



UNIVERSIDADE  
ESTADUAL DE LONDRINA

---

LIANA MARTINS DE OLIVEIRA

**ASSOCIAÇÃO DA PLUMBAGINA E DOXORRUBICINA NA  
MODULAÇÃO DE mRNA EM CULTURA 2D E 3D E NA  
ALTERAÇÃO DE PARÂMETROS RELACIONADOS A  
MORTE POR FERROPTOSE E PIROPTOSE EM CÉLULAS  
HEPG2/C3A**

---

Londrina  
2024



UNIVERSIDADE  
ESTADUAL DE LONDRINA

---



**IDR-Paraná**

Instituto de Desenvolvimento  
Rural do Paraná - IAPAR-EMATER



LIANA MARTINS DE OLIVEIRA

**ASSOCIAÇÃO DA PLUMBAGINA E DOXORRUBICINA NA  
MODULAÇÃO DE mRNA EM CULTURA 2D E 3D E NA  
ALTERAÇÃO DE PARÂMETROS RELACIONADOS A  
MORTE POR FERROPTOSE E PIROPTOSE EM CÉLULAS  
HEPG2/C3A**

LIANA MARTINS DE OLIVEIRA

**ASSOCIAÇÃO DA PLUMBAGINA E DOXORRUBICINA NA  
MODULAÇÃO DE mRNA EM CULTURA 2D E 3D E NA  
ALTERAÇÃO DE PARÂMETROS RELACIONADOS A  
MORTE POR FERROPTOSE E PIROPTOSE EM CÉLULAS  
HEPG2/C3A**

Trabalho apresentado ao Programa de Pós-Graduação em Genética e Biologia Molecular, da Universidade Estadual de Londrina, como requisito parcial para a obtenção do título de Mestre.

Orientador: Prof. Dr. Mário Sérgio Mantovani.

Londrina  
2024

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

de Oliveira, Liana Martins de Oliveira.

Associação da plumbagina e doxorrubicina na modulação de mRNA em cultura 2D e 3D e na alteração de parâmetros relacionados a morte por ferroptose e piroptose em células HEPG2/C3A / Liana Martins de Oliveira de Oliveira. - Londrina, 2024.  
98 f. : il.

Orientador: Mário Sérgio Mantovani.

Dissertação (Mestrado em Genética e Biologia Molecular) - Universidade Estadual de Londrina, Centro de Ciências Biológicas, Programa de Pós-Graduação em Genética e Biologia Molecular, 2024.

Inclui bibliografia.

1. Expressão Gênica - Tese. 2. Doxorrubicina - Tese. 3. Plumbagina - Tese. 4. Esferoides - Tese. I. Mantovani, Mário Sérgio. II. Universidade Estadual de Londrina. Centro de Ciências Biológicas. Programa de Pós-Graduação em Genética e Biologia Molecular. III. Título.

CDU 575.1

LIANA MARTINS DE OLIVEIRA

**ASSOCIAÇÃO DA PLUMBAGINA E DOXORRUBICINA NA  
MODULAÇÃO DE mRNA EM CULTURA 2D E 3D E NA  
ALTERAÇÃO DE PARÂMETROS RELACIONADOS A  
MORTE POR FERROPTOSE E PIROPTOSE EM CÉLULAS  
HEPG2/C3A**

Trabalho apresentado ao Programa de Pós-Graduação em Genética e Biologia Molecular, da Universidade Estadual de Londrina, como requisito parcial para a obtenção do título de Mestre.

**BANCA EXAMINADORA**

---

Orientador: Prof. Dr. Mário Sérgio Mantovani  
Universidade Estadual de Londrina - UEL

---

Profa. Dra. Sandra Regina Lepri  
Universidade Estadual de Londrina - UEL

---

Profa. Dra. Danielle Lazarin Bidóia  
Universidade Estadual de Maringá - UEM

Londrina, 25 de julho de 2024.

Dedico este trabalho à ciência, minha  
família, Deus e amigos.

## AGRADECIMENTOS

Expresso aqui a minha sincera gratidão ao meu orientador Prof. Dr. Mário Sérgio Mantovani, pela confiança depositada em meu trabalho, pela disposição em discutir as ideias em torno da elaboração desse trabalho, pelos bons direcionamentos e pelos valiosos momentos que compartilhamos.

Aos meus amigos do laboratório (e de fora dele também), Luan, Matheus e Maria, que compartilharam bons momentos, risadas, refeições, receitas, presepadas, momentos de descontração, muitas conversas, insights sobre os nossos trabalhos e vibrações a cada conquista que alcançamos.

Aos meus familiares que me apoiaram nos estudos, que sempre acreditaram em mim e moram dentro do meu coração, os quais eu sempre guardei em minha mente diariamente, o meu porto seguro, com quem eu posso contar para tantas aventuras.

Ao meu namorado Matheus, que me apoia, que segura minhas mãos, que me ajuda a entender a vida quando tudo está confuso, que traz infinita alegria em minha vida, que me distrai, que compartilha os momentos de altos e baixos e que acima de tudo, compartilha comigo o respeito, amor e os sonhos.

Às agências de fomento CNPq, FINEP, CAPES e Fundação Araucária pelos investimentos.

“Entregue ao Senhor tudo o que você faz,  
e os seus planos serão estabelecidos.”

Provérbios 16:3

OLIVEIRA, L.M. **Associação da Plumbagina e Doxorrubicina na Modulação de mRNA em Cultura 2D e 3D e na Alteração de Parâmetros Relacionados a Morte por Ferroptose e Piroptose em Células HepG2/C3A**. 2024. 98 f. Trabalho apresentado ao Programa de Pós-Graduação em Genética e Biologia Molecular, da Universidade Estadual de Londrina, como requisito parcial para a obtenção do título de Mestre, 2024.

## RESUMO

A doxorrubicina é um agente quimioterápico utilizado no tratamento do câncer. Contudo, a eficácia do tratamento pode ser comprometida quando o tumor apresenta resistência à droga. Os efeitos adversos resultantes da toxicidade relacionada às altas dosagens e a resistência celular à droga podem ser mitigados mediante a combinação de bioativos em concentrações menos citotóxicas. A plumbagina é um fitoquímico extraído de plantas do gênero *Plumbago*, que exibe atividades biológicas, como efeitos antioxidante, antibacteriano, antifúngico, anti-inflamatório e antitumoral. Nesse contexto, a associação dessas moléculas foi testada para a avaliação dos efeitos celulares no aspecto morfológico e molecular em células de hepatocarcinoma humano (HepG2/C3A) em modelos 2D e 3D. Para isso, realizou-se teste de citotoxicidade com resazurina e ensaio clonogênico, monitoramento celular por time-lapse, avaliação de danos no DNA (ensaio do cometa), marcação de gotículas lipídicas intracelulares, monitoramento de volume esférico, coloração fluorescente de esferoides com Hoechst 33342 e Iodeto de Propídio e RT-qPCR para genes das vias de morte celular (*CASP3*, *CASP8*, *CASP9*, *PARP1*, *BBC3*, *BIRC5*, *BCL2* e *TNF*), autofagia (*BECN1* e *SQSTM1*), ciclo celular (*C-MYC*, *NF-kB*, *CDKN1A*, *M-TOR* e *TRAF2*), reparo de danos no DNA (*H2AFX*, *GADD45A* e *GADD45AG*), estresse oxidativo (*GPXI*), estresse no retículo endoplasmático (*EIF2AK3* e *ERN1*), metabolismo de xenobióticos (*CYP1A1*, *CYP1A2*, *CYP3A4*, *CYP2E1*, *CYP2C9*) e marcadores de ferroptose e piroptose (*NQO1*, *NRF2*, *SLC7A11*, *ASNS*, *HMOX1*, *CHAC1*, *ACSL4*, *NFE2L2*, *TRFC*, *GSDMD*) nos modelos experimentais 2D e 3D. Fez-se a análise estatística no software GraphPad Prism 9.4, de acordo com a normalidade e disposição dos dados. As associações reduziram significativamente a proliferação celular em relação aos seus isolados, apresentando efeito aditivo e sinérgico. Foi observado que as associações aceleram o processo de morte e, os tipos de processos morfológicos de morte são influenciados pela concentração, sendo, portanto, diferentes nas diferentes concentrações avaliadas. As associações apresentaram capacidade de redução da sobrevivência celular, além disso, observou-se também que essas associações são genotóxicas. A doxorrubicina, a menor concentração de plumbagina e a menor concentração de associação testada apresentaram marcação mais intensa para corpúsculos lipídicos. As associações reduzem o crescimento esférico e alteraram o padrão de coloração por Hoechst 33342 (núcleo) e Iodeto de Propídio (morte). As associações alteraram a expressão de mRNAs de vias moleculares envolvidas no processo de morte, regulação do ciclo celular, reparo de dano do DNA e metabolismo de xenobióticos. Os processos de morte observados nas células expostas às associações, bem como os padrões moleculares alterados, evidenciam processo de ferroptose (menor concentração) e piroptose (evidenciada na maior concentração). Esses resultados demonstram que as associações de plumbagina e baixa concentração da doxorrubicina (IC<sub>25</sub>) apresentam atividade antiproliferativa, atuando por meio do impedimento da formação de colônias, causando alterações no DNA e na expressão de mRNAs de vias de processo de morte, regulação do ciclo celular, reparo de dano do DNA e metabolismo de xenobióticos, contribuindo para o entendimento e desenvolvimento de novos protocolos para um possível tratamento com esses compostos no câncer.

**Palavras-chave:** Sinergismo. Toxicidade. Esferoide. RT-qPCR. Expressão Gênica.

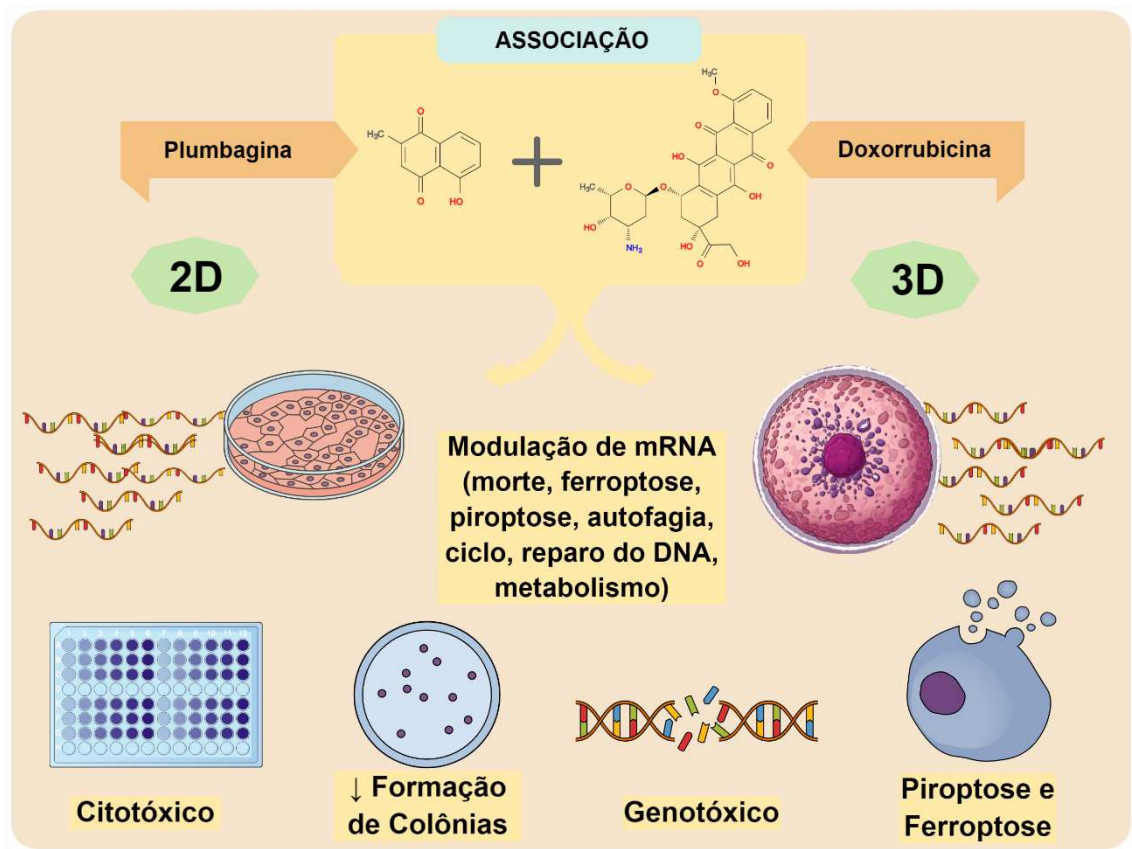
DE OLIVEIRA, L.M **Association of plumbagin and doxorubicin in the modulation of MRNA in 2D and 3D culture and in the change of parameters related to death by ferroptosis and pyroptosis in HEPG2/C3A cells.** 2024. 98 p. Master's degree work presented to the graduate program in Genetics and Molecular Biology, at the State University of Londrina, as a partial requirement for the master's degree, 2024.

## ABSTRACT

Doxorubicin is a chemotherapy agent used to treat cancer. However, the effectiveness of treatment may be compromised when the tumor is resistant to the drug. Adverse effects resulting from toxicity related to high doses and cellular resistance to the drug can be mitigated by combining bioactives in less cytotoxic concentrations. Plumbagin is a phytochemical extracted from plants of the *Plumbago* genus, which exhibits biological activities, such as antioxidant, antibacterial, antifungal, anti-inflammatory, and antitumor effects. In this context, the association of these molecules was tested to evaluate cellular effects in the morphological and molecular aspects of human hepatocellular carcinoma cells (HepG2/C3A) in 2D and 3D models. To this end, a cytotoxicity test was carried out with resazurin and a clonogenic assay, time-lapse cell monitoring, DNA damage assessment (comet assay), intracellular lipid droplet labeling, spheroidal volume monitoring, fluorescent staining of spheroids with Hoechst 33342 and Propidium Iodide and RT-qPCR for genes from the cell death pathways (*CASP3*, *CASP8*, *CASP9*, *PARP1*, *BBC3*, *BIRC5*, *BCL2* and *TNF*), autophagy (*BECN1* and *SQSTM1*), cell cycle (*C-MYC*, *NF- $\kappa$ B*, *CDKN1A*, *M-TOR* and *TRAF2*), DNA damage repair (*H2AFX*, *GADD45A*, and *GADD45AG*), oxidative stress (*GPXI*), endoplasmic reticulum stress (*EIF2AK3* and *ERN1*), xenobiotic metabolism (*CYP1A1*, *CYP1A2*, *CYP3A4*, *CYP2E1*, *CYP2C9*) and markers of ferroptosis and pyroptosis (*NQO1*, *NRF2*, *SLC7A11*, *ASNS*, *HMOX1*, *CHAC1*, *ACSL4*, *NFE2L2*, *TRFC*, *GSDMD*) in 2D and 3D experimental models. Statistical analysis was carried out using the GraphPad Prism 9.4 software, according to the normality and arrangement of the data. The associations significantly reduced cell proliferation in relation to their isolates, presenting an additive and synergistic effect. It was observed that the associations accelerate the death process and the types of morphological death processes are influenced by the concentration, and are therefore different in the different concentrations evaluated. The associations showed the capacity to reduce cell survival, in addition, it was also observed that these associations are genotoxic. Doxorubicin, the lowest concentration of plumbagin and the lowest concentration of the combination tested showed more intense staining for lipid bodies. The associations reduce spheroidal growth and altered the staining pattern by Hoechst 33342 (nucleus) and Propidium Iodide (death). The associations altered the expression of mRNAs of molecular pathways involved in the death process, cell cycle regulation, DNA damage repair and xenobiotic metabolism. The death processes observed in cells exposed to the associations, as well as the altered molecular patterns, demonstrate the process of ferroptosis (lower concentration) and pyroptosis (evidenced at higher concentrations). These results demonstrate that the combinations of plumbagin and low concentration of doxorubicin (IC<sub>25</sub>) present antiproliferative activity, acting by preventing the formation of colonies, causing changes in DNA and in the expression of mRNAs of death process pathways, regulation of the cell cycle, DNA damage repair and xenobiotic metabolism, contributing to the understanding and development of new protocols for possible treatment with these compounds in cancer.

**Key-words:** Synergy. Toxicity. Spheroid. RT-qPCR. Gene Expression.

## RESUMO GRÁFICO



## LISTA DE FIGURAS

<b>Figura 1</b> –	Estrutura Química Molecular da Plumbagina.....	20
<b>Figura 2</b> –	Flores, folhas e raízes da planta <i>Plumbago zeylanica</i> L .....	21
<b>Figura 3</b> –	Vias Envolvidas na Ação da Plumbagina .....	23
<b>Figura 4</b> –	Efeito Sinérgico da Associação de Plumbagina e Radiação Ionizante. Ctrl – Controle; IR – Radiação Ionizante; PL – Plumbagina.....	26
<b>Figura 5</b> –	Representação Ilustrativa do Modelo 3D – Esferoide .....	28
<b>Figura 6</b> –	Delineamento Experimental.....	36
<b>Figura 7</b> –	Ensaio de Citotoxicidade: HepG2/C3A tratadas 24h com Plumbagina e Doxorubicina .....	38
<b>Figura 8</b> –	Organização perinuclear em células tratadas com A1 .....	40
<b>Figura 9</b> –	Formação de prolongamentos (evento pré-morte) em células tratadas com A1 .....	40
<b>Figura 10</b> –	Ensaio Clonogênico em células HepG2/C3A tratadas por 24 h com plumbagina e doxorubicina .....	42
<b>Figura 11</b> –	Ensaio do Cometa em HepG2/C3A tratadas com doxorubicina e plumbagina por 3h .....	44
<b>Figura 12</b> –	Coloração fluorescente com Vermelho do Nilo e Hoechst em células HepG2/C3A tratadas por 24h com DX, PLB e associações destes (400 ×).....	46
<b>Figura 13</b> –	Corpúsculos lipídicos (Vermelho) e Núcleo (Azul) em A1 (IC <sub>25</sub> Doxorubicina (0,3 µM) + ½ IC <sub>50</sub> Plumbagina (9,2 µM) (400 ×) .....	47
<b>Figura 14</b> –	Monitoramento do Volume e Recuperação em esferoides de células HepG2/C3A tratadas com plumbagina e doxorubicina.....	49
<b>Figura 15</b> –	Marcação de Esferoides HepG2/C3A com Hoechst 33342 (azul) e Iodeto de Propídio (PI) (vermelho) (100 ×) tratados por 72h.....	51
<b>Figura 16</b> –	Expressão Gênica Relativa de genes envolvidos nas vias de morte celular em HepG2/C3A após 24h de tratamento .....	52
<b>Figura 17</b> –	Expressão Gênica Relativa de genes envolvidos na via de Ferroptose em HepG2/C3A após 24h de tratamento .....	54
<b>Figura 18</b> –	Expressão Gênica Relativa do gene <i>GSDMD</i> (envolvido nas vias de piroptose) em HepG2/C3A após 24h de tratamento .....	55

<b>Figura 19</b>	–	Expressão Gênica Relativa do gene <i>SQSTM1</i> (envolvido nas vias de mecanismos autofágicos) em HepG2/C3A após 24h de tratamento.....	56
<b>Figura 20</b>	–	Expressão Gênica Relativa do gene <i>GPXI</i> (envolvido nas vias de estresse oxidativo) em HepG2/C3A após 24h de tratamento .....	56
<b>Figura 21</b>	–	Expressão Gênica Relativa de genes envolvidos nas vias de ciclo celular em HepG2/C3A após 24h de tratamento .....	57
<b>Figura 22</b>	–	Expressão Gênica Relativa de genes envolvidos nas vias de reparo do DNA em HepG2/C3A após 24h de tratamento.....	58
<b>Figura 23</b>	–	Expressão Gênica Relativa de genes envolvidos nas vias de estresse no retículo endoplasmático em HepG2/C3A após 24h de tratamento.....	59
<b>Figura 24</b>	–	Expressão Gênica Relativa de genes envolvidos nas vias de metabolismo de xenobióticos em HepG2/C3A após 24h de tratamento .....	60
<b>Figura 25</b>	–	Diagrama: Efeitos da Associação de Plumbagina e Doxorubicina .....	69

## LISTA DE SIGLAS

<b>2D</b>	Bidimensional
<b>3D</b>	Tridimensional
<b>A</b>	Associação
<b>ACSL4</b>	Acil-CoA sintetase 4
<b>AKT</b>	Proteína Quinase B
<b>AMP</b>	adenosina 3',5'-monofosfato
<b>AMPK</b>	Proteína Quinase Ativada por AMP
<b>ANOVA</b>	Análise de Variância
<b>ASNS</b>	Aspagirina Sintetase
<b>BAK</b>	Antagonista/"Killer" de BCL2
<b>BAX</b>	proteína X associada a BCL2
<b>BBC3</b>	Receptor Bombesina-like 3
<b>BCL-2</b>	Linfoma de células B 2
<b>BECN1</b>	Beclin-1
<b>BIRC5</b>	Baculoviral contendo 5 repetições de IAP
<b>CAS</b>	Serviço de Resumos Químicos
<b>CASP</b>	Caspase
<b>CDK1</b>	quinase dependente de ciclina 1
<b>CDKN1A</b>	Inibidor de Quinase Dependente de Ciclina 1A
<b>cDNA</b>	DNA complementar
<b>CHAC1</b>	Glutamilciclotransferase 1 Específico para Glutathione
<b>c-MYC</b>	Oncogene Mielocitomatose Celular
<b>CP</b>	Controle Positivo
<b>CV</b>	Controle de Veículo
<b>CYP</b>	Citocromo P450
<b>DAMP</b>	Padrão Molecular Associado a Dano
<b>DMSO</b>	Dimetilsulfóxido
<b>DNA</b>	Ácido Desoxirribonucleico
<b>DX</b>	Doxorrubicina
<b>EIF2AK3</b>	Fator de Iniciação de Tradução Eucariótica 2-alfa quinase 3
<b>ERN1</b>	Sinalização de Retículo Endoplasmático para Núcleo
<b>ERO</b>	Espécies Reativas de Oxigênio

<b>GADD45A</b>	Proteína Induzida por Dano ao DNA e Parada de Crescimento A
<b>GADD45G</b>	Proteína Induzida por Dano ao DNA e Parada de Crescimento G
<b>GAPDH</b>	Desidrogenase Gliceraldeído-3-fosfato
<b>GPX1</b>	Glutationa Peroxidase 1
<b>GSDMD</b>	Gasdermina D
<b>H2AFX</b>	Membro X da família de histona H2A
<b>HMOX1</b>	genes heme oxigenase 1
<b>IC</b>	Concentração Inibitória
<b>JAK</b>	Quinase Janus
<b>JNK</b>	c-Jun N-terminal quinase
<b>KLF4</b>	Fator Kruppel-like 4
<b>MAPK1</b>	Proteína Quinase Ativada por Mitógeno 1
<b>MAPKKK</b>	Quinase quinase quinase MAP
<b>MEM</b>	Meio Essencial Mínimo
<b>MKK</b>	quinase quinase ativada por mitógeno
<b>MMP</b>	Metaloproteinase da Matriz
<b>mRNA</b>	Ácido Ribonucleico mensageiro
<b>mTOR</b>	Alvo da Rapamicina em Mamíferos
<b>NAC</b>	N-acetilcisteína
<b>NER</b>	Reparo por Excisão de Nucleotídeos
<b>NFE2L2</b>	Fator 2 Relacionado ao Fator Nuclear Eritroide 2
<b>NF-κB</b>	Fator Nuclear kappa B
<b>NQO1</b>	NAD(P)H Quinona 2 Desidrogenase
<b>NRF2</b>	Fator Nuclear E2
<b>OCT4</b>	Fator de Transcrição Ligante no Octâmero 4
<b>PARP</b>	polimerase poli (ADP-ribose)
<b>PBS</b>	Solução salina tamponada
<b>PCNA</b>	antígeno nuclear de proliferação celular
<b>PI</b>	Iodeto de Propídio
<b>PI3</b>	Fosfatidilinositol-3,4,5-trifosfato
<b>PI3K</b>	Fosfoinositídeo-3-quinase
<b>PIP2</b>	Fosfatidilinositol-4,5-bifosfato
<b>PLB</b>	Plumbagina
<b>PTEN</b>	Fosfatase Homóloga à Tensina

<b>PUFA</b>	Ácido Poliinsaturado
<b>ROS</b>	Reactive Oxygen Species (Espécies Reativas de Oxigênio)
<b>RPLPO</b>	Proteína da Subunidade Ribossômica Maior
<b>RPM</b>	Rotações por Minuto
<b>RT-qPCR</b>	Reação em Cadeia da Polimerase (quantitativa) por Transcrição Reversa
<b>SFB</b>	Soro Fetal Bovino
<b>SLC7A11</b>	Membro 11 da Família de Transportadores de Solutos 7
<b>SQSTM1</b>	Sequestossomo 1
<b>STAT3</b>	Transdutor de Sinal e Ativador da Transcrição 3
<b>TNF</b>	Fator de Necrose Tumoral
<b>TP53</b>	proteína de tumor 53
<b>TRAF2</b>	Fator associado ao receptor de TNF 2
<b>TRFC</b>	Receptor da Transferrina
<b>u-PA</b>	Ativador de Plasminogênio tipo Uroquinase
<b>UV</b>	Ultravioleta
<b>VEGF</b>	Fator de Crescimento Endotelial Vascular
<b>VEGFR2</b>	Receptor de Fator de Crescimento Endotelial Vascular 2
<b>Wnt</b>	Site de Integração Relacionado ao Wingless

## SUMÁRIO

<b>1</b>	<b>INTRODUÇÃO</b> .....	<b>20</b>
<b>2</b>	<b>FUNDAMENTAÇÃO TEÓRICA</b> .....	<b>21</b>
<b>2.1</b>	<b>Plumbagina</b> .....	<b>21</b>
<b>2.2</b>	<b>Apoptose</b> .....	<b>24</b>
<b>2.3</b>	<b>Danos no DNA</b> .....	<b>25</b>
<b>2.4</b>	<b>Ciclo celular</b> .....	<b>26</b>
<b>2.5</b>	<b>Proliferação, invasão, migração e angiogênese</b> .....	<b>26</b>
<b>2.6</b>	<b>Efeitos associativos</b> .....	<b>26</b>
<b>2.7</b>	<b>Plumbagina em HepG2</b> .....	<b>27</b>
<b>2.8</b>	<b>Doxorrubicina</b> .....	<b>27</b>
<b>2.9</b>	<b>Esferoides</b> .....	<b>28</b>
<b>3</b>	<b>OBJETIVOS</b> .....	<b>30</b>
<b>4</b>	<b>MATERIAIS E MÉTODOS</b> .....	<b>31</b>
<b>4.1</b>	<b>Linhagem celular e condições de cultivo</b> .....	<b>31</b>
<b>4.2</b>	<b>Agentes teste</b> .....	<b>31</b>
<b>4.3</b>	<b>Ensaio de citotoxicidade com resazurina (2D)</b> .....	<b>31</b>
<b>4.4</b>	<b>Monitoramento celular por Time-Lapse (2D)</b> .....	<b>33</b>
<b>4.5</b>	<b>Ensaio clonogênico (2D)</b> .....	<b>33</b>
<b>4.6</b>	<b>Ensaio do cometa (2D)</b> .....	<b>33</b>
<b>4.7</b>	<b>Coloração fluorescente com Hoechst 33342 e vermelho do nilo (2D)</b> .....	<b>34</b>
<b>4.8</b>	<b>Obtenção de esferoides (3D)</b> .....	<b>34</b>
<b>4.8.1</b>	<b>Obtenção do volume médio (mm<sup>3</sup>) dos esferoides e recuperação (3D)</b> .....	<b>34</b>
<b>4.8.1.1</b>	<b>Obtenção do volume médio (mm<sup>3</sup>)</b> .....	<b>34</b>
<b>4.8.1.2</b>	<b>Recuperação</b> .....	<b>35</b>
<b>4.8.2</b>	<b>Fluorescência com Hoechst 33342 e Iodeto de Propídio (PI) (3D)</b> .....	<b>35</b>
<b>4.9</b>	<b>Expressão gênica relativa (2D/3D)</b> .....	<b>35</b>
<b>4.10</b>	<b>Tratamento estatístico</b> .....	<b>36</b>
<b>4.11</b>	<b>Fluxograma experimental</b> .....	<b>37</b>

