



UNIVERSIDADE
ESTADUAL DE LONDRINA

VIRGINIA MARCIA CONCATO

**ATIVIDADE CITOTÓXICA DO 3,3',5,5'-
TETRAMETOXIBIFENIL-4,4'DIOL EM LINHAGEM HUMANA
DE CARCINOMA PULMONAR DE CÉLULAS NÃO
PEQUENAS, A549**

VIRGINIA MARCIA CONCATO

**ATIVIDADE CITOTÓXICA DO 3,3',5,5'-
TETRAMETOXIBIFENIL-4,4'DIOL EM LINHAGEM HUMANA
DE CARCINOMA PULMONAR DE CÉLULAS NÃO
PEQUENAS, A549**

Dissertação de Mestrado apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Patologia Experimental, Centro de Ciências Biológicas, Universidade Estadual de Londrina, como requisito parcial à obtenção do título de Mestre.

Orientador: Prof. Dr. Wander R. Pavanelli

Londrina
2019

Ficha de identificação da obra elaborada pelo autor, através do Programa de Geração Automática do Sistema de Bibliotecas da UEL

CONCATO, Virginia Márcia Concato.

ATIVIDADE CITOTÓXICA DO 3,3',5,5'-TETRAMETOXIBIFENIL-4,4'DIOL EM LINHAGEM HUMANA DE CARCINOMA PULMONAR DE CÉLULAS NÃO PEQUENAS, A549 / Virginia Márcia Concato CONCATO. - Londrina, 2019. 56 f. : il.

Orientador: Wander Rogério Pavanelli Pavanelli.

Coorientador: Mario Sergio Mantovani Mantovani .

Coorientador: Milena Menegazzo Miranda-Sapla Miranda-Sapla.

Dissertação (Mestrado em Patologia Experimental) - Universidade Estadual de Londrina, Centro de Ciências Biológicas, Programa de Pós-Graduação em Patologia Experimental, 2019.

Inclui bibliografia.

1. Câncer de Pulmão - Tese. 2. Tratamento Alternativo - Tese. 3. Indução de morte celular - Tese. I. Pavanelli, Wander Rogério Pavanelli. II. Mantovani , Mario Sergio Mantovani . III. Miranda-Sapla, Milena Menegazzo Miranda-Sapla. IV. Universidade Estadual de Londrina. Centro de Ciências Biológicas. Programa de Pós-Graduação em Patologia Experimental. V. Título.

CDU 616

VIRGINIA MARCIA CONCATO

**ATIVIDADE CITOTÓXICA DO 3,3',5,5'-
TETRAMETOXIBIFENIL-4,4'DIOL EM LINHAGEM HUMANA
DE CARCINOMA PULMONAR DE CÉLULAS NÃO
PEQUENAS, A549**

Dissertação de Mestrado apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Patologia Experimental, Universidade Estadual de Londrina, como requisito parcial à obtenção do título de Mestre.

BANCA EXAMINADORA

Orientador: Prof. Dr. Wander R. Pavanelli
Universidade Estadual de Londrina - UEL

Prof. Dr. Mario Sergio Mantovani
Universidade Estadual de Londrina - UEL

Prof^a. Dr^a. Milena Menegazzo Miranda-Sapla
Universidade Estadual de Londrina - UEL

Londrina, 14 de Junho de 2019.

Dedico este trabalho à minha mãe, por todo seu amor incondicional e por sempre acreditar em mim, motivos estes que me fazem seguir em frente.

AGRADECIMENTOS

Agradeço primeiramente a Deus, por ter me dado força, calma e coragem para trilhar os caminhos durante o mestrado, à Ele toda honra e toda glória por sempre me guiar e confortar.

À minha Mãe e rainha Nossa Senhora, por sempre interceder por mim.

Ao meu orientador, professor Dr. Wander R. Pavanelli, por ter me aceitado em seu laboratório desde a iniciação científica, pelos conselhos, pelas dicas e por ter confiado a mim este projeto no qual fui muito feliz em desenvolvê-lo. Meus sinceros agradecimentos.

Agradeço à professora Dr^a Ivete Conchon-Costa que abriu as portas de seu laboratório, por toda atenção e carinho concedido, e por todo o seu ensinamento.

Agradeço imensamente ao Prof. Dr. Mario Sergio Mantovani, por ter aberto as portas de seu laboratório, por ter se disponibilizado a me ajudar e me ensinar todos os protocolos. Agradeço pelas dicas e conselhos e por contribuir grande e estritamente com o desenvolvimento deste trabalho.

Agradeço o Prof. Dr. Juliano Bordignon por ceder gentilmente os materiais necessários para a elaboração deste trabalho.

Agradeço a prof^a. Dr^a. Aneli de Melo Barbosa Dekker, por ceder o composto e seu tempo que contribuíram muito para a realização do meu trabalho.

Agradeço à prof^a. Dr^a. Idessania Nazareth Costa pelos ensinamentos e por toda a sua contribuição na minha formação.

Agradeço grandemente à prof^a. Dr^a. Milena Menegazzo Miranda-Sapla pela sua amizade, dicas, conselhos, por brigar comigo para parar de chorar, por todo ensinamento e contribuição no meu trabalho e principalmente, por ser esse exemplo de pessoa a se seguir.

À todos os meus amigos de Laboratório do do Laboratório de Imunoparasitologia de Doenças Negligenciadas e Câncer (LIDNC), por deixarem meus dias mais felizes, por toda loucura compartilhada e por deixarem mais leve a

rotina de trabalho. Em especial, à Manoela D. Gonçalves, Taylon F. Silva , Bruna T. S. Bortoleti, Fernanda T. Pellissier, Mariana B. Detoni, Ana C. J. Rodrigues, Renan D. Cajuca, Elaine S. Siqueira, Amanda C. M. Carloto, Rachel Arruda e João P. Assolini. Ao Pedro S. R. Dionísio por todos os conselhos, ajuda e ensinamentos.

Ao Jesus Antonio Vargas (ZUI) por ter me ensinado a mexer em sua balança relíquia e por sempre me socorrer com os reagentes.

À todos os professores e funcionários do departamento de Ciências patológicas.

Agradeço à CAPES e CNPq pela bolsa concedida e financiamento de meu projeto.

Aos integrantes da banca de qualificação, Dr. Rodrigo Cabral Luiz e Dr^a. Milena Menegazzo Miranda-Sapla e de defesa, Milena Menegazzo Miranda-Sapla e Mario Sergio Mantovani pelo tempo concedido e dedicação para a correção do meu trabalho.

Gostaria de agradecer à minha mãe Lourdes, minha amiga, e guerreira, pois se não fosse por seu esforço eu não teria chegado onde estou. Agradeço à ti mãe por todo seu esforço ao longo destes anos todos, por cuidar de mim nos momentos difíceis e estressantes e por sempre me apoiar. Muito obrigada mãe!

Agradeço ao meu amor Gustavo, que acompanhou de perto meus passos e essa etapa em minha vida, por sempre me ajudar e por ter muita paciência.

Agradeço grandemente aos meus amigos Vagner Colmiran, Luciana Ap. H. Mendes, Janaína Figueredo, Carla Regina, Leonardo de Andrade e Ana C. Gomes, pois foram e são muito importantes em minha vida, sempre me apoiaram e ajudaram. Obrigada por me deixarem fazer parte da vida de cada um, amo a G5.

À todos os citados e aos possíveis esquecidos, muito obrigada!

“Não vos inquieteis com nada! Em todas as circunstâncias apresentai a Deus as vossas preocupações, mediante a oração, as súplicas e a ação de graças. E a paz de Deus, que excede toda a inteligência, haverá de guardar vossos corações e vossos pensamentos, em Jesus Cristo.”

Filipenses 4:6,7

“Não importa o quanto a vida possa ser ruim, sempre existe algo que você pode fazer, e triunfar. Enquanto há vida, há esperança.”

Stephen Hawking

CONCATO, Virgínia Márcia. **Atividade citotóxica do 3,3',5,5'-tetrametoxibifenil-4,4'diol em linhagem humana de carcinoma pulmonar de células não pequenas, A549**. 2019. 82. Dissertação (Mestrado em Patologia Experimental) – Universidade Estadual de Londrina, Londrina, 2019.

RESUMO

O carcinoma pulmonar é a principal causa de morte relacionada ao câncer em todo o mundo. Apesar do desenvolvimento de vários medicamentos antitumorais, como a cisplatina, o seu uso prolongado está relacionado com a resistência celular, resultando em um tratamento limitado. A busca por novos compostos com potencial antiproliferativo que respondam seletivamente às células tumorais, possuam menor toxicidade, têm sido o foco do desenvolvimento de muitos estudos. Os compostos fenólicos, metabólitos secundários das plantas, formam um grupo de moléculas com estruturas químicas altamente diversificadas, podendo ser classificados de acordo com seu esqueleto de carbono nas seguintes classes principais: fenóis simples, ácidos fenólicos, flavonóides, taninos, lignanas, ligninas, curcuminóides, cumarinas e estilbenos. O 3,3',5,5'-tetrametoxibifenil-4,4'diol (TMBP) é um composto bifenólico, que foi biotransformado a partir da catálise de 2,6-dimetoxifenol através da utilização de lacases (enzimas catalizadoras) produzidas pelo fungo *Botryosphaeria rhodina* MAMB-05 (*B. rhodina*). A ação antiproliferativa sobre células de câncer gástrico, ação fungicida e bactericida, de outras moléculas bifenólicas, foram relatadas na literatura, no entanto, nada se tem descrito sobre o TMBP, muito menos sobre a sua ação em câncer de pulmão. No presente estudo, investigamos o efeito citotóxico e a indução de morte do TMBP, sobre a linhagem humana A549 de carcinoma pulmonar de células não pequenas (CPCNP). Para isso, a linhagem tumoral A549, foi tratada com TMBP (12,5 - 200 μ M) e posteriormente definida a concentração inibitória de 50% (IC_{50}) (148 μ M \pm 0.05) em 72 h, a partir da qual, foram realizados ensaios para determinar a viabilidade, volume e regulação do ciclo celular. Por fim, foram investigados os mecanismos envolvidos com a ação dos tratamentos por citometria de fluxo e fluorimetria. Inicialmente, ao tratarmos hemácias e macrófagos peritoneais com TMBP, observamos que não ocorreu redução da viabilidade nestas células. Por outro lado, o TMBP foi capaz de reduzir a viabilidade da linhagem tumoral investigada, por ação citotóxica e por promover a redução do tamanho celular. Posteriormente, verificamos que o tratamento com TMBP foi capaz de causar despolarização mitocondrial. Além disso, foi constatado também, que o tratamento foi capaz de aumentar a produção de espécies reativas de oxigênio (ERO), induzir a parada do ciclo celular em G2/M e levar à morte por apoptose direta. Em conjunto, nossos resultados revelaram que o tratamento com TMBP sobre células de câncer de pulmão foi capaz de gerar ação citotóxica direta, levando a indução de apoptose mediada pelo aumento de ERO. Portanto, o TMBP é um candidato promissor para o desenvolvimento de drogas antitumorais visando o câncer de pulmão.

Palavras-chave: Câncer. Tratamento. Estresse oxidativo. Apoptose.

CONCATO, Virgínia Márcia. **Cytotoxic activity of 3,3',5,5'-tetramethoxybiphenyl-4,4'diol in human non-small cell lung carcinoma cell line, A549.** 2019. 82. Dissertation (Master's degree in Experimental Pathology) – Universidade Estadual de Londrina, Londrina, 2019.

ABSTRACT

Lung carcinoma is the leading cause of cancer-related death worldwide. Despite the development of several antitumor drugs, such as cisplatin, its prolonged use is related to cellular resistance, resulting in limited treatment. The search for new compounds with antiproliferative potential that respond selectively to tumor cells, have less toxicity, have been the focus of many studies. Phenolic compounds, secondary metabolites of plants, form a group of molecules with highly diversified chemical structures, and can be classified according to their carbon skeleton in the following main classes: simple phenols, phenolic acids, flavonoids, tannins, lignans, lignins, curcuminoids, coumarins and stilbenes. 3,3',5,5'-tetramethoxybiphenyl-4,4'diol (TMBP) is a biphenolic compound, which was biotransformed from the catalysis of 2,6-dimethoxyphenol through the use of laccases (catalyzing enzymes) produced by fungus *Botryosphaeria rhodina* MAMB-05 (*B. rhodina*). The antiproliferative action on gastric cancer cells, fungicidal and bactericidal action of other biphenolic molecules have been reported in the literature, however, nothing has been described about TMBP, much less about its action on lung cancer. In the present study, we investigated the cytotoxic effect and death induction of TMBP on human non-small cell lung carcinoma (NSCLC) cell line A549. For this, the tumor cell line A549 was treated with TMBP (12.5 - 200 μ M) and later defined the inhibitory concentration of 50% (IC₅₀) (148 μ M \pm 0.05) in 72 h, from which tests were performed to determine viability, volume and cell cycle regulation. Finally, the mechanisms involved with the action of treatments by flow cytometry and fluorimetry were investigated. Initially, when treating red blood cells and peritoneal macrophages with TMBP, we observed that there was no reduction in viability in these cells. On the other hand, TMBP was able to reduce the viability of the investigated tumor lineage, by cytotoxic action and by promoting the reduction of cell size. Subsequently, we found that treatment with TMBP was able to cause mitochondrial depolarization. Furthermore, it was also found that the treatment was able to increase the production of reactive oxygen species (ROS), induce cell cycle arrest in G₂/M and lead to death by direct apoptosis. Taken together, our results revealed that treatment with TMBP on lung cancer cells was able to generate direct cytotoxic action, leading to induction of apoptosis mediated by increased ROS. Therefore, TMBP is a promising candidate for the development of antitumor drugs targeting lung cancer.

Keywords: Cancer. Treatment. Oxidative stress. Apoptosis.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1 – Cânceres mais incidentes no mundo.....	12
Figura 2 – Taxa de sobrevivência de acordo com o diagnóstico do câncer de pulmão	13
Figura 3 – Números de novos casos de câncer de pulmão no Brasil em mulheres e homens, de acordo com o ano	14
Figura 4 – Papel das ciclinas, quinases dependentes de ciclina (CDKs) e inibidores de CDK na regulação do ciclo celular.....	22
Figura 5 – Estrutura química dos fenóis.....	29
Figura 6 – Biossíntese do 3,3',5,5'-tetrametoxibifenil-4,4'-diol (TMBP).....	32

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

1		
2		
3	2,6-DMF	2,6-dimetoxifenol
4	ADC	Adenocarcinoma
5	BP	3,3',5,5'-tetra-t-butil-bifenil-4,4'-diol
6	CBA	Carcinoma Bronquíolo Alveolar
7	CCE	Carcinoma de Células Escamosas ou Epidermóide
8	CCG	Carcinoma de Células Grandes
9	CPCNP	Câncer de Pulmão de Células Não Pequenas
10	CPCP	Câncer de Pulmão de Células Pequenas
11	DNA	do inglês <i>Deoxyribonucleic acid</i>
12	EROs	Espécies Reativas de Oxigênio
13	FasL	Ligante de Faz
14	GAP	do inglês <i>GTPase-activating proteins</i>
15	GBD	do inglês <i>Global Burden of Disease</i>
16	GCO	do inglês Global Cancer Observatory
17	GDP	do inglês <i>Guanosine Diphosphate</i>
18	GTP	do inglês <i>Guanosine Triphosphate</i>
19	H ₂ O ₂	Peróxido de Hidrogênio
20	HCAAs	do inglês <i>Heterocyclic amines</i>
21	H/R	Hipóxia - Reoxigenação
22	IAPs	Inibidores de Apoptose
23	INCA	Instituto Nacional de Câncer
24	Mdm2	do inglês <i>Murine double minute 2</i>
25	N	Nitrogênio
26	OMS	Organização Mundial de Saúde
27	O ₂ ⁻	Superóxido
28	OH	Hidroxila
29	TMBP	3,3',5,5'-tetrametoxibifenil-4,4'-diol
30	UV	Ultravioleta
31	VEGF	do inglês <i>Vascular endothelial growth factor</i>
32	WHO	do inglês <i>World Health Organization</i>

SUMÁRIO

1

2	1 INTRODUÇÃO	12
3	1.1 Câncer de pulmão	12
4	1.1.1 Dados epidemiológicos.....	12
5	1.2 Classificação e Morfologia dos tipos de Câncer de pulmão.....	15
6	1.3 Morfologia dos subtipos de carcinoma pulmonar de células não pequenas ...	16
7	1.3.1 Adenocarcinoma.....	16
8	1.3.1.1 Linhagem celular A549.....	17
9	1.3.2 Carcinoma de células escamosas	18
10	1.3.3 Carcinoma de células grandes	19
11	1.4 Patogênese do carcinoma pulmonar de células não pequenas.....	19
12	1.4.1 Ciclo celular	20
13	1.4.2 Autofagia.....	23
14	1.4.3 Morte celular	24
15	1.4.3.1 Apoptose	24
16	1.4.3.2 Necrose	25
17	1.5 Tratamento	26
18	2 COMPOSTOS FENÓLICOS	29
19	2.1 3,3',5,5'-tetrametoxibifenil-4,4'-diol (TMBP).....	31
20	3 REFERÊNCIAS	35
21	4 OBJETIVOS	44
22	4.1 Objetivo geral	44
23	4.2 Objetivos específicos	44
24	5. PRODUÇÃO CIENTÍFICA	45
25	5.1 Artigo: 3,3',5,5'-tetramethoxybiphenyl-4,4'diol induces cell cycle arrest in G2/M	
26	phase and apoptosis in A549 cell line of non-small cell lung cancer	45

27

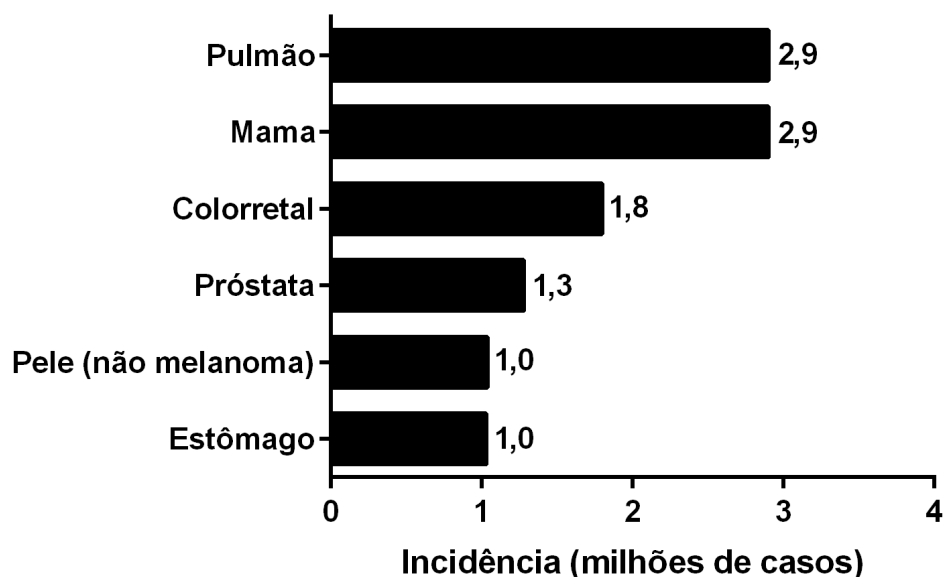
1 **1. INTRODUÇÃO**
 2 **1.1 Câncer de pulmão**
 3 **1.1.1 Dados epidemiológicos**

4
 5 Câncer é um termo genérico utilizado para determinar um grande
 6 grupo de doenças crônicas complexas, caracterizadas pelo aumento descontrolado
 7 da proliferação celular (PLANKAR; JERMAN; KRASOVEC, 2011). Nestas doenças,
 8 as células sofrem mutações até se tornarem malignas, quando são capazes de
 9 invadir tecidos adjacentes ou eventualmente se disseminar para outros tecidos
 10 (PLANKAR; JERMAN; KRASOVEC, 2011). Esta enfermidade está relacionada a
 11 uma variedade de mecanismos celulares e moleculares que ocorrem ao longo do
 12 processo de carcinogênese (WHITE; LOWRY, 2015).

13 De acordo com Bray et al., (2018) e a Organização Mundial da
 14 Saúde (OMS) (2018), os cânceres mais incidentes no mundo para ambos os sexos
 15 são os de pulmão (2,9 milhões), mama (2,9 milhões), colorretal (1,8 milhões),
 16 próstata (1,3 milhões), pele (não melanoma) (1,0 milhões) e estômago (1,0 milhões)
 17 (**Figura 1**). Já dentre os que apresentam maiores taxas de mortalidade, encontram-
 18 se os cânceres de pulmão (1,76 milhões de mortes), colorretal (862 000 mortes),
 19 estômago (783 000 mortes), fígado (782 000 mortes) e mama (627 000 mortes).

20

21 **Figura 1** – Cânceres mais incidentes no mundo.



22

23 Fonte: Adaptado de: Bray et al., (2018), World Health Organization (WHO), Global Cancer Observatory (GCO)
 24 (2018). Estimativa das taxas de incidência mundial dos cânceres que mais afeta a população para o ano de

1 2018, sem distinção dos sexos.

2 A origem e progressão do câncer de pulmão estão envolvidas com
3 diversos fatores ambientais, como o tabagismo, alimentação e exposição
4 ocupacional (ex. amianto, sílica, radônio, metais pesados e hidrocarbonetos
5 aromáticos policíclicos) (MALHOTRA et al., 2016; ARAUJO et al., 2018). Dentre
6 estes fatores, o tabagismo é considerado o mais importante fator de risco para todos
7 os principais tipos histológicos de câncer de pulmão, e esta associação foi
8 estabelecida por estudos epidemiológicos realizados já nas décadas de 50 e 60
9 (MOLINA et al., 2008; DELA CRUZ; TANOUE; MATTHAY, 2011; MALHOTRA et al.,
10 2016).

11 O fumo do tabaco contém aproximadamente 60 substâncias
12 cancerígenas conhecidas, sendo os hidrocarbonetos aromáticos policíclicos (ex.: o
13 benzo(a)pireno), nitratos e N-nitrosaminas), envolvidos na carcinogênese pulmonar
14 (DE GROOT; MUNDEN, 2012; SCHVEIGERT et al., 2016). Os cigarros são os
15 produtos do tabaco mais consumidos nos países ocidentais, mas outros produtos
16 como charutos, cigarrilhas, cachimbos, bidi e naguilé, também têm sido associados
17 ao câncer de pulmão.

