irregulares, com condensação e encolhimento celular, incluindo no tamanho do núcleo (condensado e retraído). As irregularidades da membrana plasmática sugerem perda de sua integridade (fig. 2-A). O controle positivo doxorrubicina (5,0  $\mu$ M) mostra irregularidades da membrana plasmática e fragmentação nuclear. As alterações morfológicas descritas levam a hipótese de que 22-hidroxitingenona cause apoptose em células da linhagem CAL27.

**Figura 2.** Alterações morfológicas na linhagem de carcinoma de células escamosas (CAL27) após 48h de tratamento com 22-HTG 2,5  $\mu$ M. As letras indicam: a) Irregularidades da membrana plasmática (não tem a letra a indicada na 22-HTG); b) Condensação e/ou

fragmentação nuclear; c) Vacúolo intracelular; d) condensação celular; e) Perda da integridade da membrana plasmática. Escala 50  $\mu$ M; Aumento 100x.



Fonte: Autoria Própria (2023)

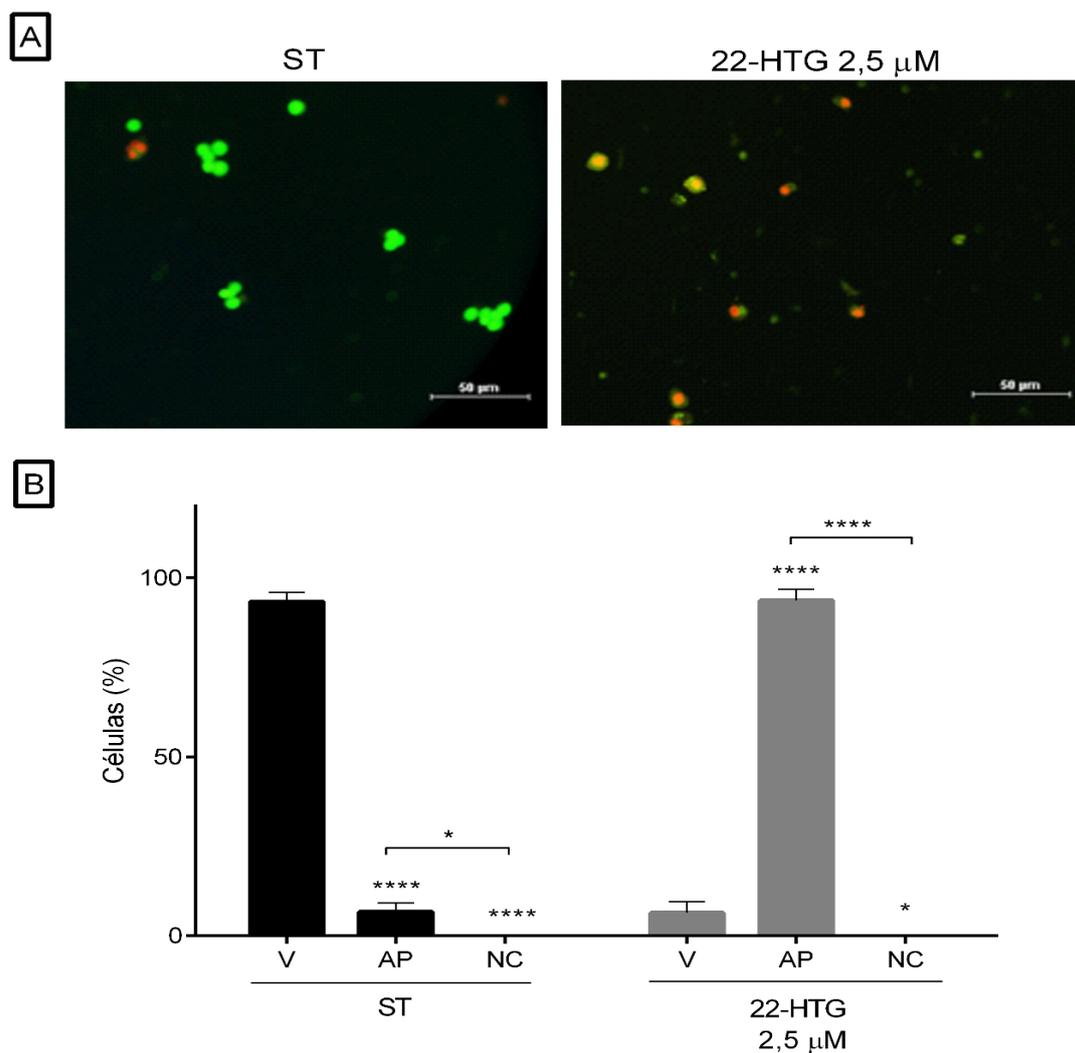
### **Análise do tipo de morte celular pelo ensaio de Acridina Orange e Brometo de Etídio**

Para ajudar a fundamentar o observado no teste de análise da morfologia celular foi utilizado o teste de coloração laranja de acridina e brometo de etídio (AO/EB).