<b>5</b>	<b>RESULTADOS .....</b>	<b>38</b>
<b>6</b>	<b>DISCUSSÃO.....</b>	<b>63</b>
<b>7</b>	<b>CONCLUSÃO .....</b>	<b>71</b>
<b>8</b>	<b>REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....</b>	<b>72</b>

## 1. INTRODUÇÃO

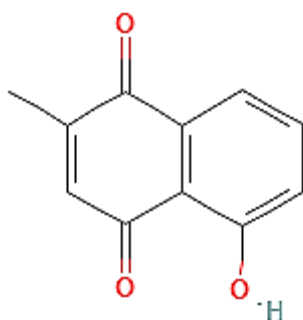
O câncer possui alto índice de mortalidade em análise global, neste quesito, é importante ressaltar os fatores que contribuem para esse fato. Uma das principais influências está no tempo de diagnóstico, sendo que quanto mais demorado, pior será o prognóstico e as chances de cura (Schiffman, Fisher & Gibbs, 2015). Além disso, durante o tratamento, não é incomum que se enfrente um grande problema: a resistência aos quimioterápicos clinicamente disponíveis, sendo que essa resistência pode já preexistir ou ser desenvolvida durante o tratamento (Amjad & Kasi, 2023). Em aspectos celulares, os tumores se caracterizam por sua heterogeneidade, apresentando, portanto, células quimiossensíveis e resistentes ao tratamento (Dagogo-Jack & Shaw, 2018). Além dessa problemática, outro fator dificulta o tratamento, o qual refere-se à toxicidade das drogas associadas a alta dosagem, levando a efeitos sistêmicos adversos, como problemas envolvendo a cardiotoxicidade (Jain, 2000). Dessa forma, a associação farmacológica pode ser uma alternativa para driblar os desafios supracitados. A doxorrubicina é extensivamente utilizada na clínica, sendo os seus mecanismos antitumorais vastamente estudados e explorados, bem como os seus efeitos adversos associados a sua toxicidade (Krischke *et al.*, 2016; Pugazhendhi *et al.*, 2018). A plumbagina, por sua vez, é um fitoquímico extraído de plantas do gênero *Plumbago*, que possui propriedades biológicas de alto interesse terapêutico, incluindo atividade antioxidante, anti-inflamatória e antiproliferativa (Bakery *et al.*, 2022; Shu *et al.*, 2022; Yao *et al.*, 2023). Dessa forma, a triagem de drogas por análise *in vitro* para o estudo do comportamento biológico celular em monocamada tem sido utilizada (Niu & Wang, 2015). Contudo, a heterogeneidade celular não é mimetizada nesse modelo experimental. Além disso, há outras características tumorais importantes que influenciam na resposta celular frente a exposição a um agente antiproliferativo, como as proteínas presentes na matriz extracelular e a adesão celular, sendo extremamente importantes para a comunicação intercelular e desenvolvimento de resistência (Brücher & Jamall, 2014; Rodrigues, Reis & Pirraco, 2024). Isso denota a importância da realização de ensaios em culturas tridimensionais na triagem de drogas. Diante do exposto, o objetivo desse trabalho é investigar os potenciais mecanismos antiproliferativos envolvidos na ação da associação de plumbagina e doxorrubicina em modelo celular *in vitro* bidimensional e tridimensional (esferoides) de células de hepatocarcinoma humano (HepG2/C3A).

## 2. FUNDAMENTAÇÃO TEÓRICA

### 2.1 Plumbagina

A 5-hidroxi-2-metil-1,4-naftoquinona, mais popularmente conhecida como plumbagina (Fig. 1), foi primeiramente isolada por D'Astafort em 1829, e é assim classificada por possuir um anel aromático fusionado ao anel de benzoquinona (Zu Astafort, 1829; Seigler, 1998). Esta configura-se como um análogo da vitamina K3, que possui peso molecular de 188,18 g/mol e solubilidade a solventes orgânicos, como o clorofórmio e o acetato de etila (Paiva *et al.*, 2004; Shukla *et al.*, 2007; National Center For Biotechnology Information, 2023). Referente aos seus aspectos físicos, apresenta coloração amarelada e cristalina, sendo sua temperatura de fusão de 78-79° C (Fieser & Dunn, 1936). Essa molécula pode ser extraída de plantas do gênero *Plumbago*, da família *Plumbaginaceae*, como a *Plumbago zeylanica* L. (Fig. 2), sendo caracterizada como um metabólito secundário (Jeyachandran *et al.*, 2009). Os fitoquímicos são compostos encontrados em plantas e – mais especificamente os metabólitos secundários – podem apresentar ações biológicas importantes no metabolismo humano. Essa classe é representada quimicamente por compostos que podem ser flavonoides, alcaloides, carotenoides, terpenoides etc. Nas plantas, os fitoquímicos desempenham um importante papel na proteção contra danos, tais como raio UV e patógenos, além de atraírem os polinizadores e auxiliarem na dispersão de sementes, como revisado por Kennedy e Wightman (2011).

**Figura 1** – Estrutura Química Molecular da Plumbagina



**Fonte:** National Center For Biotechnology Information, 2023

**Figura 2** – Flores, folhas e raízes da planta *Plumbago zeylanica* L.



**Fonte:** Mandavkar & Jalalpure, 2011

A plumbagina possui propriedades farmacológicas importantes, tais como efeitos anti-inflamatórios (Shu *et al.*, 2022), antioxidantes (Bakery *et al.*, 2022), antimicóticos (Qian *et al.*, 2022), bactericidas (Alfhili *et al.*, 2022), neuroprotetivos (Su *et al.*, 2022), hipolipidêmicos (Pai *et al.*, 2019), antiprotozoários (Titus *et al.*, 2022) e antiproliferativos (Tripathi, Rengasamy & Biswal, 2020). A estrutura de anel quinona presente em sua molécula pode ser a responsável pelos diversos efeitos biológicos que são observados nos estudos com plumbagina, uma vez que essa estrutura mimetiza a coenzima Q10, o que pode dificultar o transporte de elétrons durante o processo de fosforilação oxidativa (Alharbi *et al.*, 2019). Estudados principalmente no sistema bidimensional, os efeitos antiproliferativos da plumbagina foram observados em diversos tipos de linhagens tumorais, como câncer cervical (CaSki; HeLa), ovário (SKOV3 e A2780), mama (MCF-7), pâncreas (PANC-1), oral (CR-SAS) e melanoma murino (B16F10). Tais efeitos são decorrentes da habilidade dessa molécula em reduzir a viabilidade celular e atuar em diversas cascatas biológicas, como em vias de morte celular, ciclo celular, danos ao DNA e produção de radicais livres (Mukherjee *et al.*, 2023; Liang *et al.*, 2023; Sidhu & Capalash, 2023; Periyasamy *et al.*, 2023; Lin *et al.*, 2023).

Conforme revisado por Liu *et al.* em 2017, os efeitos antitumorais da plumbagina se devem, majoritariamente, a modulações que ocorrem nas vias PI3K, Akt, mTOR, AMPK e Ras (Fig. 3). Essas vias interagem entre si, sendo elas revisadas por Zhao *et al.* em 2017, os quais abordaram o fato de que as ERO são produzidas, principalmente, por meio do metabolismo energético mitocondrial. Esse estresse metabólico faz com que a célula ative vias específicas a fim de adaptar-se ao ambiente tumoral, assim, a depleção de glicose e outros estímulos de estresse metabólico levam a formação de ERO, o que

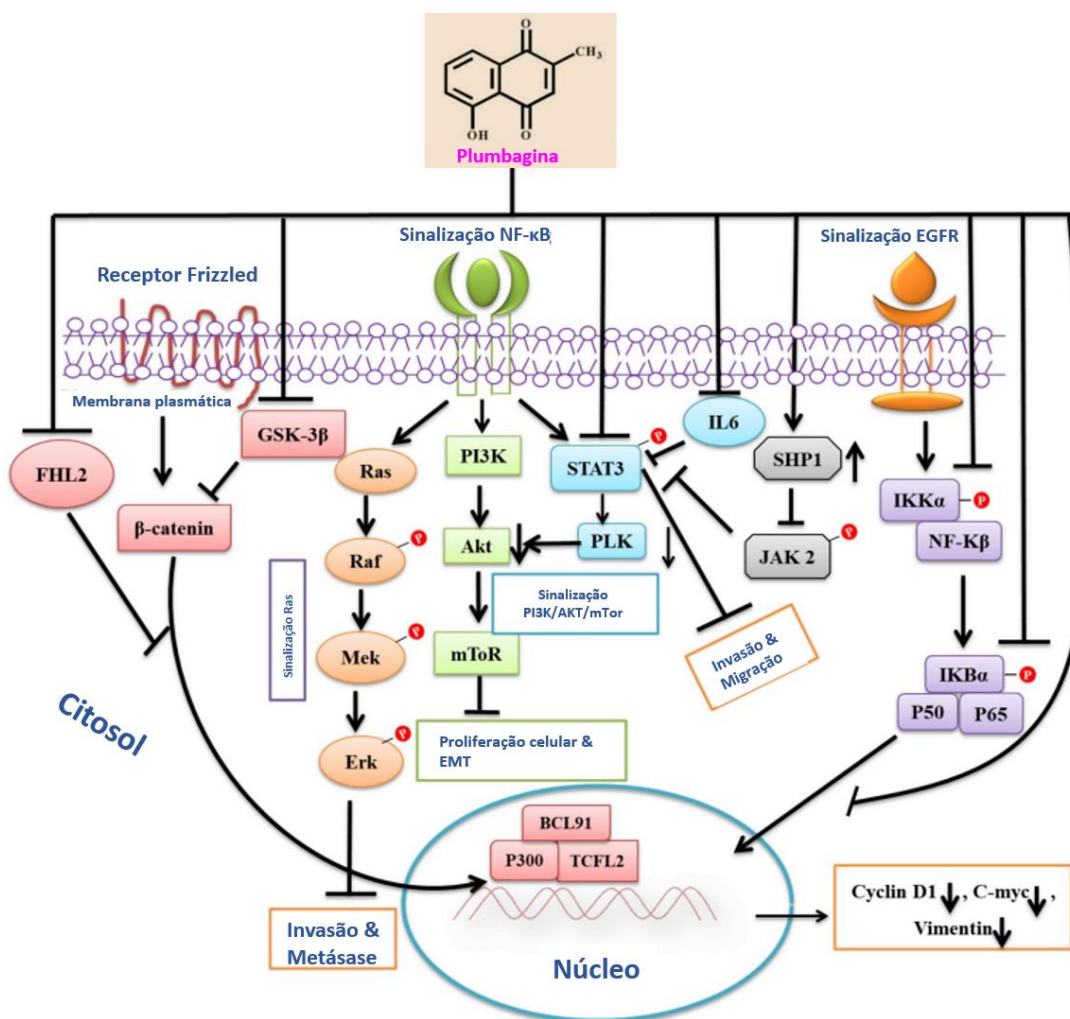
ativa a AMPK, sendo um dos métodos de sua ativação a fosforilação em razão do alto índice de AMP, o que estimula a glicólise e outros processos catabólicos. Nesse contexto de depleção energética, ocorre a ativação de AKT, a qual impede o processo apoptótico e permite a progressão tumoral antagonizando o efeito de AMPK, fazendo captação de glicose, síntese de proteínas e ativando mTOR, que por sua vez, permite um aumento no consumo de oxigênio, bem como na síntese proteica. As ERO também podem atuar inativando PTEN, o que leva a sinalização da PI3K, permitindo a sobrevivência celular tumoral. A ativação de PI3K é mediada pelo gene *Ras*, o que ocasiona a conversão da fosfatidilinositol-4,5-bisfosfato (2) em fosfatidilinositol-3,4,5-trifosfato (PIP3). Esse processo leva ao recrutamento da AKT para a região da membrana citoplasmática, onde é ativada por quinases, desencadeando a ativação de mTOR, como revisado por Ersahin, Tuncbag e Cetin-Atalay em 2015. A plumbagina aumenta a fosforilação da AMPK, e reduz a expressão de NF- $\kappa$ B, bem como a via Akt/mTOR (Wang *et al.*, 2016).

Por meio de análise de *docking* molecular, observou-se que o grupo hidroxila presente na molécula de plumbagina pode interagir com STAT3 (Li *et al.*, 2020). Conforme revisado por Yu *et al.* em 2014, essa proteína exerce funções no processo proliferativo, na angiogênese, na sobrevivência celular e na resposta imunológica e é ativada por sinalização *downstream* por meio da ativação de JAK, a qual, por sua vez, fosforila os receptores de citocinas, e isso, ativa STAT3, sendo essa translocada para o núcleo atuando como fator transcricional de genes envolvidos nos processos biológicos supracitados (Yu *et al.*, 2014).

A plumbagina também pode atuar inibindo a via Wnt/BETA-catenina (Sakunrangsit & Ketchart, 2019). Dessa forma, conforme relatado por Clevers e Nusse (2012) em sua revisão, essa via está ativa de forma excessiva em processos de carcinogênese, uma vez que ela está envolvida na manutenção da proliferação celular e, quando os ligantes Wnt ligam-se aos receptores na membrana citoplasmática, ocorre o acúmulo de BETA-catenina no citoplasma, com posterior translocação para o núcleo, onde essa atuará como fator de transcrição de vários genes, como por exemplo, o C-MYC, que é um fator de transcrição de genes envolvidos na regulação da proliferação celular e apoptose, a ciclina D1, que tem papel na regulação do ciclo celular e a MMP-7, responsável pela degradação de vários componentes da matriz extracelular. Outra via de atuação da plumbagina é a da JNK (Xue, Zhou & Qiu, 2021). Essa via foi revisada por Weston e Davis em 2007 e ela pode ser ativada por estímulos extracelulares que envolvem a fosforilação de proteínas quinases, como as MAPKKKs, as quais ativam MKK4 e

MKK7, que então, fosforilam as JNKs, as quais fosforilam fatores de transcrição como o c-Jun e p53 e outras proteínas como a Bcl-2. Essa ativação de JNK pode induzir paradas no ciclo celular e apoptose, regulando positivamente a expressão de Bax e Bak, e negativamente a expressão de Bcl-2.

**Figura 3** – Vias Envolvidas na Ação da Plumbagina



Fonte: Tripathi, Panda & Biswal, 2019 (Adaptação)

## 2.2 Apoptose

As células cancerosas apresentam uma disfunção na sinalização das vias apoptóticas, dessa forma, essas células não possuem a capacidade de serem endereçadas a morte celular programada e, portanto, progridem desenfreadamente, formando a massa tumoral. Esse processo leva a desestabilização da homeostase celular, ou seja, há a perturbação da dinâmica fisiológica dos processos biológicos intracelulares, conforme trabalho de revisão de Wong e Sy em 2011. Dentro desse contexto, enfatiza-se a

relevância da plumbagina, uma vez que a principal via de atuação desse fitoquímico é a ativação do processo de morte por apoptose, sendo que esse processo pode ser desencadeado de diversas formas, sendo esses mecanismos detalhados a seguir.

A plumbagina pode atuar na membrana mitocondrial promovendo a redução do seu potencial e, dessa forma, levando a células a morte por apoptose, o que pode ser evidenciado por citometria de fluxo com coloração de anexina V e iodeto de propídio (Sidhu & Capalash, 2023). A relatada disfunção mitocondrial foi estudada por Lin *et al.* em 2023 e está associada ao fato de que a plumbagina induz a formação de ERO, sendo observado o acúmulo das mesmas na mitocôndria. Ainda, quando realizada a inibição de ERO utilizando NAC, o efeito apoptótico também cessou, demonstrando a relação entre a formação de ERO no efeito antiproliferativo da plumbagina (Liu *et al.*, 2023). Outras vias de morte apoptótica estimuladas pela plumbagina, podem ser a estimulação da expressão da caspase 9, e a modulação da Akt, sendo a plumbagina capaz de promover a redução em sua expressão (Sidhu & Capalash, 2023).

### **2.3 Danos no DNA**

Os mecanismos de reparo a danos no DNA foram revisados por Huang e Zhou em 2021 e incluem o reparo por excisão de nucleotídeo (NER), reparo por recombinação homóloga e reparo por união de extremidades não homólogas. As células cancerosas que apresentam deficiência no mecanismo de reparo do DNA podem apresentar maior suscetibilidade aos quimioterápicos cujo mecanismo de ação seja a indução de danos ao DNA.

Uma das principais formas de atuação da plumbagina na morte celular é o dano ao DNA, uma vez que essa molécula está altamente associada a produção de espécies reativas de oxigênio, o que leva a quebra das fitas de DNA e estresse no retículo endoplasmático (Hwang *et al.*, 2015; Periasamy *et al.*, 2022; Lin *et al.*, 2023). Ademais, a plumbagina pode se ligar à topoisomerase II, como demonstrado por Dissanayake *et al.* em 2020, o que leva ao comprometimento da estrutura de DNA. Além disso, os mecanismos de reparo ao dano no DNA podem ser inviabilizados pela plumbagina, uma vez que essa atua reduzindo PARP, o qual, por sua vez, tem múltipla função no reparo do DNA, o que inclui o reparo de quebras de fitas dupla (Ray Chaudhuri & Nussenzweig 2017; Sidhu & Capalash, 2023). A plumbagina apresenta genotoxicidade, a qual pode ser avaliada por meio do ensaio do cometa (Mancilla *et al.*, 2019; Crippa *et al.*, 2020).

## 2.4 Ciclo celular

O ciclo celular é o processo de divisão celular pelo qual as células passam para a formação de duas células filhas. Conforme a revisão de Evan e Vousden de 2001, na passagem do ciclo celular, há a síntese de material genético, bem como moléculas reguladoras que, caso a célula apresente defeitos, essas moléculas encaminham a célula para a morte. Nas células cancerosas, esses mecanismos apresentam alterações que permitem a progressão da proliferação celular mesmo que a célula apresente defeitos.

A plumbagina pode atuar fazendo parada do ciclo celular, sendo relatadas paradas celulares na fase G2/M, podendo ser resultado da indução de danos no DNA ou da regulação positiva de p21 e p53 e regulação negativa de ciclina B e CDK1 (Crippa *et al.*, 2020; Zhang *et al.*, 2021). Foi observada também a parada em S (Mancilla *et al.*, 2019). Esses efeitos impedem as células de se proliferarem, o que pôde ser visualizado em ensaios clonogênicos com células expostas à plumbagina (Sidhu & Capalash, 2023). Há também relato de sua atuação na parada de ciclo em G1 em células de câncer de cólon humano (HCT116) (Eldhose *et al.*, 2014).

## 2.5 Proliferação, invasão, migração e angiogênese

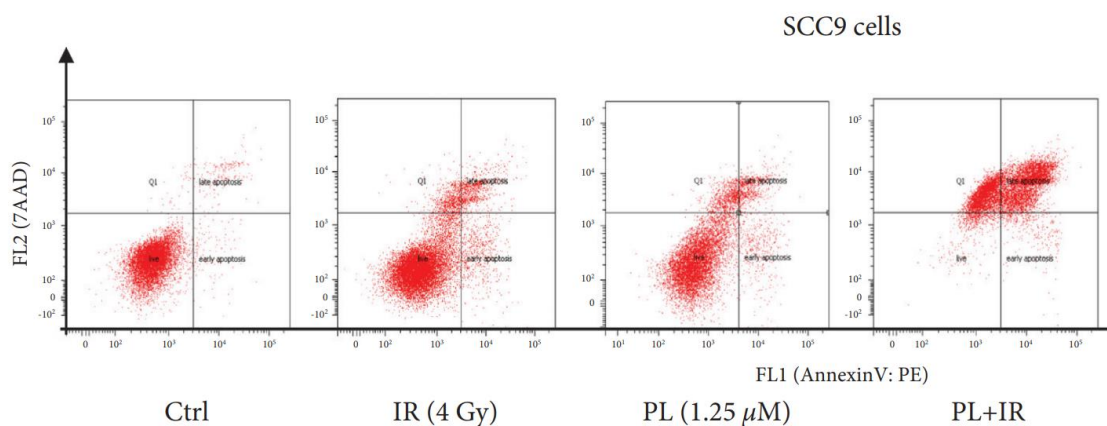
Plumbagina atua na expressão de fatores de transcrição envolvidos na proliferação, como o OCT4 e KLF4 e do cofator de DNA polimerase, o PCNA (Liang *et al.*, 2023). A plumbagina também inibe a atividade de MMP-2, a qual tem por função degradar o colágeno da matriz extracelular e a atividade da u-PA, que também atua na degradação de matriz extracelular, o que leva a metástase (Shih *et al.*, 2009; Periyasamy *et al.*, 2023). Em células não tumorais, foi observada a não citotoxicidade da plumbagina, ou ainda, um efeito citoprotetor (Zaki *et al.*, 2018; Zhang *et al.*, 2022; Titus *et al.*, 2022). Achados igualmente importantes sobre a plumbagina demonstram o efeito de inibir a angiogênese por meio da modulação em VEGF e VEGFR2 (Lai *et al.*, 2012).

## 2.6 Efeitos associativos

A plumbagina, pode atuar como quimiossensibilizante, melhorando a atuação de quimioterápicos clinicamente disponíveis (Pan *et al.*, 2023). A plumbagina, associada ao cobre, atuou na desagregação de microtúbulos, bem como induziu espécies reativas do oxigênio e causou danos ao DNA (Mukherjee *et al.*, 2023). A plumbagina também pode auxiliar na sensibilização de células à radiação ionizante (radioterapia), aumentando a

quantidade de células em apoptoses, o que demonstra a potencialidade sinérgica da plumbagina (Fig. 4) (Pan *et al.*, 2021).

**Figura 4** – Efeito Sinérgico da Associação de Plumbagina e Radiação Ionizante. Ctrl – Controle; IR – Radiação Ionizante; PL – Plumbagina.



Fonte: Pan *et al.*, 2021

## 2.7 Plumbagina em HepG2

A plumbagina é citotóxica para células de carcinoma hepático e ativa enzimas envolvidas com vias metabólicas de xenobióticos (*CYP1A1*, *CYP1A2* e *CYP3A4*) (Crippa *et al.*, 2020). Entretanto, também foi relatada a diminuição na atividade da *CYP3A4* (Chatuphonprasert *et al.*, 2021). A morte induzida pela plumbagina em HepG2 está altamente associada a processos apoptóticos, uma vez que nesse tipo celular ocorre aumento na expressão de mRNAs de *BBC3*, *CASP3*, *CASP8*, *p21*, *GADD45A*, *H2AFX* e *BCL-2* (Lu *et al.*, 2018; Crippa *et al.*, 2020) e proteína Bax, e reduziu a expressão proteica de *BCL-2* (Hwang *et al.*, 2015). Outras proteínas que também tiveram sua expressão alterada são as *TP53* e *MAPK1* (Zhou *et al.*, 2019). Há também evidências da atuação da plumbagina em vias autofágicas, sendo observada diminuição na expressão de mRNA de *BECN1* (Crippa *et al.*, 2020). A plumbagina reduz a expressão de *NF- $\kappa$ B*, o que está associado ao impedimento da transcrição de fatores que estimulam a proliferação e sobrevivência celular, o que pôde ser observado em ensaios de citotoxicidade, onde houve a redução da viabilidade celular de maneira dose dependente (Shih *et al.*, 2009).

## 2.8 Doxorrubicina

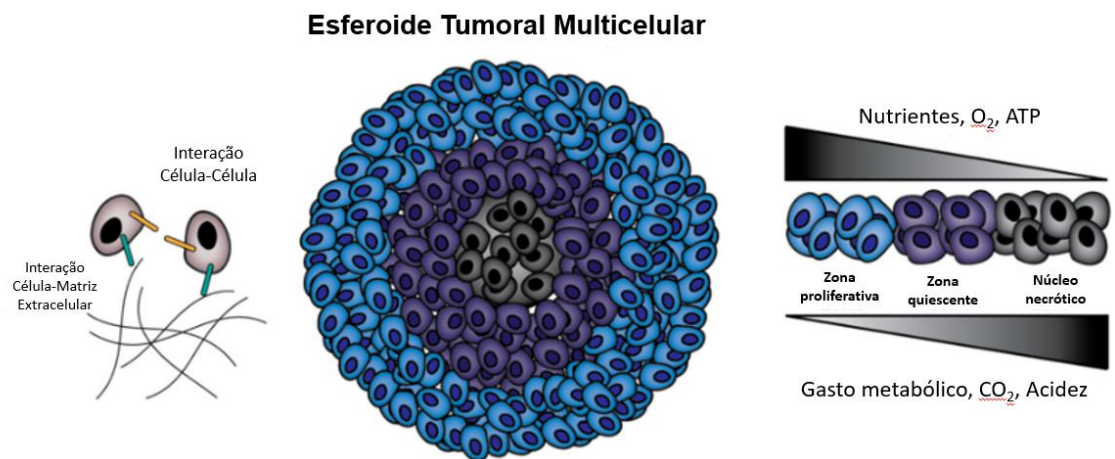
A Doxorrubicina foi isolada de um microrganismo em 1967 na Itália, onde pesquisadores, em 1963, já haviam isolado uma molécula parecida, a Daunorrubicina,

que foi isolada de *Streptomyces peucetius* e, com o passar dos anos, foi explorado o seu potencial antiproliferativo, e assim que a Doxorubicina foi isolada e os seus estudos iniciaram, observou-se que ela era mais efetiva no tratamento tumoral do que a Daunorrubicina, sendo hoje utilizada na clínica como um método de quimioterapia, devido às suas propriedades de intercalar o DNA e bloquear a topoisomerase II (Kohn, 2022). Contudo, seu uso está correlacionado ao desenvolvimento de insuficiência cardíaca (Kim *et al.*, 2018).

## 2.9 Esferoides

A cultura tridimensional, em especial, o esferoide, é um modelo de triagem de drogas que mais adequadamente se assemelha ao microambiente tumoral *in vivo*, quando comparado à cultura celular de monocamada (2D). Entre as características dos esferoides (Fig. 5), está a produção da matriz extracelular, a qual é um ambiente que interage com a célula e pode ser um fator que influencia na resposta celular frente à exposição a um xenobiótico, dessa forma, as informações biológicas obtidas são mais significativas. Ademais, os esferoides também mimetizam melhor a comunicação intercelular, bem como o heterogêneo aporte nutricional e de oxigênio, onde as regiões mais externas dos esferoides possuem maior disponibilidade de nutrientes e oxigênio e essa característica, conseqüentemente, culmina na formação de regiões hipóxicas, sendo que a hipóxia é um fator de resistência tumoral, uma vez que drogas de efeito antitumoral podem necessitar de oxigênio para atingir a sua eficácia (Ishiguro *et al.*, 2017; Kamatar, Gunay & Acar, 2020).