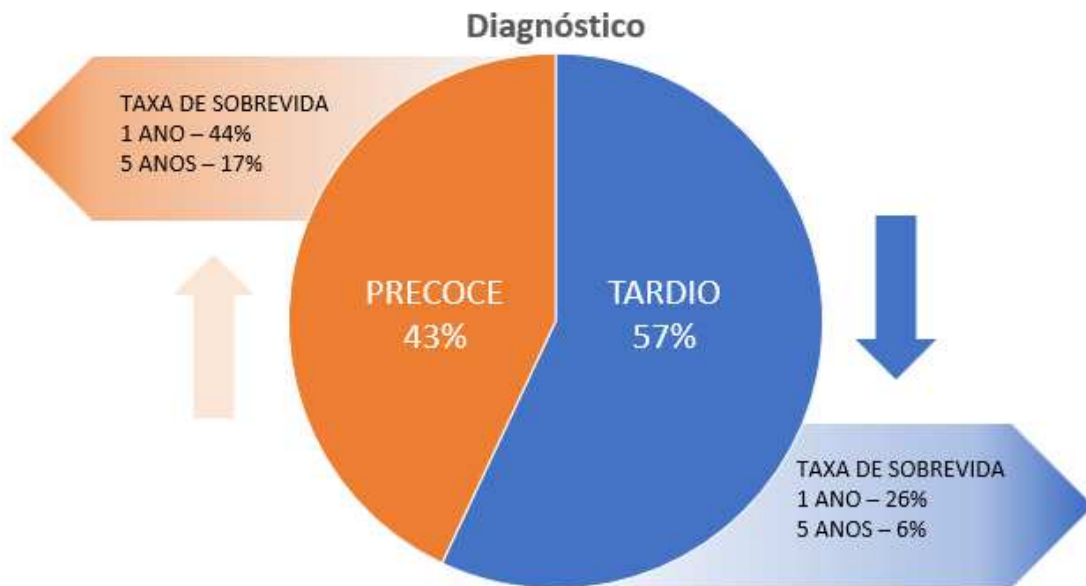
18 O Brasil tem prejuízo anual de 56,9 bilhões com o tabagismo, que
19 são gastos com despesas médicas e com custos indiretos ligados à perda de
20 produtividade, causada por incapacitação de trabalhadores ou morte prematura; o
21 controle do tabaco permanece como sendo a principal forma de redução da
22 ocorrência desse tipo de neoplasia (INCA, 2018).

23 Os cânceres de pulmão são os tipos de câncer mais comuns desde
24 1985 e, mundialmente, a sua incidência têm sofrido redução ao longo das últimas
25 décadas, devido a diminuição no consumo de tabaco e melhoramento do estilo de
26 vida, tanto em homens quanto em mulheres (INCA, 2018), mas ainda apresentam
27 números elevados em relação aos outros cânceres.

28 Atualmente 44% dos pacientes com câncer de pulmão tem um
29 tempo de sobrevida estimado em um ano, e 17% tem um tempo estimado de cinco
30 anos, porém, aproximadamente 57% dos pacientes são diagnosticados tardiamente,
31 o que leva a uma redução nas opções de tratamento, reduzindo os índices de
32 sobrevivência para 26% para um ano e 6% para cinco anos (**Figura 2**) (DELA
33 CRUZ; TANOUE; MATTHAY, 2011; ACS, 2017). Os pacientes com doença
34 localizada no momento do diagnóstico têm sobrevida em 5 anos para 52% dos

1 casos. Entretanto, pacientes que apresentam metástase têm uma taxa de sobrevida
 2 de 5 anos para 3,6% dos casos. Neste sentido, vale ressaltar a necessidade de
 3 melhoramento nos métodos de rastreamento para a detecção do câncer de pulmão
 4 em estágio inicial (DELA CRUZ; TANOUE; MATTHAY, 2011).

5
 6 **Figura 2** –Taxa de sobrevivência de acordo com o diagnóstico do câncer de pulmão.



7

8 Fonte: Adaptado de: Dela Cruz; Tanoue; Matthay, 2011; American Cancer Society (ACS), 2017.


9

10 No Brasil, o Instituto Nacional de Câncer (INCA) em 2014, estimou
 11 que o número de novos casos para o câncer de pulmão seria de 27.330, sendo
 12 16.400 em homens e 10.930 em mulheres. Já em 2016, as estimativas de novos
 13 casos subiram para 28.220, 17.330 em homens e 10.890 em mulheres. (INCA,
 14 2015). Mais recentemente para o biênio 2018/2019, estimam-se 18.740 casos novos
 15 de câncer de pulmão entre homens e de 12.530 nas mulheres (INCA, 2018) (**Figura**
 16 **3**).

17

18 **Figura 3** – Número de novos casos de câncer de pulmão no Brasil em mulheres e
 19 homens, de acordo com o ano.

SEXO

	Feminino		Masculino	Total de casos
2014	10.930		16.400	27.330
2016	10.890		17.330	28.220
2018/2019	12.530		18.740	31.270

1
2 Fonte: Adaptado de: Ministério da Saúde, Instituto Nacional de Câncer Jose Alencar Gomes da Silva (2014, 2015
3 e 2018).

4
5 Ainda no Brasil, há diferença nas incidências de CA de pulmão de
6 acordo com cada região. No ano de 2018, a incidência de câncer de pulmão por 100
7 mil habitantes em homens foi o segundo mais frequente nas Regiões Sul (36,27/100
8 mil) e Centro-Oeste (16,98/100 mil) e o terceiro mais frequente nas regiões Sudeste
9 (19,22/100 mil), Nordeste (10,37/100 mil) e Norte (9,03/100 mil). Para as mulheres,
10 CA de pulmão foi o terceiro mais frequente nas Regiões Sul (20,59/100 mil) e
11 Sudeste (12,72/100 mil). Nas Regiões Centro-Oeste (11,52/100 mil), Nordeste
12 (7,82/100 mil) e Norte (5,83/100 mil), ocupa a quarta posição (INCA, 2018).

13 14 **1.2 Classificação e morfologia dos tipos de câncer de pulmão**

15
16 O epitélio pulmonar é composto por dois tipos principais de células,
17 tipo I e tipo II. As células do tipo I cobrem aproximadamente 96% da área da
18 superfície do epitélio pulmonar e são incapazes de se dividir. Células tipo II,
19 enquanto cobrem substancialmente menos área superficial do alvéolo, são mais
20 numerosas e têm funções distintas. Uma dessas funções é produzir surfactante que
21 é armazenado em organelas chamadas corpos lamelares. Além disso, estas células
22 são uma das poucas células pulmonares nas quais as monoxigenase P-450,
23 enzimas de ativação metabólica, estão localizadas, sugerindo um possível papel no
24 metabolismo oxidativo de drogas no pulmão. Outra característica notável das células
25 tipo II é que suas propriedades endocíticas foram bem caracterizadas. Estas
26 características faz com que estas células sejam um alvo em potencial para a
27 liberação de macromoléculas pela droga (FOSTER et al., 1998).

28 Os pulmões são locais de frequentes metástases de tumores

1 extratorácicos, como o câncer de mama, colorretal, entre outros, no entanto, o
2 câncer primário de pulmão também é uma doença comum (RODRIGUEZ-CANALES;
3 PARRA-CUENTAS; WISTUBA, 2016). Os cânceres de pulmão geralmente começam
4 nas células que revestem os brônquios, bronquíolos ou alvéolos. De todos os
5 tumores pulmonares, 95% são carcinomas e apenas 5% constituem uma mistura de
6 outras neoplasias, que incluem carcinoides, tumores mesenquimais malignos (p. ex.,
7 fibrossarcomas e leiomiiossarcomas), linfomas e pequena quantidade de lesões
8 benignas, sendo o mais comum o hamartoma (KUMAR et al., 2014; RODRIGUEZ-
9 CANALES; PARRA-CUENTAS; WISTUBA, 2016; BASLI; BELKACEM; AMRANI,
10 2017). Embora existam muitos subtipos descritos para o câncer de pulmão, a
11 Organização Mundial da Saúde (OMS) em 2004, dividiu os carcinomas de pulmão
12 em duas categorias histológicas principais, o câncer de pulmão de células não
13 pequenas (CPCNP) e o câncer de pulmão de pequenas células (CPPC) (TRAVIS et
14 al., 2011; CARTER et al., 2014; KURIBAYASHI; FUNAGUCHI; NAKANO, 2016).

15 O CPPC é considerado uma neoplasia maligna neuroendócrina
16 pulmonar e tem por característica um rápido crescimento. Acomete cerca de 13 a
17 15% dos casos e é considerado o mais agressivo e invasivo (VAN MEERBEECK;
18 FENNELL; DE RUYSSCHER, 2011; SEMENOVA; NAGEL; BERNS, 2015). Esta
19 categoria de câncer de pulmão possui aparência histológica característica, onde as
20 células tumorais são pequenas, arredondadas, possuem citoplasma escasso,
21 semelhantes aos grãos de aveia, cromatina nuclear finamente granular e nucléolos
22 ausentes. É observado extensa taxa mitótica e alta taxa de células em necrose
23 (CARTER et al., 2014; WAQAR; MORGENSZTERN, 2017).

24 O CPCNP, termo aplicado aos vários tipos de carcinomas
25 broncogênicos (derivados do revestimento dos brônquios) é responsável por cerca
26 de 85% dos casos (GAZDAR, 2010). Em contraste com o CPPC, o CPCNP possui
27 menor probabilidade de metástase, mas é irresponsável às terapias citotóxicas
28 (GAZDAR, 2010). Dentro deste grupo, estão incluídos o carcinoma de células
29 escamosas e o carcinoma de grandes células e o adenocarcinoma (TRAVIS, 2011).
30 Cada subtipo do CPCNP é caracterizado por tipos celulares diferentes, que
31 apresentam padrões distintos de crescimento e metástase. Portanto, estes subtipos
32 de CPCNP são nomeados de acordo com a morfologia macro e microscópica
33 (GAZDAR, 2010).

1 1.2.1 Morfologia dos subtipos de carcinoma pulmonar de células não 2 pequenas

3 1.2.1.1 Carcinoma de células escamosas

4
5 O carcinoma de células escamosas ou epidermóide (CCE)
6 compreende 25 a 30% de todos os casos de câncer de pulmão (ZAPPA; MOUSA,
7 2016). O CCE é mais comum em homens do que em mulheres e está estritamente
8 correlacionado ao histórico de tabagismo. Atualmente, a incidência deste tipo de
9 câncer de pulmão têm sofrido redução devido às mudanças no hábito de fumar
10 (KUMAR et al., 2014; ZAPPA; MOUSA, 2016).

11 O CCE surge no brônquio central, tem crescimento endobrônquico e
12 envolve também os lobos dos pulmões; entretanto, apresenta disseminação para
13 fora do tórax mais tardiamente do que os outros tipos histológicos. Esses tumores
14 muitas vezes são antecidos por desenvolvimento de metaplasia escamosa e
15 displasia do epitélio brônquico, que evolui para carcinoma *in situ*, e esta evolução
16 pode durar vários anos (GAZDAR, 2010; KUMAR et al., 2014).

17 Assim, de forma geral, o CCE tem origem em células escamosas
18 (células finas e planas que parecem escamas de peixe). Histologicamente,
19 caracteriza-se pela presença de pérolas de queratina, sendo facilmente identificável,
20 com exceção de tumores menores e sem queratinização (RODENHUIS et al., 1987;
21 TRAVIS, 2011). Os sinais clínicos aparecem precocemente como tosses e
22 hemoptise, o que facilita o diagnostico precoce, porém pode ocorrer o
23 desenvolvimento de cavitações e disseminação para linfonodos regionais
24 (CAPELOZZI, 2001).

25 26 1.2.2 Carcinoma de células grandes

27
28 O carcinoma de células grandes (CCG) é responsável por 5-10%
29 dos cânceres de pulmão. O CCG, não demonstra características morfológicas dos
30 demais carcinomas (adenocarcinoma, CEC ou CPPC), sendo considerado um tipo
31 indiferenciado, que muitas vezes é diagnosticado através da exclusão de outras
32 possibilidades (ZAPPA; MOUSA, 2016). Portanto, os CCG apresentam um
33 prognóstico ruim, devido ao rápido crescimento.

34 Histologicamente, o CCG é caracterizado por ninhos de células

1 poligonais e volumosas, apresenta grandes núcleos, moderada quantidade de
2 citoplasma e exibe nucleólos proeminentes (ROSKOSKI, 2017). Além disso, o CCG
3 pode localizar-se em qualquer parte do pulmão (KUMAR et al., 2014), muitas vezes,
4 começa na parte central dos pulmões, às vezes em linfonodos próximos, na parede
5 torácica e em órgãos distantes. Estes tumores também estão fortemente associados
6 ao tabagismo (ZAPPA; MOUSA, 2016).

7 8 **1.2.3 Adenocarcinoma**

9
10 O adenocarcinoma (ADC) compreende cerca de 40% dos casos de
11 CPCNP, por isso é dito como o subtipo histológico dominante (ROWBOTHAM; KIM,
12 2014; ZAPPA; MOUSA, 2016). O ADC é mais prevalente em adultos (abaixo de 50
13 anos), mais comum em não-fumantes e ex-fumantes, e em mulheres (BRAMBILLA
14 et al., 2001; DAVIDSON; GADZAR; CLARKE, 2013; BALDOTTO et al., 2016). Ao
15 exame histológico o ADC pode assumir formas não-invasivas, como carcinoma
16 bronquíolo-alveolar (CBA), e invasivas, incluindo a forma acinar (em forma de
17 glândula), papilares e sólidos com mucina (GAZDAR, 2010; KUMAR et al., 2014).
18 Estes termos são baseados em como as células se parecem e são organizadas sob
19 o microscópio (KUMAR et al., 2014).

20 O ADC, inicia-se com as células que revestem os alvéolos e
21 produzem substâncias como o muco, formando estruturas glandulares. O tumor
22 origina-se nos bronquíolos e avança de alvéolo a alvéolo, cobrindo os espaços
23 alveolares; por isso, geralmente está localizado na região periférica do pulmão e
24 penetram em vasos linfáticos, por onde podem chegar à pleura e linfonodos hilares
25 (ZAMBONI, 2002; DAVIDSON; GADZAR; CLARKE, 2013). Neste tipo de neoplasia,
26 as metástases à distância aparecem frequentemente e os sintomas no local do
27 tumor são inexistentes ou aparecem na fase tardia (ZAMBONI, 2002).

28 No decorrer dos anos, foram isoladas um grande número de
29 linhagens celulares CPCNP através da remoção de tecido pulmonar cancerígeno
30 humano, com a finalidade de serem utilizadas tanto para pesquisa básica quanto
31 para descoberta de medicamentos, como por exemplo a linhagem A549, células
32 epiteliais basais alveolares adenocarcinômicas (GIARD, 1973).

33 34 **1.2.3.1 Linhagem celular A549**

1
2 Uma linhagem com características de células pulmonares do tipo II,
3 chamada de A549, foi obtida em 1972 por Giard et al., (1973) pela remoção e
4 cultivo de tecido pulmonar com tumor de um homem caucasiano de 58 anos de
5 idade. São células epiteliais basais alveolares de adenocarcinoma humano
6 diferenciadas e apresentam corpos lamelares, isoenzimas P450 (P450 IA1 e P450
7 IIB) e a produção de surfactante pulmonar. Outra característica importante desta
8 linhagem é a presença das proteínas regulatórias do ciclo celular, como a p53.
9 Células A549, quando confluentes, aparecem como monocamada de
10 paralelepípedos, com uma típica morfologia poligonal, semelhante a células
11 epiteliais, e apresentam inibição de contato do crescimento celular (FOSTER et al.,
12 1998; CROCE et al., 1999; ZHANG et al., 2009; WU et al., 2018).

13 Atualmente, as células A549 têm servido como modelos do epitélio
14 pulmonar alveolar tipo II, encontrando utilidade em pesquisas que examinam o
15 processamento metabólico do tecido pulmonar e os possíveis mecanismos de
16 liberação do fármaco no tecido. Além disso, as células serviram como base de teste
17 para o desenvolvimento de novas drogas para o CA de pulmão, como paclitaxel,
18 docetaxel e bevacizumabe, tanto *in vitro* quanto *in vivo* através de cultura celular e
19 xenoenxerto, respectivamente (FOSTER et al., 1998).

20 21 **1.3 Patogênese do carcinoma pulmonar de células não-pequenas**

22
23 O câncer de pulmão é reconhecido por ser uma doença causada por
24 alterações moleculares em proto-oncogenes ou genes supressores tumorais. Tais
25 mutações resultam na autosuficiência em sinais de crescimento, insensibilidade aos
26 sinais antiproliferativos, evasão de apoptose, potencial replicativo ilimitado devido à
27 ativação da telomerase, invasão tecidual e disseminação em locais distantes
28 (PANOV, 2005; SINGH; KATHIRESAN, 2014).

29 Neste contexto, as alterações relacionadas ao CPCNP, incluem
30 principalmente mutações nos genes EGFR (do inglês, *epidermal growth factor*
31 *receptor*), RAS (do inglês, *RAt Sarcoma virus*), e p53 (do inglês, *tumor protein 53*). A
32 sinalização do EGFR é fundamental para a proliferação celular normal, mas sua
33 desregulação é crucial para a patogênese do câncer, neoangiogênese, metástase e
34 inibição da apoptose. Além disso, o EGFR é superexpresso no CPCNP avançado e

1 está associado à baixa sobrevivência e resistência a agentes quimioterápicos, incluindo
2 a cisplatina (GOU; WU, 2014).

3 Os genes RAS (K-RAS, H-RAS e N-RAS) codificam para a proteína
4 p21, e promovem a transdução dos sinais promotores de crescimento da membrana
5 para o núcleo e, conseqüentemente, para a proliferação celular. Assim, quando
6 mutados, conduzem a proliferação desordenada das células tumorais mesmo na
7 ausência de estímulo de fatores de crescimento. As mutações nos genes RAS
8 ocorrem em cerca de 35% de todos os cânceres de pulmão (PANOV, 2005; GOU;
9 WU, 2014).

10 A p53, proteína supressora tumoral, está envolvida em vários
11 aspectos diferentes da parada do ciclo celular, apoptose, controle da integridade do
12 genoma e reparo do DNA. Além disso, regula uma variedade de processos através
13 da ativação de genes que estão envolvidos em diferentes funções celulares,
14 incluindo p21, ciclina D1, Bax, Fas1, FazL (PUCCI; KASTEN; GIORDANO, 2000;
15 WILLIAMS et al., 2011; SENTURK, 2016). A perda da função da p53, está presente
16 em aproximadamente metade de todos os cânceres humanos, incluindo o câncer de
17 pulmão, no qual é visto em 45-70% dos adenocarcinomas e 60-80% do carcinoma
18 de células escamosas (BRAMBILLA; GAZDAR, 2009; LIU et al., 2017). Ainda, a
19 mutação no gene p53 é comumente observado em tumores com prognóstico ruim,
20 aumento da malignidade e resistência ao tratamento (LIU et al., 2017).

21 22 **1.3.1 Ciclo celular**

23
24 O ciclo celular, composto por intérfase e mitose, pode ser definido
25 como uma complexa sequência de acontecimentos que resultam na proliferação
26 celular. Na intérfase, se observa a sequência das fases G1, S e G2 (SENTURK,
27 2016). Durante o ciclo, existem momentos onde há verificação dos processos
28 envolvidos na divisão, denominados de pontos de checagem ou *checkpoints*
29 (PUCCI; KASTEN; GIORDANO, 2000; WILLIAMS et al., 2011; SENTURK, 2016), os
30 quais permitem a proliferação apenas na presença de sinais estimulatórios, como
31 fatores de crescimento. Além disso, os *checkpoints* também podem ser ativados por
32 danos no DNA e por cromossomos mal alinhados no fuso mitótico. Nesse caso, a
33 parada na proliferação ou divisão permite que a célula repare o dano antes da
34 progressão do ciclo celular. Em células normais, se o dano não for reparado, a célula

1 é eliminada por apoptose (PUCCI; KASTEN; GIORDANO, 2000; WILLIAMS et al.,
2 2011; SENTURK, 2016).

3 De forma geral, quando as células em fase quiescente (G0) entram
4 em processo de divisão em resposta a sinais extracelulares, as células passam para
5 a fase G1. Nesta fase, é requerida a regulação por proteínas chamadas ciclinas, e
6 enzimas associadas, as quinases dependentes de ciclina (CDKs), como as ciclinas
7 D-CDK4, ciclina CDK6 e ciclina E-CDK2. Os complexos CDK-ciclina fosforilam
8 proteínas-alvo cruciais que impulsionam a célula através do ciclo celular. Ao passar
9 a fase G1, para a célula prosseguir com o ciclo e entrar na fase S (síntese), durante
10 a qual a replicação do DNA ocorre, é requerido a ativação das ciclinas A-CDK1 e A-
11 CDK2, quinases mitóticas que controlam o ciclo do centróssomo (principal centro
12 organizador de microtúbulos celular) e a formação do fuso mitótico (EYMIN;
13 GAZZERI, 2010; KUMAR et al., 2014; SENTURK, 2016). Paralelamente à replicação
14 do DNA, o ciclo do centróssomo também se inicia no final da fase S e prossegue até
15 a fase inicial de G2 e se separam para formar os pólos do fuso mitótico no início da
16 mitose (EYMIN; GAZZERI, 2010).

17 A transição G1-S é um estágio crítico, pois a célula passa por um
18 processo conhecido como ponto de restrição. Este processo é executado por duas
19 famílias de inibidores de CDK, os inibidores INK, compostos de p16, p15, p18 e p19,
20 agem sobre ciclina D-CDK4 e ciclina D-CDK6, e a outra família composta de três
21 inibidores, p21, p27 e p57, podem inibir todas as CDKs e, assim impedir a
22 progressão do ciclo celular caso haja algum problema. Se não existir nenhum defeito
23 ou o mesmo for reparado, o ciclo progride para a fase G2/M (WILLIAMS et al., 2011;
24 KUMAR et al., 2014; SENTURK, 2016).