Após o tratamento de células CAL-27 com 22-HTG, foi observado a redução ( $p < 0.05$ ) de células viáveis e o aumento ( $p < 0.05$ ) de células em apoptose (células com dupla marcação), em comparação com as células sem tratamento. (Fig. 2-B). Não ocorreu aumento de células em necrose.

**Figura 3.** Análise da diferenciação do tipo de morte celular das células de carcinoma de células escamosas (CAL27) após tratamento de 48 horas com a 22-HTG na concentração de 2,5  $\mu$ M. As células de CAL27 tratadas com a 22-HTG (2,5  $\mu$ M) após 48 horas de tratamento apresentaram tipo de morte celular por apoptose, identificados na imagem com dupla marcação de AO/BE.

AO: Acridina Orange; BE: Brometo de Etídio. Escala das imagens: 50  $\mu$ m.



Fonte: Autoria Própria (2023)

## DISCUSSÃO

Um potencial candidato a fármaco deve apresentar algumas características importantes, tais como: absorção oral, distribuição corporal, metabolismo, excreção, baixa toxicidade, além de sua atividade farmacológica. Assim, a triagem virtual torna-se uma importante ferramenta no desenvolvimento de medicamentos, permitindo auxiliar no entendimento desses parâmetros, bem como parâmetros para direcionar os processos de modificação molecular de novos compostos (NASTASÃ et al., 2019).

A triagem virtual mostrou ser uma ferramenta de grande utilidade para a descoberta de fármacos, podendo selecionar os perfis químicos mais promissores de candidatos a fármacos, antes da síntese em laboratório. Isso agrega valor ao processo de novas substâncias, tornando-o mais otimizado e direcionado, com uma redução

considerável do tempo de trabalho e um aumento notável na eficiência (NASTASÃ et al., 2019).

Substancias ativas oriundas de plantas podem ser candidatas potenciais no desenvolvimento de novos agentes terapêuticos (MAHNASHI et al., 2021), sendo utilizadas no desenvolvimento de fármacos ou como fonte de inspiração para moléculas inovadoras (MAYR et al., 2020).

Nesse estudo demonstramos os prováveis alvos moleculares de 22-HTG utilizando uma abordagem computacional, e observamos uma elevada probabilidade de interação com o AKR1B10. Alguns estudos demonstraram que AKR1B10 é um biomarcador importante na terapia anticancer, especialmente em cancer da cavidade oral (KO et al., 2018; FANG et al., 2020), e inibidores de AKR1B10 são considerados promissores para ensaios clínicos contra carcinomas de células escamosas orais (KO et al., 2018). Essas informacoes da literatura são consideradas relevantes e um fator positivo no que diz respeito a 22-HTG, uma vez que existe uma energia de ligação favorável com AKR1B10 na ancoragem molecular.

Na linhagem CAL-27, o gene AKR1B10 é considerado um biomarcador promissor para o prognóstico do carcinoma oral de células escamosas, uma vez que o **aumento da** expressão de AKR1B10 vem sendo correlacionado ao aumento do tamanho do tumor, invasão e recorrência da doença (KO et al., 2018). Esses autores mostraram que a marcação da AKR1B10 em células tumorais escamosas da cavidade oral de origem humana foi significativamente maior do que em células da mucosa oral normal.

O aumento da expressão de AKR1B10 está envolvido com eventos de proliferação celular e com o avanço do processo carcinogênico (CAO et al., 1998; HUANG et al., 2016; PENNING, 2015). Uma vez que AKR1B10 é um provável alvo de 22-HTG, acredita-se que a citotoxicidade da substância frente a células CAL-27, demonstrada através dos valores de CI50, pode estar relacionada com efeitos moleculares sobre esse gene.