**Figura 5** – Representação Ilustrativa do Modelo 3D – Esferoide



**Fonte:** Kamatar; Gunay & Acar, 2020 (Adaptado)

### 3. OBJETIVOS

#### 3.1 Objetivo Geral

Investigar os potenciais mecanismos antiproliferativos envolvidos na ação da associação de plumbagina e doxorrubicina em modelo celular *in vitro* bidimensional e tridimensional (esferoides) de células HepG2/C3A.

#### 3.2 Objetivos Específicos

Avaliar a influência da exposição à combinação de plumbagina com doxorrubicina em células HepG2/C3A referente à:

Citotoxicidade por meio do ensaio de citotoxicidade com resazurina (2D);

Alterações morfológicas em tempo real por meio do monitoramento por time-lapse (2D);

Formação de colônias com o ensaio clonogênico (2D);

Genotoxicidade com o ensaio do cometa (2D);

Marcação da produção de corpúsculos lipídicos e disposição da cromatina com Hoechst 33342 e vermelho do Nilo (2D);

Expressão gênica (mRNA) das vias de morte, regulação do ciclo celular, reparo do DNA, estresse oxidativo e de retículo e metabolismo de xenobióticos (2D/3D);

Alteração do volume de esferoides e recuperação da proliferação celular (3D);

Marcação nuclear e viabilidade celular esferoidal com Hoechst 33342 e Iodeto de Propídio (PI) (3D).

## 4. MATERIAIS E MÉTODOS

### 4.1 Linhagem celular e condições de cultivo

Foram utilizadas células de hepatocarcinoma humano obtidas do Banco de Células do Rio de Janeiro (HepG2/C3A), livres de micoplasma, as quais foram incubadas sob condições controladas de temperatura (37 °C) e atmosfera úmida (5% CO<sub>2</sub>) em meio de cultivo Minimum Essential Medium (MEM), suplementado com 10% de soro fetal bovino (SFB), antibiótico/antimicótico (1%) e piruvato de sódio (1 mM). Para a realização de todos os ensaios, foi mensurada a viabilidade celular com corante Azul de Tripán no contador automático Cell Counter – Life Technology, sendo esta aceita quando superior a 90%.

### 4.2 Agentes teste

Foram utilizadas a plumbagina (PLB) (Sigma-Aldrich, CAS 481-42-5; PM 188,18 g/mol) e a doxorubicina (DX) (Pharmacia, CAS: 25316-40-9, PM: 579,98 g/mol) dissolvidas em dimetilsulfóxido (DMSO) (Sigma Aldrich, CAS: 67-68, PM: 78,13 g/mol).

### 4.3 Ensaio de Citotoxicidade com Resazurina (2D)

Em placas de 96 poços, plaqueou-se  $1 \times 10^4$  célula/poço. Após 24h de incubação, realizou-se o tratamento com as concentrações de 8, 16, 32 e 48 µM de Plumbagina e 0,1, 0,2, 0,3, 0,4, 0,5 e 1 µM de Doxorubicina e, como controle de veículo, utilizou-se 0,025% de DMSO (correspondente a concentração de DMSO presente em 48 µM de Plumbagina). Com 24h de tratamento, foi adicionada a resazurina (60 µM) e após 3h fez-se a leitura em espectrofotômetro de fluorescência Glomax® (com comprimentos de onda de 520nm de excitação e 580-640nm de emissão). O ensaio foi realizado em 3 repetições experimentais tendo 6 replicatas/tratamento (O'Brien & Pognan, 2000).

A viabilidade celular (%) foi calculada com a fórmula: Viabilidade Celular (%) =  $[(A_{\text{tratamento}} - A_{\text{controle}}) \times 100]$ , onde A indica a média da unidade arbitrária de fluorescência

obtida (já descontada a média do branco). E, a partir dos dados, obteve-se a IC<sub>25</sub> da doxorubicina e a IC<sub>50</sub> da plumbagina no Software GraphPad Prism 9.0 (regressão não linear), as quais foram utilizadas para nos próximos ensaios.

Fez-se também o ensaio de viabilidade das seguintes associações (3 repetições experimentais e 4 replicatas/tratamento): IC<sub>25</sub> Doxorubicina (0,3 µM) + ½ IC<sub>50</sub> Plumbagina (9,2 µM); IC<sub>25</sub> Doxorubicina (0,3 µM) + IC<sub>50</sub> Plumbagina (18,4 µM); IC<sub>25</sub> Doxorubicina (0,3 µM) + 2 × IC<sub>50</sub> Plumbagina (36,8 µM); Controle de Veículo (CV): 0,026% DMSO e Controle Positivo (CP): Doxorubicina 2 µM, seguindo os mesmos parâmetros do ensaio, os quais estão supracitados no primeiro parágrafo desse tópico.

Calculou-se, como descrito por Ryall & Tan, 2015, o efeito das associações, segundo o modelo de independência de Bliss, o qual dispõe que, o efeito (E) aditivo de duas drogas (“a” e “b”), se dá pela multiplicação de seus efeitos de maneira isolada (portanto,  $E_a \times E_b = E_c$ ), caso o valor do efeito (aqui visto como viabilidade - %) da associação seja menor que o  $E_c$  previsto, o efeito é sinérgico.

#### **4.3.1 Tratamentos de ensaios em monocamada (2D)**

Nos ensaios em monocamada posteriores ao ensaio de citotoxicidade as células foram tratadas conforme as seguintes concentrações: Controle de Veículo (CV): 0,017% DMSO; IC<sub>25</sub> Doxorubicina (0,3 µM) (DX); PLB 1: ½ IC<sub>50</sub> Plumbagina (9,2 µM); PLB 2: IC<sub>50</sub> Plumbagina (18,4 µM); Associação 1 (A1): IC<sub>25</sub> Doxorubicina (0,3 µM) + ½ IC<sub>50</sub> Plumbagina (9,2 µM); Associação 2 (A2): IC<sub>25</sub> Doxorubicina (0,3 µM) + IC<sub>50</sub> Plumbagina (18,4 µM).

#### **4.3.2 Tratamentos de ensaios em modelo tridimensional (esferoides) (3D)**

Quanto aos esferoides, esses foram tratados conforme as seguintes concentrações: Controle de Veículo (CV): 0,026% DMSO; IC<sub>25</sub> Doxorubicina (0,3 µM) (DX); PLB 1: ½ IC<sub>50</sub> Plumbagina (9,2 µM); PLB 2: IC<sub>50</sub> Plumbagina (18,4 µM); PLB 3: 2x IC<sub>50</sub> Plumbagina (36,8 µM); Associação 1 (A1): IC<sub>25</sub> Doxorubicina (0,3 µM) + ½ IC<sub>50</sub> Plumbagina (9,2 µM); Associação 2 (A2): IC<sub>25</sub> Doxorubicina (0,3 µM) + IC<sub>50</sub> Plumbagina (18,4 µM); Associação 3 (A3): IC<sub>25</sub> Doxorubicina (0,3 µM) + 2x IC<sub>50</sub> Plumbagina (36,8 µM).

#### 4.4 Monitoramento Celular por Time-Lapse (2D)

Semeou-se  $5,5 \times 10^4$  células em placas de 48 poços e, após 24h de estabilização em incubadora, fez-se o tratamento e a cultura celular foi monitorada por 24h no microscópio EVOS® FL Auto Cell Imaging System, por meio de fotomicrografias obtidas em intervalos de 3 minutos. O ensaio foi realizado em condições controladas de temperatura (37°C) e atmosfera úmida (5% CO<sub>2</sub>).

#### 4.5 Ensaio Clonogênico (2D)

Semeou-se  $2,5 \times 10^5$  células em placas de 12 poços e, após 24h de estabilização em incubadora, fez-se o tratamento. Após 24 h de tratamento, transferiu-se 500 células de cada tratamento para uma nova placa (24 poços). Após 10 dias em incubadora, mensurou-se a viabilidade com resazurina (60 µM), sendo a leitura da fluorescência realizada após 3 h de incubação do corante, em espectrofotômetro de fluorescência Glomax® (com comprimentos de onda de 520 nm de excitação e 580-640 nm de emissão). Posteriormente, removeu-se a resazurina, fixou-se as colônias com metanol e ácido acético (3:1) por 5 min e fez-se a coloração com cristal violeta (0,5%) por 15 min. Obteve-se as fotografias das colônias fixadas e coradas. O ensaio foi realizado segundo descrito por Franken *et al.* 2006. O ensaio foi realizado em 3 repetições experimentais.

#### 4.6 Ensaio do Cometa (2D)

O ensaio foi realizado segundo descrito por Olive, Banáth & Durand, 1990. Semeou-se  $2,5 \times 10^5$  células em placas de 12 poços e, após 24h de estabilização em incubadora, fez-se o tratamento. Após 3 h de tratamento, ressuspendeu-se as células em 300 µL de PBS e adicionou-se agarose de baixo ponto de fusão (0,8%). A suspensão celular foi adicionada em lâminas previamente gelatinizadas com agarose (1,5%) e após a solidificação, foram submetidas a lise química por 24 h a 4 °C, seguida de tratamento com solução alcalina por 20 min. As lâminas foram submetidas a eletroforese em tampão alcalino (pH>13), 1V/cm e 300 mA por 20 min, seguido de neutralização (pH 7,5) e fixação com etanol absoluto e armazenamento a 4 °C. A análise das lâminas foi feita por meio de coloração com brometo de etídio (2 µg/mL), sendo avaliadas 100

células/tratamento por meio de fotomicrografias obtidas com o microscópio EVOS® FL Auto Cell Imaging System (Thermo Fisher) com 200 × de magnificação, nas quais as caudas foram avaliadas por classificação visual quanto ao índice de dano (classes 0 a 4) e então, fez-se o cálculo do índice de dano total (score) de cada tratamento, que é calculado por meio da fórmula: índice de dano total =  $0 \times (\text{n}^\circ \text{ de nucleíodes classe 0}) + 1 \times (\text{n}^\circ \text{ de nucleíodes classe 1}) + 2 \times (\text{n}^\circ \text{ de nucleíodes classe 2}) + 3 \times (\text{n}^\circ \text{ de nucleíodes classe 3}) + 4 \times (\text{n}^\circ \text{ de nucleíodes classe 4})$ , sendo 400 o dano máximo, onde os 100 nucleíodes avaliados classificam-se como classe 4 e 0 quando não há dano, onde os 100 nucleíodes avaliados classificam-se como classe 0. O ensaio foi realizado em 3 repetições experimentais.

#### **4.7 Coloração Fluorescente com Hoechst 33342 e Vermelho do Nilo (2D)**

Semeou-se  $2,5 \times 10^5$  células em placas de 12 poços e, após 24h de estabilização em incubadora, fez-se o tratamento. Após 24 h de tratamento, adicionou-se 5 µL de Hoechst 33342 (NucBlue™ Live ReadyProbes™ Reagent, Invitrogen, EUA) e 5 µL de corante Vermelho do Nilo (10 µg/mL). Após 30 minutos, foram capturadas fotomicrografias de fluorescência por meio do microscópio EVOS® FL Auto Cell Imaging System (Thermo Fisher Scientific, USA).

#### **4.8 Obtenção de Esferoides (3D)**

Foram semeadas  $2 \times 10^3$  células/poço em placas de 96 poços previamente revestidos com agarose de baixo ponto de fusão (1,5%) para remoção da aderência. As placas foram centrifugadas por 5 min a 2500 RPM e, posteriormente, fez-se a incubação a 37 °C com disponibilidade de 5% CO<sub>2</sub> por 6 dias.

##### **4.8.1 Obtenção do Volume Médio (mm<sup>3</sup>) dos Esferoides e Recuperação (3D)**

###### **4.8.1.1 Obtenção do Volume médio (mm<sup>3</sup>)**

Os esferoides tratados com DX, PLB 1, PLB 2, PLB 3, A1, A2 e A3 foram fotomicrografados com 0 h, 24 h, 48 h e 72 h de tratamento por meio do microscópio

EVOS® FL Auto Cell Imaging System (Thermo Fisher Scientific, USA). Realizou-se a análise das fotomicrografias no software AnaSP e ReViSP (Piccinini, 2015; Piccinini *et al.*, 2015). O ensaio foi realizado em 3 repetições experimentais.

#### 4.8.1.2 Recuperação

Após 72 h de tratamento, foi realizada a transferência dos esferoides para placas de 48 poços contendo 300 µL de meio/poço. Tendo 72 h de transferência, foi feita a análise qualitativa e a captura das imagens com o microscópio EVOS® FL Auto Cell Imaging System (Thermo Fisher Scientific, USA).

#### 4.8.2 Fluorescência com Hoechst 33342 e Iodeto de Propídio (PI) (3D)

Após 72 h de tratamento com DX, PLB 1, PLB 2, PLB 3, A1, A2 e A3, foi adicionado 3 µL de Hoechst 33342 (NucBlue™ Live ReadyProbes™ Reagent, Invitrogen, EUA) e 3 µL de Iodeto de Propídeo (PI)(50µg/mL) (Invitrogen, EUA). Após 30 min, a fluorescência foi analisada no microscópio EVOS® FL Auto Cell Imaging System (Thermo Fisher Scientific, USA) e as imagens capturadas.

#### 4.9 Expressão gênica relativa (2D/3D)

A fim de se avaliar a expressão relativa de genes envolvidos nas vias de morte celular (*CASP3*, *CASP8*, *CASP9*, *PARP1*, *BBC3*, *BIRC5*, *BCL2* e *TNF*), autofagia (*BECN1* e *SQSTM1*), regulação do ciclo celular (*C-MYC*, *NF-kB*, *CDKN1A*, *M-TOR*, *TRAF2*), reparo de danos ao DNA (*H2AFX*, *GADD45A* e *GADD45G*), estresse oxidativo (*GPXI*), estresse no retículo endoplasmático (*EIF2AK3* e *ERNI*), metabolismo (*CYP11A1*, *CYP11A2*, *CYP3A4*, *CYP2E1*, *CYP2C9*) e marcadores de ferroptose e piroptose (*NQO1*, *NRF2*, *SLC7A11*, *ASNS*, *HMOX1*, *CHAC1*, *ACSL4*, *NFE2L2*, *TRFC*, *GSDMD*), foi feita a reação em cadeia da polimerase por transcriptase reversa (RT-qPCR) no termociclador BIO-RAD CFX96 com o PowerUp™ SYBR™ Green Master Mix (1X) e primers (10 pmol) (Tabela S6 – Material Suplementar), sendo utilizados como genes de referência os genes *GAPDH* (2D) e *RPLPO* (3D). Esse ensaio foi realizado em triplicata (2D) e duplicata (3D), sendo que, para o 3D, cada tratamento representa um pool de 15 esferoides.

Para a obtenção do RNA da monocamada, semeou-se  $2,5 \times 10^5$  células em placas

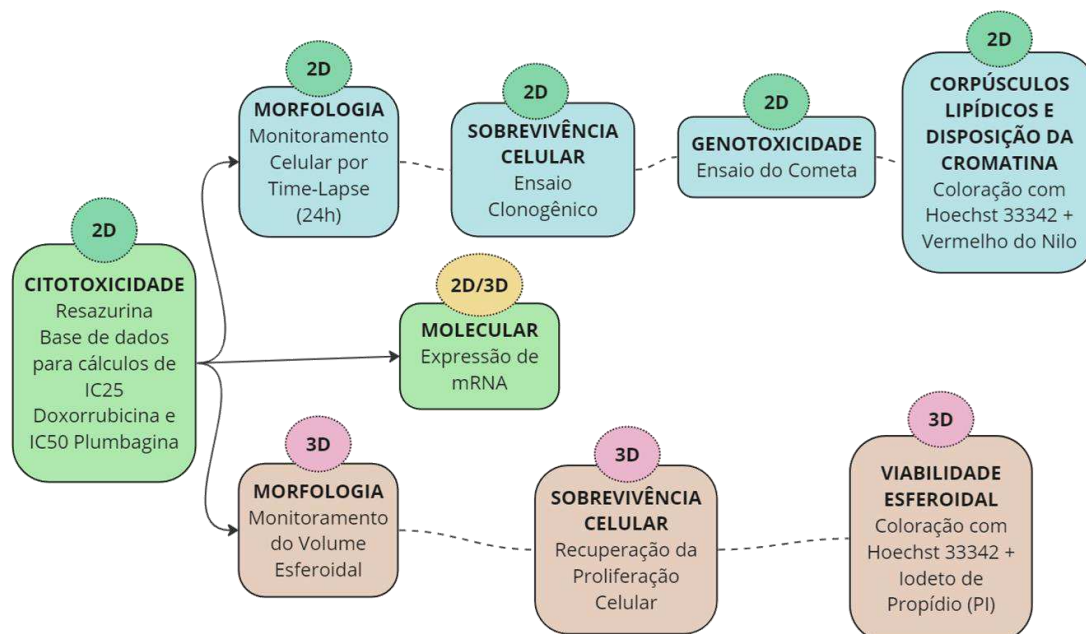
de 12 poços e, após 24h de estabilização em incubadora, fez-se o tratamento. Após 24 h de tratamento com DX, PLB 1, PLB 2, A1 e A2, lavou-se as células duas vezes com PBS e extraiu-se o RNA total usando o PureLink™ RNA Mini Kit (Life Technologies), mediante orientações do fabricante. Já para a obtenção de RNA dos esferoides, fez-se pool de 15 esferoides, tratados com DX, PLB 1, PLB 2, A1 e A2, no qual foi adicionado o tampão de lise e, em seguida, o pool foi submetido a processo de sonicação por 3 minutos e, então, seguiu-se as orientações do fabricante para a extração do RNA total (PureLink™ RNA Mini Kit – Life Technologies). As amostras de RNA foram quantificadas e qualificadas (quanto ao seu grau de pureza) no espectrofotômetro BioDrop  $\mu$ Lite, sendo validadas com base na razão das absorbâncias ( $A_{260}/A_{280}$ ), a qual foi aceita quando entre 1,9 e 2. O cDNA foi sintetizado no termociclador T100™ Thermal Cycler BIO-RAD, onde 500 ng (2D) e 300 ng (3D) de RNA total de cada replicata foi diluído em água ultrapura ( $V_f = 12,4 \mu\text{L}$ ) e, em seguida, foi adicionado 2  $\mu\text{L}$  de dNTPs (2,5  $\mu\text{M}$ ) e 1  $\mu\text{L}$  de oligo(dT) (20 pmol), a reação ocorreu por 15'' a 60 °C seguida de choque térmico. Posteriormente, adicionou-se 0,1  $\mu\text{L}$  de RNase OUT (40 U/ $\mu\text{L}$ ), 4  $\mu\text{L}$  5x first-strand buffer e 0,5  $\mu\text{L}$  de M-MLV-RT (200 U/ $\mu\text{L}$ ), a reação ocorreu por 2'' a 37 °C, 45'' a 50 °C e 15'' a 70 °C. O cDNA foi diluído na razão de 1:10 e usado na reação de RT-qPCR que ocorreu por 40 ciclos, sendo 5'' a 95 °C, 15' a 95 °C, 20' a 58 °C, 20' 72 °C, com a curva de melting analisada ao final de cada reação em 50 °C a 90 °C, com 0,5 °C/ciclo.

#### 4.10 Tratamento estatístico

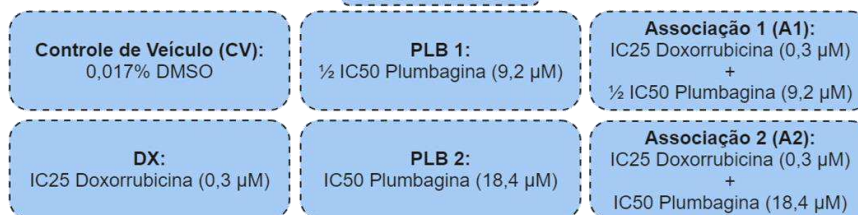
A normalidade dos dados foi verificada realizando-se o teste de Shapiro-Wilk. A análise estatística foi efetuada no Software GraphPad Prism ® 9.4 (GraphPad Software, Inc.). Os dados estão apresentados por média  $\pm$  desvio padrão, com  $p \leq 0,05$ . Os dados da citotoxicidade foram analisados por ANOVA com post-hoc de Tukey. O efeito preditivo (sinérgico ou aditivo) foi analisado por teste T. Os dados obtidos no ensaio clonogênico e cometa foram analisados por ANOVA com post-hoc de Tukey. Os dados obtidos no monitoramento do volume esferoidal foram analisados por ANOVA de duas vias, com post-hoc de Dunnett e de Tukey. A análise da Expressão Gênica Relativa foi realizada por meio de  $2^{-\Delta\Delta\text{Ct}}$ , sendo significativa a expressão que apresentasse p-valor  $\leq 0,05$  (teste T), e  $\log(2) > 1$  ou  $< -1$ .

## 4.11 Fluxograma Experimental

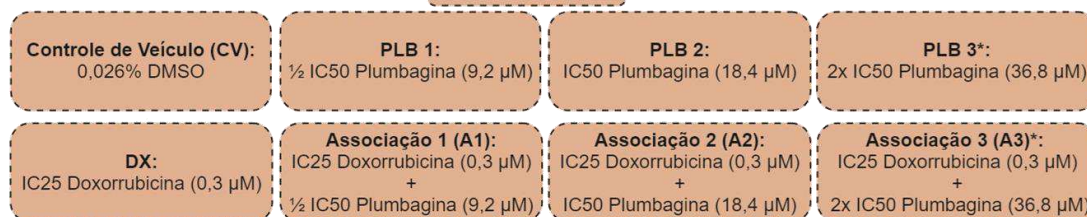
Figura 6 – Delineamento Experimental.



### Tratamentos 2D



### Tratamentos 3D



\* no 2D, testados somente no ensaio de citotoxicidade

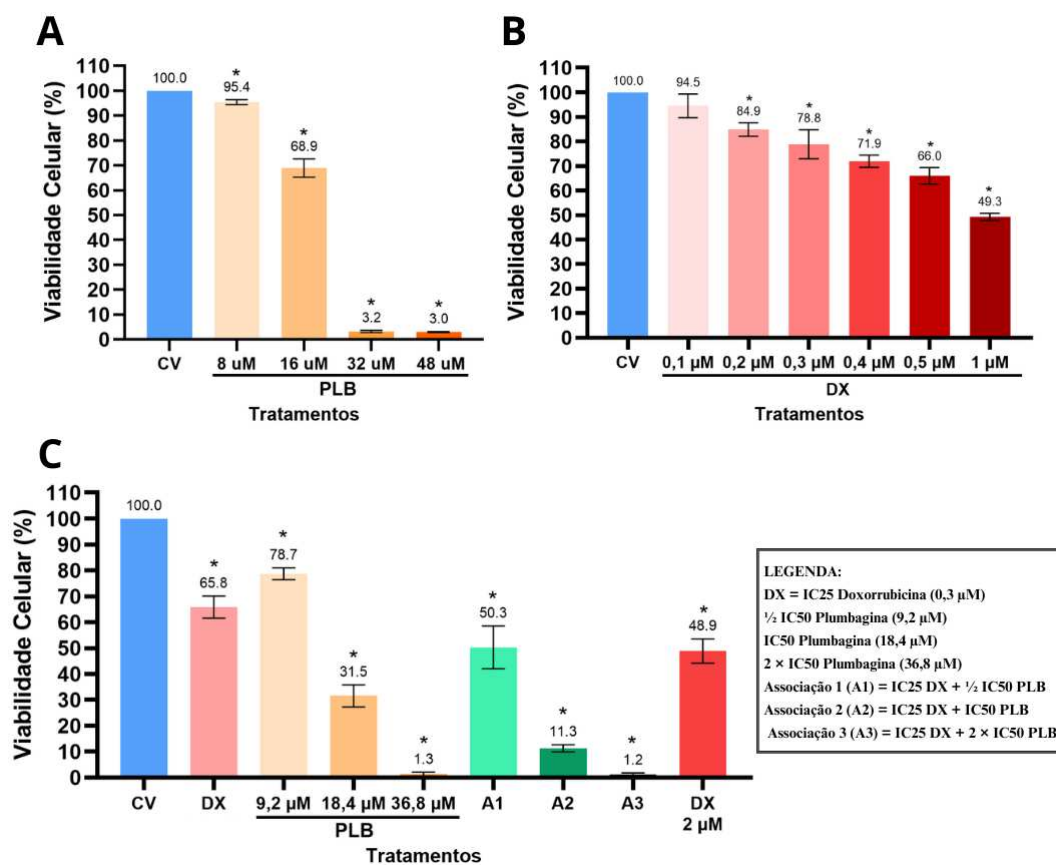
## 5. RESULTADOS

### 5.1 Ensaio de Citotoxicidade com Resazurina e Cálculo do Efeito pelo Modelo de Independência de Bliss (2D)

Após 24h de tratamento com plumbagina e doxorrubicina, houve redução da viabilidade. A plumbagina apresentou redução da viabilidade (%) com padrão dose-dependente, com valores significativos em todas as concentrações testadas (8  $\mu\text{M}$ : 95,4; 16  $\mu\text{M}$ : 68,9; 32  $\mu\text{M}$ : 3,2; 48  $\mu\text{M}$ : 3) (Fig. 7.A). Da mesma forma, houve redução da viabilidade (%) de células tratadas com doxorrubicina com valores significativos a partir de 0,2  $\mu\text{M}$  em padrão de dose-dependência (0,1  $\mu\text{M}$ : 94,5; 0,2  $\mu\text{M}$ : 84,8; 0,3  $\mu\text{M}$ : 78,8; 0,4  $\mu\text{M}$ : 71,8; 0,5  $\mu\text{M}$ : 65,9; e 1  $\mu\text{M}$ : 49,2) (Fig. 7.B). A  $\text{IC}_{50}$  calculada para plumbagina foi de 18,4  $\mu\text{M}$ , enquanto, a  $\text{IC}_{25}$  para doxorrubicina foi de 0,3  $\mu\text{M}$ . No ensaio de citotoxicidade das associações, obteve-se as seguintes viabilidades (%): DX  $\text{IC}_{25}$ : 65,8; PLB  $\frac{1}{2}$   $\text{IC}_{50}$ : 78,7; PLB  $\text{IC}_{50}$ : 31,5; PLB 2 x  $\text{IC}_{50}$ : 1,3; A1: 50,3 (DX  $\text{IC}_{25}$ /PLB  $\frac{1}{2}$   $\text{IC}_{50}$ ); A2: 11,3 (DX  $\text{IC}_{25}$ /PLB  $\text{IC}_{50}$ ); A3: 1,2 (DX  $\text{IC}_{25}$ /PLB 2 x  $\text{IC}_{50}$ ). A viabilidade de células tratadas com as associações de plumbagina (PLB) e doxorrubicina (DX) estão representadas na Figura 7.C.

Ainda, por meio do cálculo do efeito, predisposto pelo Modelo de Independência de Bliss, foi possível inferir que a associação 1 (efeito médio (predição) ( $E_c$ )=0,517 ou 51,7%) apresenta efeito aditivo, uma vez que a associação teve o  $E_c$  médio de 0,503 ou 50,3%, portanto, não apresentando diferença do efeito médio calculado por predição, enquanto a associação 2 (predição do  $E_c$ =0,206 ou 20,6%), apresenta efeito sinérgico, uma vez que a associação teve o  $E_c$ =0,113% ou 11,3%, que é menor que efeito médio calculado por predição.