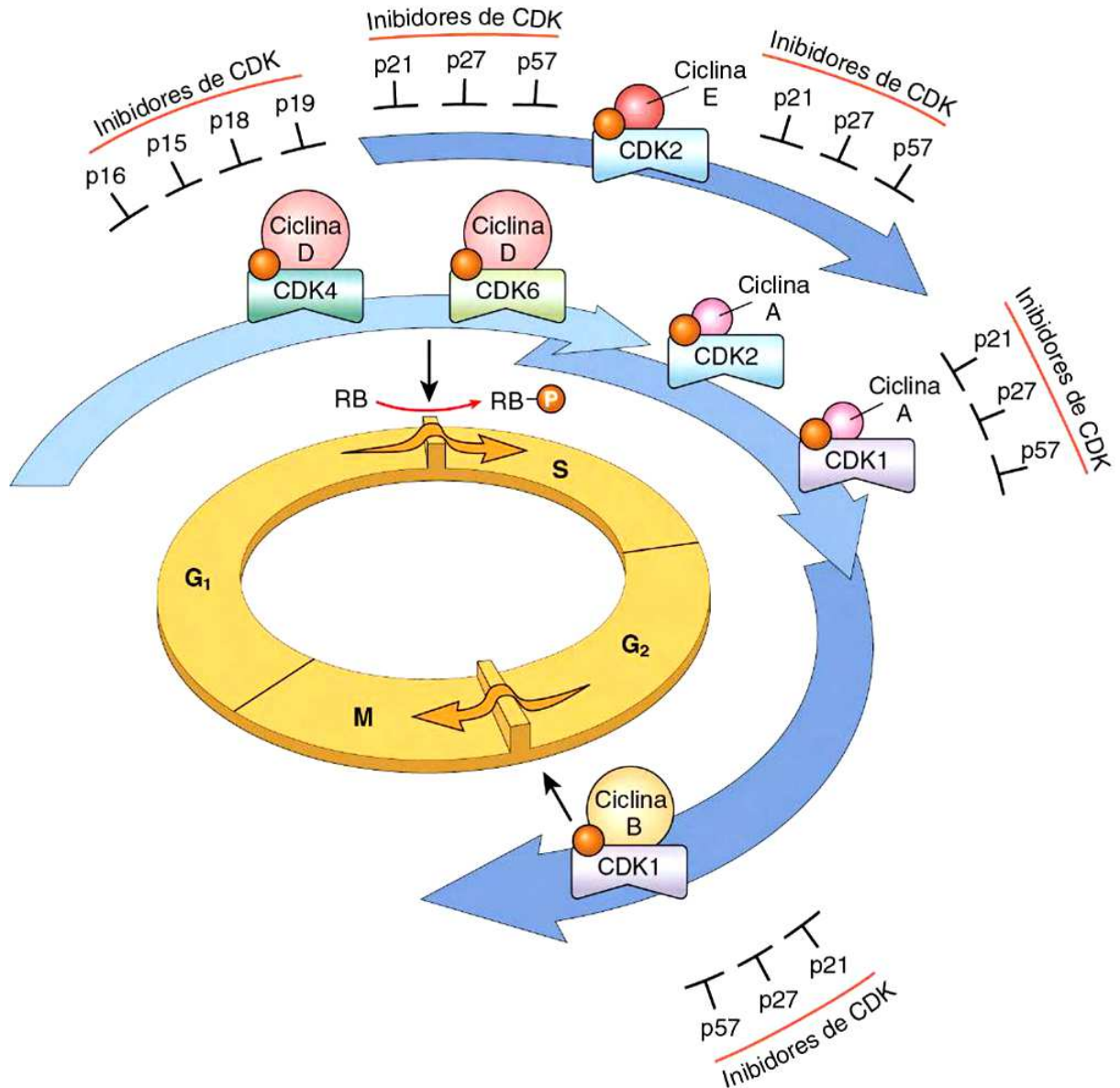
25 Em G2/M, a ciclina A é degradada e os complexos ciclina B-CDK1
26 são ativados para permitir a progressão através da fase M. A ciclina B-CDK1, ao
27 passar por um segundo ponto de checagem, mediado por p21, p27 e p57, as células
28 normais se tornam irreversivelmente comprometidas com a replicação do DNA,
29 promovendo a condensação cromossômica e a montagem do fuso. A citocinese
30 ocorre após a degradação da ciclina B1. Após a divisão, a célula volta ao seu estado
31 quiescente e os níveis de ciclina diminuem rapidamente (**Figura 4**). No entanto, se a
32 célula não conseguir reparar o seu dano, a célula pode entrar em senescência
33 (interrupção permanente do ciclo) induzida por p53 ou sofrer apoptose direcionada

1 pela proteína (EYMIN; GAZZERI, 2010; KUMAR et al., 2014; OTTO; SICINSKI,
 2 2017).

3

4 **Figura 4.** - Papel das ciclinas, quinases dependentes de ciclina (CDKs) e inibidores
 5 de CDK na regulação do ciclo celular.

6



7

8

9 **Fonte:** KUMAR, Vinay et al. **Robbins and Cotran pathologic basis of disease,**
 10 **professional edition e-book.** Elsevier health sciences, 2014. As setas sombreadas representam as
 11 fases do ciclo celular durante o qual os complexos ciclina-CDK estão ativos. Conforme ilustrado,
 12 ciclina D-CDK4, ciclina CDK6 e ciclina E-CDK2 regulam a transição G₁ para S por fosforilação da
 13 proteína Rb (pRb). A ciclina A-CDK2 e a ciclina A-CDK1 estão ativas na fase S. A ciclina B-CDK1 é
 14 essencial para a transição de G₂ para M. Duas famílias de inibidores de CDK podem bloquear a
 atividade de CDKs e a progressão através do ciclo celular. Os chamados inibidores INK4, compostos

1 de p16, p15, p18 e p19, agem sobre ciclina D-CDK4 e ciclina D-CDK6. A outra família de três
2 inibidores, p21, p27 e p57, pode inibir todas as CDKs.

3
4 A proteína p53 controla a proliferação celular atuando no ponto de
5 checagem na fase G1/S, conteúdo 2N de DNA, e no ponto de checagem G2/M,
6 conteúdo 4N de DNA. Estímulos desfavoráveis à divisão celular, incluindo danos no
7 DNA, hipóxia, privação de nucleotídeos ou drogas quimioterápicas ativam a resposta
8 da proteína p53 que resulta na expressão de muitas proteínas, como a p21, para
9 reparar o DNA. O ponto de verificação G1/S é dependente de p53, portanto, uma
10 parada na fase G1 é decorrente do aumento da expressão de p21 e a consequente
11 inibição da ciclina D/CDKs, de forma a interromper a progressão do ciclo celular e
12 impedir a replicação do DNA danificado (PUCCI; KASTEN; GIORDANO, 2000;
13 WILLIAMS et al., 2011; SENTURK, 2016).

14 No entanto, numerosos estudos demonstraram que p53 também
15 funciona no ponto de verificação G2/M. A capacidade de p53 induzir uma parada no
16 ponto de verificação de G2 é específica para cada tipo celular. Esta parada parece
17 ser ativada quando a duplicação de DNA é bloqueada, sendo que a parada do ciclo
18 ocorre através da diminuição da transcrição da ciclina B-CDK1 (PUCCI; KASTEN;
19 GIORDANO, 2000; WILLIAMS et al., 2011; SENTURK, 2016).

20 Em vista dessas atividades, o gene TP53 é de grande importância
21 para o controle da carcinogênese (SENTURK, 2016; OTTO; SICINSKI, 2017). Em
22 cancer de pulmão foram encontrados ainda, níveis de ciclinas B/CDK1 elevados,
23 especialmente em CCE, e este achado é indicativo de pior prognóstico ao paciente,
24 pois estão relacionados à indiferenciação, invasão e alto índice proliferativo das
25 células tumorais (EYMIN; GAZZERI, 2010; OTTO; SICINSKI, 2017). Aberrações no
26 controle do ciclo celular são uma característica dos tumores de pulmão, portanto, a
27 modulação dos reguladores do ciclo celular pode ter um uso importante para o
28 tratamento desses cânceres (KUMAR et al., 2014; OTTO; SICINSKI, 2017).

29 PARAGRAFO LINKANDO

30 **1.3.2 Autofagia**

31
32 A autofagia é um mecanismo celular de degradação, no qual
33 proteínas e organelas são envoltas em vesículas intracelulares especializadas e são
34 então decompostas por proteases lisossomais, para reciclagem e fornecimento de

1 nutrientes à célula. Em situações fisiológicas, a autofagia está sempre ocorrendo em
2 níveis basais, funcionando como um sistema controlado para manter a homeostase.
3 Entretanto, este processo é ativado em resposta ao estresse celular, como a
4 privação de nutrientes, hipóxia, estresse de retículo endoplasmático, estresse
5 oxidativo ou o tratamento com certos agentes tóxicos, que desencadeiam uma via
6 pró-sobrevivência, evitando a morte celular (RADOGNA; DICATO; DIEDERICH,
7 2015; LALAOUI et al., 2015).

8 Existem três tipos de autofagia que culminam em degradação
9 lisossomal: (1) a macroautofagia (referida como autofagia) caracterizada pela
10 formação de autofagossomos; (2) microautofagia, onde o material citosólico é
11 diretamente englobado pelo lisossomo; e (3) autofagia mediada por chaperonas, na
12 qual ocorre a translocação de determinadas proteínas para o lúmen lisossomal
13 através da membrana, resultando no desenrolamento das proteínas e sua
14 degradação. Sendo que dentre elas, a macroautofagia é a mais extensivamente
15 estudada (RADOGNA; DICATO; DIEDERICH, 2015; LALAOUI et al., 2015).

16 Neste contexto, a macroautofagia é caracterizada pela formação do
17 autofagossomo, um vacúolo autofágico de membrana dupla, que sequestra
18 proteínas citoplasmáticas, mitocôndrias, retículo endoplasmático, e ribossomos para
19 a degradação por enzimas hidrolases lisossomais após a fusão com o lisossoma,
20 formando então, o autofagolisossomo. Os produtos de degradação gerados,
21 incluindo nucleotídeos, aminoácidos, ácidos graxos e açúcares, podem então ser
22 reciclados para o metabolismo celular geral, garantindo a sua sobrevivência
23 (RADOGNA; DICATO; DIEDERICH, 2015; LALAOUI et al., 2015).

24 Ainda não foi totalmente esclarecido se a autofagia é contrária ou
25 favorável ao surgimento dos tumores, pois pode agir tanto como mecanismo de
26 *prosurvival*, quanto *prodeath*. Neste contexto, o seu papel na promoção da
27 carcinogênese é dado pela garantia de sobrevivência através da reciclagem
28 lisossomal de nutrientes intracelulares. Isso pode provocar o desenvolvimento de
29 mudanças adaptativas na expressão gênica e na atividade metabólica, além de
30 promover evasão de quimioterapia. No entanto, a autofagia também pode atuar na
31 supressão da carcinogênese, onde as células cancerígenas incapazes de sofrer
32 apoptose são eliminadas pela degradação autofágica. Além disso, algumas células
33 cancerígenas são dependentes de um bloqueio da autofagia para manutenção do
34 seu fenótipo maligno (JABOIN; HWANG; LU, 2009; LIU et al., 2017). Em geral, a

1 autofagia protege as células tumorais durante a quimioterapia, levando à resistência
2 ao câncer (LI et al., 2017).

3 **1.3.3 Morte celular**

4 **1.3.3.1 Apoptose**

5

6 Como mencionado previamente, quando detectada alguma falha no
7 processo de proliferação, as células são direcionadas à morte, de forma a impedir a
8 propagação de anomalias. Diferentes tipos de morte celular foram descritos, dos
9 quais destacam-se apoptose e necrose, passíveis de distinção por diferenças
10 morfológicas e moleculares (LIU et al., 2017).

11 A apoptose ou morte celular programada é um processo fisiológico
12 que promove de maneira eficaz a remoção de células em excesso ou danificadas,
13 sem a geração de resposta inflamatória, garantindo assim a homeostase do tecido.
14 A apoptose é o principal tipo de morte celular que ocorre quando o dano ao DNA é
15 irreparável e pode ser ativada de duas maneiras, pela via intrínseca ou mitocondrial
16 e pela via extrínseca ou do receptor de morte. A via intrínseca é desencadeada pela
17 perda do potencial de membrana mitocondrial e pelo seu rompimento decorrentes de
18 danos no DNA causados por agentes citotóxicos, o que resulta na liberação do
19 citocromo C no citoplasma. A via extrínseca é mediada por receptores
20 transmembranares, chamados de receptores de morte, que são membros da
21 superfamília do gene do receptor do fator de necrose tumoral (TNF) (PATEL et al.,
22 2012; PORE; HILTERMANN; KRUYT, 2013).

23 O termo apoptose descreve um processo de morte celular, cujas
24 alterações incluem arredondamento da célula, redução do volume celular (picnose),
25 formação de bolhas na membrana plasmática (*blebbing*), perda de adesão celular,
26 condensação nuclear e, por fim, fagocitose por macrófagos residentes. As alterações
27 moleculares observadas neste processo correspondem à exposição de
28 fosftidilserina, fragmentação oligonucleossomal de DNA, ativação de caspases,
29 perda do potencial de membrana mitocondrial com manutenção da integridade da
30 membrana plasmática (JIMÉNEZ-RUIZ et al., 2010; PATEL et al., 2012).

31 Evidências acumuladas mostraram que a expressão anormal de
32 alguns fatores regulatórios da apoptose pode levar ao câncer, indicando as
33 intrincadas relações entre apoptose e câncer, como por exemplo, a molécula Bcl-2, a

1 qual é superexpressa em muitos tipos de células cancerígenas e o seu aumento
2 ainda conduz a resistêcia a fármacos quimioterapêuticos e terapia de radiação
3 (OUYANG, 2012).

4 5 **1.3.3.2 Necrose**

6
7 O processo de morte celular por necrose ocorre pela resposta a
8 muitos tipos de danos, como trauma, infarto, toxinas, e, portanto, é normalmente o
9 resultado de um processo patológico. Por este motivo, a necrose foi considerada
10 morte celular quase "acidental", um processo aleatório e descontrolado (ELMORE,
11 2007; JABOIN; HWANG; LU, 2009; LIU et al., 2017).

12 No entanto, atualmente se sabe que a necrose também pode
13 funcionar como um modo alternativo programado de morte celular, desencadeada
14 pelos mesmos sinais de morte que induzem a apoptose, passando a ser
15 denominada de necroptose (NIKOLETOPOULOU et al., 2013; PASPARAKIS &
16 VANDENABEELE, 2015). O termo "necroptose" foi posteriormente introduzido para
17 descrever os casos em que a necrose representava uma forma de morte regulada e
18 programada, em vez de uma morte acidental, e ainda distinta da apoptose. No
19 entanto, os eventos de sinalização deste processo de morte permanecem pouco
20 caracterizados (NIKOLETOPOULOU et al., 2013).

21 As principais alterações morfológicas que ocorrem com a necrose
22 incluem inchaço celular, formação de vacúolos citoplasmáticos, retículo
23 endoplasmático distendido, formação de bolhas citoplasmáticas, mitocôndrias
24 condensadas, inchadas ou rompidas, desagregação e desprendimento dos
25 ribossomos, membranas organelares rompidas, lisossomas inchados e rompidos, e,
26 finalmente, a ruptura da membrana celular. Essa perda de integridade da membrana
27 celular resulta na liberação do conteúdo citoplasmático no tecido circundante,
28 enviando sinais quimiotáticos com eventual recrutamento de células inflamatórias
29 (ELMORE, 2007; ROCK; KONO, 2008). Além disso, a inflamação local subsequente
30 induzida pela necrose pode promover o crescimento do tumor e correlaciona-se com
31 mau prognóstico em tumores sólidos (NIKOLETOPOULOU et al., 2013).

32 33 **1.4 Tratamento**

34

1 O câncer é considerado um importante problema de saúde em todo
2 o mundo, sendo associado, principalmente ao envelhecimento da população e ao
3 estilo de vida. Em vista disso, o diagnóstico precoce juntamente com o acesso
4 universal aos cuidados de saúde e desenvolvimento de novas terapias, resultou
5 numa melhoria significativa da sobrevivência das pessoas afetadas. Atualmente, as
6 principais terapias aplicadas no tratamento do câncer incluem cirurgia, radioterapia e
7 quimioterapia (URRUTICOECHEA et al., 2010; PALUMBO et al., 2013). A maioria
8 das terapias antitumorais é baseada em drogas quimioterápicas com efeitos
9 citotóxicos, que causam a morte de células tumorais por dano direto ao DNA ou por
10 inibição da divisão celular. Infelizmente, essas drogas são em sua maioria
11 inespecíficas, portanto, sua administração frequentemente causa toxicidade tecidual
12 prolongada (GALLUZZI et al., 2012; SHEN et al., 2012; SARIN et al., 2017).

13 No câncer de pulmão, cerca de 70% dos pacientes apresentam a
14 doença localmente avançada ou metastática no momento do diagnóstico.
15 Aproximadamente 40% dos pacientes com CPCNP que são diagnosticados
16 geralmente encontram-se já em estágio avançado da doença (ZAPPA; MOUSA,
17 2016). No estágio avançado, o tratamento quimioterápico disponibilizado ocorre
18 através da administração de químicos à base de platina, como a cisplatina e
19 carboplatina (SECHLER et al., 2013).

20 A cisplatina, é um importante medicamento de primeira linha para o
21 tratamento de vários tumores malignos humanos, incluindo o câncer de pulmão. O
22 mecanismo antineoplásico preciso da cisplatina ainda permanece não
23 completamente compreendido (SARIN et al., 2017). Estudos relatam que a cisplatina
24 passa por reações de substituição antes de chegar ao interior celular, principalmente
25 por hidrólise, substituindo os ligantes cloreto (FONTES et al., 2005; JAIN et al.,
26 2017). Posteriormente, seu alvo de ação é a molécula de DNA, formando ligações
27 intrafita, interfita e intermolecular, e induzindo danos irreversíveis. Estes danos
28 fazem com que a célula seja incapaz de se replicar, e, portanto, causar à morte
29 celular (REEDIJK et al., 1987; PAGE 2012; JAIN et al., 2017). No entanto, seu uso
30 induz efeitos adversos nos pacientes, como toxicidade renal, náusea e vômito
31 (DASARI; TCHOUNWOU, 2014).

32 Embora a cisplatina possua efeito antitumoral mais eficaz,
33 principalmente em uma resposta inicial do tratamento, com o seu uso extenso as
34 células tornam-se resistentes, pois sua utilização causa alterações na captação

1 celular, efluxo da droga, aumento da biotransformação e desintoxicação no fígado,
2 inibição da apoptose e aumento do reparo do DNA, e com isso, a terapia é limitada e
3 muitas vezes fracassada (GALLUZZI et al., 2012; SHEN et al., 2012; DASARI;
4 TCHOUNWOU, 2014; SARIN et al., 2017).

5 A carboplatina, por sua vez, é comumente utilizada como tratamento
6 de câncer de ovário, cabeça, pescoço e pulmão. A carboplatina apresenta menor
7 reatividade e menor cinética de ligação ao DNA, além disso, também exibe menor
8 taxa de excreção e, portanto, seus efeitos são mais duradouros (meia-vida de 30
9 horas) em comparação com a cisplatina (1,5 a 3,6 horas). O maior benefício da
10 carboplatina é a redução dos efeitos colaterais, particularmente a eliminação dos
11 efeitos nefrotóxicos. No entanto, o tratamento com a carboplatina promove ação
12 supressora na medula óssea, o que resulta na redução das células sanguíneas e
13 plaquetas, com até 10% dos seus níveis normais de produção, além de ser menos
14 eficaz contra as células tumorais dependendo do tipo de câncer tratado.

15 Neste contexto, tem sido cada vez mais estudada a utilização de
16 compostos que possam atuar como agentes terapêuticos sobre o câncer de pulmão,
17 devido à alta letalidade e à todas as complicações encontradas no tratamento desta
18 doença. Por muitos anos, compostos fenólicos têm sido intensamente estudados por
19 seus efeitos antitumorais, pró-apoptóticos, anti-angiogênicos e quimiopreventivo no
20 câncer e em diversas doenças (BASLI; BELKACEM; AMRANI, 2017). Estes
21 compostos correspondem a uma diversificada família de fitoquímicos classificados
22 em vários subgrupos, como fenóis simples, lignanas, fenilpropanóides, flavonóides,
23 cumarinas, e ligninas, e são produzidos a partir do metabolismo secundário das
24 plantas. Além disso, possuem diversidade química, a qual é correspondida por seu
25 papel variado na planta, seja suprimindo o crescimento de plantas concorrentes
26 próximas ou fornecendo proteção contra herbívoros e patógenos. Desta maneira,
27 acredita-se que compostos biossintetizados obtidos a partir dos compostos fenólicos,
28 possam exercer atividades antiproliferativa e quimiopreventiva para o câncer de
29 pulmão.

30

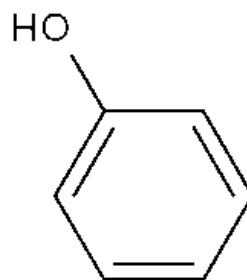
31 **2. COMPOSTOS FENÓLICOS**

32

33 Os compostos fenólicos compreendem um ou mais anéis aromáticos com
34 grupos hidroxila (OH) ligados nas estruturas químicas (**Figura 5**) (WANG et al.,

1 2015; GRIGORE, 2017; TELLES; KUPSKI; FURLONG, 2017). A síntese destes
2 compostos ocorrem naturalmente no metabolismo secundário das plantas, atuando
3 em processos fisiológicos e morfológicos, tais como mecanismos de defesa,
4 estrutura da parede celular, interação com fitohormônios, proteínas e enzimas,
5 sequestro de radicais livres e sinalização para expressão gênica (GRIGORE, 2017;
6 PETROPOULOS et al., 2018). Estes compostos são frequentemente encontrados
7 ligados a açúcares (glicosídeos), assim, tendem a ser solúveis em água (ROSS;
8 KASUM, 2002; MURADOR et al., 2018). Além disso, contribuem de forma
9 significativa para o sabor, cor e odor das plantas (PETROPOULOS et al., 2018).

10
11 **Figura 5** - Estrutura química dos fenóis.