Outros autores já demonstraram o efeito citototxico de 22-HTG contra diferentes linhagens celulares e propuseram a indução de apoptose como o mecanismo de morte celular (CEVATEMRE et al., 2016; ARANHA et al., 2021), o que também foi demonstrado no presente estudo para a linhagem CAL-27. Os autores Cevatemre et al. 2016; Aranha 2021 justificaram a indução de apoptose causada pela substancia 22-HTG devido a disfunção mitocondrial, sugerindo a indução de apoptose pela via intrínseca.

Inibidores do gene AKR1B10, incluindo produtos naturais e compostos sintéticos, tem sido investigados para o desenvolvimento de novas drogas anticancerígenas (HUANG et al., 2016). Por essa razão, destacamos o efeito biológico de 22-HTG contra células CAL-27 e seu provável efeito molecular sobre o gene AKR1B10. Além disso, no que diz respeito a desenvolvimento de novos candidatos a fármacos com efeito anticancer, o conhecimento sobre as propriedades farmacológicas e toxicológicas são essenciais para esse direcionamento. Nesse estudo, através da triagem virtual, demonstramos que a substância 22-HTG não apresenta efeitos carcinogênicos e/ou mutagênicos e os parâmetros farmacocinéticos são considerados positivos para o desenvolvimento de drogas com potencial anticâncer.

## CONCLUSÃO

A busca por novas substâncias de origem natural que possam reverter ou interferir no processo carcinogênico levou a identificação da substância 22-HTG. Demonstramos o efeito citotóxico de 22-HTG contra células CAL-27 e análise virtual mostrou afinidade da substância com o gene AKR1B10, sendo um provável alvo molecular de 22-HTG. Nossos resultados corroboram com as informações da literatura, uma vez que demonstramos que 22-HTG induziu apoptose em células CAL-27. Sendo assim, a substância 22-HTG pode ser considerada um potencial inibidor do gene AKR1B10, servindo como agente terapêutico ou como um modelo para o desenvolvimento de novas estruturas químicas que sejam úteis no tratamento de câncer da cavidade oral.

## REFERÊNCIAS

- AHMED SA, GOGAL RM, JR, WALSH JE. A new rapid and simple non-radioactive assay to monitor and determine the proliferation of lymphocytes: an alternative to [3H]thymidine incorporation assay. *J Immunol Methods* 1994;170:211–24. Disponível em: <https://www.sciencedirect.com/science/article/abs/pii/0022175994903964>
- ARANHA ESP, DA SILVA EL, MESQUITA FP, DE SOUSA LB, DA SILVA FMA, ROCHA WC, LIMA ES, KOOLEN HHF, DE MORAIS MEA, MONTENEGRO RC, de Vasconcellos, MC. 22 $\beta$ -hydroxytingenone reduces proliferation and invasion of human melanoma cells. *In Vitro Toxicology* 2020, 6 Disponível em: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0887233319307015>
- ARANHA, ESP, DE SOUSA PORTILHO AJ, DE SOUSA LB, DA SILVA EL, MESQUITA FP, ROCHA WC, DA SILVA FMA, LIMA ES, ALVES APNN, KOOLEN HHF, MONTENEGRO RC, DE VASCONCELLOS MC. 22 $\beta$ -hydroxytingenone induces apoptosis and suppresses invasiveness of melanoma cells by inhibiting MMP-9 activity and MAPK signaling. *Journal of Ethnopharmacology* 2021, 267, 113605. Disponível em: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0378874120334930>