**Figura 7 – Ensaio de Citotoxicidade: HepG2/C3A tratadas 24h com Plumbagina e Doxorrubicina. (A) Viabilidade celular (%) após 24h de tratamento com plumbagina. (B) Viabilidade celular (%) após 24h de tratamento com doxorrubicina. (C) Viabilidade celular (%) após 24h de tratamento com associação de doxorrubicina e plumbagina.** Dados analisados por ANOVA com post-hoc de Dunnet (A e B) e Tukey (C), apresentados como média  $\pm$  desvio padrão, com  $p \leq 0,05$ .



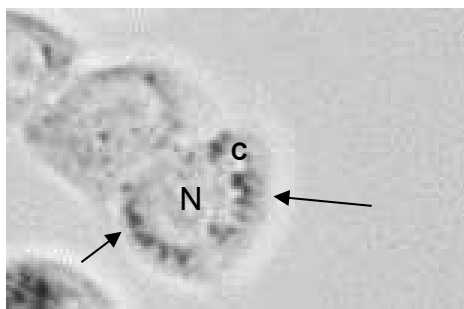
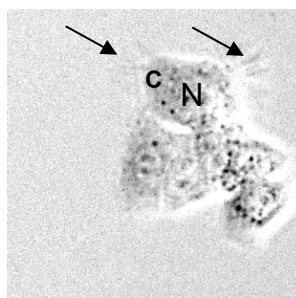
## 5.2 Monitoramento Celular por Time-Lapse – 24h de Tratamento (2D)

Os vídeos produzidos nesse experimento estão disponíveis para acesso no link: [https://drive.google.com/drive/folders/1U5L7hciFlkPyOOv6zzekrmFgLVosXQyZ?usp=drive\\_link](https://drive.google.com/drive/folders/1U5L7hciFlkPyOOv6zzekrmFgLVosXQyZ?usp=drive_link)

Os achados estão sumarizados na Tabela 1. As células do controle apresentaram intensa atividade mitótica, sendo possível a visualização de células em processo de divisão em praticamente todo o período de monitoramento. Já as células tratadas com DX 0,3  $\mu\text{M}$  ( $\text{IC}_{25}$ ) apresentaram evidente cessação da atividade mitótica e, dentro do período observado, as células estão citostáticas, sem apresentar processo de morte. Com relação às células tratadas com PLB 9,2  $\mu\text{M}$  ( $\frac{1}{2} \text{IC}_{50}$ ), essas apresentaram divisões celulares menos frequentes, sendo a atividade mitótica mais atenuada no sentido de haver menos focos proliferativos, se comparadas ao controle, além disso, não se observou células em processo de morte (Fig. 10). Já nas células tratadas com PLB 18,4  $\mu\text{M}$  ( $\text{IC}_{50}$ ), foi possível observar alta citotoxicidade para as células HepG2/C3A, uma vez que, após 01:30 h de tratamento, as células entraram em processo de morte, o qual consistiu em encolhimento celular seguido de formação de bolhas, e então, rompimento celular (após 8h) e extravasamento do conteúdo celular – não é observada a perda de adesão intercelular. Na associação 1 (A1), foi possível observar que há uma maior intensidade na caracterização de células no processo de morte – comparando aos controles (CV e drogas isoladas) – o qual foi acompanhado de perda da adesão intercelular, além disso, observou-se deslocamento de grânulos para a periferia nuclear (Fig. 8) e formação de processos que são prévios a morte, como prolongamentos celulares (Fig. 9). Com relação a associação 2 (A2), foi possível observar os mesmos fenômenos que aconteceram nas células tratadas com PLB 18,4  $\mu\text{M}$  ( $\text{IC}_{50}$ ), contudo, esse processo ocorreu antes, dando início após 1 h de tratamento.

**Tabela 1 – Características celulares observadas em monitoramento por Time-Lapse.**

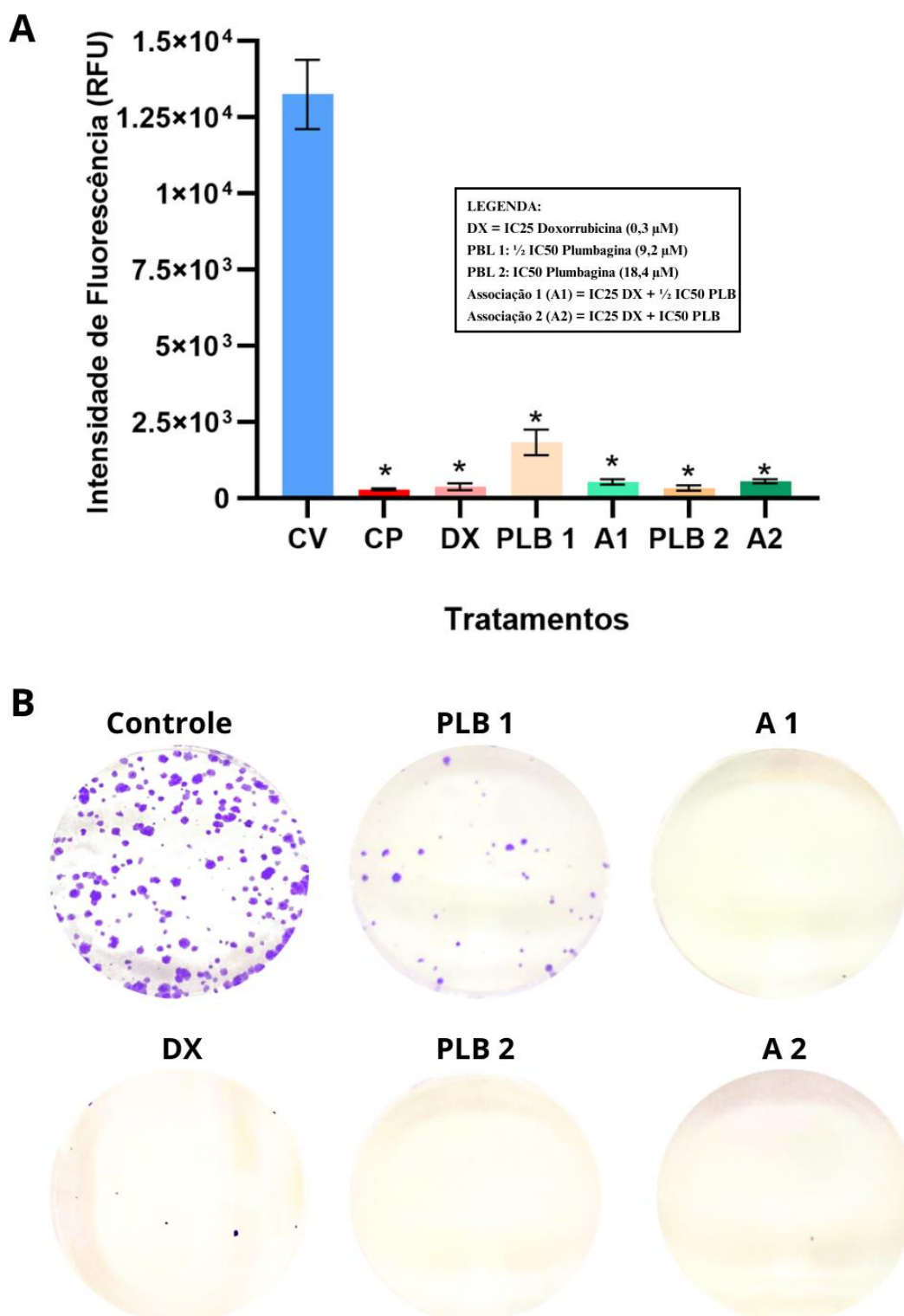
	Alterações		
	Morfológicas	Mitose	Morte
Controle	Regular	Ativa	Ausência
DX 0,3 $\mu$ M (IC25)	Regular – Citostáticas	Ausência	Ausência
PLB 9,2 $\mu$ M ( $\frac{1}{2}$ IC50)	Regular	Menos frequente	Ausência
Associação 1	Deslocamento de grânulos para a periferia nuclear, prolongamentos celulares, perda da adesão intercelular	Ausência	Presente
PLB 18,4 $\mu$ M (IC50)	Encolhimento celular, formação de bolhas, rompimento celular, extravasamento do conteúdo celular, não há perda da adesão intercelular	Ausência	Após 1h30 de tratamento
Associação 2	Encolhimento celular, formação de bolhas, rompimento celular, extravasamento do conteúdo celular, não há perda da adesão intercelular	Ausência	Após 1h de tratamento

**Figura 8 – Organização perinuclear em células tratadas em A1.** Setas pretas indicando grânulos perinucleares; N=núcleo; C=citoplasma.**Figura 9 – Formação de prolongamentos (evento pré-morte) em células tratadas em A1.** Setas pretas indicando prolongamentos; N=núcleo; C=citoplasma.

### 5.3 Ensaio Clonogênico (2D)

Para obtenção da viabilidade celular das colônias, fez-se a leitura com resazurina, a qual está representada na Figura 10.A. Com esse ensaio, foi possível observar que todos os tratamentos foram capazes de reduzir a formação de colônias. A plumbagina foi capaz de reduzir a formação de colônias em sua menor concentração testada com uma redução de 86% comparado ao controle, enquanto que, a doxorrubicina e a maior concentração de plumbagina testada inibem completamente a formação de colônias, visto que apresentam redução da viabilidade celular de 97,1% e 97,4%, respectivamente (não há diferença estatística entre esses tratamentos) – somando ao fato de que, por meio dos registros fotográficos (Fig. 10.B), é possível observar que não há formação de colônias como no controle, há apenas um pequeno foco proliferativo nos poços. As associações também evidenciaram a não formação de colônias (reduções de A1: 95,9% e A2: 95,7% em comparação ao controle).

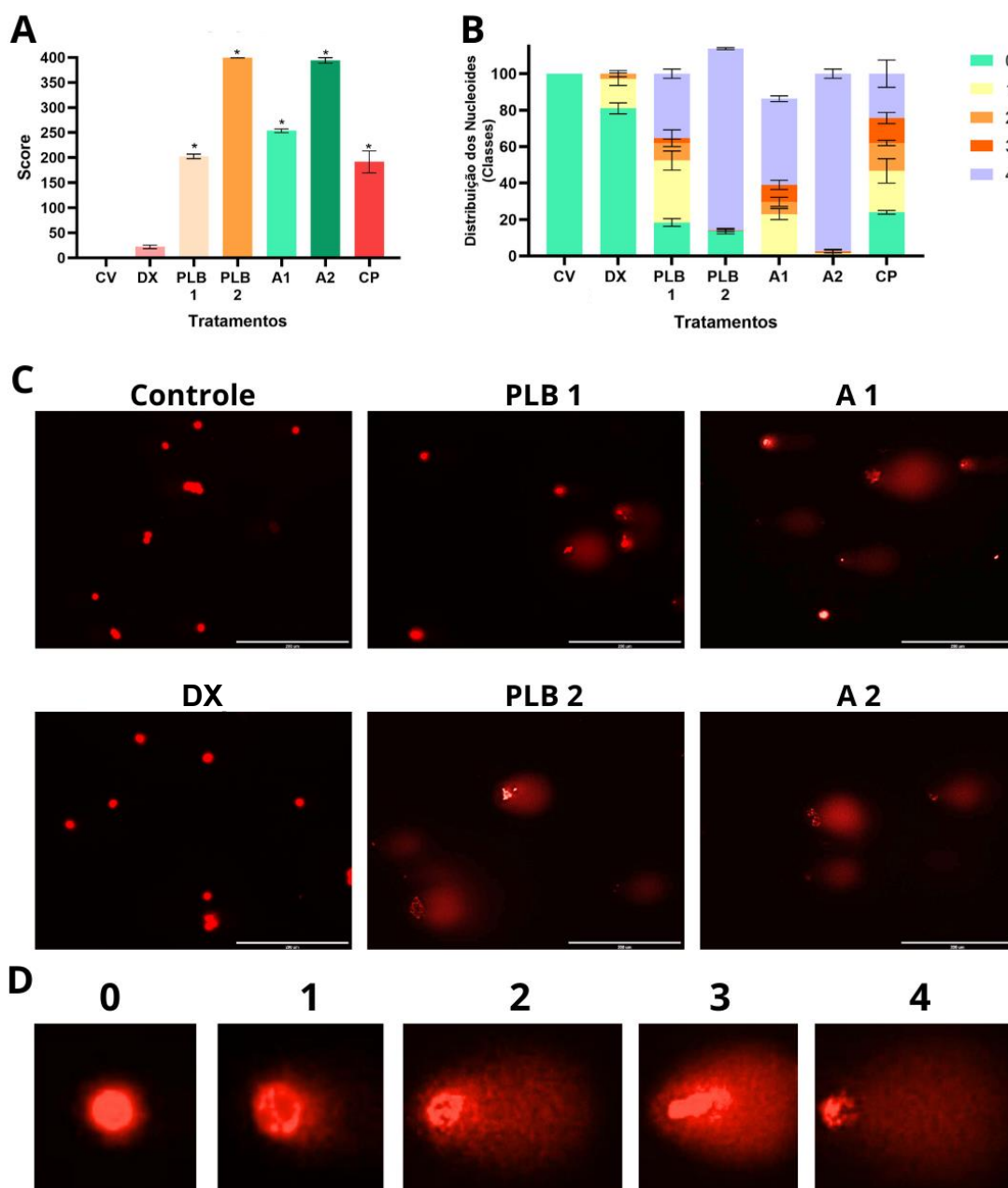
**Figura 10 – Ensaio Clonogênico em células HepG2/C3A tratadas por 24 h com plumbagina e doxorrubicina. (A)** Quantificação da fluorescência com resazurina das colônias formadas nos diferentes tratamentos. **(B)** Imagens representativas da coloração com cristal de violeta (0,5%) nos diferentes tratamentos. Dados analisados por ANOVA com post-hoc de Tukey, apresentados como média  $\pm$  desvio padrão, com  $p \leq 0,05$ .



#### 5.4 Ensaio do Cometa (2D)

Por meio do cálculo do índice de dano (score), realizado por meio de fotos de nucleoides obtidos no ensaio do cometa (Fig. 11A), foi possível observar que, a doxorrubicina 0,3  $\mu\text{M}$  (score de  $22\pm 3,5$ , sendo o controle  $0\pm 0$ ) não apresentou genotoxicidade, diferentemente dos outros tratamentos testados, os quais demonstraram efeito genotóxico. Ainda, foi possível constatar que, a genotoxicidade da associação 1 (A1) (score:  $253,7\pm 3,5$ ) é significativamente diferente de seus compostos de maneira isolada (PLB 1 e DX 0,3  $\mu\text{M}$ ), sendo o score de PLB 1  $202,7\pm 4,5$ . Além disso, a genotoxicidade da associação 2 (score:  $394\pm 5,5$ ), foi igual a genotoxicidade da plumbagina isolada (PLB 2), a qual apresenta score de  $399,7\pm 0,6$ . Na Figura 11.B, está representada a distribuição dos nucleoides nas diferentes classes. Na Figura 11.C, estão as imagens representativas dos nucleoides analisados nos diferentes tratamentos. Na figura Fig. 11.D estão ilustrativamente representados os nucleoides de cada classe.

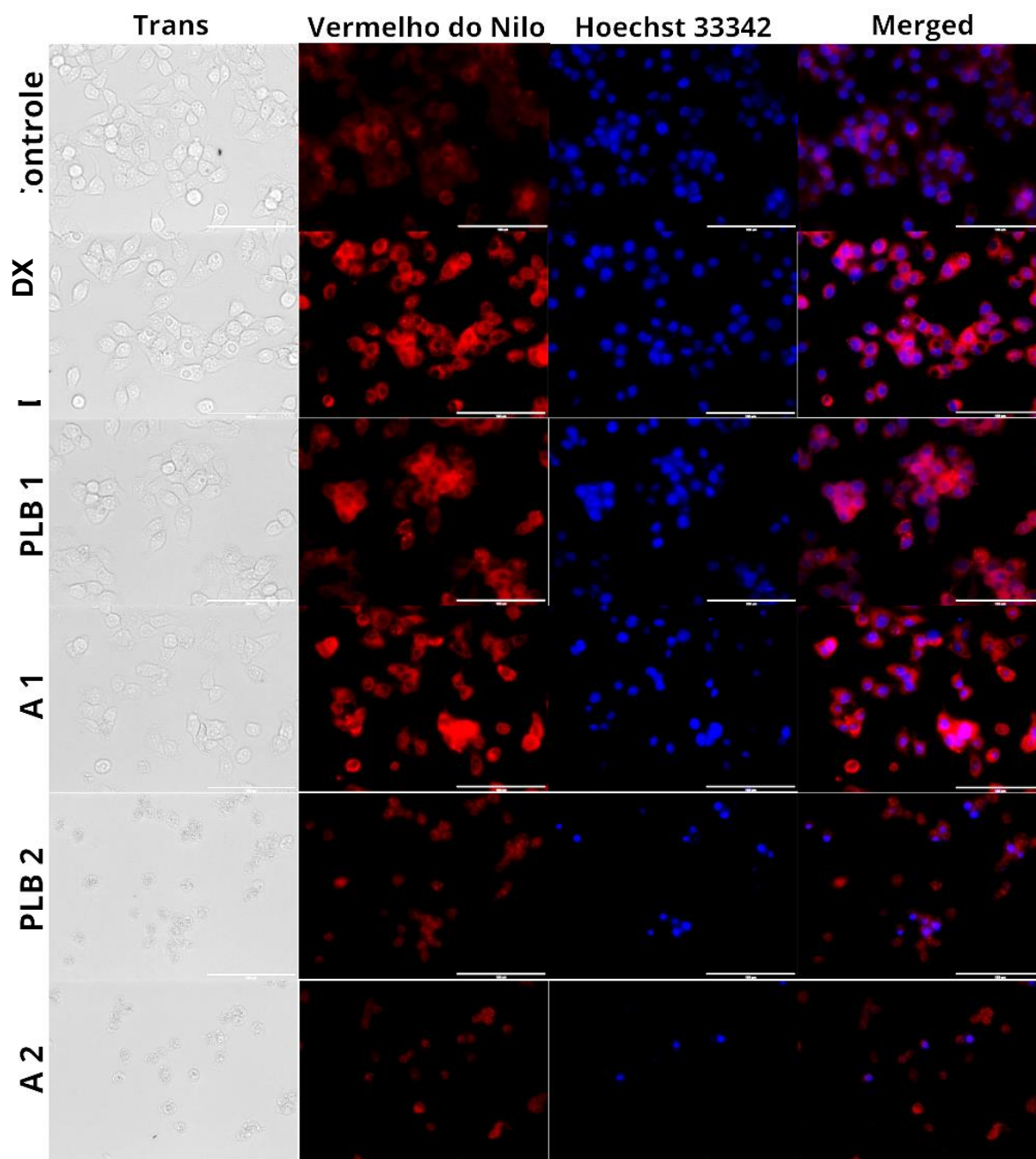
**Figura 11 – Ensaio do Cometa em HepG2/C3A tratadas com doxorubicina e plumbagina por 3h. (A)** Score médio calculado por meio do ensaio do cometa em cada tratamento. **(B)** Distribuição dos nucleóides dentro das classes (0 a 4 – referente ao dano por meio da análise da cauda) em cada tratamento. **(C)** Imagens representativas da coloração dos nucleóides com Brometo de Etídio (2  $\mu\text{g}/\text{mL}$ ) (200  $\times$ ) nos diferentes tratamentos. **(D)** Padrão de Classificação Visual dos Nucleóides - Score. CV = Controle de Veículo; DX = IC<sub>25</sub> Doxorubicina (0,3  $\mu\text{M}$ ); PLB 1 =  $\frac{1}{2}$  IC<sub>50</sub> Plumbagina (9,2  $\mu\text{M}$ ); PLB 2 = IC<sub>50</sub> Plumbagina (18,4  $\mu\text{M}$ ); Associação 1 (A1) = IC<sub>25</sub> DX +  $\frac{1}{2}$  IC<sub>50</sub> PLB; Associação 2 (A2) = IC<sub>25</sub> DX + IC<sub>50</sub> PLB. Dados analisados por ANOVA com post-hoc de Tukey, apresentados como média  $\pm$  desvio padrão, com  $p \leq 0,05$ .



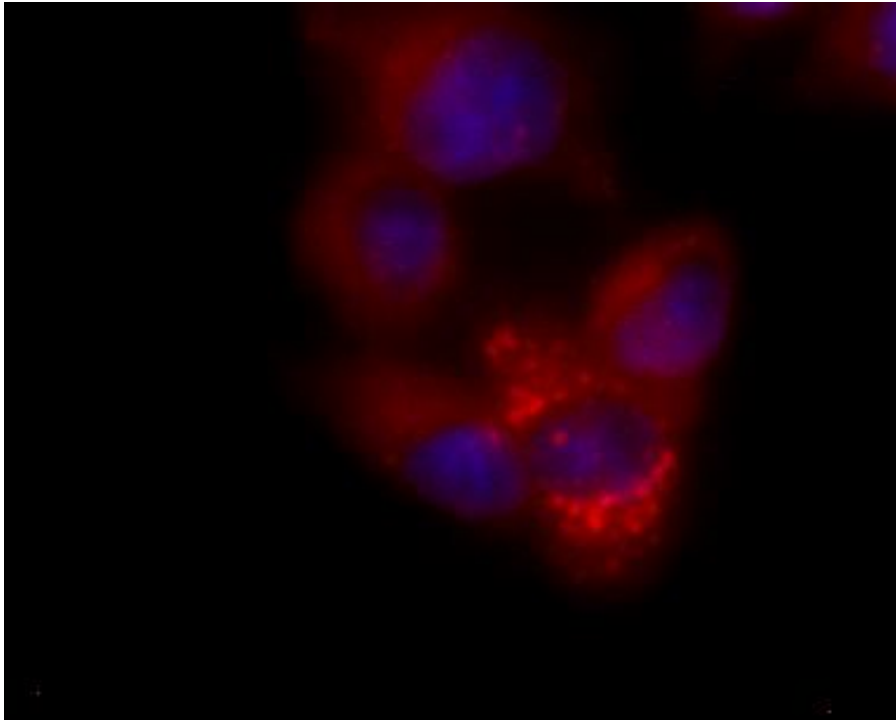
### **5.5 Coloração Fluorescente com Hoechst 33342 e Vermelho do Nilo (2D)**

Por meio da coloração com Hoechst 33342, foi possível observar que em PLB 2 e A2 que as células não apresentam marcação nuclear (Fig. 12). A coloração fluorescente por vermelho do nilo é acentuada nos tratamentos com DX 0,3  $\mu$ M, PLB 1 e A1, denotando a maior formação de corpúsculos lipídicos (Fig. 13).

**Figura 12 – Coloração fluorescente com Vermelho do Nilo e Hoechst em células HepG2/C3A tratadas por 24h com DX, PLB e suas associações (400 ×). CV = Controle de Veículo; DX = IC<sub>25</sub> Doxorubicina (0,3 μM); PLB 1 = ½ IC<sub>50</sub> Plumbagina (9,2 μM); PLB 2 = IC<sub>50</sub> Plumbagina (18,4 μM); Associação 1 (A1) = IC<sub>25</sub> DX + ½ IC<sub>50</sub> PLB; Associação 2 (A2) = IC<sub>25</sub> DX + IC<sub>50</sub> PLB.**



**Figura 13 – Corpúsculos lipídicos (Vermelho) e Núcleo (Azul) em A1 (IC<sub>25</sub> Doxorubicina (0,3 μM) + ½ IC<sub>50</sub> Plumbagina (9,2 μM) (400 ×).**



### 5.6 Obtenção do Volume Médio (mm<sup>3</sup>) dos Esferoides e Recuperação (3D)

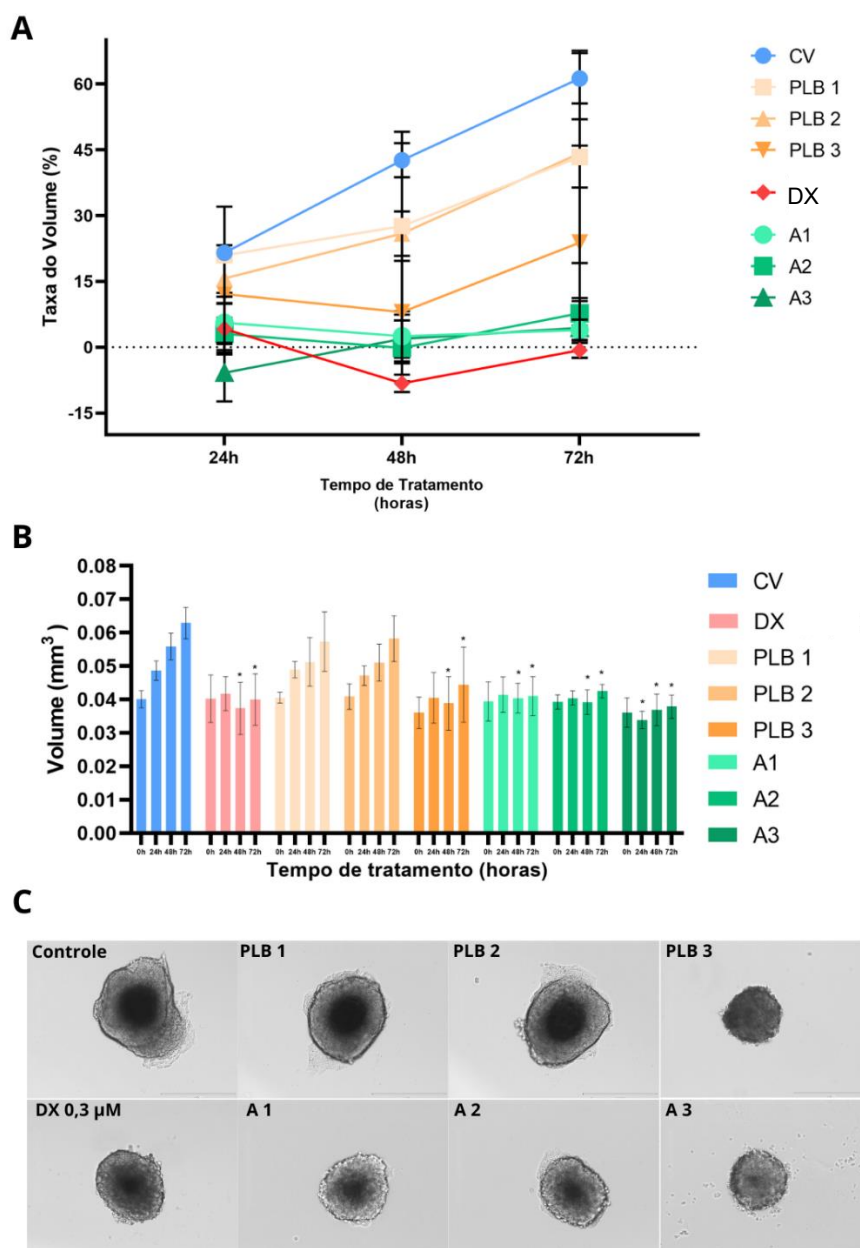
Com o monitoramento do crescimento dos esferoides, foi possível observar, com 24h, as seguintes taxas de crescimento (%): CV: 21,5; DX: 4,2; PLB 1: 20,9; PLB 2: 15,7; PLB 3: 12,1; A1: 5,6; A2: 3; A3: -5,8 (Fig. 14.A). Dessa forma, com 24h de tratamento, foi possível observar diferenças estatísticas (em comparação ao controle) em A3, que apresentou capacidade de inibição total do crescimento esferoidal, reduzindo o tamanho do esferoide em comparação à 0h.