12
13 **PHENOL**

14
15 Atualmente, o interesse pela utilização de compostos fenólicos no câncer
16 tem aumentado cada vez mais, principalmente devido à sua estrutura química
17 diversificada e ampla atividade biológica, pois diversos estudos tem demonstrado
18 que estes compostos atuam de forma anti-inflamatória, incluindo inibição de
19 citocinas, quimiocinas, função plaquetária, entre outras (JIANG; ESPANANDO,
20 2003), anti-angiogênica, impedindo o desenvolvimento de novos vasos sanguíneos
21 (WAHLE et al., 2010), inibem a iniciação, progressão e disseminação do cancer *in*
22 *vitro* e *in vivo* (WAHLE et al., 2010; ANANTHARAJU et al., 2016).

23 Neste contexto, foi relatado que dois compostos fenólicos (hydroxybenzoic
24 acids and protocatechuic acid) exibiram ação citotóxica dependente da concentração
25 em células PC-3 (câncer de próstata) e MCF-7 (câncer de mama), reduzindo a
26 proliferação (KASSI et al., 2014; ANANTHARAJU et al., 2016). Além disso, os

1 compostos fenólicos foram capazes de reduzir o potencial de membrana
2 mitocondrial, promover a geração de espécies reativas de oxigênio, aumentar os
3 níveis de lactato desidrogenase, bloquear a replicação celular na fase G2/M e induzir
4 a morte por apoptose em linhagens celulares de câncer de mama (MDA-MB-231 e
5 MCF-7) (ANANTHARAJU et al., 2016), por outro lado, não se mostraram tóxicos ao
6 organismo de ratos F344, mesmo em doses altas (NIHO et al., 2001).

7 Dentre os compostos fenólicos, o 2,6-dimetoxifenol (2,6-DMP) é um produto
8 natural que possui em sua estrutura química uma hidroxila e dois grupos metoxi (2 e
9 6) ligados ao anel aromático. O 2,6-DMP é encontrado na composição da lignina e é
10 liberado por meio da degradação da mesma (ARESKOGH et al., 2010). Este
11 composto é usado como substrato para o mensuramento da atividade de lacase
12 (ADELAKUN et al., 2012b).

13 A lignina é um constituinte integral em todas as plantas vasculares e uma
14 importante fonte alternativa de combustível e matéria-prima química (RAGAUSKAS
15 et al., 2014; DE GONZALO et al., 2016). É considerada um complexo de polímeros
16 que são encontrados em madeiras fornecendo força e rigidez às plantas e é
17 bastante resistente à degradação, conferindo proteção contra a hidrólise da celulose
18 e da hemicelulose (DE GONZALO et al., 2016). Diversas indústrias utilizam os
19 polissacarídeos vegetais para queimarem a lignina e assim gerar a energia
20 necessária para transformar de maneira produtiva a biomassa vegetal (produto mais
21 abundante e renovável) (RAGAUSKAS et al., 2014; DE GONZALO et al., 2016).
22 Assim, para obter essa biomassa, duas enzimas modificadoras de lignina bacteriana,
23 as peroxidases e lacases, promovem a sua degradação, e posteriormente resultam
24 na geração de combustível, compostos de alimentos e aromas, componentes
25 farmacêuticos e também catalizam a síntese de diversos compostos fenólicos (DE
26 GONZALO et al., 2016).

27 As lacases são enzimas polifenol oxidases, que podem ser obtidas a partir
28 de fungos, plantas, insetos e bactérias (WAN; DU; MIYAKOSHI, 2008;
29 CANNATELLI; RAGAUSKAS, 2017). Estas enzimas oxidam uma extensa variedade
30 de compostos fenólicos, promovendo a formação de derivados que podem
31 apresentar propriedades bioativas potencializadas em relação aos substratos de
32 origem (MOGHARABI; FARAMARZI, 2014; CANNATELLI; RAGAUSKAS, 2017). A
33 oxidação do ácido ferúlico catalisada por lacase levou a formação de derivados
34 fenólicos com maior atividade antioxidante (ADELAKUN et al., 2012a). Na oxidação

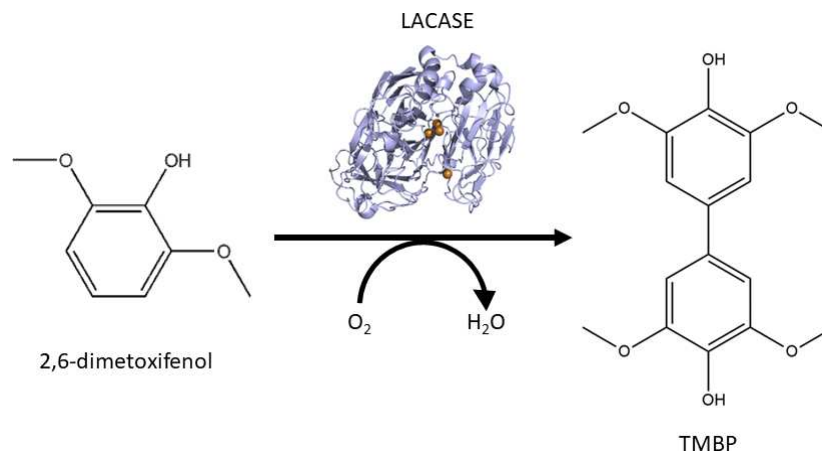
do 2,6-dimetoxifenol catalisada por lacases, o composto bifenólico formado, 3,3',5,5'-tetrametoxibifenil-4,4'-diol (TMBP), apresentou potencial antioxidante superior ao substrato. (ADELAKUN et al., 2012b; SCHIRMANN et al., 2018).

2.1 3,3',5,5'-tetrametoxibifenil-4,4'-diol (TMBP)

Compostos fenólicos são encontrados naturalmente em plantas, mas a obtenção de compostos dessa classe também pode ser alcançada por diferentes metodologias de síntese. A biocatálise, é uma metodologia baseada no uso de enzimas para a transformação estrutural de moléculas. Na biocatálise de compostos fenólicos por lacases é possível a síntese de moléculas estruturalmente diversas. Dentre os compostos fenólicos que podem ser sintetizados por catálise enzimática está o 3,3',5,5'-tetrametoxibifenil-4,4'-diol (TMBP).

O TMBP, é um composto bifenólico, que pode ser sintetizado através da oxidação do 2,6-dimetoxifenol catalisada pela enzima lacase, produzida pelo fungo ascomycetes *Botryosphaeria rhodina* MAMB-05 (*B. rhodina*) (Figura 6) (SCHIRMANN et al., 2018; SCHIRMANN et al., 2019). Do ponto de vista estrutural, o TMBP é composto por dois anéis aromáticos, duas hidroxilas e quatro grupos metoxilas (RIZWANUL FATTAH et al., 2014), conferindo à molécula propriedades antioxidantes (FOTI et al., 1996; RICE-EVANS; MILLER; PAGANGA, 1996; SOARES, 2002; SCHIRMANN et al., 2018; SCHIRMANN et al., 2019).

Figura 6: Biossíntese do 3,3',5,5'-tetrametoxibifenil-4,4'-diol (TMBP).



Fonte: Adaptado de: Schirmann et al., (2019).

1 Os compostos bifenólicos apresentam estruturas químicas interessantes,
2 que podem ser encontradas em moléculas naturais bioativas. Muitos destes
3 compostos possuem diferentes propriedades biológicas, desde atividade
4 antioxidante, até mesmo atividade antitumoral (QUIDEAU & FELDMAN, 1996; VON
5 NUSSBAUM et al., 2006).

6 Neste contexto, estudos usando compostos bifenólicos têm
7 mostrado ações fungicida (KOBAYASHI et al., 1994; BANG et al., 2000), bactericida
8 (KOBAYASHI et al., 1994; HAWKSHAW; KIAMANESH; WALTON, 2008),
9 antiinflamatória (MURAKAMI et al., 2009; UTA et al., 2018), antioxidante
10 (RAMACHANDRAN et al., 2017), antiproliferativa e antitumoral (HUANG et al., 2018)
11 que foram relatadas em literatura científica.

12 Kobayashi et al., (1994) descreveu em seu estudo a obtenção de um
13 composto, nomeado dímero de guaiacol, o qual foi sintetizado a partir da catálise do
14 guaiacol utilizando a enzima peroxidase (POD) (enzima distribuída nas plantas que é
15 ativada em resposta à infecções patogênicas e lesões teciduais, além de polimerizar
16 uma gama de compostos fenólicos) e investigaram a atividade antimicrobiana do
17 composto. Assim, ao semear os microrganismos (*Bacillus subtilis*, *Escherichia coli*,
18 *Aspergillus candidus* e *Cladosporium herbarum*) e tratar com o dímero de guaiacol,
19 foi observado redução no crescimento de *B. subtilis*, *E. coli* e *A. candidus*, mas não
20 em *C. herbarum*, indicando que o composto possui atividade anti-fúngica e anti-
21 bacteriana.

22 No estudo realizado por Murakami et al., (2009) investigaram a ação
23 indutora e/ou inibitória de ciclooxigenase-2 (COX-2), proteína ativadora-1 (AP-1) e
24 fator nuclear kappa-B (NF-κB) dos compostos 4,4'-bifenol, 2,2'-bifenol e fenol sobre
25 células RAW 264.7.A estimuladas com lipopolissacarídeos (LPS). Assim, os
26 resultados obtidos mostraram que o composto 2,2'-bifenol promoveu efeitos
27 inibidores na expressão de COX-2 estimulada por LPS e na ligação de AP-1 e NF-κB
28 nas concentrações testadas (1-10 Mm), no entanto o 4,4'-bifenol, aumentou a
29 expressão de COX-2 nestas células. Já o fenol mostrou atividade antiinflamatória,
30 mas não inibiu completamente a expressão de COX-2, mesmo em concentrações
31 mais altas. Com isso, concluíram que a atividade do 2,2'-bifenol pode ser o resultado
32 da formação de um dímero derivado da oxidação deste composto e o aumento da
33 expressão de COX-2 após o tratamento com 4,4'-bifenol é possivelmente devido à
34 sua transformação para a difenilquinona citotóxica. No entanto, o mecanismo pelo

1 qual os bifenólicos inibem a expressão de COX-2 ainda não está claro e mais
2 estudos são necessários para elucidar estes mecanismos.

3 No estudo realizado por Huang et al., (2018), demonstraram que ao testar o
4 bifenólico honokiol, *in vitro*, sobre células OSCC (carcinoma de células escamosas
5 oral) foi capaz de reduzir a proliferação, bem como promover a parada do ciclo
6 celular na fase G1 e induzir apoptose. Posteriormente, ao ser administrado o
7 honokiol de forma oral em camundongos balb/c *nude* que foram enxertados
8 com células OSCC, observaram que o composto induziu apoptose e autofagia na
9 massa de tumor tratado, o que sugere atividade anti-tumoral eficaz de honokiol *in*
10 vivo. Assim, este estudo revelou que honokiol poderia ser um candidato promissor
11 na terapia do câncer bucal.

12 Na literatura tem descrito também diversas ações biológicas do 2,6-DMP
13 (usado na obtenção do TMBP sintético), como seus efeitos citotóxicos sobre a
14 linhagem HCCLM3 (human hepatocellular carcinoma) (INTISAR et al., 2013) e
15 propriedades inseticidas altamente eficiente contra larvas, *Culex quinquefasciatus*
16 Say, e adultos, *Musca domestica* L (PAVELA, 2011). No entanto, como o TMBP é
17 um dímero do 2,6-DMP é possível que apresente as mesmas ações biológicas,
18 porém com potencial maior, pois, de acordo com Adalakun et al., (2012b) ao
19 comparar os efeitos antioxidantes do 2,6-DMP e do TMBP (que também foi obtido
20 através de 2,6-DMP), foi observado atividade antioxidante duas vezes maior para o
21 TMBP que para o 2,6-DMP.

22 Em vista disso, os compostos sintéticos estão sendo cada vez mais
23 estudados por possuírem vantagens em relação aos compostos naturais, uma vez
24 que podem ser obtidos com alto rendimento e atuarem de forma específica sobre
25 determinada doença (DE SOUZA et al., 2005; VARELA et al.,2016). Além disso, a
26 síntese de compostos por biocatálise têm como benefício o uso de metodologias
27 menos tóxicas, fazendo parte de processos verdes (Schirmann et al., 2018).

28 Diante do exposto, como já apresentamos anteriormente, a atual
29 quimioterapia para o câncer de pulmão não é satisfatória, além dos quimioterápicos
30 não atuarem de forma seletiva nas células tumorais. Deste modo, o 3,3',5,5'-
31 tetrametoxibifenil-4,4'-diol (TMBP), obtido através de biocatálise, pode ter ação
32 antiproliferativa contra a linhagem celular humana A549 de adenocarcinoma
33 pulmonar, uma vez que seu núcleo bifenólico pode ser encontrado em diferentes
34 compostos naturais que apresentam atividades biológicas (QUIDEAU & FELDMAN,

1 1996; VON NUSSBAUM et al., 2006. Por conseguinte, devido à escassez de
 2 estudos com este composto, o presente trabalho propõe avaliar parâmetros
 3 biológicos eventualmente induzidos pelo TMBP nestas células, possibilitando o
 4 melhor entendimento dos mecanismos e vias de ação envolvidas.

6 3. REFERÊNCIAS

7 ACS American Cancer Society. **Non-Small Cell Lung Cancer Survival Rates,**
 8 **by Stage.** (2017) Disponível em: <[https://www.cancer.org/cancer/non-small-cell-](https://www.cancer.org/cancer/non-small-cell-lung-cancer/detection-diagnosis-staging/survival-rates.html)
 9 [lung-cancer/detection-diagnosis-staging/survival-rates.html](https://www.cancer.org/cancer/non-small-cell-lung-cancer/detection-diagnosis-staging/survival-rates.html)> acesso em:
 10 28/01/2019.

11 ADELAKUN, Oluyemisi E. et al. Laccase-catalyzed dimerization of ferulic acid
 12 amplifies antioxidant activity. **Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic**, v.
 13 74, n. 1-2, p. 29-35, 2012a.

14 ADELAKUN, Oluyemisi E. et al. Enzymatic modification of 2, 6-dimethoxyphenol
 15 for the synthesis of dimers with high antioxidant capacity. **Process biochemistry**,
 16 v. 47, n. 12, p. 1926-1932, 2012b.

17 AMINI, A.; YEH, N.; GASPAS, L. E.; KAVANAGH, B.; KARAM, S. D. Stereotactic
 18 Body Radiation Therapy (SBRT) for lung cancer patients previously treated with
 19 conventional radiotherapy: a review. **Radiation Oncology**, v. 9, n. 1, p. 210,
 20 2014.

21 ANANTHARAJU, P. G.; GOWDA, P. C.; VIMALAMBIKE, M. G. et al. An overview
 22 on the role of dietary phenolics for the treatment of cancers. **Nutrition journal**, v.
 23 15, n. 1, p. 99, 2016.

24 ARAUJO, L. H.; BALDOTTO, C.; CASTRO JR, G. DE; et al. Lung cancer in
 25 Brazil. **Jornal Brasileiro de Pneumologia**, v. 44, n. 1, p. 55–64, 2018.

26 BALDOTTO, C.; MASSON, P.; ZUKIN, M.; HENRIQUE ARAUJO, L. Mutações
 27 drivers em câncer de pulmão não-pequenas células (CPNPC). **Pulmão RJ**, v. 25,
 28 n. 2, p. 23–28, 2016.

29 BALS, R. [Cell types of respiratory epithelium: morphology, molecular biology and
 30 clinical significance]. **Pneumologie (Stuttgart, Germany)**, v. 51, n. 2, p. 142–9,
 31 1997.

32 BANG, Kyu Ho et al. Antifungal activity of magnolol and honokiol. **Archives of**
 33 **Pharmacal Research**, v. 23, n. 1, p. 46-49, 2000.

34 BASLI, Abdelkader; BELKACEM, Nassim; AMRANI, Iman. Health benefits of
 35 phenolic compounds against cancers. **Phenolic compounds–Biological**
 36 **activity.** London, UK: IntechOpen, p. 193-210, 2017.

37 BETTS, W. B.; KING, J. E. Oxidative coupling of 2, 6-dimethoxyphenol by fungi
 38 and bacteria. **Mycological research**, v. 95, n. 5, p. 526-530, 1991.

- 1 BLANCHARD, E. M. Cisplatin and solid tumors: Still working, after all these years.
2 **Journal of Solid Tumors**, v. 2, n. 1, p. 26–33, 2012.
- 3 BOFFETTA, P. Epidemiology of environmental and occupational cancer.
4 **Oncogene**, v. 23, n. 38, p. 6392–6403, 2004.
- 5 BRAMBILLA, E.; GAZDAR, A. Pathogenesis of lung cancer signalling pathways:
6 roadmap for therapies. **The European respiratory journal**, v. 33, n. 6, p. 1485–
7 1497, 2009.
- 8 BRAMBILLA, E.; TRAVIS, W. D.; COLBY, T. V.; CORRIN, B.; SHIMOSATO, Y.
9 The new World Health Organization classification of lung tumours. **European**
10 **Respiratory Journal**, v. 18, n. 6, p. 1059–1068, 2001.
- 11 BRAY, Freddie et al. Global cancer statistics 2018: GLOBOCAN estimates of
12 incidence and mortality worldwide for 36 cancers in 185 countries. **CA: a cancer**
13 **journal for clinicians**, v. 68, n. 6, p. 394-424, 2018.
- 14 CANNATELLI, Mark D.; RAGAUSKAS, Arthur J. Two decades of laccases:
15 advancing sustainability in the chemical industry. **The Chemical Record**, v. 17, n.
16 1, p. 122-140, 2017.
- 17 CAPELOZZI, V. L. Entendendo o papel de marcadores biológicos no câncer de
18 pulmão *. **J Pneumol**, v. 27, n. 6, p. 321–328, 2001.
- 19 CARTER, B. W.; GLISSON, B. S.; TRUONG, M. T.; ERASMUS, J. J. Small Cell
20 Lung Carcinoma: Staging, Imaging, and Treatment Considerations.
21 **RadioGraphics**, v. 34, n. 6, p. 1707–1721, 2014.
- 22 CHABNER, B. A.; ROBERTS, T. G. Chemotherapy and the war on cancer.
23 **Nature Reviews Cancer**, v. 5, n. 1, p. 65–72, 2005.
- 24 CHEN, X.; LU, P.; WU, Y.; et al. MiRNAs-mediated cisplatin resistance in breast
25 cancer. **Tumor Biology**, v. 37, n. 10, p. 12905–12913, 2016.
- 26 CHIA, S. K.; SPEERS, C. H.; D'YACHKOVA, Y.; et al. The impact of new
27 chemotherapeutic and hormone agents on survival in a population-based cohort
28 of women with metastatic breast cancer. **Cancer**, v. 110, n. 5, p. 973–979, 2007.
- 29 CROCE, M. V.; COLUSSI, A. G.; PRICE, M. R.; et al. Identification and
30 characterization of different subpopulations in a human lung adenocarcinoma cell
31 line (A549). **Pathology & Oncology Research**, v. 5, n. 3, p. 197-204, 1999.
- 32 DELA CRUZ, C. S.; TANOUE, L. T.; MATTHAY, R. A. Lung Cancer:
33 Epidemiology, Etiology, and Prevention. **Clinics in Chest Medicine**, v. 32, n. 4,
34 p. 605–644, 2011.
- 35 DASARI, S.; BERNARD TCHOUNWOU, P. Cisplatin in cancer therapy: Molecular
36 mechanisms of action. **European Journal of Pharmacology**, v. 740, p. 364–378,
37 2014.
- 38 DAVIDSON, M. R.; GADZAR, A. F.; CLARKE, B. E. The pivotal role of pathology

- 1 in the management of lung cancer. **Journal of Thoracic Disease**, v. 5, n. 5, p.
2 463–478, 2013.
- 3 DE SOUZA, M. V. N., FERREIRA, S. B., MENDONÇA, J. S.; et al. Métodos de
4 obtenção e aplicações sintéticas de tiazóis, uma importante classe de compostos
5 heterocíclicos. **Química Nova**, v. 28, n. 1, p. 78-83, 2005.
- 6 ELMORE, Susan. Apoptosis: a review of programmed cell death. **Toxicologic**
7 **pathology**, v. 35, n. 4, p. 495-516, 2007.
- 8 EYMIN, B.; GAZZERI, S. Role of cell cycle regulators in lung carcinogenesis. **Cell**
9 **Adhesion & Migration**, v. 4, n. 1, p. 114–123, 2010. Taylor & Francis.
- 10 FOTI, M.; PIATTELLI, M.; BARATTA, M. T.; RUBERTO, G. Flavonoids,
11 Coumarins, and Cinnamic Acids as Antioxidants in a Micellar System.
12 Structure–Activity Relationship. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v.
13 44, n. 2, p. 497–501, 1996.
- 14 GALLUZZI, L. et al. Molecular mechanisms of cisplatin resistance. **Oncogene**, v.
15 31, n. 15, p. 1869, 2012.
- 16 GAZDAR, A. F. Should we continue to use the term non-small-cell lung cancer?
17 **Annals of Oncology**, v. 21, n. Supplement 7, p. vii225-vii229, 2010.
- 18 GENNARI, A.; CONTE, P.; ROSSO, R.; ORLANDINI, C.; BRUZZI, P. Survival of
19 metastatic breast carcinoma patients over a 20-year period. **Cancer**, v. 104, n. 8,
20 p. 1742–1750, 2005.
- 21 GIARD, D. J.; AARONSON, S. A.; TODARO, G. J.; et al. In vitro cultivation of
22 human tumors: establishment of cell lines derived from a series of solid tumors.
23 **Journal of the National Cancer Institute**, v. 51, n. 5, p. 1417-1423, 1973.
- 24 GILMAN, A.; PHILIPS, F. S. The Biological Actions and Therapeutic Applications
25 of the B-Chloroethyl Amines and Sulfides. **Science**, v. 103, n. 2675, p. 409–436,
26 1946.
- 27 GOU, Lan-Ying; WU, Yi-Long. Prevalence of driver mutations in non-small-cell
28 lung cancers in the People’s Republic of China. **Lung Cancer**, v. 5, p. 1, 2014.
- 29 GRIGORE, A. Plant Phenolic Compounds as Immunomodulatory Agents.
30 **Phenolic Compounds - Biological Activity**. p.75–98, 2017.
- 31 DE GROOT, P.; MUNDEN, R. F. Lung Cancer Epidemiology, Risk Factors, and
32 Prevention. **Radiologic Clinics of North America**, v. 50, n. 5, p. 863–876, 2012.
- 33 HANAHAN, D.; WEINBERG, R. A. Hallmarks of Cancer: The Next Generation.
34 **Cell**, v. 144, n. 5, p. 646–674, 2011.
- 35 HAWKSHAW, Craig; KIAMANESH, Omid; WALTON, Ryan. The Effects of the
36 Antimicrobial Honokiol on the Intracellular pH of *Bacillus subtilis* WB746 and
37 *Escherichia coli* B23. **Journal of Experimental Microbiology and Immunology**
38 **Vol.**, v. 12, p. 14-20, 2008.