- CAMPBELL BR, NETTERVILLE JL, SINARD RJ, MANNION K, ROHDE SL, LANGERMAN A, ET AL. Early onset oral tongue cancer in the United States: A literature review. *Oral Oncology* 2018 Dec;87:1-7. Disponível em: <https://www.sciencedirect.com/science/article/abs/pii/S1368837518303634>
- CAO DF, CHUNG SS. Identification and characterization of a novel human aldose reductase-like gene. *J Biol Chem*. Disponível em: 1998;273:11429-11435. [https://www.jbc.org/article/S0021-9258\(19\)89339-0/fulltext](https://www.jbc.org/article/S0021-9258(19)89339-0/fulltext)
- CEVATEMRE B, BOTTA B, MORIM, BERARDOZZI S, INGALLINA C, ULUKAYA E. The plant-derived triterpenoid tingenin B is a potent anticancer agent due to its cytotoxic activity on cancer stem cells of breast cancer in vitro. *Chemico-Biological Interactions* 2016, 260, 248-255. Disponível em: <https://www.sciencedirect.com/science/article/abs/pii/S0009279716304239>
- CHANG WM, CHANG YC, YANG YC, LIN SK, CHANG PMH, HSIAO M. AKR1C1 controls cisplatin-resistance in head and neck squamous cell carcinoma through cross-talk with the STAT1/3 signaling pathway. *Journal of Experimental & Clinical Cancer Research* (2019) 38:245. Disponível em: <https://jccr.biomedcentral.com/articles/10.1186/s13046-019-1256-2>
- KO, HH, PENG, HH, CHENG, SJ E KUO, MYP. Increased salivary AKR1B10 level: association with progression and poor prognosis of oral squamous cell carcinoma. *Head & Neck* 2018, 40 (12), 2642-2647. Disponível em: <https://onlinelibrary.wiley.com/doi/abs/10.1002/hed.25370>
- DAINA A, MICHIELIN O, ZOETE V. SwissADME: a free web tool to evaluate pharmacokinetics, drug-likeness and medicinal chemistry friendliness of small molecules. *Scientific reports* 2017, 7(1), 42717. Disponível em: <https://www.nature.com/articles/srep42717>
- FANG WY, KUO YZ, CHANG JY, HSIAO, J.-R.; KAO, H.-Y.; TSAI, S.-T.; WU, L.-W. The Tumor Suppressor TGFBR3 Blocks Lymph Node Metastasis in Head and Neck Cancer. *Cancer* 2020, 12, 1375. Disponível em: <https://www.mdpi.com/2072-6694/12/6/1375>
- GALI-MUHTASIB H, HMADI R, KAREH M, TOHME R, DARWICHE N. Cell death mechanisms of plant-derived anticancer drugs: beyond apoptosis. *Apoptosis* 2015, 20, 1531–1562. Disponível em: <https://link.springer.com/article/10.1007/s10495-015-1169-2>
- GFELLER D, GROSDIDIER A, WIRTH M, DAINA A, MICHIELIN O, ZOETE V. SwissTargetPrediction: um servidor web para previsão de alvos de pequenas moléculas bioativas. *Pesquisa de ácidos nucleicos* 2014, 42, 32-38. Disponível em: <https://academic.oup.com/nar/article/42/W1/W32/2435215?login=false>
- GU Y, LIU H, KONG F, YEI J, JIA X, ZHANG Z, LI N, YIN J, ZHENG G, HE Z. miR-22/KAT6B axis is a chemotherapeutic determiner via regulation of PI3k-Akt-NF- $\kappa$ B pathway in tongue squamous cell carcinoma. *Journal of Experimental & Clinical Cancer Research* 2018, 37:164. Disponível em: <https://jccr.biomedcentral.com/articles/10.1186/s13046-018-0834-z>
- HUI-HSIN KO, SHIH-LUNG CHENG, JANG-JAER LEE, HSIN-MING CHEN, DDS, MS, PHD, MARK YEN-PING KUO, DDS, PHD, SHIH-JUNG CHENG. Expression of AKR1B10 as an independent marker for poor prognosis in human oral squamous cell carcinoma. *Journal of the sciences and specialties of the head and neck* 2017, 39(7):1327-1332. Disponível em: <https://onlinelibrary.wiley.com/doi/abs/10.1002/hed.24759>
- JANK BJ, LENZ T, HAAS M, KADLETZ-WANKE L, CAMPION NJ, SCHNOELL J, HEIDUSCHKA G, MACFELDA K. Radiosensitizing effect of galunisertib, a TGF- $\beta$  receptor I inhibitor, on head and neck squamous cell carcinoma in vitro. *Invest New*

Drugs 40, 478–486 (2022). Disponível em: <https://link.springer.com/article/10.1007/s10637-021-01207-1>

KIM Y, KANG H, JANG S, KO J. Celastrol inhibits breast cancer cell invasion via suppression of NF- $\kappa$ B -mediated matrix metalloproteinase-9 expression. *Cell. Physiol. Biochem* 2011. 701, 175–184. Disponível em: [https://web.archive.org/web/20190502130254id\\_/https://www.karger.com/Article/Pdf/331729](https://web.archive.org/web/20190502130254id_/https://www.karger.com/Article/Pdf/331729)