Com 48h de tratamento, as seguintes taxas de crescimento (%) foram obtidas: CV: 42,6; DX: -8,3; PLB 1: 27,6; PLB 2: 25,9; PLB 3: 8; A1: 2,5; A2: -0,2; A3: 1,8, indicando o alto potencial de redução do crescimento das associações 1 e 3, e da PLB 3. Com relação a DX e A2, essas apresentaram capacidade de reduzir o volume do esferoide, inibindo completamente o crescimento.

Já com 72h, as taxas de crescimento (%) foram: CV: 61,3; DX: -0,7; PLB 1: 43,4; PLB 2: 44,2; PLB 3: 23,8; A1: 3,9; A2: 7,7; A3: 4,4. As associações 1, 2 e 3 apresentaram capacidade de reduzir o crescimento esferoidal. Não houve diferença entre as associações e o tratamento com DX nos tempos de 24, 48 e 72h. Na Figura 14.A-B é possível observar a representação das taxas de crescimento no monitoramento do volume de acordo com cada tratamento.

Com relação a recuperação da proliferação celular (Fig. 14.C), após o término da exposição dos esferoides aos tratamentos, foi possível observar que DX impede a recuperação, enquanto os tratamentos com plumbagina de maneira isolada, permitem a recuperação da proliferação celular até o tratamento PLB 18,4 µM. Já com 36,8 µM de plumbagina, os esferoides não apresentaram recuperação da capacidade proliferativa. Nas associações, foi possível observar que tanto em A1 como em A2, a recuperação da proliferação ainda foi observada, contudo, em A3 não.

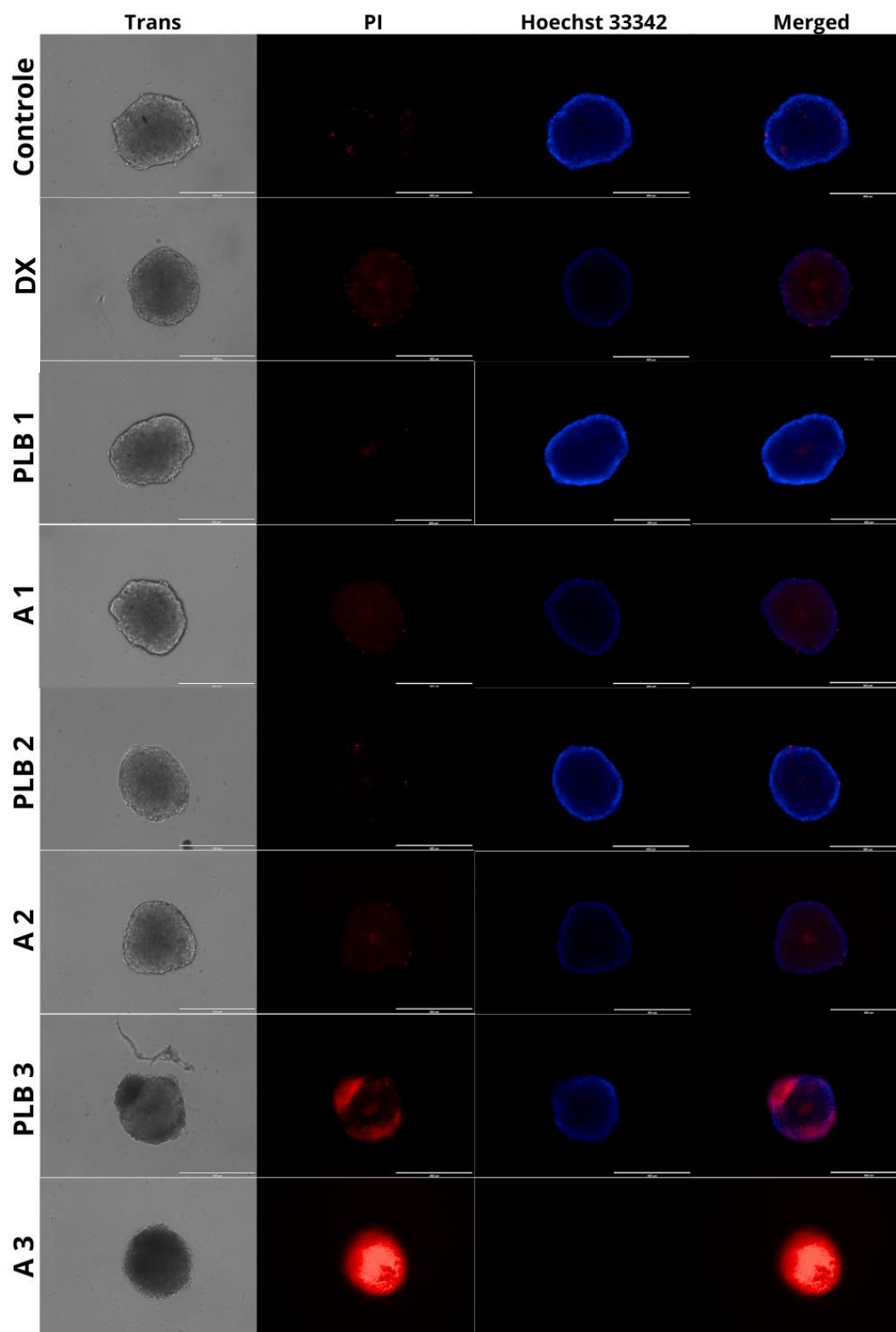
**Figura 14 – Monitoramento do Volume e Recuperação em esferoides de células HepG2/C3A tratadas com plumbagina e doxorrubicina. (A) Taxa de crescimento do esferoide. (B) Monitoramento do volume com 0, 24, 48 e 72h de tratamento. (C) Imagens representativas do ensaio de recuperação da proliferação (100 ×). CV = Controle de Veículo; DX = IC<sub>25</sub> Doxorrubicina (0,3 μM); PLB 1 = ½ IC<sub>50</sub> Plumbagina (9,2 μM); PLB 2 = IC<sub>50</sub> Plumbagina (18,4 μM); PLB 3 = 2 × IC<sub>50</sub> Plumbagina (36,8 μM); Associação 1 (A1) = IC<sub>25</sub> DX + ½ IC<sub>50</sub> PLB; Associação 2 (A2) = IC<sub>25</sub> DX + IC<sub>50</sub> PLB; Associação 3 (A3) = IC<sub>25</sub> DX + 2 × IC<sub>50</sub> PLB. Dados analisados por ANOVA de duas vias com post-hoc de Dunnett e de Tukey, apresentados como média ± desvio padrão, com  $p \leq 0,05$ .**



### **5.7 Marcação fluorescente com Hoechst 33342 e Iodeto de Propídio (PI) (3D)**

Por meio da microscopia de fluorescência com Hoechst 33342 e Iodeto de Propídio (Fig. 15), foi possível observar que o esferoide controle apresenta algumas células positivas para a coloração com PI, enquanto no tratamento com doxorrubicina isolada, há um número maior de focos no esferoide marcando PI-positivo. Nos tratamentos com plumbagina isolada, é possível observar que a coloração PI-positiva aumenta de forma dose-dependente, de maneira que com PLB 1 (9,2  $\mu\text{M}$ ), apenas a zona necrótica e alguns poucos focos na zona proliferativa do esferoide são PI-positivos. Já com PLB 2 (18,4  $\mu\text{M}$ ), além da zona necrótica, observamos um aumento dos focos na zona proliferativa marcando PI-positivo. Com PLB 3 (46,8  $\mu\text{M}$ ), é possível observar uma intensa marcação por PI na zona proliferativa do esferoide. Referente as associações, A1 e A2, apresentam visualmente maior marcação PI-positivo quando comparadas ao controle, já A3 se destoa de todos os tratamentos, visto que é possível observar a marcação por PI-positivo em todo o esferoide. Com relação a coloração com Hoechst 33342, as associações marcaram menos com o corante do que os tratamentos com a plumbagina de forma isolada e em comparação ao controle. Não houve marcação de Hoechst 33342 em esferoide tratado com A3.

**Figura 15 – Marcação de Esferoides HepG2/C3A com Hoechst 33342 (azul) e Iodeto de Propídio (PI) (vermelho) (100 ×) tratados por 72h.** CV = Controle de Veículo; DX = IC<sub>25</sub> Doxorrubicina (0,3 μM); PLB 1 = ½ IC<sub>50</sub> Plumbagina (9,2 μM); PLB 2 = IC<sub>50</sub> Plumbagina (18,4 μM); PLB 3 = 2 × IC<sub>50</sub> Plumbagina (36,8 μM); Associação 1 (A1) = IC<sub>25</sub> DX + ½ IC<sub>50</sub> PLB; Associação 2 (A2) = IC<sub>25</sub> DX + IC<sub>50</sub> PLB; Associação 3 (A3) = IC<sub>25</sub> DX + 2 × IC<sub>50</sub> PLB.

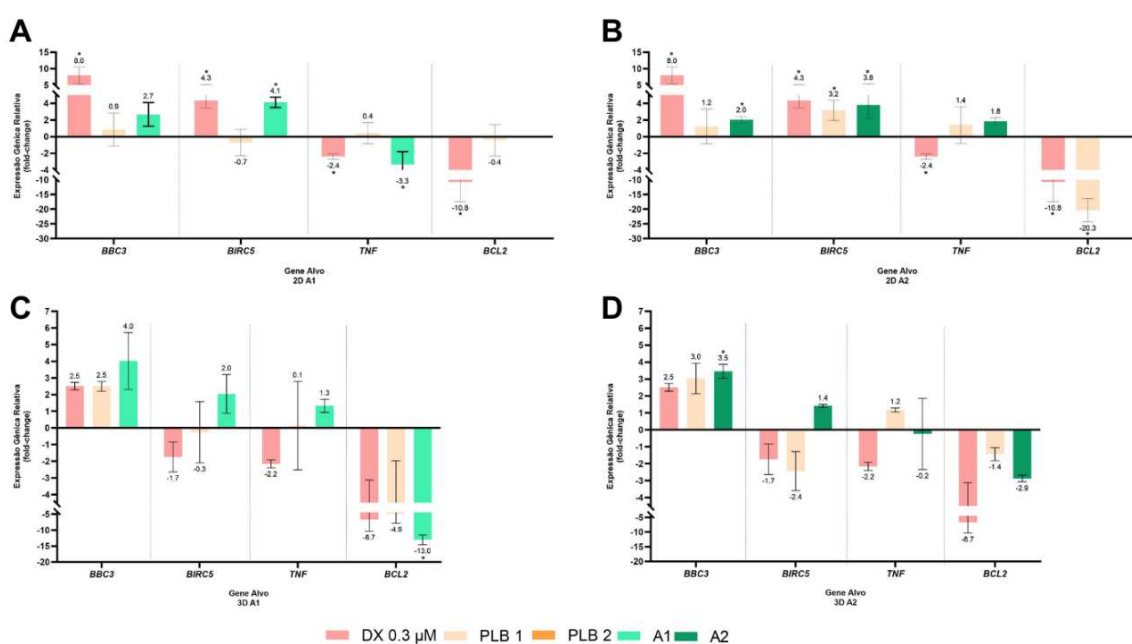


### 5.8 Expressão de mRNA (2D/3D)

Na avaliação da alteração de mRNA, por meio da RT-qPCR, foi possível observar que, nos genes de morte (Figura 16), a regulação positiva de *BBC3* se deu em DX (2D: 8×) e em A2 (2D: 2×; 3D: 3,5×), e a de *BIRC5* em DX (2D: 4,3×), PLB2 (2D: 3,2×), A1 (2D: 4,1×) e em A2 (2D: 3,8×), já a regulação negativa de *TNF* se deu em DX (2D: -2,4×)

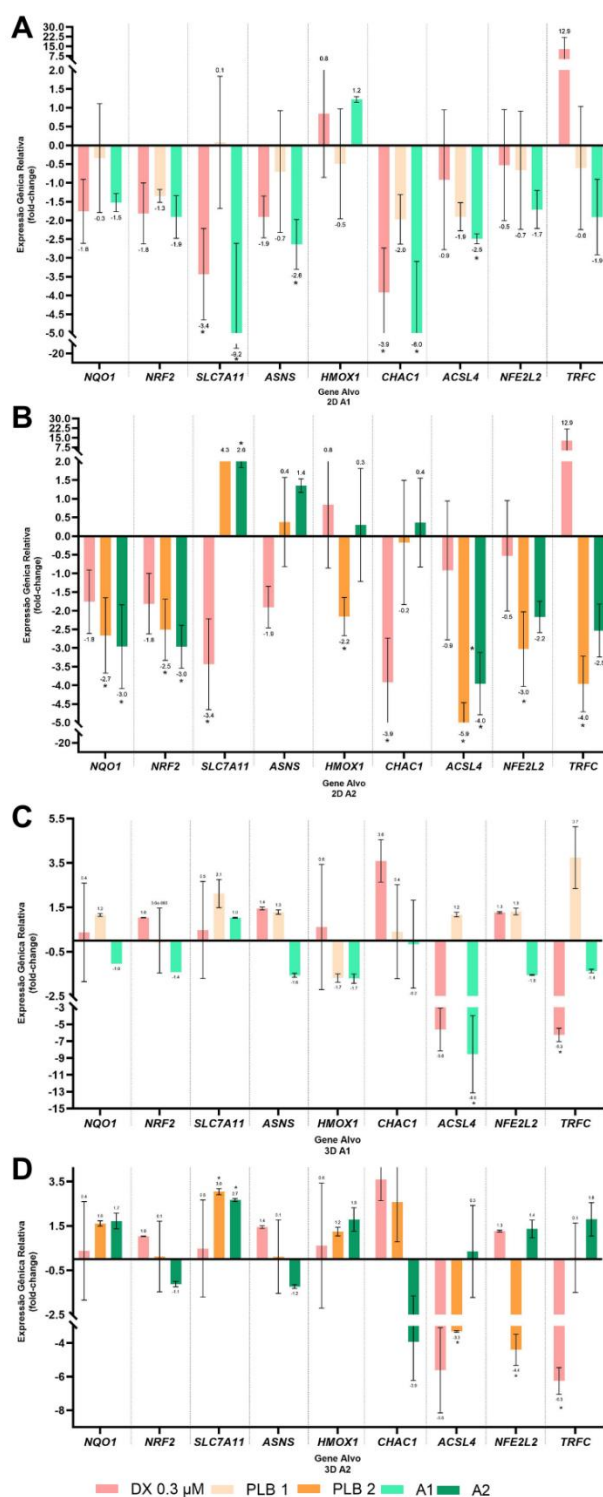
e A1 (2D: -3,3×) e de *BCL2* se deu em DX (2D: -10,8×), PLB2 (2D: -20,3×), A1 (2D: sem amplificação; 3D: -13×) e em A2 (2D: sem amplificação).

**Figura 16 – Expressão Gênica Relativa de genes envolvidos nas vias de morte celular em HepG2/C3A após 24h de tratamento. (A e B)** Dados referentes à expressão em monocamada (2D). **(C e D)** Dados referentes à expressão em esferoides (3D). DX = IC<sub>25</sub> Doxorubicina (0,3 μM); PLB 1 = ½ IC<sub>50</sub> Plumbagina (9,2 μM); PLB 2 = IC<sub>50</sub> Plumbagina (18,4 μM); Associação 1 (A1) = IC<sub>25</sub> DX + ½ IC<sub>50</sub> PLB; Associação 2 (A2) = IC<sub>25</sub> DX + IC<sub>50</sub> PLB. Análise realizada por 2<sup>-ΔΔCt</sup>, sendo significativa a expressão que apresentasse p-valor ≤0,05 (teste T), e log (2) >1 ou <-1.

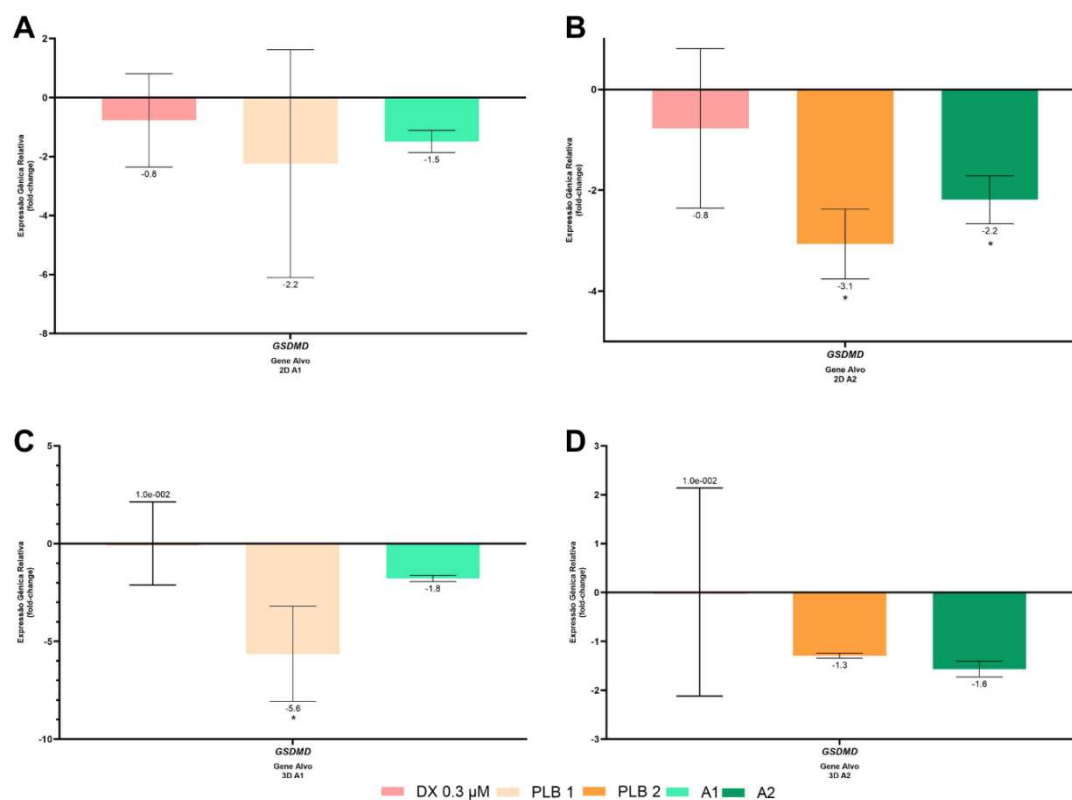


Nos genes de ferroptose (Figura 17) e piroptose (Figura 18), houve regulação positiva no gene *SLC7A11* em PLB2 (3D: 3×) e em A2 (2D: 2,6×; 3D: 2,7×) e regulação negativa dos genes *NQO1* em PLB2 (2D: -2,7×) e A2 (2D: -3×), *NRF2* em PLB2 (2D: -2,5×) e A2 (2D: -3×), *SLC7A11* em DX (2D: -3,4×) e em A1 (2D: -9,2×), *ASNS* em A1 (2D: -2,6×), *HMOX1* em PLB2 (2D: -2,2×), *CHAC1* em DX (2D: -3,9×) e em A1 (2D: -6×), *ACSL4* em PLB2 (2D: -5,9×; 3D: -3,3×), A1 (2D: -2,5×; 3D: -8,6×) e A2 (2D: -4×), *NFE2L2* em PLB2 (2D: -3×; 3D: -4,4×), *TRFC* em DX (3D: -6,3×) e em PLB2 (2D: -4×) e *GSDMD* em PLB1 (3D: -5,6×), em PLB2 (2D: -3,1×) e em A2 (2D: -2,2×).

**Figura 17 – Expressão Gênica Relativa de genes envolvidos na via de Ferroptose em HepG2/C3A após 24h de tratamento. (A e B) Dados referentes à expressão em monocamada (2D). (C e D) Dados referentes à expressão em esferoides (3D). DX = IC<sub>25</sub> Doxorubicina (0,3 μM); PLB 1 = ½ IC<sub>50</sub> Plumbagina (9,2 μM); PLB 2 = IC<sub>50</sub> Plumbagina (18,4 μM); Associação 1 (A1) = IC<sub>25</sub> DX + ½ IC<sub>50</sub> PLB; Associação 2 (A2) = IC<sub>25</sub> DX + IC<sub>50</sub> PLB. Análise realizada por 2<sup>-ΔΔCt</sup>, sendo significativa a expressão que apresentasse p-valor ≤0,05 (teste T), e log (2) >1 ou <-1.**

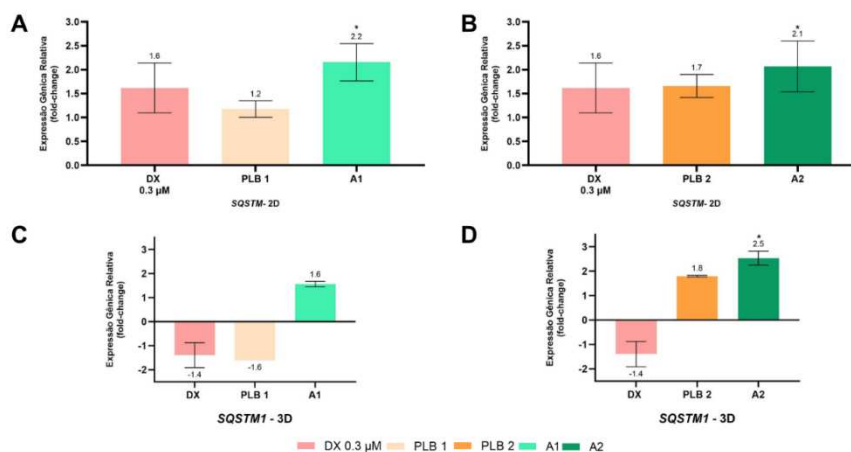


**Figura 18 – Expressão Gênica Relativa do gene *GSDMD* (envolvido nas vias de piroptose) em HepG2/C3A após 24h de tratamento. (A e B) Dados referentes à expressão em monocamada (2D). (C e D) Dados referentes à expressão em esferoides (3D). DX = IC<sub>25</sub> Doxorrubicina (0,3  $\mu$ M); PLB 1 =  $\frac{1}{2}$  IC<sub>50</sub> Plumbagina (9,2  $\mu$ M); PLB 2 = IC<sub>50</sub> Plumbagina (18,4  $\mu$ M); Associação 1 (A1) = IC<sub>25</sub> DX +  $\frac{1}{2}$  IC<sub>50</sub> PLB; Associação 2 (A2) = IC<sub>25</sub> DX + IC<sub>50</sub> PLB. Análise realizada por  $2^{-\Delta\Delta Ct}$ , sendo significativa a expressão que apresentasse p-valor  $\leq 0,05$  (teste T), e  $\log_2 > 1$  ou  $< -1$ .**

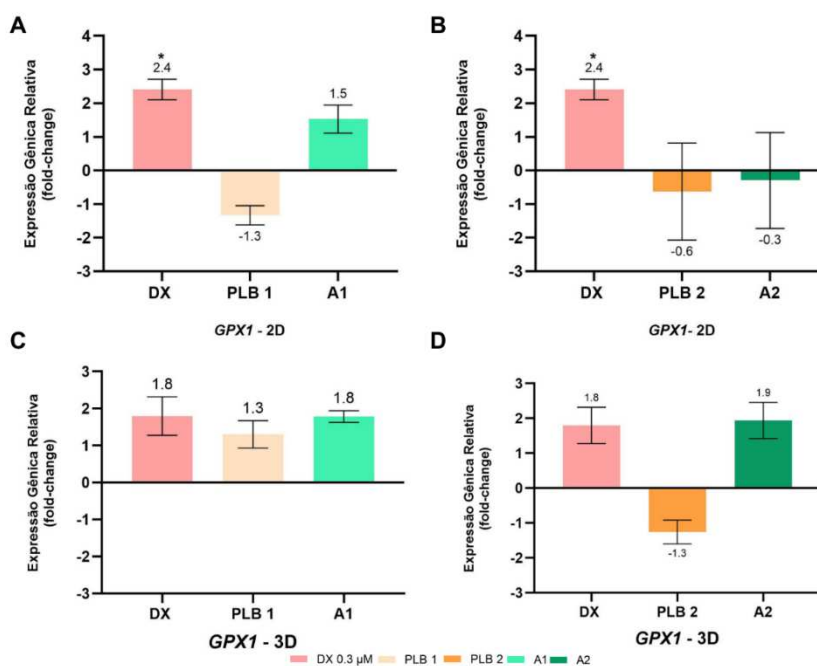


Houve regulação positiva de *SQSTM1* (Figura 19), que se deu em A1 (2D: 2,2 $\times$ ) e A2 (2D: 2,1 $\times$ ; 3D: 2,5 $\times$ ) e em *GPXI* (Figura 20), que se deu em DX (2D: 2,4 $\times$ ).