- 1 HUANG, Kao-Jean et al. Honokiol inhibits in vitro and in vivo growth of oral
2 squamous cell carcinoma through induction of apoptosis, cell cycle arrest and
3 autophagy. **Journal of cellular and molecular medicine**, v. 22, n. 3, p. 1894-
4 1908, 2018.
- 5 INCA. Instituto Nacional de Câncer José Alencar Gomes da Silva. **Câncer de**
6 **pulmão – Estatísticas, 2018.** Disponível em:
7 <<http://www1.inca.gov.br/estimativa/2018/>>. Acesso em: 22/1/2019.
- 8 INCA. Instituto Nacional de Câncer José Alencar Gomes da Silva. **Coordenação**
9 **de Prevenção e Vigilância Estimativa 2016: incidência de câncer no Brasil /**
10 Instituto Nacional de Câncer José Alencar Gomes da Silva – Rio de Janeiro:
11 INCA, 2015.
- 12 INCA. Instituto Nacional de Câncer José Alencar Gomes da Silva. **Coordenação**
13 **de Prevenção e Vigilância Estimativa 2014: Incidência de Câncer no Brasil /**
14 Instituto Nacional de Câncer José Alencar Gomes da Silva, Coordenação de
15 Prevenção e Vigilância. Rio de Janeiro: INCA, 2014.
- 16 INTISAR, A.; ZHANG, L.; LUO, H.; et al. Anticancer constituents and cytotoxic
17 activity of methanol-water extract of Polygonum bistorta L. **African Journal of**
18 **Traditional, Complementary and Alternative Medicines**, v. 10, n. 1, p. 53-59,
19 2013.
- 20 JABOIN, J. J.; HWANG, M.; LU, B. Chapter 14 Autophagy in Lung Cancer.
21 **Methods in Enzymology**, v. 453, p. 287–304, 2009. Academic Press.
- 22 JAIN, Z. J.; GIDE, P. S.; KANKATE, R. S. Biphenyls and their derivatives as
23 synthetically and pharmacologically important aromatic structural moieties.
24 **Arabian Journal of Chemistry**, v. 10, p. S2051–S2066, 2017.
- 25 JIANG, F.; DUSTING, G. J. Natural phenolic compounds as cardiovascular
26 therapeutics: potential role of their antiinflammatory effects. **Current vascular**
27 **pharmacology**, v. 1, n. 2, p. 135-156, 2003.
- 28 JIMÉNEZ-RUIZ, A. et al. Apoptotic markers in protozoan parasites. **Parasites &**
29 **vectors**, v. 3, n. 1, p. 104, 2010.
- 30 KASSI, E.; CHINOUI, I.; SPILIOTI, E.; et al. A monoterpene, unique component of
31 thyme honeys, induces apoptosis in prostate cancer cells via inhibition of NF-Kb
32 activity and IL-6 secretion. **Phytomedicine**, v. 21, n. 11, p. 1483-1489, 2014.
- 33 KELLAND, L. The resurgence of platinum-based cancer chemotherapy. **Nature**
34 **Reviews Cancer**, v. 7, n. 8, p. 573–584, 2007.
- 35 KOBAYASHI, A., KOGUCHI, Y., KANZAKI, H.; et al. Production of a new type of
36 bioactive phenolic compound. **Bioscience, biotechnology, and biochemistry**, v.
37 58, n. 1, p. 133-134, 1994.
- 38 KUMAR, A.; PUROHIT, S.; SHARMA, N. K. Aberrant DNA Double-strand Break
39 Repair Threads in Breast Carcinoma: Orchestrating Genomic Insult Survival.
40 **Journal of Cancer Prevention**, v. 21, n. 4, p. 227–234, 2016.

- 1 KUMAR, V.; ABBAS, A. K.; FAUSTO, N.; et al. **Robbins and Cotran pathologic**
2 **basis of disease, professional edition e-book**. Elsevier health sciences, 2014.
- 3 KURIBAYASHI, K.; FUNAGUCHI, N.; NAKANO, T. Chemotherapy for advanced
4 non-small cell lung cancer with a focus on squamous cell carcinoma. **Journal of**
5 **Cancer Research and Therapeutics**, v. 12, n. 2, p. 528–534, 2016.
- 6 LALAOUI, N.; LINDQVIST, L. M.; SANDOW, J. J.; et al. The molecular
7 relationships between apoptosis, autophagy and necroptosis. In: *Seminars in cell*
8 *& developmental biology*. Academic Press, 2015. p. 63-69.
- 9 LI, Y.J.; LEI, Y. H.; YAO, N.; et al. Autophagy and multidrug resistance in cancer.
10 **Chinese journal of cancer**, v. 36, n. 1, p. 52, 2017.
- 11 LIU, G.; PEI, F.; YANG, F.; et al. Role of Autophagy and Apoptosis in Non-Small-
12 Cell Lung Cancer. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 18, n. 2, p.
13 367, 2017.
- 14 MALHOTRA, J.; MALVEZZI, M.; NEGRI, E.; LA VECCHIA, C.; BOFFETTA, P.
15 Risk factors for lung cancer worldwide. **European Respiratory Journal**, v. 48, n.
16 3, p. 889–902, 2016.
- 17 MALUMBRES, Marcos; BARBACID, Mariano. Cell cycle, CDKs and cancer: a
18 changing paradigm. **Nature reviews cancer**, v. 9, n. 3, p. 153, 2009.
- 19 VAN MEERBEECK, J. P.; FENNELL, D. A.; DE RUYSSCHER, D. K. Small-cell
20 lung cancer. **The Lancet**, v. 378, n. 9804, p. 1741–1755, 2011.
- 21 MOGHARABI, Mehdi; FARAMARZI, Mohammad Ali. Laccase and
22 laccase-mediated systems in the synthesis of organic compounds. **Advanced**
23 **Synthesis & Catalysis**, v. 356, n. 5, p. 897-927, 2014.
- 24 MOLINA, J. R.; YANG, P.; CASSIVI, S. D.; SCHILD, S. E.; ADJEI, A. A. Non-
25 Small Cell Lung Cancer: Epidemiology, Risk Factors, Treatment, and
26 Survivorship. **Mayo Clinic Proceedings**, v. 83, n. 5, p. 584–594, 2008.
- 27 MURADOR, D.; BRAGA, A. R.; DA CUNHA, D.; DE ROSSO, V. Alterations in
28 phenolic compound levels and antioxidant activity in response to cooking
29 technique effects: A meta-analytic investigation. **Critical Reviews in Food**
30 **Science and Nutrition**, v. 58, n. 2, p. 169–177, 2018.
- 31 MURAKAMI, Y.; ISHII, H.; HOSHINA, S.; et al. Antioxidant and cyclooxygenase-
32 2-inhibiting activity of 4, 4'-biphenol, 2, 2'-biphenol and phenol. **Anticancer**
33 **research**, v. 29, n. 6, p. 2403-2410, 2009.
- 34 NIHO, N.; SHIBUTANI, M.; TAMURA, T.; et al. Subchronic toxicity study of gallic
35 acid by oral administration in F344 rats. **Food and Chemical Toxicology**, v. 39,
36 n. 11, p. 1063-1070, 2001.
- 37 OUYANG, L.; SHI, Z.; ZHAO, S.; et al. Programmed cell death pathways in
38 cancer: a review of apoptosis, autophagy and programmed necrosis. **Cell**
39 **proliferation**, v. 45, n. 6, p. 487-498, 2012.

- 1 OTTO, Tobias; SICINSKI, Piotr. Cell cycle proteins as promising targets in cancer
2 therapy. **Nature Reviews Cancer**, v. 17, n. 2, p. 93, 2017.
- 3 PALUMBO, M. O.; KAVAN, P.; MILLER, W. H.; et al. Systemic cancer therapy:
4 achievements and challenges that lie ahead. **Frontiers in Pharmacology**, v. 4, n.
5 57, p. 1–9, 2013.
- 6 PANOV, S. Z. Molecular biology of the lung cancer. **Radiol Oncol**, v. 39, n. 3, p.
7 197–210, 2005.
- 8 PATEL, Vimal A. et al. Apoptotic cells, at all stages of the death process, Trigger
9 characteristic signaling events that are divergent from and dominant over those
10 triggered by necrotic cells implications for the delayed clearance model of
11 autoimmunity. **Journal of Biological Chemistry**, v. 281, n. 8, p. 4663-4670,
12 2006.
- 13 PAVELA, R. Insecticidal properties of phenols on *Culex quinquefasciatus* Say and
14 *Musca domestica* L. **Parasitology research**, v. 109, n. 6, p. 1547-1553, 2011.
- 15 PETROPOULOS, S. A.; FERNANDES, Â.; BARROS, L.; FERREIRA, I. C. A
16 comparison of the phenolic profile and antioxidant activity of different *Cichorium*
17 *spinosum* L. ecotypes. **Journal of the Science of Food and Agriculture**, v. 98,
18 n. 1, p. 183–189, 2018.
- 19 PLANKAR, M.; JERMAN, I.; KRAŠOVEC, R. On the origin of cancer: Can we
20 ignore coherence? **Progress in Biophysics and Molecular Biology**, v. 106, n.
21 2, p. 380–390, 2011.
- 22 PORE, Milind M.; HILTERMANN, T. Jeroen N.; KRUYT, Frank AE. Targeting
23 apoptosis pathways in lung cancer. **Cancer letters**, v. 332, n. 2, p. 359-368,
24 2013.
- 25 PUCCI, B.; KASTEN, M.; GIORDANO, A. Cell cycle and apoptosis. **Neoplasia**
26 **(New York, N.Y.)**, v. 2, n. 4, p. 291–299, 2000. Neoplasia Press.
- 27 RADOGNA, Flavia; DICATO, Mario; DIEDERICH, Marc. Cancer-type-specific
28 crosstalk between autophagy, necroptosis and apoptosis as a pharmacological
29 target. **Biochemical pharmacology**, v. 94, n. 1, p. 1-11, 2015.
- 30 RAMACHANDRAN, C.; WILK, B.; MELNICK, S. J.; et al. Synergistic antioxidant
31 and anti-inflammatory effects between modified citrus pectin and honokiol.
32 **Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine**, v. 2017, 2017.
- 33 RICE-EVANS, C. A.; MILLER, N. J.; PAGANGA, G. Structure-antioxidant activity
34 relationships of flavonoids and phenolic acids. **Free radical biology & medicine**,
35 v. 20, n. 7, p. 933–956, 1996.
- 36 RIZWANUL FATTAH, I. M.; MASJUKI, H. H.; KALAM, M. A.; et al. Effect of
37 antioxidants on oxidation stability of biodiesel derived from vegetable and animal
38 based feedstocks. **Renewable and Sustainable Energy Reviews**, v. 30, p. 356–
39 370, 2014.

- 1 ROCK, Kenneth L.; KONO, Hajime. The inflammatory response to cell death.
2 Annu. Rev. pathmechdis. Mech. Dis., v. 3, p. 99-126, 2008.
- 3 RODENHUIS, S.; VAN DE WETERING, M. L.; MOOI, W. J.; et al. Mutational
4 Activation of the K- ras Oncogene. **New England Journal of Medicine**, v. 317, n.
5 15, p. 929–935, 1987.
- 6 RODRIGUEZ-CANALES, Jaime; PARRA-CUENTAS, Edwin; WISTUBA, Ignacio
7 I. Diagnosis and molecular classification of lung cancer. In: **Lung Cancer**.
8 Springer, Cham, 2016. p. 25-46.
- 9 ROSKOSKI, R. Anaplastic lymphoma kinase (ALK) inhibitors in the treatment of
10 ALK-driven lung cancers. **Pharmacological Research**, v. 117, p. 343–356, 2017.
- 11 ROSS, J. A.; KASUM, C. M. DIETARY FLAVONOIDS : Bioavailability, Metabolic
12 Effects, and Safety. **Annual Review of Nutrition**, v. 22, n. 1, p. 19–34, 2002.
- 13 ROWBOTHAM, S. P.; KIM, C. F. Diverse cells at the origin of lung
14 adenocarcinoma: Table 1. **Proceedings of the National Academy of Sciences**,
15 v. 111, n. 13, p. 4745–4746, 2014.
- 16 SAMET, J. M.; AVILA-TANG, E.; BOFFETTA, P.; et al. Lung Cancer in Never
17 Smokers: Clinical Epidemiology and Environmental Risk Factors. **Clinical Cancer**
18 **Research**, v. 15, n. 18, p. 5626–5645, 2009.
- 19 SARIN, Navin et al. Cisplatin resistance in non-small cell lung cancer cells is
20 associated with an abrogation of cisplatin-induced G2/M cell cycle arrest. **PloS**
21 **one**, v. 12, n. 7, p. e0181081, 2017.
- 22 SCHIRMANN, J. G.; ANGILELLI, K. G.; DEKKER, R. F. H.; BORSATO, D.;
23 BARBOSA-DEKKER, A. M. 3,3',5,5'-Tetramethoxybiphenyl-4,4'-diol: A new
24 antioxidant enhancing oxidative stability of soybean biodiesel. **Fuel**, v. 237, p.
25 593–596, 2019.
- 26 SCHIRMANN, J. G.; DEKKER, R. F. H.; BORSATO, D.; BARBOSA-DEKKER, A.
27 M. Selective control for the laccase-catalyzed synthesis of dimers from 2,6-
28 dimethoxyphenol: Optimization of 3,3',5,5'-tetramethoxy-biphenyl-4,4'-diol
29 synthesis using factorial design, and evaluation of its antioxidant action in
30 biodiesel. **Applied Catalysis A: General**, v. 555, p. 88–97, 2018.
- 31 SCHVEIGERT, D.; KRASAUSKAS, A.; DIDZIAPETRIENE, J.; KALIBATIENE, D.;
32 CICENAS, S. Smoking, hormonal factors and molecular markers in female lung
33 cancer. **Neoplasma**, v. 63, n. 4, p. 504–9, 2016.
- 34 SECHLER, A. D.; CIZMIC, S.; AVASARALA, M.; et al. Non-small-cell lung cancer:
35 molecular targeted therapy and personalized medicine – drug
36 resistance, mechanisms, and strategies. **Pharmacogenomics and Personalized**
37 **Medicine**, v. 4, n. 6, p. 25–36, 2013.
- 38 SEMENOVA, E. A.; NAGEL, R.; BERNS, A. Origins, genetic landscape, and
39 emerging therapies of small cell lung cancer. **Genes & development**, v. 29, n.
40 14, p. 1447–62, 2015.

- 1 SHAHINIAN, V. B.; KUO, Y.-F.; FREEMAN, J. L.; GOODWIN, J. S. Risk of
2 Fracture after Androgen Deprivation for Prostate Cancer. **New England Journal**
3 **of Medicine**, v. 352, n. 2, p. 154–164, 2005.
- 4 SHEN, Ding-Wu et al. Cisplatin resistance: a cellular self-defense mechanism
5 resulting from multiple epigenetic and genetic changes. **Pharmacological**
6 **reviews**, v. 64, n. 3, p. 706-721, 2012.
- 7 SINGH, C. R.; KATHIRESAN, K. Molecular understanding of lung cancers-A
8 review. **Asian Pacific journal of tropical biomedicine**, v. 4, n. Suppl 1, p. 35–
9 41, 2014.
- 10 SMITH, M. R.; SAAD, F.; EGERDIE, B.; et al. Sarcopenia During Androgen-
11 Deprivation Therapy for Prostate Cancer. **Journal of Clinical Oncology**, v. 30, n.
12 26, p. 3271–3276, 2012.
- 13 SOARES, S. E. **Phenolic acids as antioxidants**. 2002.
- 14 SOTO-HERNANDEZ, M.; PALMA-TENANGO, M.; GARCIA-MATEOS, M. DEL R.
15 **Phenolic Compounds - Biological Activity**. InTech, 2017.
- 16 STOVER, E. H.; KONSTANTINOPOULOS, P. A.; MATULONIS, U. A.; SWISHER,
17 E. M. Biomarkers of Response and Resistance to DNA Repair Targeted
18 Therapies. **Clinical Cancer Research**, v. 22, n. 23, p. 5651–5660, 2016.
- 19 SUI, X.; SUN, Z.; AN, W.; et al. 2,4,3',4'-tetramethoxy-biphenyl induces apoptosis
20 in MGC-803 cells through a mitochondrial/caspase pathway. **Bangladesh**
21 **Journal of Pharmacology**, v. 9, n. 2, p. 235–243, 2014.
- 22 SUN, S.; SCHILLER, J. H.; GAZDAR, A. F. Lung cancer in never smokers — a
23 different disease. **Nature Reviews Cancer**, v. 7, n. 10, p. 778–790, 2007.
- 24 TELLES, A. C.; KUPSKI, L.; FURLONG, E. B. Phenolic compound in beans as
25 protection against mycotoxins. **Food Chemistry**, v. 214, p. 293–299, 2017.
- 26 TRAVIS, W. D. Pathology of Lung Cancer. **Clinics in Chest Medicine**, v. 32, n.
27 4, p. 669–692, 2011.
- 28 TRAVIS, W. D.; BRAMBILLA, E.; NOGUCHI, M.; et al. International Association
29 for the Study of Lung Cancer/American Thoracic Society/European Respiratory
30 Society International Multidisciplinary Classification of Lung Adenocarcinoma.
31 **Journal of Thoracic Oncology**, v. 6, n. 2, p. 244–285, 2011.
- 32 URRUTICOECHEA, A.; ALEMANY, R.; BALART, J.; et al. Recent Advances in
33 Cancer Therapy: An Overview. **Current Pharmaceutical Design**, v. 16, n. 1, p.
34 3–10, 2010.
- 35 UTA, Rickert et al. Anti-inflammatory properties of Honokiol in activated primary
36 microglia and astrocytes. **Journal of neuroimmunology**, v. 323, p. 78-86, 2018.
- 37 VARELA, M. T., DIAS, R. Z., MARTINS, L. F.; et al. Gibbilimbol analogues as
38 antiparasitic agents—Synthesis and biological activity against *Trypanosoma cruzi*

- 1 and Leishmania (L.) infantum. **Bioorganic & medicinal chemistry letters**, v. 26,
2 n. 4, p. 1180-1183, 2016.
- 3 WAGNER, H. Non-Small Cell Lung Cancer. **Clinical Radiation Oncology**.
4 p.805–838, 2012.
- 5 WAHLE, K. W. J.; BROWN, I.; ROTONDO, D. et al. **Plant phenolics in the**
6 **prevention and treatment of cancer**. In: Bio-Farms for Nutraceuticals. Springer,
7 Boston, MA, 2010. p. 36-51.
- 8 WALTER, M.; MARCHESAN, E. Phenolic compounds and antioxidant activity of
9 rice. **Brazilian Archives of Biology and Technology**, v. 54, n. 2, p. 371–377,
10 2011.
- 11 WAN, YunYang; DU, YuMin; MIYAKOSHI, Tetsuo. Enzymatic catalysis of 2, 6-
12 dimethoxyphenol by laccases and products characterization in organic
13 solutions. **Science in China Series B: Chemistry**, v. 51, n. 7, p. 669-676, 2008.
- 14 WANG, W.; GUO, J.; ZHANG, J.; et al. Isolation, identification and antioxidant
15 activity of bound phenolic compounds present in rice bran. **Food Chemistry**, v.
16 171, p. 40–49, 2015.
- 17 WAQAR, S. N.; MORGENSZTERN, D. Treatment advances in small cell lung
18 cancer (SCLC). **Pharmacology & Therapeutics**, v. 180, p. 16–23, 2017.
- 19 WHITE, A. C.; LOWRY, W. E. Refining the role for adult stem cells as cancer cells
20 of origin. **Trends in Cell Biology**, v. 25, n. 1, p. 11–20, 2015.
- 21 WILKE, D. R.; PARKER, C.; ANDONOWSKI, A.; et al. Testosterone and erectile
22 function recovery after radiotherapy and long-term androgen deprivation with
23 luteinizing hormone-releasing hormone agonists. **BJU International**, v. 97, n. 5, p.
24 963–968, 2006.
- 25 WORLD HEALTH ORGANIZATION (WHO) (2004). **Cancer**. Disponível
26 em:<<http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs297/en/>> acesso em
27 22/03/2017.
- 28 WORLD HEALTH ORGANIZATION (WHO); **International Association of**
29 **Cancer Registries (IACR)** (2018). Cancer today. Disponível
30 em:<<https://gco.iarc.fr/today/home>> acesso em15/01/2019.
- 31 WU, J.; WANG, Y.; LIU, G.; et al. Characterization of air-liquid interface culture of
32 A549 alveolar epithelial cells. **Brazilian Journal of Medical and Biological**
33 **Research**, v. 51, n. 2, 2018.
- 34 ZAMBONI, Mauro. Epidemiologia do câncer do pulmão. **J Pneumol**, v. 28, n. 1,
35 p. 41-7, 2002.
- 36 ZHANG, L.; ZHANG, J.; HU, C.; et al. Efficient activation of p53 pathway in A549
37 cells exposed to L2, a novel compound targeting p53–MDM2 interaction. **Anti-**
38 **cancer drugs**, v. 20, n. 6, p. 416-424, 2009.

1 ZAPPA, C.; MOUSA, S. A. Non-small cell lung cancer: current treatment and
2 future advances. **Transl Lung Cancer Res.** v. 5, n. 3, p. 288–300, Jun, 2016.

3

4 **4. OBJETIVOS**

5 **4.1 Objetivo Geral**

6

- 7 • Avaliar *in vitro* a ação citotóxica do tratamento com 3,3',5,5'-
8 tetramethoxybiphenyl-4,4'-diol sobre a linhagem tumoral humana de carcinoma
9 de pulmão de células não pequenas, A549 (adenocarcinoma pulmonar).