LAFFIN B., PETRASH JM. Expression of the aldo-ketoreductases AKR1B1 and AKR1B10 in human cancers. *Frontiers in pharmacology* 2012, 3, 104. Disponível em: <https://www.frontiersin.org/articles/10.3389/fphar.2012.00104/full>

LEE SK, CHANG GS, LEE IH, CHUNG JE, SUNG KY, NO KT. The PreADME: PC-Based program for batch prediction of adme properties, EuroQSAR, v. 9, p. 5-10, Istanbul, Turkey, 2004. Disponível em: <https://preadmet.webservice.bmdrc.org/>

LI HUANG, RONGZHANG HE, WEIHAO LUO, YUAN-SHAN ZHU, JIA LI, TAN TAN, XI ZHANG, ZHENG HU, DIXIAN LUO. Aldo-Keto reductase Family 1 member B10 inhibitors: Potential drugs for cancer treatment. *Recent Patents on Anti-Cancer Drug Discovery*, 2016, 11(2), 184-196. Disponível em: <https://www.ingentaconnect.com/content/ben/pra/2016/00000011/00000002/art00005>

LIU J, BAN H, LIU Y, NI, J. The expression and significance of AKR1B10 in laryngeal squamous cell carcinoma. *Scientific reports* 2021, 11 (1), 1-12. Disponível em: <https://link.springer.com/content/pdf/10.1038/s41598-021-97648-y.pdf>

MAYER AM, HAMANN MT. Marine pharmacology in 2000: marine compounds with antibacterial, anticoagulant, antifungal, anti-inflammatory, antimalarial, antiplatelet, antituberculosis, and antiviral activities; affecting the cardiovascular, immune, and nervous systems and other miscellaneous mechanisms of action. *Marine Biotechnology* 2004, 6, 37-52. Disponível em: <https://link.springer.com/article/10.1007/s10126-003-0007-7>

MAHNASHI, MH, ALQAHTANI, YS, ALQARNI AO, ALYAMI BA, JAN MS, AYAZ M, ULLAH F, RASHID U, SADIQ A. Crude extract and isolated bioactive compounds from *Notholirion thomsonianum* (Royale) Stapf as multitargets antidiabetic agents: in-vitro and molecular docking approaches. *BMC Complement Med Ther* 2021, 21, 270. Disponível em: <https://link.springer.com/article/10.1186/s12906-021-03443-7>

MOSMANN T. Ensaio colorimétrico rápido para crescimento e sobrevivência celular: aplicação a ensaios de proliferação e citotoxicidade. *J Immunol Methods*. 1983; 65 :55–63. Disponível em: <https://www.sciencedirect.com/science/article/abs/pii/0022175983903034>

NASTASĂ C, TAMAIAN R, ONIGA O, TIPERCIUC B. 5-Arylidene (chromenyl-methylene)-thiazolidinediones: potential new agents against mutant oncoproteins K-Ras, N-Ras and B-Raf in colorectal cancer and melanoma. *Medicina* 2019, 55(4), 85. Disponível em: <https://www.mdpi.com/1648-9144/55/4/85>

RIBBLE D, GOLDSTEIN NB, NORRIS DA, SHELLMAN YG. A simple technique for quantifying apoptosis in 96-well plates. *BMC Biotechnology* 2005, 5:12. Disponível em: <https://bmcbiotechnol.biomedcentral.com/articles/10.1186/1472-6750-5-12>

RODRIGUES ACBDC, DE OLIVEIRA FP, DIAS RB, SALES CB, ROCHA CA, SOARES MB, COSTA EV, DA SILVA FMA, ROCHA WC, KOOLEN HHF, BEZERRA DP. In vitro and in vivo anti-leukemia activity of the stem bark of *Salacia impressifolia* (Miers) AC Smith (Celastraceae). *Journal of ethnopharmacology* 2019, 231, 516-524. Disponível em:

<https://bmcbiotechnol.biomedcentral.com/articles/10.1186/1472-6750-5-12>

RUIZ FX, COUSIDO-SIAH A, PORTO S, DOMÍNGUEZ M, CRESPO I, RECHLIN C, MITSCHLER A, LERA AR, MARTÍN MJ, LA FUENTE JÁ, KLEBE G, PAROS X, FARROS J, PODJARNY A. Structural Determinants of the Selectivity of 3-Benzyluracil-1-acetic Acids toward Human Enzymes Aldose Reductase and AKR1B10. *ChemMedChem* 2015, 10, 1989 – 2003. Disponível em: <https://chemistry-europe.onlinelibrary.wiley.com/doi/abs/10.1002/cmdc.201500393>