**Figura 19 – Expressão Gênica Relativa do gene *SQSTM1* (envolvido nas vias de mecanismos autofágicos) em HepG2/C3A após 24h de tratamento. (A e B) Dados referentes à expressão em monocamada (2D). (C e D) Dados referentes à expressão em esferoides (3D). DX = IC<sub>25</sub> Doxorubicina (0,3 μM); PLB 1 = ½ IC<sub>50</sub> Plumbagina (9,2 μM); PLB 2 = IC<sub>50</sub> Plumbagina (18,4 μM); Associação 1 (A1) = IC<sub>25</sub> DX + ½ IC<sub>50</sub> PLB; Associação 2 (A2) = IC<sub>25</sub> DX + IC<sub>50</sub> PLB. Análise realizada por 2<sup>-ΔΔCt</sup>, sendo significativa a expressão que apresentasse p-valor ≤0,05 (teste T), e log (2) >1 ou <-1.**

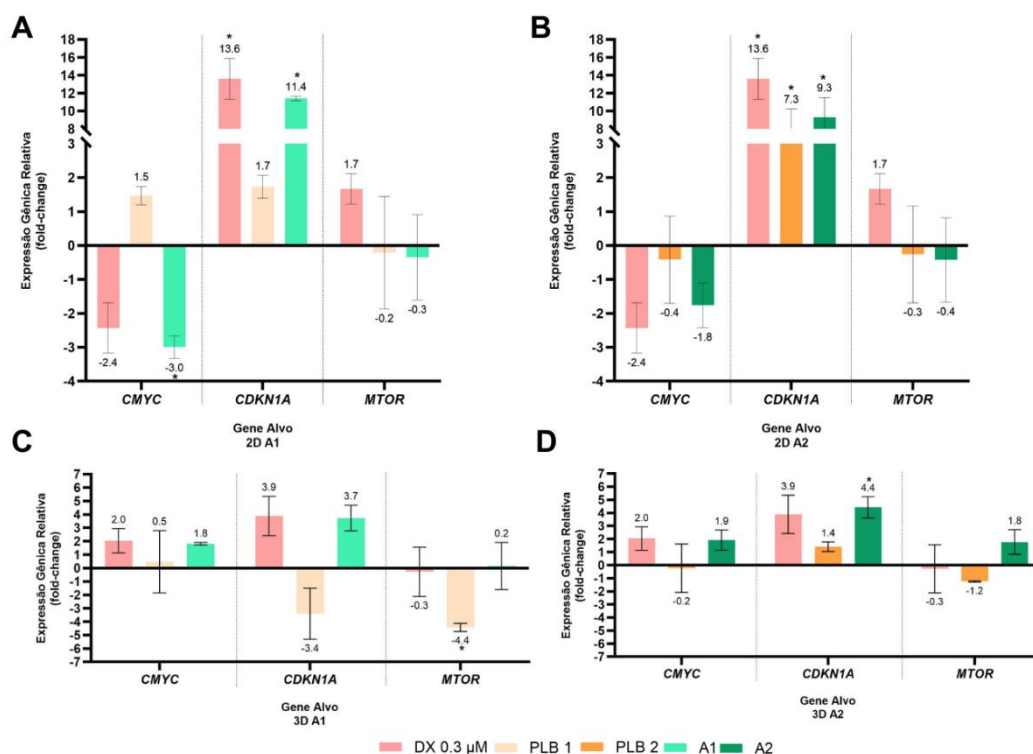


**Figura 20 – Expressão Gênica Relativa do gene *GPX1* (envolvido nas vias de estresse oxidativo) em HepG2/C3A após 24h de tratamento. (A e B) Dados referentes à expressão em monocamada (2D). (C e D) Dados referentes à expressão em esferoides (3D). DX = IC<sub>25</sub> Doxorubicina (0,3 μM); PLB 1 = ½ IC<sub>50</sub> Plumbagina (9,2 μM); PLB 2 = IC<sub>50</sub> Plumbagina (18,4 μM); Associação 1 (A1) = IC<sub>25</sub> DX + ½ IC<sub>50</sub> PLB; Associação 2 (A2) = IC<sub>25</sub> DX + IC<sub>50</sub> PLB. Análise realizada por 2<sup>-ΔΔCt</sup>, sendo significativa a expressão que apresentasse p-valor ≤0,05 (teste T), e log (2) >1 ou <-1.**



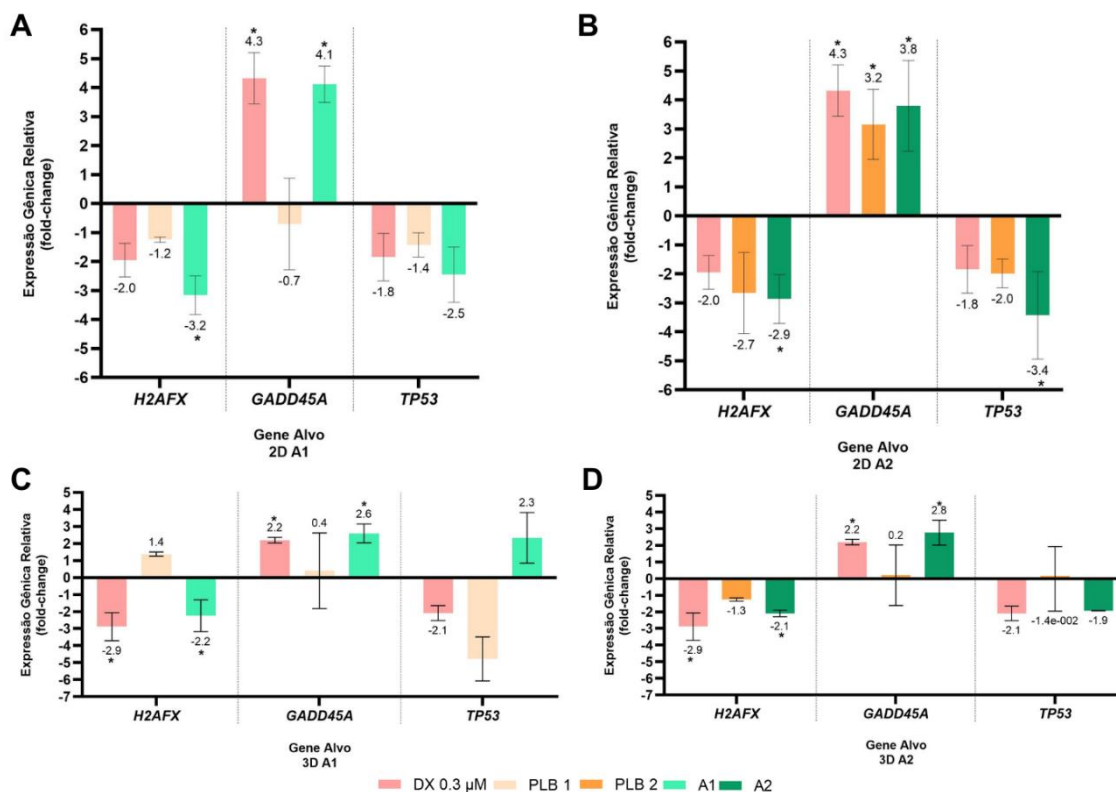
Nos genes de regulação do ciclo celular (Figura 21), a regulação negativa de *CMYC* ocorreu em A1 (2D:  $-3\times$ ) e de *MTOR* em PLB1 (3D:  $-4,4\times$ ) e a regulação positiva em *CDKN1A* se deu em DX (2D:  $13,6\times$ ), PLB2 (2D:  $7,3\times$ ), A1 (2D:  $11,4\times$ ) e A2 (2D:  $9,3\times$ ; 3D:  $4,4\times$ ).

**Figura 21 – Expressão Gênica Relativa de genes envolvidos nas vias de ciclo celular em HepG2/C3A após 24h de tratamento. (A e B) Dados referentes à expressão em monocamada (2D). (C e D) Dados referentes à expressão em esferoides (3D). DX = IC<sub>25</sub> Doxorubicina ( $0,3\ \mu\text{M}$ ); PLB 1 =  $\frac{1}{2}$  IC<sub>50</sub> Plumbagina ( $9,2\ \mu\text{M}$ ); PLB 2 = IC<sub>50</sub> Plumbagina ( $18,4\ \mu\text{M}$ ); Associação 1 (A1) = IC<sub>25</sub> DX +  $\frac{1}{2}$  IC<sub>50</sub> PLB; Associação 2 (A2) = IC<sub>25</sub> DX + IC<sub>50</sub> PLB. Análise realizada por  $2^{-\Delta\Delta\text{Ct}}$ , sendo significativa a expressão que apresentasse p-valor  $\leq 0,05$  (teste T), e  $\log(2) > 1$  ou  $< -1$ .**



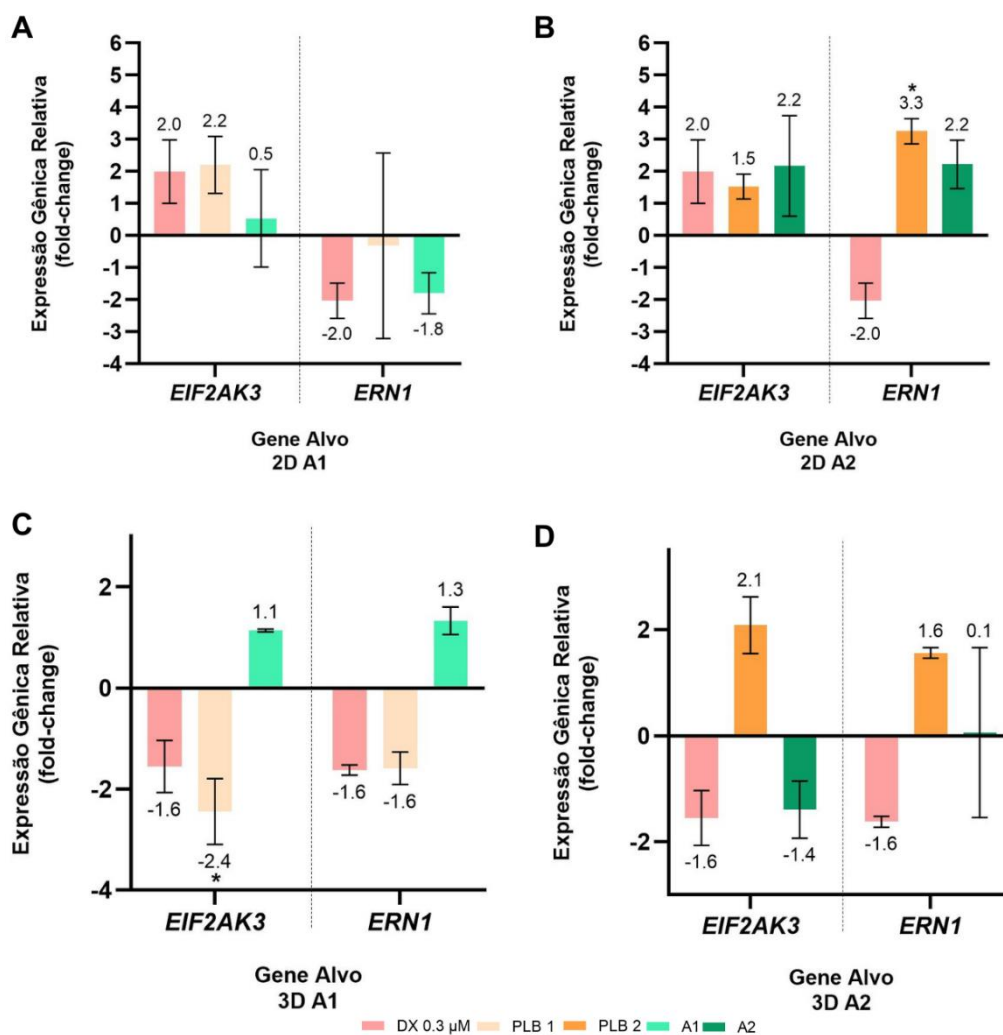
Nos genes envolvidos nas vias de sinalização de dano no DNA (Figura 22), houve regulação negativa em *H2AFX* em DX (3D:  $-2,9\times$ ), A1 (2D:  $-3,2\times$ ), e em A2 (2D:  $-2,9\times$ ; 3D:  $-2,1\times$ ) e em *TP53*, em A2 (2D:  $-3,4\times$ ) e regulação positiva em *GADD45A*, em DX (2D:  $4,3\times$ ; 3D:  $2,2\times$ ), PLB 2 (2D:  $3,2\times$ ), A1 (2D:  $4,1\times$ ; 3D:  $2,6\times$ ) e em A2 (2D:  $3,8\times$ ).

**Figura 22 – Expressão Gênica Relativa de genes envolvidos nas vias de sinalização de dano no DNA em HepG2/C3A após 24h de tratamento. (A e B) Dados referentes à expressão em monocamada (2D). (C e D) Dados referentes à expressão em esferoides (3D). DX = IC<sub>25</sub> Doxorubicina (0,3 μM); PLB 1 = ½ IC<sub>50</sub> Plumbagina (9,2 μM); PLB 2 = IC<sub>50</sub> Plumbagina (18,4 μM); Associação 1 (A1) = IC<sub>25</sub> DX + ½ IC<sub>50</sub> PLB; Associação 2 (A2) = IC<sub>25</sub> DX + IC<sub>50</sub> PLB. Análise realizada por 2<sup>-ΔΔCt</sup>, sendo significativa a expressão que apresentasse p-valor ≤0,05 (teste T), e log (2) >1 ou <-1.**



Nos genes envolvidos na via de estresse no retículo endoplasmático (Figura 23), houve regulação positiva de *ERN1* em PLB2 (2D: 3,3×) e negativa de *EIF2AK3* em PLB1 (3D: -2,4×).

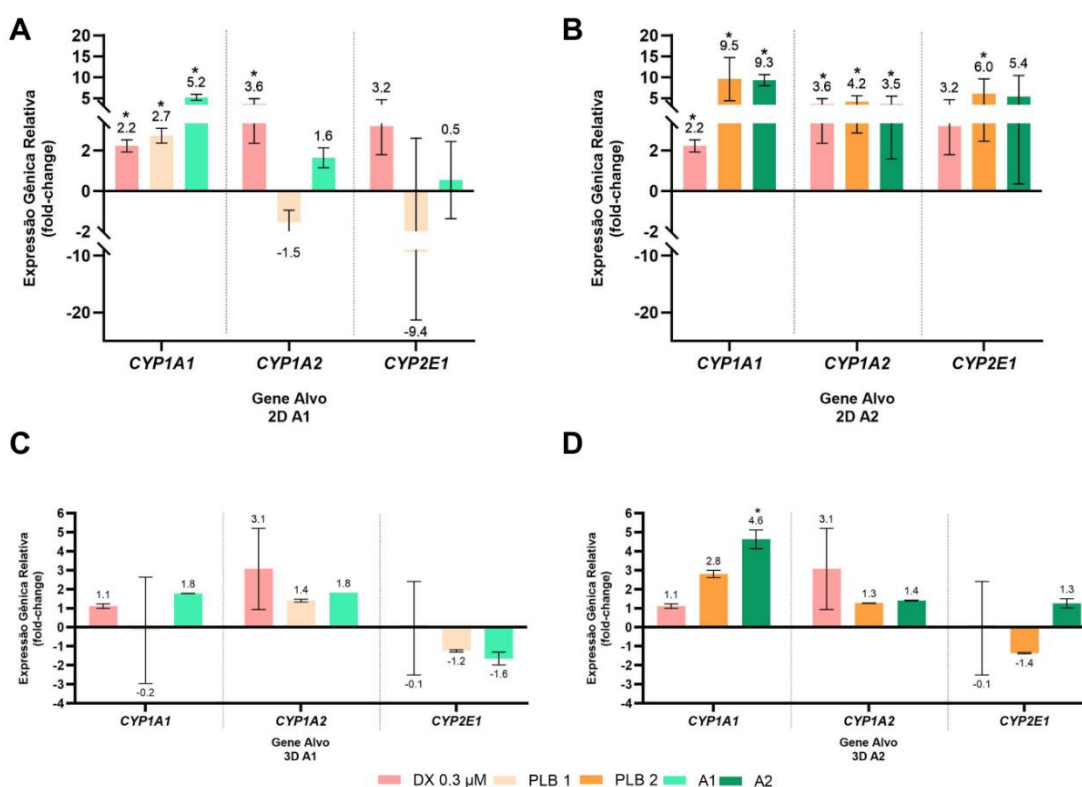
**Figura 23 – Expressão Gênica Relativa de genes envolvidos nas vias de estresse no retículo endoplasmático em HepG2/C3A após 24h de tratamento. (A e B) Dados referentes à expressão em monocamada (2D). (C e D) Dados referentes à expressão em esferoides (3D). DX = IC<sub>25</sub> Doxorubicina (0,3 μM); PLB 1 = ½ IC<sub>50</sub> Plumbagina (9,2 μM); PLB 2 = IC<sub>50</sub> Plumbagina (18,4 μM); Associação 1 (A1) = IC<sub>25</sub> DX + ½ IC<sub>50</sub> PLB; Associação 2 (A2) = IC<sub>25</sub> DX + IC<sub>50</sub> PLB. Análise realizada por 2<sup>-ΔΔCt</sup>, sendo significativa a expressão que apresentasse p-valor ≤0,05 (teste T), e log (2) >1 ou <-1.**



Dos genes envolvidos nas vias de metabolismo de xenobióticos (Figura 24), houve regulação positiva em *CYP1A1* em todos os tratamentos, sendo DX (2D: 2,2×), PLB1

(2D: 2,7×), PLB2 (2D: 9,5×), A1 (2D: 5,2×) e A2 (2D: 9,3×; 3D: 4,6×), em *CYP1A2*, nos tratamentos DX (2D: 3,6×), PLB2 (2D: 4,2×) e A2 (2D: 3,5×) e em *CYP2E1*, em PLB2 (2D: 6×).

**Figura 24 – Expressão Gênica Relativa de genes envolvidos nas vias de metabolismo de xenobióticos em HepG2/C3A após 24h de tratamento. (A e B) Dados referentes à expressão em monocamada (2D). (C e D) Dados referentes à expressão em esferoides (3D). DX = IC<sub>25</sub> Doxorubicina (0,3 μM); PLB 1 = ½ IC<sub>50</sub> Plumbagina (9,2 μM); PLB 2 = IC<sub>50</sub> Plumbagina (18,4 μM); Associação 1 (A1) = IC<sub>25</sub> DX + ½ IC<sub>50</sub> PLB; Associação 2 (A2) = IC<sub>25</sub> DX + IC<sub>50</sub> PLB. Análise realizada por 2<sup>-ΔΔCt</sup>, sendo significativa a expressão que apresentasse p-valor ≤0,05 (teste T), e log (2) >1 ou <-1.**



Os genes *CASP3*, *CASP8*, *CASP9*, *PARP1*, *NFκB*, *BECN1*, *GADD45G*, *CYP3A4* e *CYP2C9* não apresentaram alteração na expressão dos mRNA (dados disponíveis no material suplementar).

## 6. DISCUSSÃO

Estudos têm demonstrado que a associação de drogas com múltiplos sítios de ação é uma boa estratégia no tratamento contra o câncer, visto o seu efeito benéfico na redução de efeitos tóxicos para o organismo e redução da resistência ao tratamento (Jaaks *et al.*, 2022). Dentro desse contexto, o efeito aditivo e sinérgico observados nas associações 1 e 2, respectivamente, denotam a possibilidade de potencialização dos tratamentos terapêuticos convencionais. Contudo, é importante trazer à tona o ponto de vista no âmbito da definição do que de fato é um efeito sinérgico na análise de associações de drogas, visto que os modelos matemáticos assumem a interação ou não das drogas com sítios específicos, o que, muitas vezes exige um vasto conhecimento bioquímico dos agentes em questão, sendo que muitos agentes não possuem completa elucidação de seus mecanismos (Greco, Faessel & Levasseur, 1996). Ainda, deve-se considerar o fato de que a doxorrubicina e a plumbagina agem em múltiplos sítios, podendo ter sítios em comum, bem como, divergentes (Carvalho *et al.*, 2009; Tripathi, Panda & Biswal, 2019). Devido ao efeito altamente citotóxico do tratamento com 36,8  $\mu\text{M}$  de plumbagina (viabilidade celular = 1,3%), essa concentração (isolada e associada) foi investigada apenas no modelo tridimensional.

A  $\text{IC}_{50}$  calculada para plumbagina em células HepG2/C3A foi de 18,4  $\mu\text{M}$  em monocamada, contudo, em outras linhagens celulares, é possível observar divergentes valores, como, em linhagens tumorais de cérvix, foi calculado o valor de 4  $\mu\text{M}$  em CasKi (Sidhu & Capalash, 2023) e 8,85  $\mu\text{M}$  em HeLa (Binoy *et al.*, 2019), em células escamosas da língua, esse valor foi de 9,02  $\mu\text{M}$  (HSC-2), 7,01  $\mu\text{M}$  (HSC-3) e 4,34  $\mu\text{M}$  (HSC-4) (Ono *et al.*, 2015), em células de câncer de mama (MDA-MB-231), 2,44  $\mu\text{M}$ , em pulmão (A549) 7,3  $\mu\text{M}$  (Binoy *et al.*, 2019) e em linhagem de cólon (HT29) 22,5  $\mu\text{M}$  (Subramaniya *et al.*, 2011). Essa variação do efeito citotóxico muito se deve às características peculiares de cada célula e sua sensibilidade, visto que os mecanismos celulares que podem, por exemplo, fazer o transporte da droga para fora da célula, manutenção da estabilidade genômica e superexpressão de moléculas antiapoptóticas são diferentes em decorrência das características gênicas (Rebucci & Michiel, 2013).

No monitoramento do volume esferoidal, em um comparativo entre as associações, apenas A3 ( $\text{IC}_{25} \text{DX} + 2 \times \text{IC}_{50} \text{PLB}$ ) teve capacidade de reduzir o tamanho esferoidal, visto que foi a única a apresentar taxa negativa de crescimento estatisticamente significativa, além de esta ser a única associação a impedir a recuperação da proliferação, e, na coloração com PI, a marcação por iodeto de propídio (PI) é evidentemente mais

intensa quando se compara aos seus tratamentos não associados. Dessa forma, o modelo tridimensional apresenta menores variações comparadas ao seu controle, do que o modelo de monocamada, isso porque a resposta celular depende da difusão da droga, bem como de interações intercelulares, as quais envolvem as proteínas presentes na matriz extracelular e as proteínas de adesão, que permitem a comunicação intercelular (Smart; Oleksak & Hartsough, 2021).

Com o monitoramento celular por time-lapse, foi possível constatar que as células tratadas com a associação 1 (A1) ( $IC_{25}$  DX +  $\frac{1}{2}$   $IC_{50}$  PLB), divergem, em comportamento, das células tratadas com os compostos de maneira isolada (DX 0,3  $\mu$ M e PLB 1). Enquanto que células tratadas com DX 0,3  $\mu$ M ( $IC_{25}$ ) não entram em processo de morte, e em células tratadas com PLB 1 ( $\frac{1}{2}$   $IC_{50}$ ) há evidente proliferação celular, na associação A1 há o encaminhamento das células para o processo de morte, o qual é caracterizado pela formação de grânulos perinucleares, os quais puderam ser observados por meio da coloração fluorescente com vermelho do nilo sendo então esses identificados como gotículas lipídicas, os quais são característicos do processo de ferroptose (Ferrada *et al.*, 2023).

A ferroptose é um tipo de morte que foi primeiramente caracterizada por Dixon *et al.*, 2012 e é tipificada pelo acúmulo de ferro e pela peroxidação lipídica decorrente da formação de espécies reativas de oxigênio (ERO) (Dixon *et al.*, 2012). Dentro desse contexto, a plumbagina, como uma indutora de formação de ERO (Lin *et al.*, 2023), pode contribuir para o encaminhamento celular à ferroptose. Como revisado por Zhao *et al.* 2020, a erastina é a principal molécula que desencadeia a ferroptose, essa proteína inibe o sistema de transporte cistina-glutamato  $X_c^-$ , o qual se caracteriza por um transportador aniônico voltagem dependente localizado na membrana plasmática, importando para dentro da célula a cistina e exportando glutamato, sendo a cistina reduzida a cisteína, a qual é utilizada para a biossíntese de glutathione, importante na proteção celular contra danos oxidativos (Zhao *et al.*, 2020). Os corpúsculos lipídicos provenientes da ferroptose são ácidos poliinsaturados (PUFAs), especificamente, os ácidos aracdônico e o adrênico, os quais são produzidos e incorporados na membrana plasmática, em forma de fosfolipídios (Kagan *et al.*, 2017).

O transcrito do gene *SLC7A11*, que codifica um componente essencial do sistema de transporte cistina-glutamato  $X_c^-$ , foi inibido em DX e em A1, o que corrobora com os achados morfológicos de ferroptose. Em DX e A1, houve regulação negativa no transcrito do gene *CHAC1*, que atua clivando a glutathione, o que, em tese, reduziria a atividade

ferroptótica por mecanismos antioxidantes, porém em A1, houve regulação negativa em *ASNS* (Asparginina Sintetase), que é responsável pelo crescimento celular e participa da síntese do glutamato, o qual é essencial para a formação da enzima antioxidante glutathione peroxidase 4 (GPX4).

Além disso, o transcrito *NRF2* também se encontra inibido em PLB2 e A2, sendo esse gene associado à proteção celular contra lesões induzidas por ferro, regulando genes com atividade antioxidante, como o *NQO1*, o qual também estava inibido em PLB2 e A2. Entretanto, os achados morfológicos de A2 não denotam aspectos característicos de ferroptose, podendo esse fato estar atrelado à modulação positiva na expressão de mRNAs do gene *SLC7A11*, fazendo com que seja produzida defesas antioxidantes importantes para a inibição da via ferroptótica e então evidencia-se que outros mecanismos, que não os de ferroptose, estão envolvidos no processo antiproliferativo de A2.

A regulação negativa no transcrito *ACSL4* em PLB2, A1 e A2 reflete a não metabolização dos PUFAs evidentes na coloração por Vermelho do Nilo, o produto proteico desse gene é responsável pela reação de esterificação dos ácidos poli-insaturados, mais especificamente, o ácido araquidônico. Kan *et al.*, 2014, demonstrou que o ácido araquidônico regula negativamente a expressão de *ACSL4*. O ácido araquidônico liberado no citoplasma pode ser utilizado por enzimas do tipo ciclooxigenases (COX) e lipooxigenases (LOX) para formação de prostaglandinas, tromboxanos e leucotrienos, importantes mediadores químicos da inflamação (Wang *et al.*, 2019).

A regulação negativa nos transcritos dos genes *HMOX1*, *NFE2L2* e *TRFC* em PLB2 evidencia que a ativação de vias moléculas envolvidas com a ferroptose variam conforme a concentração da associação, o que leva a alterações morfológicas diferentes, onde *TRFC* é responsável pelo influxo de ferro, sendo que o acúmulo intracelular de ferro é essencial para o desencadeamento da ferroptose, porém a sua regulação negativa, como aqui visto, pode alterar vias como PI3K/Akt/mTOR, de forma a impedir a proliferação celular (Feng *et al.*, 2023). Além disso, *NFE2L2* (regulado negativamente em PLB 2 no 2D e 3D) é um importante regulador transcricional que regula positivamente a expressão de genes citoprotetores, além de genes como *HMOX1* (Yan *et al.*, 2023), responsável pela conversão de heme em biliverdina e produção de  $Fe^{2+}$ , essencial para a ferroptose (Liao *et al.*, 2023). Dessa forma, o presente estudo também configura essa relação entre os genes *HMOX1* e *NFE2L2*, podendo, portanto, a regulação negativa de *HMOX1* aqui observada, decorrer da também regulação negativa de *NFE2L2*.

*ACSL4* esteve alterado tanto no 2D quanto no 3D em PLB 2 e A1, sendo um potencial alvo, visto que a expressão desse gene está associada a malignidade tumoral (Kuwata & Hara, 2019). A alteração em *SLC7A11* ocorre em concentrações mais altas, estando regulada positivamente em PLB 2 e A2, demonstrando o mecanismo de resistência do esferoide por meio da produção de moléculas antioxidantes, visto que esse gene culmina na formação da enzima antioxidante GPX4. Em condições anóxicas, a ferroptose não é executada, visto a dependência da formação de espécies reativas de oxigênio, dessa forma, o modelo tridimensional dificulta o acontecimento da ferroptose uma vez que há porções celulares em condições de hipóxia (Dixon et al., 2012; Petrenko, Syková & Kubinová, 2017).

As características morfológicas observadas em células nos tratamentos PLB 2 e A2, como a formação de bolhas e extravasamento do conteúdo celular, junto ao fato de as células não apresentarem coloração para Hoechst 33342, mesmo com o núcleo íntegro, sugerem que o encaminhamento das células ao processo de morte se dá via piroptose. A piroptose é morfológicamente caracterizada pela tumefação celular, formação de bolhas, fragmentação do DNA com manutenção da integridade da membrana nuclear (Jorgensen & Miao, 2016). Como revisado por Man, Karki & Kanneganti, 2018, a piroptose é bioquimicamente caracterizada pela ativação da proteína gasdermina D (GSDMD), a qual é ativada pelas caspases-1 (pró-inflamatória) ou caspases-11 -4 e -5, e desempenha o papel de formar poros na membrana plasmática. Esse tipo de morte envolve a formação de um complexo proteico, denominado inflamassoma, que é formado em decorrência do reconhecimento celular a padrões moleculares associados a danos (DAMPs) (Man, Karki & Kanneganti, 2017). Entretanto, a gasdermina D também tem seu papel atribuído à progressão da proliferação celular, provavelmente por modulações na via EGFR/Akt, sendo observada a supressão do crescimento tumoral sob depleção da GSDMD (Gao *et al.*, 2018). Isso é evidenciado em PLB2 e A2, onde foi possível observar efeito antiproliferativo e encaminhamento celular à morte com a regulação negativa de *GSDMD*. Em 2022, Planés *et al.* observaram que na ausência de GSDMD, pode haver morte mediada por GSDME, que é ativada pela Proteína da Família NLR Contendo Domínio de Pirina 1 (NLRP1), que está presente nos inflamassomas, levando a uma morte por piroptose por via não canônica. Outro aspecto que pôde ser contemplado em nossos estudos foi a permanência da adesão celular mesmo após a morte em PLB 2 e A2, visto que, apesar de muitos tipos de morte celular se caracterizarem pela perda da adesão

celular, células que passam por piroptose, não alteram esse padrão morfológico (De Vasconcelos *et al.*, 2018).