10

11 **4.2 Objetivos específicos**

12

- 13 • Determinar *in vitro* a viabilidade mitocondrial do TMBP em macrófagos do
14 lavado peritoneal de camundongos BALB/c.
- 15 • Avaliar *in vitro* a viabilidade hemolítica do TMBP em eritrócitos extraídos de
16 carneiro.
- 17 • Determinar *in vitro* a citotoxicidade do TMBP, bem como seu efeito citotóxico
18 ou citostático na linhagem tumoral A549.
- 19 • Analisar as alterações morfológicas das células tumorais após o tratamento
20 com TMBP.
- 21 • Avaliar alterações no potencial de membrana mitocondrial das células A549,
22 após o tratamento com TMBP.
- 23 • Avaliar se o tratamento com TMBP induz a produção de espécies reativas de
24 oxigênio na linhagem A549.
- 25 • Analisar se o TMBP é capaz de promover a regulação do ciclo celular nas
26 células A549.
- 27 • Analisar se o tratamento com TMBP promove a indução do processo
28 autofágico nas células A549.
- 29 • Caracterizar *in vitro* os mecanismos de morte envolvidos durante a ação
30 direta deste tratamento sob as células tumorais.

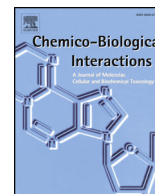
1 **5. PRODUÇÃO CIENTÍFICA**

2

3 **5.1 Artigo:** 3,3',5,5'-tetramethoxybiphenyl-4,4'diol induces cell cycle arrest in
4 G2/M phase and apoptosis in human non-small cell lung cancer A549 cells

5

6 Submetido e aceito na revista: Chemico-biological Interactions



3,3',5,5'-tetramethoxybiphenyl-4,4'-diol induces cell cycle arrest in G2/M phase and apoptosis in human non-small cell lung cancer A549 cells



Virginia Marcia Concato^{a,*}, Fernanda Tomiotto-Pellissier^{a,b}, Taylon Felipe Silva^a, Manoela Daiele Gonçalves^c, Bruna Taciane da Silva Bortoleti^{a,b}, Mariana Barbosa Detoni^a, Elaine da Silva Siqueira^a, Ana Carolina Jacob Rodrigues^a, Jéseka Gabriela Schirmann^d, Aneli de Melo Barbosa-Dekker^d, Idessania Nazareth Costa^a, Ivete Conchon-Costa^a, Milena Menegazzo Miranda-Sapla^a, Mario Sergio Mantovani^e, Wander Rogério Pavanelli^a

^a Laboratory of Immunoparasitology of Neglected Diseases and Cancer, State University of Londrina, PR, Brazil

^b Graduate Program in Biosciences and Biotechnology, Carlos Chagas Institute (ICC), Fiocruz, Curitiba, PR, Brazil

^c Laboratory of Biotransformation and Phytochemical, State University of Londrina, PR, Brazil

^d Laboratory Research of Bioactive Molecules, State University of Londrina, PR, Brazil

^e Laboratory of Toxicological Genetics, State University of Londrina, PR, Brazil

ARTICLE INFO

Keywords:

Lung cancer
Cytotoxic
Cell cycle
Reactive oxygen species
Apoptosis

ABSTRACT

Lung cancer is one of the leading causes of cancer-related death worldwide. It has aggressive manifestation, high ability to promote metastasis and late diagnosis. In the present study, we investigated the cytotoxic effect of 3,3',5,5'-tetramethoxybiphenyl-4,4'-diol (TMBP), against the A549 human non-small cell lung carcinoma lineage. The A549 cell line was treated for 72h with TMBP (12.5–200 μM) with and subsequently defined the 50% inhibitory concentration (148 $\mu\text{M} \pm 0.05$), from which tests were performed to determine the viability, volume, and regulation of the cell cycle. Finally, we investigated the death mechanisms involved in the action of the treatments by flow cytometry and fluorimetry. The TMBP-treatment of primary cells, peritoneal macrophages, and sheep erythrocytes did not reduce the viability of these cells. On the other hand, TMBP was able to reduce the viability of the investigated cell line, by cytotoxic action and to promote the reduction of cell size. Subsequently, we found that TMBP treatment was able to increase the production of reactive oxygen species, cause mitochondrial depolarization, induce cell cycle arrest in G2/M phase and lead to death by direct apoptosis. Thus, this study revealed that TMBP could be a promising candidate for the development of antitumor drugs targeting lung cancer.

1. Introduction

Lung cancer is one of the leading causes of cancer death worldwide and is responsible for causing about 1.7–1.8 million deaths annually [1]. Currently, lung carcinomas are divided into two groups, non-small cell lung cancer (NSCLC) and small cell lung cancer (SCLC) [2]. Of all the diagnosed cases of lung carcinomas, SCLC is responsible for 13–15%, being considered the most aggressive and the most invasive type to other organs [3]. On the other hand, NSCLC, a group that includes adenocarcinoma, squamous cell carcinoma and large cell carcinoma [4], account for approximately 85% of the cases and do not demonstrate responses to cytotoxic therapies [5].

Drug resistance during chemotherapy for various types of cancer is the main obstacle to treatment efficacy. Approximately 40% of patients diagnosed with NSCLC are at an advanced disease stage. In these cases, the available chemotherapy treatment is based on platinum, mainly cisplatin and carboplatin. However, the use of these drugs is associated with several toxic effects as significantly renal, auditory and neurological toxicities [6,7].

The biphenolic 3,3',5,5'-tetramethoxybiphenyl-4,4'-diol (TMBP) is a dimeric product synthesized during the biocatalysed oxidation of 2,6-dimethoxyphenol (2,6-DMF) by fungal laccase from *Botryosphaeria rhodina*. Although an antioxidant activity of TMBP has already been demonstrated, the effects of these compounds on biological models are

* Corresponding author. the Department of Pathology Science, Center of Biological Sciences, State University of Londrina, Celso Garcia Cid Highway, Pr 445 Km 380 Campus Universitário, 86057-970, Paraná, Brazil.

E-mail address: vir_93@hotmail.com (V.M. Concato).

<https://doi.org/10.1016/j.cbi.2020.109133>

Received 23 March 2020; Received in revised form 29 April 2020; Accepted 8 May 2020

Available online 24 May 2020

0009-2797/ © 2020 Elsevier B.V. All rights reserved.

Abbreviations

2,6-DMF	2,6-dimethoxyphenol
CCCP	Carbonylcyanide m-chlorophenylhydrazone
NSCLC	Non-small cell lung cancer
SCLC	Small cell lung cancer
DMSO	Dimethyl sulfoxide
ROS	Reactive Oxygen Species
H ₂ DCFDA	2',7'-dichlorofluorescein diacetate
MDC	Monodanzylcadaverine
MTT	3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide
PBS	Phosphate-buffered saline
RPM	Rotations per minute
SBF	Fetal bovine serum

TMBP	3,3',5,5'-tetramethoxybiphenyl-4,4'-diol
TMRE	Tetramethylrhodamine ethyl ester
DNA	Deoxyribonucleic acid
COX-2	Cyclooxygenase-2
AP-1	Activator protein-1
NF- κ B	Nuclear factor Kappa-B
TPSA	Molecular Polar Surface Area
ADMET	Absorption, distribution, metabolism, excretion and toxicity
hERG	Human Ether-a-go-go- Related Gene
H ₂ O ₂	Hydrogen peroxide
PI	Propidium iodide
CYP	Cytochrome
FDA	Food and drug administration

poorly understood [8,9]. Nevertheless, biphenolic compounds have chemical structures that can be found in natural bioactive molecules. Many of these compounds have several biological properties, ranging from antioxidant activity, even antiproliferative/antitumor activity [10,11], being able to induce autophagy and apoptosis in osteosarcoma cell lines (HOST and U2OS) [12], and also, inhibiting the growth of pancreatic tumors in nude mice [13].

The currently used anti-cancer therapeutic agents are associated with serious side effects, in addition to the development of resistance, there is an urgent need for new antineoplastic drugs with greater selectivity to tumor cells and less toxicity to normal tissue. In this context, the present study aimed to examine TMBP theoretical predictions of drug similarity, through the *in silico* study, and to identify cytotoxic activity against NSCLC A549 cell line (pulmonary adenocarcinoma) and primary cells. We also investigated a mechanism that would promote the death of the cell cells, as well as the type of death that the compound would induce in these cells.

2. Methods

2.1. Animals and ethics committee

This study was approved by the Animal Ethics Committee of the State University of Londrina (4496/2018.81) and all methods performed were conducted following the Arouca Guideline and all ethical international regulations. BALB/c mice were provided by the Carlos Chagas Institute/Fiocruz-PR, Curitiba, Brazil.

2.2. Cell lines and reagents

The established lineage of NSCLC A549 (lung adenocarcinoma) (kindly provided by Dr. Juliano Bordingnon - Laboratory of Molecular Virology, Carlos Chagas Institute), were cultured with DMEM culture medium (Lifetechnologies, 14Carlsbad, CA, USA) supplemented with 10% fetal bovine serum (SBF) (GIBCO, Invitrogen, New York, USA), 100 U/ml Penicillin and 100 μ g/mL Streptomycin (Santa Cruz Biotechnologies, Dallas, TX, USA) and incubated at 37 °C in 5% CO₂.

2.3. TMBP

The 3,3',5,5'-tetramethoxybiphenyl-4,4'-diol (TMBP), C₁₆H₁₈O₆ (MW: 306) was synthesized and kindly provided by Professor Dr. Aneli de Melo Barbosa-Dekker, Laboratory of Research Bioactive Molecules from the State University of Londrina. The dimer TMBP was synthesized from 2,6-DMP using laccase from *Botryosphaeria rhodina* MAMB-05 under the conditions previously described by Schirrmann and collaborators [14], resulting in a yellow solid that was identified by 1H NMR (CDCl₃, 400 MHz) δ (ppm): 3.98 (s, 12H), 6.73 (s, 4H), 5.56 (s, 2H),

Table 1

Molecular properties of TMBP based on Lipinski's and Veber's criteria.

	LIMITS	TMBP	
Lipinski's Rules	MW	≤ 500	306.31
	miLog P	≤ 5	2.44
	H-Acc	≤ 10	6
	H-Don	≤ 5	2
Veber's Rules	RB	≤ 10	5
	tPSA	≤ 140 Å ²	77.39
	H-Acc + H-Don	≤ 12	8
Number of Violations		None	

MW: molecular weight; miLog P: Log of partition-coefficient; H-Acc: number of Hydrogen bond acceptor; H-Don: number of Hydrogen bond donor; RB: number of rotatable bonds; tPSA: molecular polar surface area.

purity 99% and melting point 185–188 °C. The chemical structure of TMBP is provided in Table 1. A stock solution of TMBP was prepared in 1% dimethylsulfoxide (DMSO) (Sigma, St. Louis, MO, USA). The concentration of DMSO did not exceed 0.06% in all experiments.

2.4. *In silico* study of TMBP

For the *in silico* study, the TMBP structure was analyzed in order to theoretically evaluate some parameters. From the Molinspiration Property Calculator program (available at: www.molinspiration.com), parameters related to oral bioavailability were determined according to the Lipinski Rule of Five (Ro5), which analyzes the molecular weight (≤ 500), lipophilicity (Log P) (≤ 5), hydrogen bond acceptors (≤ 10) and hydrogen bridge donors (≤ 5) [15], followed by the analysis of the rule proposed by Veber, which evaluates number of rotary bonds (≤ 10), molecular polar surface area (TPSA) (≤ 140 Å²) and sum of hydrogen bridge donors and acceptors (≤ 12) [16].

After that, the theoretical parameters of similarity of drugs related to the oral bioavailability and absorption, distribution, metabolism, excretion, and toxicity properties were verified. These pharmacokinetic predictions were calculated using the SwissADME online database (<http://www.swissadme.ch/index.php>). The properties analyzed were blood-brain barrier penetration, human intestinal absorption and the five most important cytochrome P450 isoforms, besides assessing whether TMBP is a substrate for permeability glycoprotein (P-gp) (glycoprotein that evaluates active efflux through biological membranes) [17,18].

2.5. Non-tumor cell studies

2.5.1. Hemolytic assay

The direct membrane toxicity of the compound was tested by the

hemolytic assay using sheep erythrocytes. The sheep blood was collected with heparin, and the erythrocytes were washed three times with PBS (centrifugation at 1000 RPM for 10 min). A 2% erythrocyte suspension was prepared in PBS and treated with 25, 50, 100 and 200 μM (v/v) TMBP or 50 μM -Cisplatin (München, Germany) in the total volume of 200 μL in 96-well plates for 3h at 37 °C in 5% CO_2 . PBS was used as negative control, and as the positive control was used triton-X100 at 1%. The plates were centrifuged at 1800 rpm for 10 min and the absorbance of the supernatants was read at 550 nm.

2.5.2. Viability of peritoneal macrophages

To evaluate whether TMBP affects the viability of peritoneal macrophages, the MTT assay was performed as described by Mosmann [19]. Peritoneal macrophages (3×10^4 cells/well) were incubated with TMBP in 96-well plates (25, 50, 100, 148 and 200 μM) for 24, 48 and 72h (37 °C, 5% CO_2). The cells were washed and MTT added was added (0.05 mg/ml) with incubation for 3h. The MTT product (formazan crystals) was diluted with 100 μL of DMSO, and read in a spectrophotometer (Thermo Scientific, Multiskan GO) at 540 nm. In this study, the experimental groups were defined as follows: a control group, vehicle group (0.06% DMSO, the maximum concentration of vehicle used in treated groups), groups with TMBP concentrations described above and cisplatin group (50 $\mu\text{M}/\text{ml}$) as a positive control. The results were expressed as percentage of viability compared to the control group calculated with the following formula: % (viable cells) = (OD of TMBP-treated samples/OD control-sample) x 100.

2.6. Studies with A549 cell line

2.6.1. Cell viability assay

A549 cells (1×10^4 cell/well) were treated with TMBP (25, 50, 100 and 200 μM) and cytotoxicity evaluation occurred after 24, 48 and 72h. From the data obtained by the MTT assay, the 50% inhibitory concentration of (IC_{50}) curve was calculated by logarithmic regression, obtaining a value of 148 μM (± 0.05) after 72h of treatment. Experimental groups were defined as described in item 2.5.2.

2.6.2. Viability assay by Tripin Blue and cellular morphology

A549 cells were seeded at a density of 1×10^6 cells/well in 6-well plates. Fresh DMEM medium containing IC_{50} (148 μM) of TMBP was added and incubated for 24, 48 and 72h. For evaluation of cell viability, the suspension was diluted in 0.4% Tripin Blue solution in a 1:1 ratio. The count and measurement of cell size were determined by the automatic cell counter Countess™ (Invitrogen®). The experimental groups were defined as a control group (untreated cells) and an IC_{50} group (148 $\mu\text{M}/\text{ml}$ TMBP). In addition, representative images were captured with inverted imaging system EVOS™ (Thermo Fischer Scientific®) at 1000x magnification to observe morphological changes after 72 h treatment with TMBP IC_{50} .

2.6.3. Production of reactive oxygen species (ROS)

To evaluate the production of ROS, cells (1×10^4 cells/well) were treated with IC_{50} of TMBP per 72h in 96-well plates at 37 °C with 5% CO_2 . After incubation, the cells were washed with PBS and a solution of 10 μM 2',7'-dichlorofluorescein diacetate (H_2DCFDA) (Sigma Aldrich) was added for 45 min in the dark at 37 °C. The spectrophotometer was set at 488 nm excitation and 530 nm emission on a fluorescence microtiter reader (Victor X3, PerkinElmer, Finland). Peroxide (H_2O_2) was used as a positive control.

2.6.4. Determination of mitochondrial membrane potential ($\Delta\psi\text{m}$)

Mitochondrial membrane potential analysis was performed by tetramethylrhodamine-ethyl ester (TMRE) labeling (Sigma, St. Louis, MO, USA). Cells (1×10^4 /well) treated with IC_{50} (148 $\mu\text{M} \pm 0.05$) for 72h, washed with PBS and incubated with 25 nM TMRE for 30 min at 37 °C and analyzed at 480 nm excitation wavelength and 580 nm emission on

Table 2

ADME/TOX and pharmacological parameter assessment of TMBP predicted using SwissADME toolbox.

ADMET Properties	TMBP	Reference
Subcellular localization	Mitochondria	
P-gp substrate	No	17
Human intestinal absorption	High	18
Blood-brain barrier penetration	Penetrate	17
Predicted aqueous solubility	Soluble	17
CYP1A2	Inhibitor	17
CYP2C9	Inhibitor	17
CYP2C19	Inhibitor	17

Predictions based on: admetSAR online database developed by Cheng et al., 2012; hERG - Human Ether-a-go-go-Related Gene.

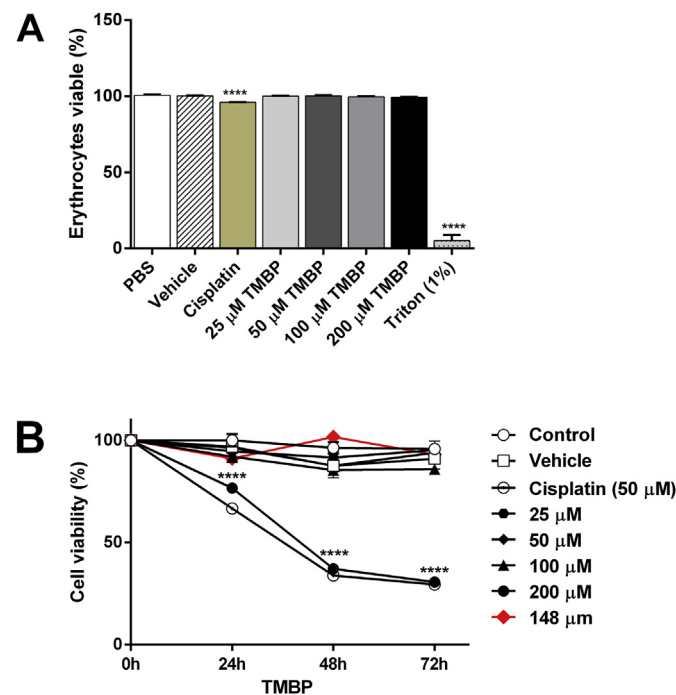


Fig. 1. TMBP does not promote lysis in sheep red blood cells and murine peritoneal macrophages. (A) Blood cells were treated with TMBP for 3h at different concentrations (25–200 μM) and the relative hemolysis rate was detected by spectrophotometer. (B) Peritoneal macrophages were treated at different concentrations (25–200 μM) for 24, 48 and 72h and the relative survival rate was determined by MTT. Values were expressed as mean \pm standard deviation. ****p \leq 0.0001 vs. control; vehicle (DMSO 0.06%). #### p \leq 0.0001 vs. cisplatin.

a fluorescence microplate reader (Victor X3, PerkinElmer, Finland). Carbonylcyanide m-chlorophenylhydrazine (CCCP) was used as a positive control.

2.6.5. Detection of lipid droplets (LD)

A549 cells (1×10^4 cells/well) were treated with TMBP- IC_{50} for 72h. Subsequently, cells were labeled with 10 $\mu\text{g}/\text{mL}$ Nile Red (Sigma Aldrich, St. Louis, MO, USA) for 30 min [20] and analyzed on the PerkinElmer Victor X3 fluorimeter using 530 and 635 nm wavelengths for excitation and emission, respectively. PBS was used as a positive control.

2.6.6. Determination of the formation of autophagic vacuoles

For quantification of autophagic vacuoles, cells (1×10^4 cells/well) treated with IC_{50} (148 $\mu\text{M}/\text{ml} \pm 0.05$) of TMBP for 72h. Afterwards, the cells were washed with PBS and incubated with monodanzylcadaverine (MDC) (50 μM) (Sigma - Aldrich, St. Louis, MO, USA).

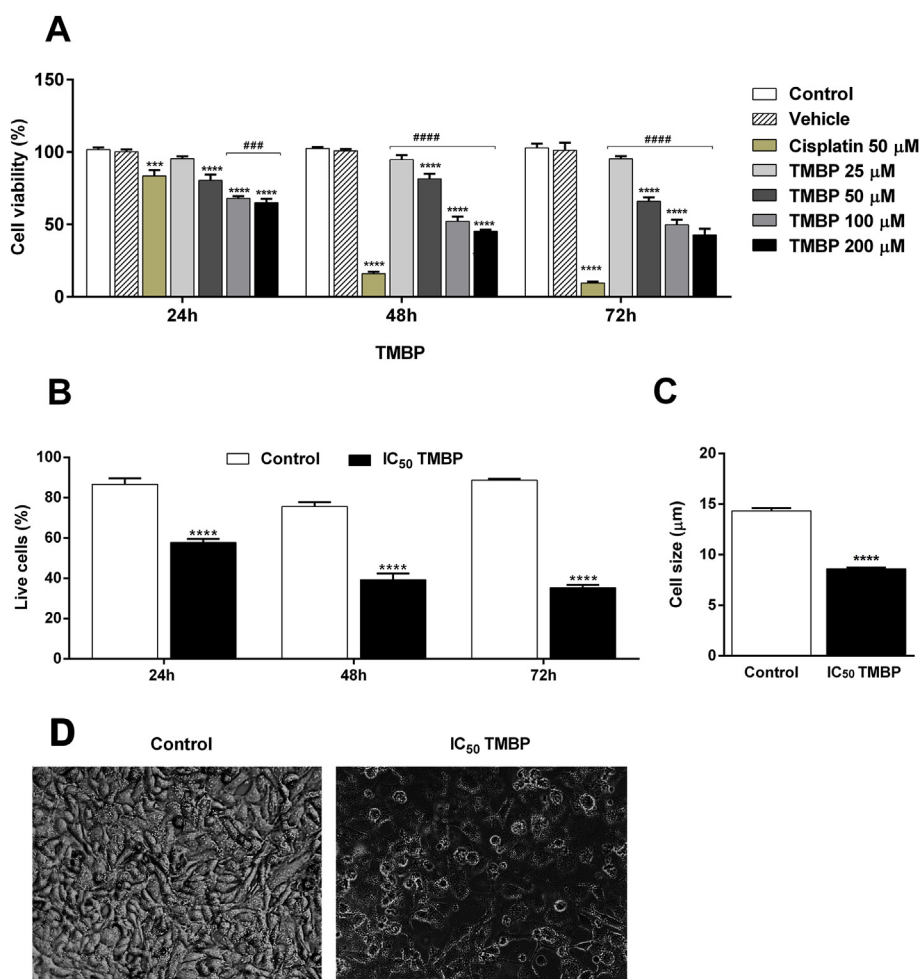


Fig. 2. Effect of different concentrations of TMBP on the viability and morphology of the A549 lineage. NSCLC cells were treated with TMBP for 24, 48 and 72h. The relative survival rate of A549 cells were detected by the MTT assay. After determination of the 50% inhibitory concentration (IC₅₀) of TMBP, the number of viable cells was counted for 24h, 48 and 72h in A549 (B) by the trypan blue exclusion method. Cell size changes were quantified and presented in panel (C) (A549), and in (D) representative images observed by light microscopy (1000x). Values were expressed as mean \pm standard deviation. ****p \leq 0.0001 vs. control; vehicle (DMSO 0.06%). ####p \leq 0.0001 vs. cisplatin. ****p \leq 0.0001 vs. positive control.