PENNING TM. The aldo-keto reductases (AKRs): overview. *Chem Biol Inter-act.* 2015; 234:236-246. Disponível em:

<https://www.sciencedirect.com/science/article/abs/pii/S0009279714002737>

SHEVKAR C., ARMARKAR A., WEERASINGHE R., MADURANGA K., PARANAGAMA P., PANDEY K., BEHERA S. K., KATE A. S. (2022). Cytotoxic Bioanthracene and Macrocyclic Polyester from Endolichenic Fungus *Talaromyces pinophilus*: In-Vitro and In-Silico Analysis. *Indian Journal of Microbiology*, 1-11. Disponível em: <https://link.springer.com/article/10.1007/s12088-021-00994-8>

SORKIN BC, KUSZAK AJ, BLOSS G, FUKAGAWA NK, HOFFMAN FA, JAFARI M, BARRETT B, BROWN PN, BUSHMAN FD, CASPER SJ, CHILTON FH, COFFEY CS, FERRUZZI MG, HOPP DC, KIELY M, LAKENS D, MACMILLAN JB, MELTZER DO, PAHOR M, PAUL J, PRITCHETT-CORNING K, QUINNEY SK, REHERMANN B, SETCHELL KDR, SIPES NS, STEPHENS JM, TAYLOR DL, TIRIAC H, WALTERS MA, XI D, ZAPPALÁ G, PAULI GF. Improving natural product research translation: From source to clinical trial. *FASEB J.* 2020, 34(1):41-65. Disponível em: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC7470648/>

THOMFORD NE, SENTHEBANE DA, ROWE A, MUNRO D, SEELE P, MAROYI A, DZOBO K. Natural Products for Drug Discovery in the 21st Century: Innovations for New Drug Discovery. *International Journal of Molecular Sciences*, 2018, 19(6), 1578. Disponível em: <https://www.mdpi.com/1422-0067/19/6/1578>

TROTT O, OLSON AJ. AutoDock Vina: improving the speed and accuracy of docking with a new scoring function, efficient optimization, and multithreading. *J Comput Chem* 2010, 30;31(2):455-61. Disponível em:

<https://onlinelibrary.wiley.com/doi/abs/10.1002/jcc.21334>

WANG H, KUI-WU W. Lupene-type triterpenoids from *Celastrus oblaneifolius*. *Chemistry of Natural Compounds* 2016, 52:764-765. Disponível em: <https://link.springer.com/article/10.1007/s10600-016-1769-2>

WARNAKULASURIYA, S. Viver com câncer bucal: epidemiologia com referência particular à prevalência e mudanças no estilo de vida que influenciam a sobrevivência. *Oral oncology* 2010, 46 (6), 407-410. Disponível em: <https://www.sciencedirect.com/science/article/abs/pii/S136883751000062X>

WU Y, WANG J, ZHAO J, ZHANG Y, SUN Y, CHEN J, WANG J. Gene regulation analysis of the effects of evodiamine on tongue squamous cell carcinoma. *Journal of Cell*

Biochem 2019, 120:15933-15940. Disponível em:  
<https://onlinelibrary.wiley.com/doi/full/10.1002/jcb.28869>

Yadav VR, Sung B, Prasad S, Kannappan R, Cho SG, Liu M, Chaturvedi MM, Aggarwal BB. Celastrol suppresses invasion of colon and pancreatic cancer cells through the downregulation of expression of CXCR4 chemokine receptor. *J. Mol. Med. (Berl)* 2010, 88, 1243–1253. Disponível em: <https://link.springer.com/article/10.1007/s00109-010-0669-3>

Yang X, Zhao H, Yang J, Ma Y, Liu Z, Li C, WANG T, YAN Z, Du N. MiR-150-5p regulates melanoma proliferation, invasion, and metastasis via the SIX1-mediated Warburg Effect . *Biochemical and Biophysical Research Communications* 2019, 515(1), 85-91. Disponível em:  
<https://www.sciencedirect.com/science/article/abs/pii/S0006291X19309970>