No modelo bidimensional, a associação 1 promoveu a regulação negativa de mRNAs dos genes de morte celular *TNF* e positiva do gene *BIRC5*. *TNF* é uma citocina pró-inflamatória que está associada à morte por necrose, enquanto *BIRC5* atua inibindo a formação de caspases, atuando, portanto, como um gene anti-apoptótico. Contudo, ainda assim, como discutido acima foram possíveis observações de mecanismos antiproliferativos incluindo morte, o que sugere que os achados independem de vias moleculares clássicas de morte, como a necrose e a apoptose. Já a associação 2, que promove a regulação positiva do transcrito do *BBC3* e *BIRC5*, sendo *BBC3* um indutor da ativação de caspases e *BIRC5* um inibidor delas, é possível que a ativação de *BIRC5* tenha se dado em decorrência da ativação de *BBC3* como mecanismo de defesa para a promoção da sobrevivência celular, inativando as vias apoptóticas. Como revisado por Shen, Shao & Li, 2023, há um nível de complexidade nas análises moleculares de vias não clássicas, podendo, portanto, ativar mecanismos de morte de forma independente de genes clássicos de grandes vias. No modelo tridimensional, a regulação negativa do transcrito do gene *BCL2* (-13X), responsável pela manutenção da permeabilidade da membrana mitocondrial, em células tratadas com A1 e positiva em *BBC3* (8X) em células tratadas com A2, denotam a ação na contenção da proliferação celular por mecanismos que promovem a disfunção mitocondrial por meio da formação de poros na membrana mitocondrial (Hikisz & Kiliańska, 2012).

Além de DX 0,3  $\mu$ M apresentar baixa citotoxicidade nos ensaios de viabilidade com resazurina, não apresentou genotoxicidade. No ensaio do cometa a genotoxicidade foi maior na maior concentração de PLB testada. Em células tumorais, a plumbagina promove quebra das fitas de DNA (Sameni & Hande, 2016). Dessa forma, a genotoxicidade apresentada pelas associações sugere um dos mecanismos antiproliferativos que elas utilizam para o encaminhamento das células ao processo de morte, isto é, apesar da doxorubicina não atuar quebrando as fitas de DNA, a plumbagina presente nas associações podem ser as responsáveis pelo dano genético, visto que pode se ligar à topoisomerase II, como demonstrado por Dissanayake *et al.* em 2020, o que leva ao comprometimento da estrutura de DNA, e desta forma, as células não conseguem desenvolver o processo de divisão mitótica e são encaminhadas a morte.

Outra via que as associações atuam é na modulação positiva do transcrito *GADD45A*, indicando, portanto, junto ao ensaio do cometa, a indução de dano ao DNA,

enquanto a regulação negativa do transcrito do gene *H2AFX*, o qual possui papel atrelado ao reparo do dano de DNA, vai permitir o acúmulo de quebras de fita dupla de DNA e a não progressão tumoral. A regulação negativa do transcrito *TP53* por A2, reflete a redução do reparo e o acúmulo de danos na célula. Já no modelo tridimensional, com a regulação positiva de *GADD45A*, evidencia-se a ação antiproliferativa por meio da parada do ciclo celular e indução de morte. O acúmulo de danos ativa vias de reparo, contudo, a formação de DNA com quebra de fita dupla é tóxica (Roos, Thomas & Kaina, 2016), o que pode ter feito com que as células fossem encaminhadas a morte (Ando *et al.*, 2012).

No modelo 3D, a regulação negativa de *H2AFX* em A2 evidencia o mecanismo utilizado para o efeito antiproliferativo, ou seja, os danos ao DNA não estão sendo identificados pela maquinaria celular para um possível reparo. Ainda nesse contexto, é importante denotar que o transcrito do gene *CDKN1A*, está regulado positivamente. O alto nível de p21 (produto proteico do gene *CDKN1A*) desencadeia na inibição transcricional de muitos genes envolvidos na regulação do ciclo celular, e, portanto, estando as células com seu ciclo interrompido, o dano pode ser reparado ou essa célula pode ser encaminhada ao processo de morte se o dano for extenso, como é o caso das associações, dado, por exemplo, o alto potencial genotóxico das mesmas (Sharma *et al.*, 2006).

Mesmo DX 0,3  $\mu\text{M}$  não sendo genotóxica e nem altamente citotóxica, ela é capaz de impedir a formação de colônias. A doxorrubicina induz parada do ciclo celular em G2/M (Azizi *et al.*, 2022). As diferentes respostas decorrentes da variação da concentração de PLB, onde, em baixa concentração ( $1/2$   $\text{IC}_{50}$ ), reduz a formação de colônias, enquanto na maior concentração ( $2 \times \text{IC}_{50}$ ), impede a formação de colônias (sem diferença estatística da mesma e de DX 0,3  $\mu\text{M}$ ).

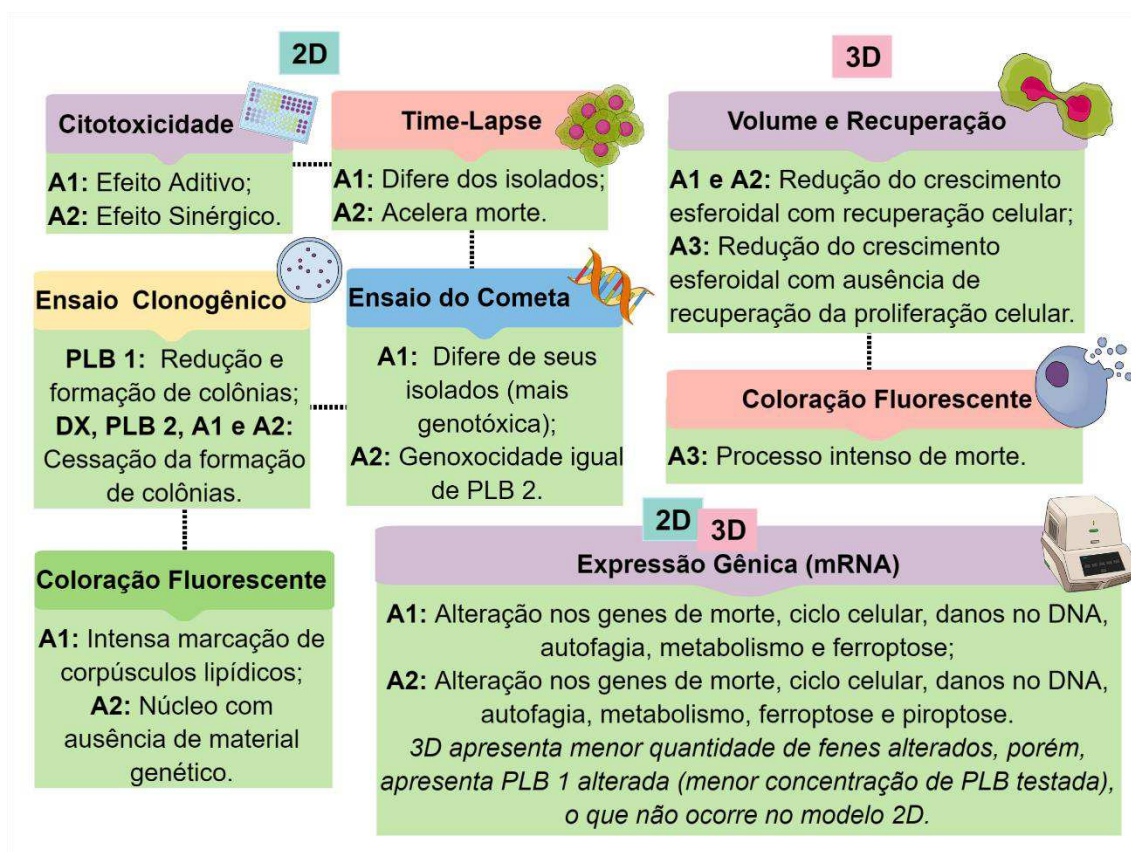
Houve alterações em genes reguladores do ciclo celular, em células tratadas com A1, o gene *CMYC* (aqui regulado negativamente), um protooncogene, é um fator de transcrição que contribui para a manutenção da proliferação celular, sendo que sua inibição, em conjunto com o aumento de *CDKN1A* (regulação positiva) denotam a atuação desta associação nessa via, promovendo efeito antiproliferativo via indução da parada do ciclo celular. Em células tratadas com A2, observou-se que *CDKN1A* teve sua expressão aumentada, mesmo sob a regulação negativa de *TP53*, indicando a síntese de *CDKN1A* independente de *TP53*. No modelo 3D, essa associação promove regulação positiva de *CDKN1A*. Como já supracitado, p21 desencadeia a inibição de genes envolvidos com a regulação do ciclo celular, promovendo, portanto, a indução da parada

do ciclo celular. A redução do tamanho esferoidal observada nos esferoides tratados com A3, bem como o impedimento da recuperação da proliferação celular desses esferoides evidenciam a regulação do ciclo celular no modelo tridimensional.

As associações apresentaram regulação positiva do transcrito do gene *SQSTM1*, gene envolvido em mecanismos autofágicos, sendo ainda A2 positivamente regulada tanto no modelo 2D quanto no 3D. A ativação desse gene pode decorrer da necessidade de eliminar proteínas mal dobradas decorrentes de um possível estresse no retículo endoplasmático, decorrente da peroxidação lipídica (Haberzettl & Hill, 2013).

As associações promovem alteração nas vias metabólicas, mais especificamente, essa alteração ocorreu nas enzimas da família 1 do citocromo P450 (CYP1), as quais estão envolvidas no processo de metabolismo de fase I de xenobióticos. A regulação positiva em *CYP1A1*, promovida por A1 e A2, e a regulação positiva de *CYP1A2* que acontece em A2, evidencia a resposta celular de tentativa de inativação da droga. No modelo tridimensional essa via também é ativada, visto que A2 promove a regulação positiva da *CYP1A1*. A ativação da transcrição de CYPs é mediada pela interação dos xenobióticos com receptores celulares (Manikandan & Nagini, 2018). Apesar dessas enzimas ativarem pró-carcinógenos (He & Feng, 2015), os experimentos aqui demonstraram uma suplantação desse efeito, visto que diversas moléculas envolvidas com as vias de morte e proliferação sofreram alteração. É importante ressaltar que os transcritos trazem luz aos mecanismos envolvidos no efeito terapêutico, entretanto, principalmente para as moléculas que são reguladas positivamente, faz-se necessária a investigação proteica. As principais percepções observadas neste trabalho que foram aqui discutidas estão sumarizadas na Figura 27.

**Figura 25 – Diagrama: Efeitos da Associação de Plumbagina e Doxorrubicina.**



## 7. CONCLUSÃO

Diante do exposto, conclui-se que as associações compostas de doxorubicina e plumbagina possuem potencial proliferativo diferencial de seus isolados em monocamada e aparente dose-dependência em modelo tridimensional (esferoides). As associações foram mais citotóxicas que seus isolados, apresentaram capacidade de reduzir a formação de colônias, são genotóxicas e alteram a expressão de mRNA de vias moleculares de morte (*BBC3*, *BIRC5*, *TNF* e *BCL2*), autofagia (*SQSTM1*), controle de ciclo (*CMYC*, *CDKN1A* e *MTOR*), reparo do DNA (*H2AFX*, *GADD45A* e *TP53*), metabolismo de xenobióticos (*CYP1A1*, *CYP1A2* e *CYP2E1*), ferroptose (*NQO1*, *NRF2*, *SLC7A11*, *ASNS*, *CHAC1* e *ACSL4*) e piroptose (*GSDMD*). Conclui-se também, que o tipo de morte depende da concentração, sendo aqui observada provável ferroptose e piroptose. O modelo tridimensional apresentou-se mais refratário ao tratamento, alterando em menor grau (quantidade de genes testados) a expressão de mRNA, sendo alvo dessas associações as vias de morte, autofagia, controle de ciclo, reparo do DNA e metabolismo de xenobióticos. Contudo, esse modelo demonstrou-se mais sensível, no sentido em que altera a expressão de genes na concentração mais baixa de plumbagina testada. Foi possível concluir, portanto, que em maior concentração, ocorre mais alterações antiproliferativas no esferoide, o que foi visto com o monitoramento, a coloração com PI e a avaliação da expressão gênica. Ademais, o uso de associações de drogas em concentrações isoladamente não citotóxicas é uma ferramenta útil para um tratamento clínico eficaz, que pode contornar problemas de resistência, atuar em maior número de vias moleculares e ainda, com provável redução nos efeitos adversos associados a alta concentração de uma única droga, considerando ainda que são necessárias maiores investigações dessa associação para a garantia da efetividade do tratamento e maiores observações dos efeitos que essas drogas em conjunto causam.

## 8. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ALFHILI, Mohammad A. et al. Antibacterial and anti-biofilm activity of plumbagin against multi-drug resistant clinical bacterial isolates. **Saudi Medical Journal**, v. 43, n. 11, p. 1224-1233, 2022.

ALHARBI, Yousef et al. Plumbagin-induced oxidative stress leads to inhibition of Na<sup>+</sup>/K<sup>+</sup>-ATPase (NKA) in canine cancer cells. **Scientific Reports**, v. 9, n. 1, p. 11471, 2019.

AMJAD, Muhammad T.; CHIDHARLA, Anusha; KASI, Anup. Cancer chemotherapy. 2023.

ANDO, Kiyohiro et al. PIDD death-domain phosphorylation by ATM controls prodeath versus prosurvival PIDDosome signaling. **Molecular cell**, v. 47, n. 5, p. 681-693, 2012.

AZIZI, Ebrahim et al. Quercetin Effects on Cell Cycle Arrest and Apoptosis and Doxorubicin Activity in T47D Cancer Stem Cells. **Asian Pacific Journal of Cancer Prevention: APJCP**, v. 23, n. 12, p. 4145, 2022.

BAKERY, Heba H. et al. Anti-inflammatory, antioxidant, anti-fibrotic and schistosomicidal properties of plumbagin in murine schistosomiasis. **Parasite Immunology**, v. 44, n. 11, p. e12945, 2022.

BINOY, Anupama et al. Plumbagin induces paraptosis in cancer cells by disrupting the sulfhydryl homeostasis and proteasomal function. **Chemico-biological interactions**, v. 310, p. 108733, 2019.

BRÜCHER, Björn LDM; JAMALL, Ijaz S. Cell-cell communication in the tumor microenvironment, carcinogenesis, and anticancer treatment. **Cellular Physiology and Biochemistry**, v. 34, n. 2, p. 213-243, 2014.

CARVALHO, Cristina et al. Doxorubicin: the good, the bad and the ugly effect. **Current medicinal chemistry**, v. 16, n. 25, p. 3267-3285, 2009.

CHATUPHONPRASERT, Waranya et al. Plumbagin and Plumbago indica Differentially Modulated Cytochrome P450 and Transporter Profiles in BeWo and HepG2 Cells. **Pakistan Journal of Biological Sciences: PJBS**, v. 24, n. 11, p. 1195-1201, 2021.

CLEVERS, Hans; NUSSE, Roel. Wnt/ $\beta$ -catenin signaling and disease. **Cell**, v. 149, n. 6, p. 1192-1205, 2012.

CRIPPA, Giovanna Vaz et al. Up and down-regulation of mRNA in the cytotoxicity and genotoxicity of Plumbagin in HepG2/C3A. **Environmental Toxicology and Pharmacology**, v. 75, p. 103328, 2020.

DAGOGO-JACK, Ibiayi; SHAW, Alice T. Tumour heterogeneity and resistance to cancer therapies. **Nature reviews Clinical oncology**, v. 15, n. 2, p. 81-94, 2018.

DE VASCONCELOS, Nathalia M. et al. Single-cell analysis of pyroptosis dynamics reveals conserved GSDMD-mediated subcellular events that precede plasma membrane rupture. **Cell Death & Differentiation**, v. 26, n. 1, p. 146-161, 2019.

DISSANAYAKE, D. M. I. H. et al. Antimicrobial activity of *Plumbago indica* and ligand screening of plumbagin against methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. **Journal of Biomolecular structure and dynamics**, 2020.

DIXON, Scott J. et al. Ferroptosis: an iron-dependent form of nonapoptotic cell death. **cell**, v. 149, n. 5, p. 1060-1072, 2012.

ELDHOSE, Binil et al. Plumbagin reduces human colon cancer cell survival by inducing cell cycle arrest and mitochondria-mediated apoptosis. **International journal of oncology**, v. 45, n. 5, p. 1913-1920, 2014.

ERSAHIN, Tulin; TUNCBAG, Nurcan; CETIN-ATALAY, Rengul. The PI3K/AKT/mTOR interactive pathway. **Molecular BioSystems**, v. 11, n. 7, p. 1946-1954, 2015.

EVAN, Gerard I.; VOUSDEN, Karen H. Proliferation, cell cycle and apoptosis in cancer. **nature**, v. 411, n. 6835, p. 342-348, 2001.

FENG, Guofei et al. Knockdown of TFRC suppressed the progression of nasopharyngeal carcinoma by downregulating the PI3K/Akt/mTOR pathway. **Cancer Cell International**, v. 23, n. 1, p. 185, 2023.

FERRADA, Luciano et al. Dehydroascorbic acid sensitizes cancer cells to system xc<sup>-</sup> inhibition-induced ferroptosis by promoting lipid droplet peroxidation. **Cell Death & Disease**, v. 14, n. 9, p. 637, 2023.

FIESER, L. F.; DUNN, J. T. Synthesis of plumbagin. **Journal of the American Chemical Society**, v. 58, n. 4, p. 572-575, 1936.

FRANKEN, Nicolaas AP et al. Clonogenic assay of cells in vitro. **Nature protocols**, v. 1, n. 5, p. 2315-2319, 2006.

GAO, Jianwei et al. Downregulation of GSDMD attenuates tumor proliferation via the intrinsic mitochondrial apoptotic pathway and inhibition of EGFR/Akt signaling and predicts a good prognosis in non-small cell lung cancer. **Oncology reports**, v. 40, n. 4, p. 1971-1984, 2018.

GRECO, William R.; FAESSEL, H.; LEVASSEUR, L. The search for cytotoxic synergy between anticancer agents: a case of Dorothy and the ruby slippers?. **Journal of the National Cancer Institute**, v. 88, n. 11, p. 699-700, 1996.

HABERZETTL, Petra; HILL, Bradford G. Oxidized lipids activate autophagy in a JNK-dependent manner by stimulating the endoplasmic reticulum stress response. **Redox biology**, v. 1, n. 1, p. 56-64, 2013.

- HE, Xin; FENG, Shan. Role of metabolic enzymes P450 (CYP) on activating procarcinogen and their polymorphisms on the risk of cancers. **Current drug metabolism**, v. 16, n. 10, p. 850-863, 2015.
- HIKISZ, Paweł; KILIAŃSKA, Zofia. PUMA, a critical mediator of cell death—one decade on from its discovery. **Cellular and Molecular Biology Letters**, v. 17, n. 4, p. 646-669, 2012.
- HUANG, Ruixue; ZHOU, Ping-Kun. DNA damage repair: Historical perspectives, mechanistic pathways and clinical translation for targeted cancer therapy. **Signal Transduction and Targeted Therapy**, v. 6, n. 1, p. 254, 2021.
- HWANG, Geun Hye et al. The role of thioredoxin reductase and glutathione reductase in plumbagin-induced, reactive oxygen species-mediated apoptosis in cancer cell lines. **European journal of pharmacology**, v. 765, p. 384-393, 2015.
- ISHIGURO, Tatsuya et al. Tumor-derived spheroids: relevance to cancer stem cells and clinical applications. **Cancer science**, v. 108, n. 3, p. 283-289, 2017.
- JAAKS, Patricia et al. Effective drug combinations in breast, colon and pancreatic cancer cells. **Nature**, v. 603, n. 7899, p. 166-173, 2022.
- JAIN, Diwakar. Cardiotoxicity of doxorubicin and other anthracycline derivatives. **Journal of Nuclear Cardiology**, v. 7, p. 53-62, 2000.
- JEYACHANDRAN, R. et al. Antibacterial activity of plumbagin and root extracts of *Plumbago zeylanica* L. **Acta Biologica Cracoviensia Series Botanica**, v. 51, n. 1, p. 17-22, 2009.
- JORGENSEN, Ine; MIAO, Edward A. Pyroptotic cell death defends against intracellular pathogens. **Immunological reviews**, v. 265, n. 1, p. 130-142, 2015.
- KAGAN, Valerian E. et al. Oxidized arachidonic and adrenic PEs navigate cells to ferroptosis. **Nature chemical biology**, v. 13, n. 1, p. 81-90, 2017.
- KAMATAR, Advika; GUNAY, Gokhan; ACAR, Handan. Natural and synthetic biomaterials for engineering multicellular tumor spheroids. **Polymers**, v. 12, n. 11, p. 2506, 2020.
- KAN, Chin Fung Kelvin et al. Arachidonic acid downregulates acyl-CoA synthetase 4 expression by promoting its ubiquitination and proteasomal degradation [S]. **Journal of Lipid Research**, v. 55, n. 8, p. 1657-1667, 2014.
- KENNEDY, David O.; WIGHTMAN, Emma L. Herbal extracts and phytochemicals: plant secondary metabolites and the enhancement of human brain function. **Advances in Nutrition**, v. 2, n. 1, p. 32-50, 2011.
- KIM, Young Ae et al. Doxorubicin-induced heart failure in cancer patients: A cohort study based on the Korean National Health Insurance Database. **Cancer medicine**, v. 7, n. 12, p. 6084-6092, 2018.

KOHN, Kurt W. **Drugs Against Cancer: Stories of Discovery and the Quest for a Cure**. National Cancer Institute, 2022.

KRISCHKE, Miriam et al. Pharmacokinetic and pharmacodynamic study of doxorubicin in children with cancer: results of a “European Pediatric Oncology Off-patents Medicines Consortium” trial. **Cancer chemotherapy and pharmacology**, v. 78, p. 1175-1184, 2016.

KUWATA, Hiroshi; HARA, Shuntaro. Role of acyl-CoA synthetase ACSL4 in arachidonic acid metabolism. **Prostaglandins & other lipid mediators**, v. 144, p. 106363, 2019.

LAI, Li et al. Plumbagin inhibits tumour angiogenesis and tumour growth through the Ras signalling pathway following activation of the VEGF receptor-2. **British journal of pharmacology**, v. 165, n. 4b, p. 1084-1096, 2012.

LI, Na et al. Design, synthesis and biological evaluation of novel plumbagin derivatives as potent antitumor agents with STAT3 inhibition. **Bioorganic Chemistry**, v. 104, p. 104208, 2020.

LIANG, Kai et al. Anti-ovarian cancer actions and pharmacological targets of plumbagin. **Naunyn-Schmiedeberg's Archives of Pharmacology**, p. 1-6, 2023.

LIAO, Shengjie et al. HMOX1 promotes ferroptosis induced by erastin in lens epithelial cell through modulates Fe<sup>2+</sup> production. **Current Eye Research**, v. 48, n. 1, p. 25-33, 2023.

LIN, Chien-Liang et al. Plumbagin induces the apoptosis of drug-resistant oral cancer in vitro and in vivo through ROS-mediated endoplasmic reticulum stress and mitochondrial dysfunction. **Phytomedicine**, p. 154655, 2023.

LIU, Yuling et al. Anticancer properties and pharmaceutical applications of plumbagin: a review. **The American journal of Chinese medicine**, v. 45, n. 03, p. 423-441, 2017.

LIU, Huan et al. Plumbagin exhibits genotoxicity and induces G2/M cell cycle arrest via ROS-mediated oxidative stress and activation of ATM-p53 signaling pathway in hepatocellular cells. **International journal of molecular sciences**, v. 24, n. 7, p. 6279, 2023.

LU, Jian et al. Plant natural product plumbagin presents potent inhibitory effect on human cytochrome P450 2J2 enzyme. **Phytomedicine**, v. 39, p. 137-145, 2018.

MAN, Si Ming; KARKI, Rajendra; KANNEGANTI, Thirumala-Devi. Molecular mechanisms and functions of pyroptosis, inflammatory caspases and inflammasomes in infectious diseases. **Immunological reviews**, v. 277, n. 1, p. 61-75, 2017.

MANCILLA, Igor Alves et al. Molecular pathways related to the control of proliferation and cell death in 786-O cells treated with plumbagin. **Molecular Biology Reports**, v. 46, p. 6071-6078, 2019.

MANDAVKAR, Yuvaraj D.; JALALPURE, Sunil S. A comprehensive review on *Plumbago zeylanica* Linn. **African Journal of pharmacy and pharmacology**, v. 5, n. 25, p. 2738-2747, 2011.

MANIKANDAN, Palrasu; NAGINI, Siddavaram. Cytochrome P450 structure, function and clinical significance: a review. **Current drug targets**, v. 19, n. 1, p. 38-54, 2018.

MUKHERJEE, Sandipan et al. Copper-Plumbagin Complex Produces Potent Anticancer Effects by Depolymerizing Microtubules and Inducing Reactive Oxygen Species and DNA Damage. **ACS Omega**, 2023.

NATIONAL CENTER FOR BIOTECHNOLOGY INFORMATION. *PubChem Compound Summary for CID 10205*, Plumbagin. Bethesda: National Library of Medicine (US), National Center for Biotechnology Information; 2023 [acesso em 11 abril 2023]. Disponível em: <https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/Plumbagin>.

NIU, Nifang; WANG, Liewei. In vitro human cell line models to predict clinical response to anticancer drugs. **Pharmacogenomics**, v. 16, n. 3, p. 273-285, 2015.

O'BRIEN, J.; POGNAN, F. Investigation of the Alamar blue (Resazurin) fluorescent dye for the assessment of mammalian cell cytotoxicity. In: **Toxicology**. CUSTOMER RELATIONS MANAGER, BAY 15, SHANNON INDUSTRIAL ESTATE CO, CLARE, IRELAND: ELSEVIER SCI IRELAND LTD, 2001. p. 132-132.

OLIVE, Peggy L.; BANÁTH, Judit P.; DURAND, Ralph E. Heterogeneity in radiation-induced DNA damage and repair in tumor and normal cells measured using the " comet" assay. **Radiation research**, v. 122, n. 1, p. 86-94, 1990.

ONO, T. et al. Plumbagin suppresses tumor cell growth in oral squamous cell carcinoma cell lines. **Oral Diseases**, v. 21, n. 4, p. 501-511, 2015.

PAI, Sarayu A. et al. Plumbagin reduces obesity and nonalcoholic fatty liver disease induced by fructose in rats through regulation of lipid metabolism, inflammation and oxidative stress. **Biomedicine & Pharmacotherapy**, v. 111, p. 686-694, 2019.

PAIVA, Selma R. de et al. Plumbagin quantification in roots of *Plumbago scandens* L. obtained by different extraction techniques. **Anais da Academia Brasileira de Ciências**, v. 76, p. 499-504, 2004.

PAN, Shu-Ting et al. Plumbagin Enhances the Anticancer Effects of PF Chemotherapy via Downregulation of the PI3K/AKT/mTOR/p70S6K Pathway in Human Tongue Squamous Cell Carcinoma. **Journal of Oncology**, v. 2023, 2023.

PAN, Shu-Ting et al. Plumbagin Enhances the Radiosensitivity of Tongue Squamous Cell Carcinoma Cells via Downregulating ATM. **Journal of Oncology**, v. 2021, 2021.