The data were obtained using a microplate fluorescence reader (Victor X3, PerkinElmer, Finland), with excitation wavelength (380 nm) and emission (525 nm). To compare the different treatments, the fluorescence values obtained were normalized to the respective number of cells. Experimental groups were defined as described in item 2.4.2.

2.6.7. Analysis of the cell cycle

A549 cells were seeded at a density of 1×10^6 cells/well in 6-well plates. Fresh DMEN medium containing IC₅₀ ($148 \mu\text{M} \pm 0.05$) of TMBP was added for 24 and 72h. Thereafter, the cell suspension was subjected to centrifugation at 1500 rpm for 5 min and the cell pellet resuspended in 300 μL of PBS. Subsequently, a solution containing 0.05% ribonuclease A (RNase A) (Sigma, St. Louis, MO, USA) was added and incubated for 30 min at 37 $^\circ\text{C}$. In the end, a solution of 0.1% sodium citrate and 1% Triton-X100 was added with 50 $\mu\text{g}/\text{ml}$ propidium iodide (PI) (Sigma, St. Louis, MO, USA) for 30 min. The fluorescence was estimated using a Muse Cell Analyzer (Merck Millipore), with 5000 events. The DNA content was analyzed, and the percentage of cells in different phases of the cycle (G1, S, and G2/M) were estimated according to the fluorescence intensity.

2.6.8. Cell apoptosis assay

A549 cells (1×10^6 cells/well) were treated with IC₅₀ of TMBP for 24 and 72h. After this treatment period, the cell suspension was washed with PBS and 50 μL of Annex in V and a dead cell kit (Millipore, Billerica, MA, USA) was added for 20 min at room temperature to determine apoptosis. Samples were analyzed using the flow cytometer Muse Cell Analyzer (Muse[®] Cell Analyzer, Merck Millipore) and the results were analyzed using the Muse Cell Analyzer[™] software.

2.7. Statistical analysis

Statistical differences were obtained after analysis of variance (ANOVA), followed by the Tukey test for multiple comparisons using GraphPad Prism 6.01 for Windows (GraphPad Software, San Diego California, USA). Data were expressed as mean \pm SEM and were considered significant differences when p-value \leq 0.05. The values were also categorized by: * (p \leq 0.05); ** (p \leq 0.01); *** (p \leq 0.001); **** (p \leq 0.0001).

3. Results

3.1. TMBP presents drug-likeness properties

The rules of Lipinski (Ro5) + Veber are good parameters for the verification of the potential use of a molecule as an oral drug. *In silico* analyzes of TMBP molecule revealed that the compound did not violate any parameters of the established rules (Table 1).

In the theoretical predictions evaluated by the ADMET program, it was observed that TMBP, according to its chemical structure, has potential to accumulate in mitochondria, has high human intestinal absorption and is not a substrate for permeability glycoprotein. On the other side, according to the theoretical prediction, TMBP has potential to blood-brain barrier penetration and high promiscuity with three CYP isoforms (CYP1A2, CYP2C9 and CYP3A4) (Table 2).

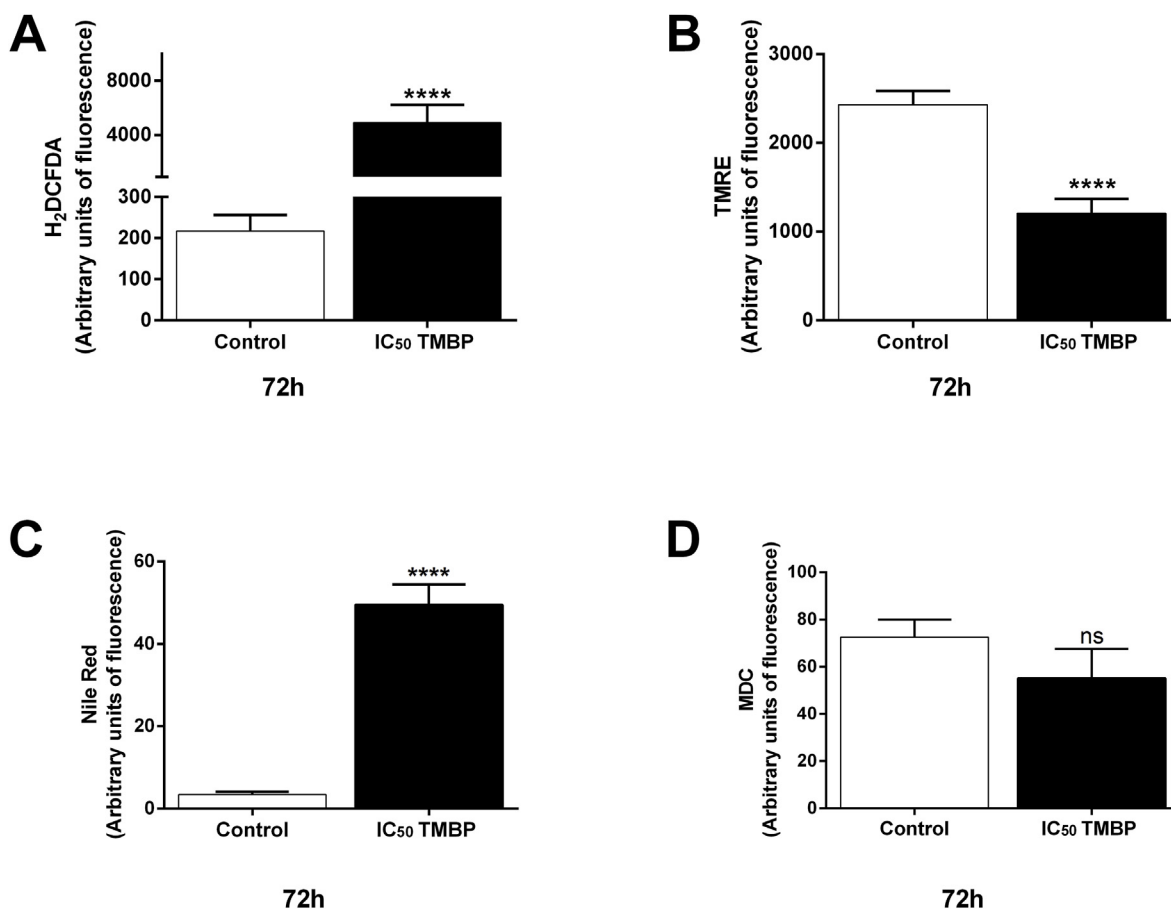


Fig. 3. Evaluation of total ROS levels, mitochondrial membrane potential, lipids droplets and autophagic vacuoles after treatment with TMBP IC₅₀ for 72h. Fluorescence intensity was quantified on A549 cells to determine total ROS (A), $\Delta\Psi_m$ (B), Lipids droplets (C) and MDC (D) in A549 cells after TMBP treatment. Values were expressed as mean \pm standard deviation. **** $p \leq 0.0001$ vs. control.

3.2. TMBP does not induce hemolysis and has low cytotoxic to murine peritoneal macrophages

Initially, TMBP was tested on two non-tumor primary cells: erythrocytes and macrophages. When evaluating the viability of erythrocytes, after 3h of treatment, the tested concentrations (12.5, 25, 50, 100 and 200 μM) did not show hemolytic activity when compared to the control group (Fig. 1a). After these data, the cellular viability of peritoneal macrophages when treated with TMBP at 24, 48 and 72h was evaluated. The TMBP-treated group at concentrations of 12.5–100 μM did not differ from the control group and only the higher concentration tested (200 μM) reduced the viability of this cell type after 24h of treatment ($p \leq 0.0001$) (Fig. 1b), as well as the treatment with cisplatin (50 μM), that reduced the cell viability at all tested times ($p \leq 0.0001$).

3.3. TMBP reduces viability, induces toxicity and alters the morphology of the A549 cell line

In order to verify the action of TMBP against the A549 cell line, we initially analyzed cell viability after 24, 48 and 72h of treatment by MTT assay. TMBP reduced the metabolically cell viability from 50 μM concentration at all times evaluated ($p \leq 0.0001$). Although this effect was not time and dose-dependent, the largest reductions occurred at 72h reducing viability by 65%, 49% and 42% at 50, 100 and 200 μM concentrations, respectively (Fig. 2a). In addition, when compared TMBP-treated groups to cisplatin, concentrations of 100 and 200 μM were found to be more effective than cisplatin in inhibiting cell growth at 24h. At 48h and 72h, this effect was not maintained.

From the viability assay described, the TMBP inhibitory

concentrations for 50% of the cells (IC₅₀) of each analyzed time were calculated. The values obtained were 325 (± 0.09), 158 (± 0.03) and 148 (± 0.05) μM , for 24, 48 and 72h, respectively. As the best effects of TMBP treatment on A549 cells were obtained in 72h, we proceeded the remaining experiments with this IC₅₀ (148 ± 0.05 μM) and this time point of treatment.

Thus, in order to complement the obtained data, we analyzed the number of viable cells determined indirectly from cell membrane integrity after 24, 48 and 72h of the respective IC₅₀ treatment and observed a significant reduction in the number of viable cells ($p \leq 0.0001$) at all analyzed times (Fig. 2b).

Corroborating with these data, representative images demonstrate that both the growth and morphology were altered in A549 cells after treatment with TMBP IC₅₀ at 72h, as well as the reduction of the size of these treated cells compared to the control group ($p \leq 0.0001$) (Fig. 2c and d). According to these findings, the *in vitro* TMBP treatment showed selectively action against tumor cells by a direct cytotoxic effect on NSCLC A549 cells reducing cell proliferation.

3.4. TMBP induces the production of total ROS, promotes depolarization of the mitochondrial membrane and formation of lipid droplets, without inducing autophagic vacuole in A549 cells

In order to elucidate the mechanism involved in the TMBP-treated A549 cells elimination, we assessed the ROS production, the mitochondrial membrane potential, the lipid droplet formation and the autophagic vacuoles on treated cells. The effect of total ROS production on TMBP IC₅₀ treated cells was evaluated in 72h via the H₂DCFDA probe. The results showed that there was a significant increase in total

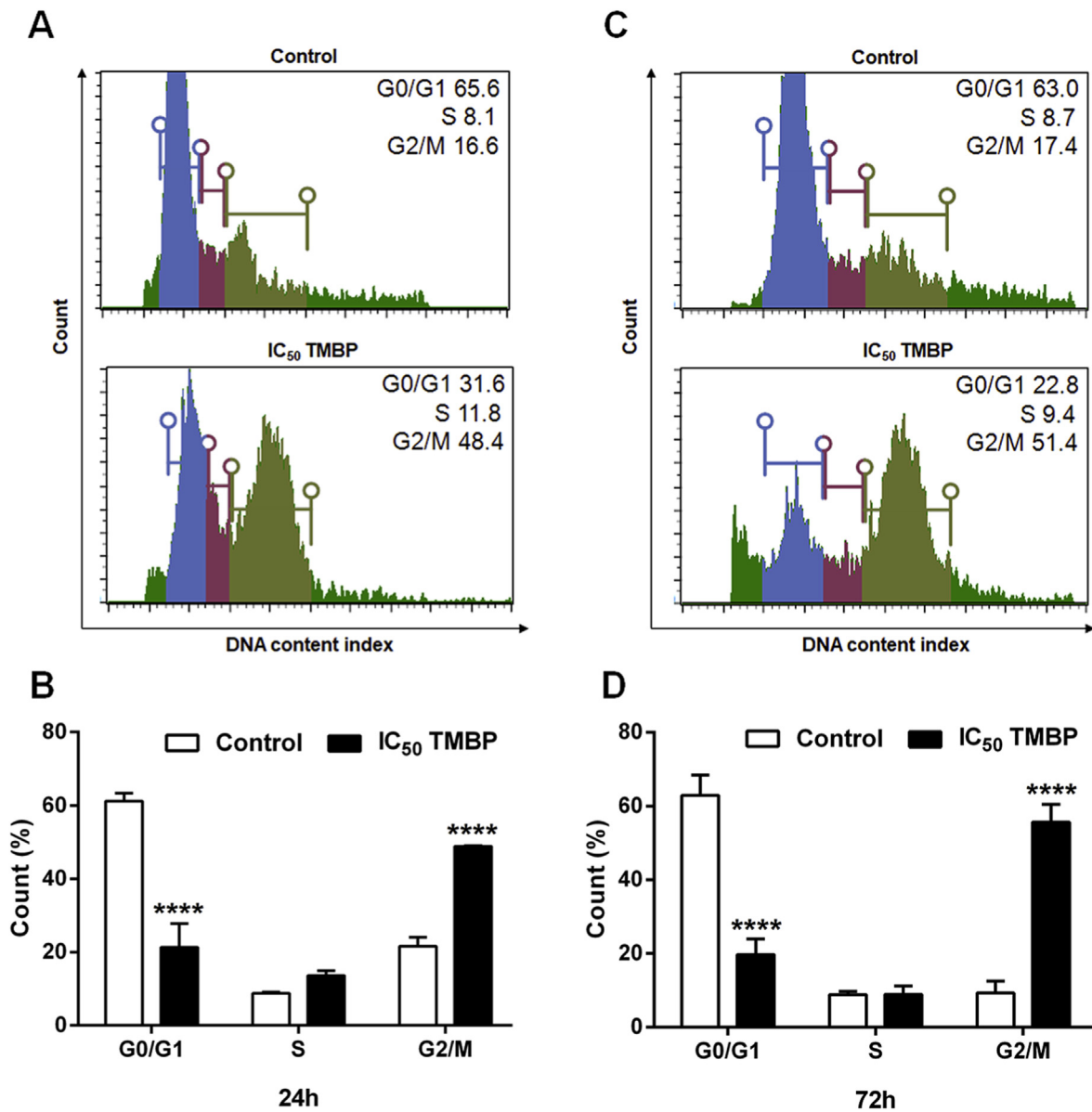


Fig. 4. TMBP induces cell cycle arrest in the G2/M phase in A549 cells. A549 cells were treated with the IC₅₀ of TMBP for 24 (A) and 72 h (C) and the cell cycle distribution by flow cytometry were plotted. Quantitative analysis of cells at different stages of the cell cycle were evaluated in 24 (B) and 72h (D). Values were expressed in % vs. control; and mean \pm standard deviation. ** $p \leq 0.01$; *** $p \leq 0.001$; **** $p \leq 0.0001$ vs. control.

ROS production in tumor cells compared to the control group increased by 20 times the production of ROS in the tested period ($p \leq 0.0001$) (Fig. 3a).

There is a relation of ROS enhanced production and direct damage to mitochondria leading, to the alteration on mitochondrial function profile. Therefore, we evaluated the integrity of the mitochondrial membrane in TMBP-treated cells after 72h, in which it was verified that the group treated with TMBP reduced by 49,7% the total intensity of TMRE fluorescence in relation to the control group ($p \leq 0.0001$) (Fig. 3b).

Biogenesis of lipid droplets is known to be induced during metabolic stress, including oxidative stress such as ROS production, the formation of autophagic vacuoles, mitochondrial damage, and apoptotic cell death. When we evaluated lipid droplets using the NR marker, we found a 15-fold increase in lipid droplet formation in TMBP-treated cells after 72h, compared to the control group ($p \leq 0,0001$) (Fig. 3c).

In addition, we verified the autophagic vacuoles formation in A549 cells by MDC marking and it was observed that after treatment

with TMBP-IC₅₀ for 72 h, A549 cells did not induces autophagy vacuoles formation ($p > 0.05$) (Fig. 3D).

3.5. TMBP causes cell cycle arrest in G2/M phase in A549 cells

To investigate if TMBP inhibits cell proliferation by inducing cell cycle disruption, we evaluated the cell cycle distribution in TMBP IC₅₀ treated A549 cells for 24 and 72h.

After 24h, we found that TMBP treatment increased the percentage of cells by 31.8% in G2/M phase ($p \leq 0.0001$) when compared to the control group (Fig. 4a,c). There was also a reduction in the percentage of cells in G0/G1 (34%, $p \leq 0.0001$). When the effect of TMBP-IC₅₀ was evaluated at 72h of treatment, it reduced the percentage of cells in G0/G1 (40.2%, $p \leq 0.0001$) and increased these in G2/M phase (28.6%, $p \leq 0.0001$), when compared to the control (Fig. 4b,d). Phase S did not differ in any of the times.

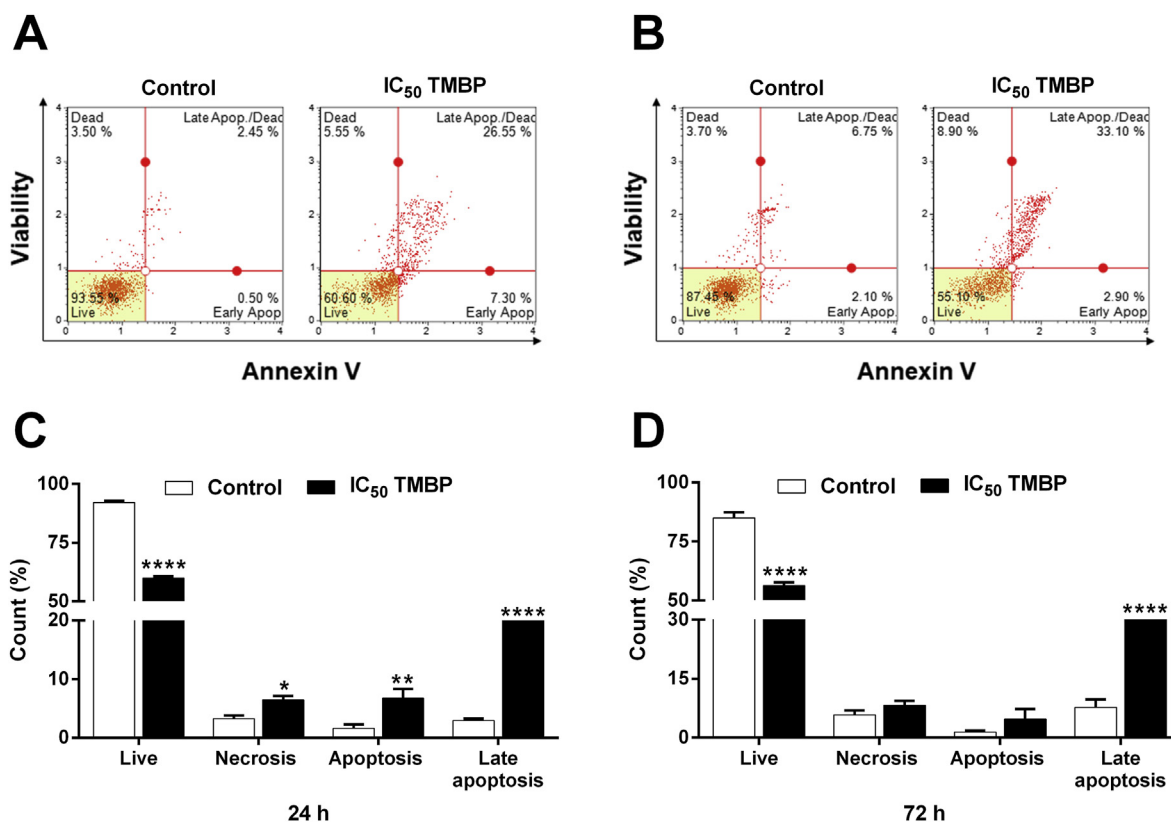


Fig. 5. Treatment with TMBP induce apoptosis in A549 cells. For analysis in dot plots of cytometry, the viable cell induction, apoptosis and necrosis were evaluated for 24 (A) and 72h (B). Quantitative analysis of viable, apoptotic and necrotic A549 cells were evaluated in 24 (C) and 72h (D). Values are expressed as mean \pm standard deviation. Cytometry data were expressed in % vs. control; and mean \pm standard deviation. * $p \leq 0.05$; *** $p \leq 0.001$; **** $p \leq 0.0001$ vs. control.

3.6. TMBP induces late apoptotic cell death in A549 cell line

Knowing that the disturbance of cancer cell cycle inhibits cell growth and could activate the apoptosis process, we investigated the mechanism that leads to reduced cell viability and alterations in the kinetics of cell growth.

Thus, we used Annexin V-FITC/PI double staining to evaluate the population of necrotic/apoptotic on TMBP-IC₅₀ treated cells. The results showed that there was a reduction of viable (non-labeled) cells (32.2% ($p \leq 0.0001$), and an increase in necrosis (3.2%, $p \leq 0.05$), apoptosis (5.1%, $p \leq 0.01$) and mainly late apoptosis (23.8%, $p \leq 0.0001$) labeled cells, when compared to control (Fig. 5a,c) after 24h of TMBP treatment. Similarly, after 72h of treatment, there was a considerable increase in double-labeled cells (23.0%, $p \leq 0.0001$) in the TMBP-treated group (Fig. 5b,d), suggesting that treatment with TMBP induced late-stage apoptosis in A549 cells.

4. Discussion

Several studies have reported the problems involved in the treatments available for NSCLC, since chemotherapy is associated with diverse side effects, including nausea, vomiting, fever, sleep-wake cycle alteration, hepatotoxicity, neurotoxicity and nephrotoxicity [21]. Thus, it is necessary the search for new forms of treatment, aiming at reducing the proliferation and induction of death of tumor cells with fewer side effects. In this sense, TMBP, a biosynthetic compound belonging to the phenol class, shows promise for new drug development with antitumor activity.

In this context, we investigated the effects of 3,3',5,5'-tetramethoxybiphenyl-4,4'-diol (TMBP) on lung carcinoma cells, A549, and found that TMBP structure meets the main *in silico* drug-likeness

requirements and has more pronounced cytotoxic and antiproliferative activity on tumor cells when compared to non-tumor cells. It has also been observed that TMBP promotes cell cycle arrest at G2/M phases and induction of apoptosis possibly by the mitochondrial apoptosis pathway since the compound is able to accumulate in this organelle and cause increased production of reactive oxygen species and consequently depolarization of the mitochondrial membrane, leading to apoptosis cell death.

"Drug-likeness" is defined as the qualitatively chance for a molecule to become an oral drug with respect to bioavailability through the inspection of structural or physicochemical compounds advanced enough to be considered oral drug-candidates. The *in silico* analysis of TMBP revealed that the molecule does not present violations to the rules proposed by Lipinski and Veber. These physico-chemical parameters are associated with high intestinal permeability, suggesting drug similarity and oral bioavailability [17,18].

In addition, after the pharmacokinetic prediction by ADMET, according to the TMBP structure and theoretical data, it was predicted that this biphenolic has the potential to accumulate in mitochondria, has high human intestinal absorption and is not a substrate for permeability glycoprotein, characteristics favorable for a drug-likeness compound. However, the permeability of BBB and promiscuity with CYP enzymes found in the present study are important parameters, since, depending on the effect generated with TMBP, they can cause toxicity, and drug interaction, respectively. On the other hand, the permeability of BBB may be appropriate in case of treatment for metastases to the central nervous system [22] and CYP enzymes may act by reducing the toxicity of the compound in the body. Taken together, these data suggest that TMBP has the potential for use as an oral drug.

To reinforce these results, we investigate the cytotoxic activity of TMBP on primary cells. Several compounds can cause toxic hemolysis;

therefore the FDA recommends testing for hemolytic potential to investigate the safety of a potential drug [23]. TMBP did not induce hemolysis, once again strengthening its potential drug use. We also found that there was no cytotoxic action on macrophages at the lowest concentrations of the compound. However, as peritoneal macrophages are not immortalized cells and are less resistant in culture [24], the higher concentration tested reduced cell viability similar to cisplatin. Thus, TMBP, at lower concentrations, does not induce cytotoxicity in these cells.

Knowing its potential use as a drug, we investigated the effect of TMBP on tumor cells. TMBP treatment induced a reduction of viability, morphological alterations, and reduction on cell size in A549 cell line, which are good parameters to identify the cell death [25,26].

Then, aiming to understand the mechanisms by which TMBP would be triggering these effects, we verified that the treatment increased ROS levels. These molecules are important mediators in the regulation of cell survival and death in response to different stimuli, such as nutrient deprivation, chemotherapeutic agents, senescence, ionizing radiation or protein unfolding. Although the proliferation of cancer cells can be stimulated by low doses of superoxide or hydrogen peroxide, irreversible damage to cancer cells can be induced by over-production of ROS, resulting in apoptosis [27–30].

Once that the *in silico* results predicted that the treatment would be able to accumulate in mitochondria and could induce damage to these cellular organelles, we investigated the mitochondrial membrane potential ($\Delta\Psi_m$) of TMBP-treated tumor cells, and we found that TMBP was able to reduce the $\Delta\Psi_m$. Mitochondria, in their normal physiology, are considered the main energy-generating mechanism of eukaryotic cells and play an important role in triggering cell death by altering the redox potential [28,29]. Thus, damage to these organelles promotes a reduction of $\Delta\Psi_m$, lower respiratory chain activity and, release of cytochrome *c* into the cytosol.

Lipid droplets (LD) are intracellular storage organelles of neutral lipids (fatty acids, cholesterol and esters) and have been associated with various processes, including energy regulation, fatty acid storage, control of lipid signaling molecules and lipid toxicity mediation. LDs also interact with other structures within the cell, such as mitochondria and the endoplasmic reticulum (ER), which are closely involved in the progression of apoptotic death [31,32].

It is clear that mitochondrial damage, as well as oxidative stress induce the formation of LDs, and one of the characteristics of apoptosis death is the rapid accumulation of cytoplasmic lipid droplets [33]. Therefore, this result set are indicative of apoptosis cell death by the mitochondrial pathway, which was supported by the result of flow cytometry with Annexin V/PI staining, cell size reduction, the generation of ROS and mitochondrial intracellular damage, strategies of chemotherapeutics to induce this type of death in cancer cells [30,34].

Another important parameter in the apoptosis induction is the cell cycle arrest, in which the cell cycle promotes the monitoring of replication through checkpoints, which check the phases G1/S and G2/M [35]. Our results showed that treatment with TMBP caused accumulation of cells in the G2/M phases. The G2/M phase is characterized by activation of the cyclin A/CDK1 complex, aiming to initiate mitosis by regulating chromosome condensation and microtubules [36,37]. Thus, our data suggest that TMBP-treated cells were not able to complete the cell cycle, which was disrupted in G2/M, indicating inhibition of proliferation and adding further evidence of apoptotic death induction [34,38].

In order to confirm the data obtained, we studied the type of cell death induced by the treatment. First, we found that in the cells treated with TMBP there was no induction of autophagic vacuoles. The autophagic process plays an ambiguous role in cancer, and may act as both a pro-survival and a pro-death mechanism [39]. In general, the autophagic process usually occurs in the body at the basal level, functioning as a controlled system to maintain intracellular homeostasis. Though, it can be activated in response to cell degradation for various

types of stress, including nutrient deprivation, hypoxia, ROS, and DNA damage [40,41]. However, if autophagy is inhibited or ineffective, it can induce excessive generation of ROS, leading to more severe DNA damage [39], which can result in apoptosis or necrosis. Thus, induction of autophagy does not necessarily imply a causal therapeutic benefit [42–44].

The apoptosis outcome is an orderly and efficient removal of damaged cells, such as those resulting from DNA damage, without generating an inflammatory response [45,46]. Also, the tumor development is related not only to undifferentiation and exacerbated proliferation, but also to the inability of cells going under apoptosis [30]. In this sense, the deregulation in apoptotic cell death machinery is an hallmark of cancer, and the capacity of a drug to induce this type of death is an important strategy to eliminate tumor cells [46].

Taken together, our results suggest that TMBP treatment on the A549 lineage contributes to the cytotoxic activity of the cell, through a process involving the production of ROS effector molecules, mitochondrial dysfunction, cell cycle arrest, and ultimately culminating in cell death by apoptosis.

5. Conclusion

In this work, we show that *in vitro* treatment with TMBP, a bio-transformed compound from the 2,6-dimethoxyphenol catalase by fungal laccases, presents drug-likeness characteristics, both by *in silico* and *in vitro* analysis. TMBP treatment showed potent activities on human NSCLC A549 cells at low concentrations resulting in reduction of viability through cytotoxic effect, increasing ROS levels, mitochondrial dysfunction, and cell cycle arrest in G2/M phases, which are essential for the induction of apoptosis-mediated cell death. These findings provided a rationale application of TMBP to *in vivo* antitumor study model and then could become a promising drug candidate for NSCLC cancer therapy in the future.

Funding

Not applicable.

Ethics approval and consent to participate

This study was approved by the ethics committee of the State University of Londrina.

CRedit authorship contribution statement

Virginia Marcia Concato: Formal analysis, Writing - original draft. **Fernanda Tomiotto-Pellissier:** Formal analysis, Writing - original draft. **Taylon Felipe Silva:** Formal analysis, Writing - original draft. **Manoela Daiele Gonçalves:** Formal analysis, Writing - original draft. **Bruna Taciane da Silva Bortoleti:** Formal analysis, Writing - original draft. **Mariana Barbosa Detoni:** Formal analysis, Writing - original draft. **Elaine da Silva Siqueira:** Formal analysis. **Ana Carolina Jacob Rodrigues:** Formal analysis. **Jéseka Gabriela Schirmann:** Formal analysis. **Aneli de Melo Barbosa-Dekker:** Writing - original draft. **Idessania Nazareth Costa:** Writing - original draft. **Ivete Conchon-Costa:** Writing - original draft. **Milena Menegazzo Miranda-Sapla:** Writing - original draft. **Mario Sergio Mantovani:** Writing - original draft. **Wander Rogério Pavanelli:** Writing - original draft.

Declaration of competing interest

The authors declare that they have no known competing financial interests or personal relationships that could have appeared to influence the work reported in this paper.

Acknowledgments

This work was carried out with the support of the Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES, Brazil), Conselho Nacional de Pesquisa (CNPq, Brazil), Universidade Estadual de Londrina (UEL, Brazil).

References

- J. Ferlay, I. Soerjomataram, R. Dikshit, S. Eser, C. Mathers, M. Rebelo, D.M. Parkin, D. Forman, F. Bray, Cancer incidence and mortality worldwide: sources, methods and major patterns in GLOBOCAN 2012, *Int. J. Canc.* 136 (2015) E359–E386, <https://doi.org/10.1002/ijc.29210>.
- K. Kuribayashi, N. Funaguchi, T. Nakano, Chemotherapy for advanced non-small cell lung cancer with a focus on squamous cell carcinoma, *J. Canc. Res. Therapeut.* 12 (2016) 534, <https://doi.org/10.4103/0973-1482.174185>.
- E.A. Semanova, R. Nagel, A. Berns, Origins, genetic landscape, and emerging therapies of small cell lung cancer, *Genes Dev.* 29 (2015) 1447–1462, <https://doi.org/10.1101/gad.263145.115>.
- W.D. Travis, Pathology of lung cancer, *Clin. Chest Med.* 32 (2011) 669–692, <https://doi.org/10.1016/j.ccm.2011.08.005>.
- A.F. Gazdar, Should we continue to use the term non-small-cell lung cancer? *Ann. Oncol.* 21 (2010) vii225–vii229, <https://doi.org/10.1093/annonc/mdq372>.
- C.Y. Huang, D.T. Ju, C.F. Chang, P. Muralidhar Reddy, B.K. Velmurugan, A review on the effects of current chemotherapy drugs and natural agents in treating non-small cell lung cancer, *Biomed* 7 (2017) 12–23, <https://doi.org/10.1051/bmcdm/2017070423>.
- J.P. Sculier, J. Klastersky, V. Giner, G. Bureau, J. Thiriaux, G. Dabouis, A. Efreimidis, F. Ries, M.C. Berchier, R. Sergysels, P. Mommen, M. Paesmans, Phase II randomized trial comparing high-dose cisplatin with moderate-dose cisplatin and carboplatin in patients with advanced non-small-cell lung cancer, *J. Clin. Oncol.* 12 (1994) 353–359, <https://doi.org/10.1200/jco.1994.12.2.353>.
- J.G. Schirrmann, K.G. Angilelli, R.F.H. Dekker, D. Borsato, A.M. Barbosa-Dekker, 3,3',5,5'-Tetramethoxybiphenyl-4,4'-diol: a new antioxidant enhancing oxidative stability of soybean biodiesel, *Fuel* 237 (2019) 593–596, <https://doi.org/10.1016/j.fuel.2018.10.044>.
- H.G. Choi, I.G. Je, G.J. Kim, H. Choi, S.H. Kim, J.A. Kim, S.H. Lee, Anti-allergic inflammatory activities of compounds of amomi fructus, *Nat. Prod. Commun.* 10 (2015) 631–632, <https://doi.org/10.1177/1934578x1501000425>.
- F. Von Nussbaum, M. Brands, B. Hinz, S. Weigand, D. Häbich, Antibacterial natural products in medicinal chemistry - exodus or revival? *Angew. Chem. Int. Ed.* 45 (2006) 5072–5129, <https://doi.org/10.1002/anie.200600350>.
- S. Quideau, K.S. Feldman, Ellagitannin chemistry, *Chem. Rev.* 96 (1996) 475–503, <https://doi.org/10.1021/cr940716a>.
- K. Huang, Y. Chen, R. Zhang, Y. Wu, Y. Ma, X. Fang, S. Shen, Honokiol induces apoptosis and autophagy via the ROS/ERK1/2 signaling pathway in human osteosarcoma cells in vitro and in vivo article, *Cell Death Dis.* 9 (2018) 1–17, <https://doi.org/10.1038/s41419-017-0166-5>.
- C. Averett, A. Bhardwaj, S. Arora, S. K.Srivastava, M. Aslam Khan, A. Ahmad, S. Singh, J. ECarter, A. PSingh, Honokiol suppresses pancreatic tumor growth, metastasis and desmoplasia by interfering with tumor-stromal cross-talk, *Carcinogenesis* 37 (2016) 1052–1061, <https://doi.org/10.1093/carcin/bgw096>.
- J.G. Schirrmann, R.F.H. Dekker, D. Borsato, A.M. Barbosa-Dekker, Selective control for the laccase-catalyzed synthesis of dimers from 2,6-dimethoxyphenol: optimization of 3,3',5,5'-tetramethoxy-biphenyl-4,4'-diol synthesis using factorial design, and evaluation of its antioxidant action in biodiesel, *Appl. Catal. Gen.* 555 (2018) 88–97, <https://doi.org/10.1016/j.apcata.2018.02.015>.
- C.A. Lipinski, Lead- and drug-like compounds: the rule-of-five revolution, *Drug Discov. Today Technol.* 1 (2004) 337–341, <https://doi.org/10.1016/j.ddtec.2004.11.007>.
- D.F. Veber, S.R. Johnson, H.Y. Cheng, B.R. Smith, K.W. Ward, K.D. Kopple, Molecular properties that influence the oral bioavailability of drug candidates, *J. Med. Chem.* 45 (2002) 2615–2623, <https://doi.org/10.1021/jm020017n>.
- A. Daina, O. Michielin, V. Zoete, SwissADME: a free web tool to evaluate pharmacokinetics, drug-likeness and medicinal chemistry friendliness of small molecules, *Sci. Rep.* 7 (2017) 1–13, <https://doi.org/10.1038/srep42717>.
- A. Daina, V. Zoete, A BOILED-egg to predict gastrointestinal absorption and brain penetration of small molecules, *ChemMedChem* 11 (2016) 1117–1121, <https://doi.org/10.1002/cmdc.201600182>.
- T. Mosmann, Rapid Colorimetric Assay for Cellular Growth and Survival: Application to Proliferation and Cytotoxicity Assays, (1983).
- P.H.F. Stroppa, L.M.R. Antinarelli, A.M.L. Carmo, J. Gameiro, E.S. Coimbra, A.D. da Silva, Effect of 1,2,3-triazole salts, non-classical bioisosteres of miltefosine, on *Leishmania amazonensis*, *Bioorg. Med. Chem.* 25 (2017) 3034–3045, <https://doi.org/10.1016/j.bmc.2017.03.051>.
- L. Astolfi, S. Ghiselli, V. Guarani, M. Chicca, E. Simoni, E. Olivetto, G. Lelli, A. Martini, Correlation of adverse effects of cisplatin administration in patients affected by solid tumours: a retrospective evaluation, *Oncol. Rep.* 29 (2013) 1285–1292, <https://doi.org/10.3892/or.2013.2279>.
- J.-W. Lin, Chen Juei-Tai, C.-Y. Hong, Y.-L. Lin, K.-T. Wang, C.-J. Yao, G.-M. Lai, R.-M. Chen, Honokiol traverses the blood-brain barrier and induces apoptosis of neuroblastoma cells via an intrinsic bax-mitochondrion-cytochrome c-caspase protease pathway, *Neuro. Oncol.* 14 (3) (2012) 302–314, <https://doi.org/10.1093/neuonc/nor217> 302–314, (accessed March 4, 2020).
- Immunotoxicology evaluation of investigational new drugs, FDA. (n.d.) <https://www.fda.gov/regulatory-information/search-fda-guidance-documents/immunotoxicology-evaluation-investigational-new-drugs> (accessed March 4, 2020).
- G. Kaur, J.M. Dufour, Cell lines, *Spermatogenesis* 2 (2012) 1–5, <https://doi.org/10.4161/spmg.19885>.
- H.L. Martin, M. Adams, J. Higgins, J. Bond, E.E. Morrison, S.M. Bell, S. Warriner, A. Nelson, D.C. Tomlinson, High-content, high-throughput screening for the identification of cytotoxic compounds based on cell morphology and cell proliferation markers, *PLoS One* 9 (2014), <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0088338>.
- T.L. Riss, R.A. Moravec, A.L. Niles, S. Duellman, H.A. Benink, T.J. Worzella, L. Minor, Cell Viability Assays, Eli Lilly & Company and the National Center for Advancing Translational Sciences, 2004, <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23805433> (accessed March 4, 2020).
- W.S. Wu, The signaling mechanism of ROS in tumor progression, *Canc. Metastasis Rev.* 25 (2006) 695–705, <https://doi.org/10.1007/s10555-006-9037-8>.
- E. Cadenas, Mitochondrial free radical production and cell signaling, *Mol. Aspect. Med.* 25 (2004) 17–26, <https://doi.org/10.1016/j.mam.2004.02.005>.
- Z. Yue Li, Y. Yang, M. Ming, B. Liu, Mitochondrial ROS generation for regulation of autophagic pathways in cancer, *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 414 (2011) 5–8, <https://doi.org/10.1016/j.bbrc.2011.09.046>.
- L.D. Zorova, V.A. Popkov, E.Y. Plotnikov, D.N. Silachev, I.B. Pevzner, S.S. Jankauskas, V.A. Babenko, S.D. Zorov, A.V. Balakireva, M. Juhászova, S.J. Sollott, D.B. Zorov, Mitochondrial membrane potential, *Anal. Biochem.* 552 (2018) 50–59, <https://doi.org/10.1016/j.ab.2017.07.009>.
- S.J. Lee, J. Zhang, A.M.K. Choi, H.P. Kim, Mitochondrial dysfunction induces formation of lipid droplets as a generalized response to stress, *Oxid. Med. Cell. Longev.* (2013), <https://doi.org/10.1155/2013/327167>.
- J. Boren, K.M. Brindle, Apoptosis-induced mitochondrial dysfunction causes cytoplasmic lipid droplet formation, *Cell Death Differ.* 19 (2012) 1561–1570, <https://doi.org/10.1038/cdd.2012.34>.
- T. Petan, E. Jarc, M. Jusović, Lipid droplets in cancer: guardians of fat in a stressful world, *Molecules* 23 (2018) 1941, <https://doi.org/10.3390/molecules23081941>.
- H. Wang, T. Zhang, W. Sun, Z. Wang, D. Zuo, Z. Zhou, S. Li, J. Xu, F. Yin, Y. Hua, Z. Cai, Eriarin induces G2/M-phase arrest, apoptosis, and autophagy via the ROS/JNK signaling pathway in human osteosarcoma cells in vitro and in vivo, *Cell Death Dis.* 7 (2016), <https://doi.org/10.1038/cddis.2016.138> e2247–e2247.
- G. Pistrutto, T. Trisciunglio, C. Ceci, Alessia Garufi, G. D'Orazi, Apoptosis as anticancer mechanism: function and dysfunction of its modulators and targeted therapeutic strategies, *Aging (Albany, NY)* 8 (2016) 603–619, <https://doi.org/10.18632/aging.100934>.
- T. Otto, P. Sicinski, Cell cycle proteins as promising targets in cancer therapy, *Nat. Rev. Cancer.* 17 (2017) 93–115, <https://doi.org/10.1038/nrc.2016.138>.
- B. Eymin, S. Gazzeri, Role of cell cycle regulators in lung carcinogenesis, *Cell Adhes. Migrat.* 4 (2010) 114–123, <https://doi.org/10.4161/cam.4.1.10977>.
- J. Li, W. Zhu, T. Leng, M. Shu, Y. Huang, D. Xu, P. Qiu, X. Su, G. Yan, Triptolide-induced cell cycle arrest and apoptosis in human renal cell carcinoma cells, *Oncol. Rep.* 25 (2011) 979–987, <https://doi.org/10.3892/or.2011.1158>.
- G. Liu, F. Pei, F. Yang, L. Li, A.D. Amin, S. Liu, J. Ross Buchan, W.C. Cho, Role of autophagy and apoptosis in non-small-cell lung cancer, *Int. J. Mol. Sci.* 18 (2017), <https://doi.org/10.3390/ijms18020367>.
- N. Lalaoui, L.M. Lindqvist, J.J. Sandow, P.G. Ekert, The molecular relationships between apoptosis, autophagy and necroptosis, *Semin. Cell Dev. Biol.* 39 (2015) 63–69, <https://doi.org/10.1016/j.semcdb.2015.02.003>.
- F. Radogna, M. Dicato, M. Diederich, Cancer-type-specific crosstalk between autophagy, necroptosis and apoptosis as a pharmacological target, *Biochem. Pharmacol.* 94 (2015) 1–11, <https://doi.org/10.1016/j.bcp.2014.12.018>.
- H. Ito, S. Daido, T. Kanzawa, S. Kondo, Y. Kondo, Radiation-induced autophagy is associated with LC3 and its inhibition sensitizes malignant glioma cells, *Int. J. Oncol.* 26 (2005) 1401–1410, <https://doi.org/10.3892/ijo.26.5.1401>.
- J.J. Jaboin, M. Hwang, B. Lu, Chapter 14 autophagy in lung cancer, *Methods Enzymol.* 453 (2009) 287–304, [https://doi.org/10.1016/S0076-6879\(08\)04014-7](https://doi.org/10.1016/S0076-6879(08)04014-7).
- Y.-H. Chiu, S.-H. Hsu, H.-W. Hsu, K.-C. Huang, W. Liu, C.-Y. Wu, W.-P. Huang, J. Chen, B.-H. Chen, C.-C. Chiu, Human non-small cell lung cancer cells can be sensitized to camptothecin by modulating autophagy, *Int. J. Oncol.* 53 (2018) 1967–1979, <https://doi.org/10.3892/ijo.2018.4523>.
- V.A. Patel, A. Longacre, K. Hsiao, H. Fan, F. Meng, J.E. Mitchell, J. Rauch, D.S. Ucker, J.S. Levine, Apoptotic cells, at all stages of the death process, trigger characteristic signaling events that are divergent from and dominant over those triggered by necrotic cells: implications for the delayed clearance model of autoimmunity, *J. Biol. Chem.* 281 (2006) 4663–4670, <https://doi.org/10.1074/jbc.M508342200>.
- S. Elmore, Apoptosis: a review of programmed cell death, *Toxicol. Pathol.* 35 (2007) 495–516, <https://doi.org/10.1080/01926230701320337>.