PERIASAMY, Vaiyapuri Subbarayan et al. Plumbagin triggers redox-mediated autophagy through the LC3B protein in human papillomavirus-positive cervical cancer cells. **Archives of Medical Science: AMS**, v. 18, n. 1, p. 171, 2022.

PERIYASAMY, Loganayaki et al. Screening of MMP-2 Inhibiting Phytoconstituents for The Development of Newer Pancreatic Cancer Modalities. **Protein and Peptide Letters**, 2023.

PETRENKO, Yuriy; SYKOVÁ, Eva; KUBINOVÁ, Šárka. The therapeutic potential of three-dimensional multipotent mesenchymal stromal cell spheroids. **Stem cell research & therapy**, v. 8, n. 1, p. 1-9, 2017.

PICCININI, Filippo et al. Cancer multicellular spheroids: volume assessment from a single 2D projection. **Computer methods and programs in biomedicine**, v. 118, n. 2, p. 95-106, 2015.

PICCININI, Filippo. AnaSP: a software suite for automatic image analysis of multicellular spheroids. **Computer methods and programs in biomedicine**, v. 119, n. 1, p. 43-52, 2015.

PLANÈS, Rémi et al. Human NLRP1 is a sensor of pathogenic coronavirus 3CL proteases in lung epithelial cells. **Molecular cell**, v. 82, n. 13, p. 2385-2400. e9, 2022.

PUGAZHENDHI, Arivalagan et al. Toxicity of Doxorubicin (Dox) to different experimental organ systems. **Life sciences**, v. 200, p. 26-30, 2018.

QIAN, Weidong et al. Exploitation of the antifungal and antibiofilm activities of plumbagin against *Cryptococcus neoformans*. **Biofouling**, v. 38, n. 6, p. 558-574, 2022.

RAY CHAUDHURI, Arnab; NUSSENZWEIG, André. The multifaceted roles of PARP1 in DNA repair and chromatin remodelling. **Nature reviews Molecular cell biology**, v. 18, n. 10, p. 610-621, 2017.

REBUCCI, Magali; MICHIELS, Carine. Molecular aspects of cancer cell resistance to chemotherapy. **Biochemical pharmacology**, v. 85, n. 9, p. 1219-1226, 2013.

RODRIGUES, Daniel B.; REIS, Rui L.; PIRRACO, Rogério P. Modelling the complex nature of the tumor microenvironment: 3D tumor spheroids as an evolving tool. **Journal of Biomedical Science**, v. 31, n. 1, p. 13, 2024.

ROOS, Wynand P.; THOMAS, Adam D.; KAINA, Bernd. DNA damage and the balance between survival and death in cancer biology. **Nature Reviews Cancer**, v. 16, n. 1, p. 20-33, 2016.

RYALL, Karen A.; TAN, Aik Choon. Systems biology approaches for advancing the discovery of effective drug combinations. **Journal of cheminformatics**, v. 7, n. 1, p. 1-15, 2015.

SAKUNRANGSIT, Nithidol; KETCHART, Wannarasmi. Plumbagin inhibits cancer stem-like cells, angiogenesis and suppresses cell proliferation and invasion by targeting Wnt/ $\beta$ -catenin pathway in endocrine resistant breast cancer. **Pharmacological research**, v. 150, p. 104517, 2019.

SAMENI, Safoura; HANDE, M. Prakash. Plumbagin triggers DNA damage response, telomere dysfunction and genome instability of human breast cancer cells. **Biomedicine & Pharmacotherapy**, v. 82, p. 256-268, 2016.

SCHIFFMAN, Joshua D.; FISHER, Paul G.; GIBBS, Peter. Early detection of cancer: past, present, and future. **American Society of Clinical Oncology Educational Book**, v. 35, n. 1, p. 57-65, 2015.

- SEIGLER, David S.; SEIGLER, David S. Benzoquinones, naphthoquinones, and anthraquinones. **Plant secondary metabolism**, p. 76-93, 1998.
- SHARMA, Nidhi et al. Control of the p53-p21CIP1 Axis by E2f1, E2f2, and E2f3 is essential for G1/S progression and cellular transformation. **Journal of Biological Chemistry**, v. 281, n. 47, p. 36124-36131, 2006.
- SHEN, Sikou; SHAO, Yina; LI, Chenghua. Different types of cell death and their shift in shaping disease. **Cell death discovery**, v. 9, n. 1, p. 284, 2023.
- SHIH, Yuan-Wei et al. Plumbagin inhibits invasion and migration of liver cancer HepG2 cells by decreasing productions of matrix metalloproteinase-2 and urokinase-plasminogen activator. **Hepatology research**, v. 39, n. 10, p. 998-1009, 2009.
- SHU, Chang et al. Plumbagin relieves rheumatoid arthritis through nuclear factor kappa-B (NF- $\kappa$ B) pathway. **Bioengineered**, v. 13, n. 5, p. 13632-13642, 2022.
- SHUKLA, Suneet et al. The naphthoquinones, vitamin K3 and its structural analogue plumbagin, are substrates of the multidrug resistance–linked ATP binding cassette drug transporter ABCG2. **Molecular cancer therapeutics**, v. 6, n. 12, p. 3279-3286, 2007.
- SIDHU, Harsimran; CAPALASH, Neena. Plumbagin downregulates UHRF1, p-Akt, MMP-2 and suppresses survival, growth and migration of cervical cancer CaSki cells. **Toxicology in Vitro**, v. 86, p. 105512, 2023.
- SMART, Jessica A.; OLEKSAK, Julia E.; HARTSOUGH, Edward J. Cell adhesion molecules in plasticity and metastasis. **Molecular Cancer Research**, v. 19, n. 1, p. 25-37, 2021.
- SU, Yan et al. Inhibition of the TLR/NF- $\kappa$ B Signaling Pathway and Improvement of Autophagy Mediates Neuroprotective Effects of Plumbagin in Parkinson's Disease. **Oxidative Medicine and Cellular Longevity**, v. 2022, 2022.
- SUBRAMANIYA, Bharathi Raja et al. Apoptosis inducing effect of plumbagin on colonic cancer cells depends on expression of COX-2. **PloS one**, v. 6, n. 4, p. e18695, 2011.
- TITUS, E. Eben et al. In vitro efficacy of plumbagin and thymol against *Theileria annulata*. **Journal of Parasitic Diseases**, p. 1-9, 2022.
- TRIPATHI, Surya Kant; PANDA, Munmun; BISWAL, Bijesh K. Emerging role of plumbagin: cytotoxic potential and pharmaceutical relevance towards cancer therapy. **Food and Chemical Toxicology**, v. 125, p. 566-582, 2019.
- TRIPATHI, Surya Kant; RENGASAMY, Kannan RR; BISWAL, Bijesh Kumar. Plumbagin engenders apoptosis in lung cancer cells via caspase-9 activation and targeting mitochondrial-mediated ROS induction. **Archives of pharmacal research**, v. 43, p. 242-256, 2020.
- WANG, Huafeng et al. Plumbagin protects liver against fulminant hepatic failure and chronic liver fibrosis via inhibiting inflammation and collagen production. **Oncotarget**, v. 7, n. 50, p. 82864, 2016.

- WANG, Tianqi et al. Arachidonic acid metabolism and kidney inflammation. **International journal of molecular sciences**, v. 20, n. 15, p. 3683, 2019.
- WESTON, Claire R.; DAVIS, Roger J. The JNK signal transduction pathway. **Current opinion in cell biology**, v. 19, n. 2, p. 142-149, 2007.
- WONG, Rebecca SY. Apoptosis in cancer: from pathogenesis to treatment. **Journal of experimental & clinical cancer research**, v. 30, n. 1, p. 1-14, 2011.
- XUE, Danfeng; ZHOU, Xiongming; QIU, Jiaxuan. Cytotoxicity mechanisms of plumbagin in drug-resistant tongue squamous cell carcinoma. **Journal of Pharmacy and Pharmacology**, v. 73, n. 1, p. 98-109, 2021.
- YAN, Ruihan et al. NRF2, a Superstar of Ferroptosis. **Antioxidants**, v. 12, n. 9, p. 1739, 2023.
- YAO, Leyi et al. Plumbagin is a novel GPX4 protein degrader that induces apoptosis in hepatocellular carcinoma cells. **Free Radical Biology and Medicine**, v. 203, p. 1-10, 2023.
- YU, Hua et al. Revisiting STAT3 signalling in cancer: new and unexpected biological functions. **Nature reviews Cancer**, v. 14, n. 11, p. 736-746, 2014.
- ZAKI, Aya M. et al. Plumbagin ameliorates hepatic ischemia-reperfusion injury in rats: role of high mobility group box 1 in inflammation, oxidative stress and apoptosis. **Biomedicine & Pharmacotherapy**, v. 106, p. 785-793, 2018.
- ZHANG, Qianrui et al. Plumbagin protects H9c2 cardiomyocytes against TBHP-induced cytotoxicity by alleviating ROS-induced apoptosis and modulating autophagy. **Experimental and Therapeutic Medicine**, v. 24, n. 2, p. 1-8, 2022.
- ZHANG, Xiangsheng et al. Plumbagin induces Ishikawa cell cycle arrest, autophagy, and apoptosis via the PI3K/Akt signaling pathway in endometrial cancer. **Food and Chemical Toxicology**, v. 148, p. 111957, 2021.
- ZHAO, Yang et al. ROS signaling under metabolic stress: cross-talk between AMPK and AKT pathway. **Molecular cancer**, v. 16, p. 1-12, 2017.
- ZHAO, Yuechen et al. The role of erastin in ferroptosis and its prospects in cancer therapy. **OncoTargets and therapy**, p. 5429-5441, 2020.
- ZHOU, Rui et al. Bioinformatic and experimental data decipher the pharmacological targets and mechanisms of plumbagin against hepatocellular carcinoma. **Environmental Toxicology and Pharmacology**, v. 70, p. 103200, 2019.
- ZU ASTAFORT, Dulong. Chemische Versuche mit dem Plumbagin, der scharfen Materie aus der Wurzel von Plumbago europaea. **Archiv der Pharmazie**, v. 29, n. 3, p. 245-250, 1829.

## MATERIAL SUPLEMENTAR

**Tabela S1 – Citotoxicidade DX**

<b>Tratamentos</b>	<b>Média (%) ± DP</b>
Controle	100 ± 0
DX 0,1 µM	94,5 ± 4,8
DX 0,2 µM	84,8 ± 2,7
DX 0,3 µM	78,8 ± 5,9
DX 0,4 µM	71,8 ± 2,4
DX 0,5 µM	65,9 ± 3,3
DX 1 µM	49,2 ± 1,4

**Tabela S2 – Citotoxicidade PLB**

<b>Tratamentos</b>	<b>Média (%) ± DP</b>
Controle	100 ± 0
PLB 8 µM	95,4 ± 1
PLB 16 µM	68,9 ± 3,7
PLB 32 µM	3,2 ± 0,4
PLB 48 µM	3 ± 0,2

**Tabela S3 – Citotoxicidade Associações**

<b>Tratamentos</b>	<b>Média (%) ± DP</b>
Controle	100 ± 0
DX 0,3 µM	65,8 ± 4,2
PLB 9,2 µM	78,7 ± 2,3
PLB 18,4 µM	31,5 ± 4,3
PLB 36,8 µM	1,3 ± 0,7
A1	50,3 ± 8,3
A2	11,3 ± 1,4
A3	1,2 ± 0,6

**Tabela S4 – Ensaio Clonogênico**

Tratamentos	Média (RFU) ± DP
Controle	13253 ± 1140
Controle Positivo	297,6 ± 33
DX 0,3 µM	380,2 ± 109
PLB 1	1842 ± 420,3
A1	540,7 ± 86,4
PLB 2	343,5 ± 82,8
A2	563,9 ± 66,3

**Tabela S5 – Ensaio do Cometa**

	Classes					SCORE
	0	1	2	3	4	
CV1	100					0
CV2	100					0
CV3	100					0
DX1	84	14	2			18
DX2	81	14	5			24
DX3	78	20	2			24
P1.1	16	40	9		35	198
P1.2	19	31	12		38	207
P1.3	20	31	8	8	33	203
P2.1				1	99	399
P2.2					100	400
P2.3					100	400
A1.1	12	26	4	12	46	254
A1.2	14	23	9	7	47	250
A1.3	15	20	7	9	49	257
A2.1		3		2	95	389
A2.2		2		1	97	393
A2.3					100	400
CP 1	25	27	14	17	17	174
CP 2	23	15	17	13	32	216
CP 3	24	26	15	11	24	185

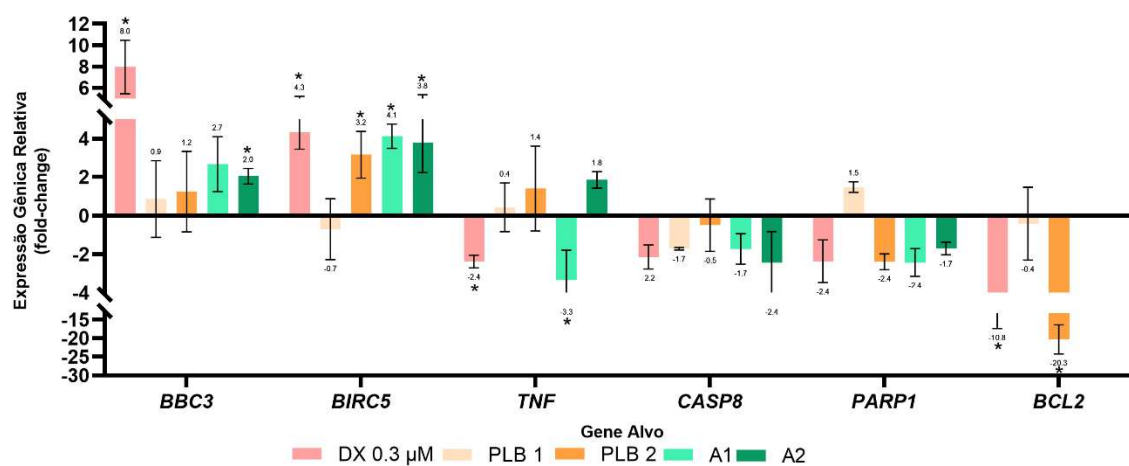
**Tabela S6 – Primers utilizados**

<b>Gene</b>	<b>Foward</b>	<b>Reverse</b>
<i>BBC3</i>	5' GTAAGATACTGTATATGCGCTG 3'	5' TTTTCCACTGTTCCAATCTG 3'
<i>BIRC5</i>	5' CATCTCTACATTCAAGAACTGG 3'	5' CCTTGAAGCAGAAGAAACAC 3'
<i>CASP3</i>	5' AAAGCACACTGGAATGACATC 3'	5' CGCATCAATTCCACAATTC 3'
<i>CASP8</i>	5' CTACAGGGTCATGCTCTACT 3'	5' ATTTGGAGATTTCTCTTGC 3'
<i>CASP9</i>	5' CTCTACTTTCCAGGTTTTG 3'	5' TTTCACCGAAACAGCATTAG 3'
<i>PARP1</i>	5' AAAAGGAGGTGGAAAAGATG 3'	5' GCTAAGAACAACCTCCTGAAG 3'
<i>BCL2</i>	5' AACATCACAGAGGAAGTAGAC 3'	5' CACTTGATTCTGGTGTTC 3'
<i>TNF</i>	5' AGGCAGTCAGATCATCTTC 3'	5' TTATCTCTCAGCTCCACG 3'
<i>GPX1</i>	5' CAACCAGTTTGGGCATCAG 3'	5' CGATGTCAATGGTCTGGAAG 3'
<i>ERN1</i>	5' ACGGACGTCAAGTTTGATCC 3'	5' TTGGTAGACGCAGACAGTGG 3'
<i>EIF2AK3</i>	5' CAAACCAGAGGTATTTGGGAAT 3'	5' GAAAGGAACTGTTCCATGCTT 3'
<i>GADD45A</i>	5' TCAGCGCACGATCACTGTC 3'	5' CCAGCAGGCACAACACCAC 3'
<i>H2AFX</i>	5' AATCCAAGCACCTAGATACC 3'	5' CAGAATTCAGTTCCAGAAGC 3'
<i>CDKN1A</i>	5' CAGCATGACAGATTTCTACC 3'	5' CAGGGTATGTACATGAGGAC 3'
<i>MTOR</i>	5' GGAGGAGAAATTTGATCAGG 3'	5' GGGCAACAAATTAAGGATTG 3'
<i>NFKB</i>	5' GCAGCTCTTCTCAAAGCAGCA 3'	5' GCTCAAAGTTCTCCACCAGGG 3'
<i>TRAF2</i>	5' GCCCAAGTTCCCTTAACT 3'	5' GAATCTGCAAGGGACTCGAC 3'
<i>CMYC</i>	5' TGAGGAACAAGAAGATG 3'	5' ATCCAGACTCTGACCTTTTG 3'
<i>TP53</i>	5' ACCTATGGAACTACTTCCTG 3'	5' ACCATTGTTCAATATCGTCC 3'
<i>BECN1</i>	5' CAGTATCAGAGAATACAGTG 3'	5' TGGAAGGTTGCATTAAGAC 3'
<i>CYP1A1</i>	5' CCAGGCTCCAAGATCCA 3'	5' GATCTTGGAGGTGGCTGCT 3'
<i>CYP1A2</i>	5' CACTATCAGGACTTTGACAAG 3'	5' AGGTTGACAATCTTCTCCTG 3'
<i>CYP3A4</i>	5' AGTCTTTCCATTCCCTCATCC 3'	5' TGCTTTTGTGTATCTTCGAG 3'
<i>CYP2E1</i>	5' GACACCATTTTCAGAGGATAC 3'	5' TTCATTCCAGGAAGTGTCTG 3'
<i>CYP2C9</i>	5' GAAGCACCCAGAGGTCACAG 3'	5' CTCGTGCACCACAGCATC 3'
<i>GAPDH</i>	5' GAAGGTGAAGGTCGGAGTC 3'	5' GGAAGATGGTGTATGGGATTT 3'
<i>RPLPO</i>	5' AGATGCAGCAGATCCGCAT 3'	5' GTGGTGATACCTAAAGCCTG 3'
<i>SQTM1</i>	5' TCCGAGTGTGAATTCCTG 3'	5' AGCTGCCACACTCTCCC 3'
<i>GADD45G</i>	5' CTTTTACGCTGATCCAGG 3'	5' GGGTTCGAAATGAGGATG 3'
<i>NQO1</i>	5' AGCCCAGATATTGTGGCTGA 3'	5' CGGAAGGGTCCCTTTGTCATA 3'
<i>NRF2</i>	5' GAGAGCCCAGTCTTCATTGC 3'	5' GTTTGGCTTCTGGACTTGA 3'
<i>SLC7A11</i>	5' TTTGCACCCTTTGACAATGA 3'	5' GGAAAACAAAGCTGGGATGA 3'
<i>ASNS</i>	5' CGACCAAAAAGAAGCCTTCAG 3'	5' GCCATCATTGCATCATCAAC 3'
<i>HMOX1</i>	5' CTTCTTCACCTTCCCCAACA 3'	5' AGCTCCTGCAACTCCTCAA 3'
<i>CHAC1</i>	5' GATCATGAGGGCTGCACTTG 3'	5' CCTCCTTGGTATCGTAGCCA 3'
<i>ACSL4</i>	5' ATAAAGCAGAGTACCCTGAAG 3'	5' CAAGTTTTCTGGGTTAGATCC 3'
<i>NFE2L2</i>	5' CGTTTGTAGATGACAATGAGG 3'	5' AGAAGTTTCAGGTGACTGAG 3'
<i>TRFC</i>	5' AAGATTCAGGTCAAAGACAG 3'	5' CTTACTATACGCCACATAACC 3'
<i>GSDMD</i>	5' ACCTGTCTATCAAGGACATC 3'	5' GCGAGTACACATTCATTGAG 3'

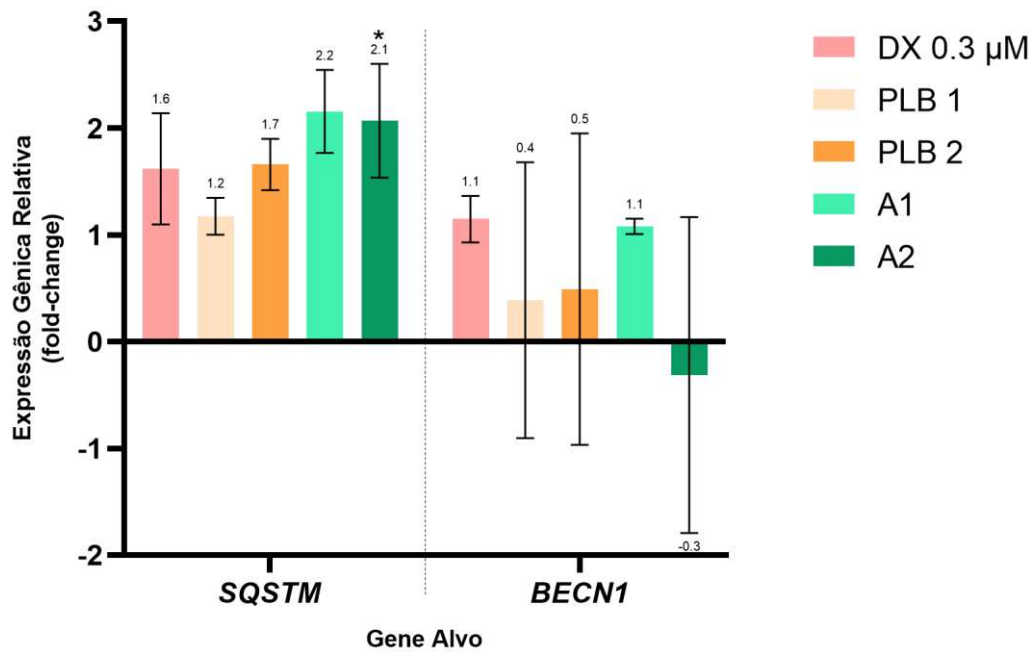
Tabela S7 – Volume (mm<sup>3</sup>) - Taxas

Média das Taxas do Volume (mm <sup>3</sup> ) ± D.P.			
Tratamentos	24h	48h	72h
Controle	21,5 ± 1,5	42,6 ± 3,9	61,3 ± 5,7
DX 0,3 µM	20,9 ± 11	27,6 ± 21,5	43,4 ± 24,2
PLB 1	15,7 ± 4,2	25,9 ± 5	44,2 ± 7,8
PLB 2	12,1 ± 11,1	8 ± 11,7	23,8 ± 22,14
PLB 3	4,2 ± 5,9	-8,3 ± 2	-0,7 ± 1,7
A1	5,5 ± 6,8	2,5 ± 5,7	3,9 ± 2,3
A2	3 ± 3,7	-0,2 ± 7,5	7,7 ± 2,8
A3	-5,9 ± 6,5	1,9 ± 4,2	4,4 ± 6,8

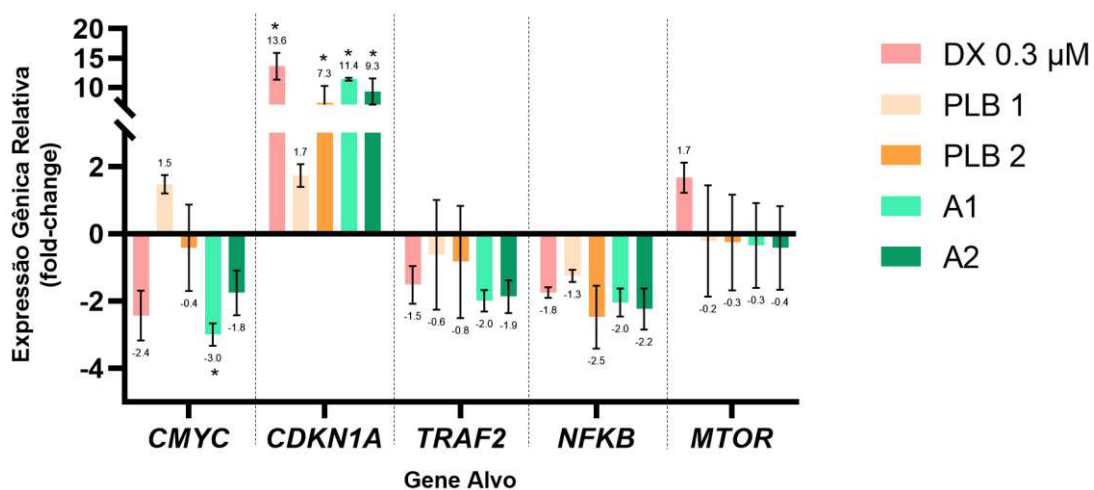
**Figura S1 – Expressão Gênica Relativa de Genes Envolvidos nas Vias de Morte Celular (2D) em células HepG2/C3A tratadas por 24h com DX e PLB.** DX = IC<sub>25</sub> Doxorrubicina (0,3 µM); PLB 1 = ½ IC<sub>50</sub> Plumbagina (9,2 µM); PLB 2 = IC<sub>50</sub> Plumbagina (18,4 µM); Associação 1 (A1) = IC<sub>25</sub> DX + ½ IC<sub>50</sub> PLB; Associação 2 (A2) = IC<sub>25</sub> DX + IC<sub>50</sub> PLB. Análise realizada por 2<sup>-ΔΔCt</sup>, sendo significativa a expressão que apresentasse p-valor ≤0,05 (teste T), e log (2) >1 ou <-1.



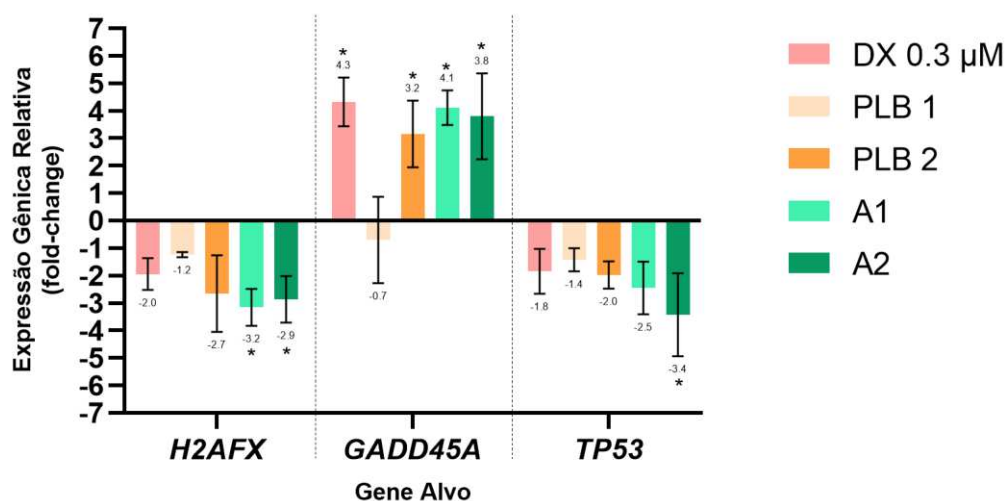
**Figura S2 – Expressão Gênica Relativa de genes envolvidos em vias autofágicas (2D) em células HepG2/C3A tratadas por 24h com DX e PLB. DX = IC<sub>25</sub> Doxorrubicina (0,3 µM); PLB 1 = ½ IC<sub>50</sub> Plumbagina (9,2 µM); PLB 2 = IC<sub>50</sub> Plumbagina (18,4 µM); Associação 1 (A1) = IC<sub>25</sub> DX + ½ IC<sub>50</sub> PLB; Associação 2 (A2) = IC<sub>25</sub> DX + IC<sub>50</sub> PLB. Análise realizada por 2<sup>-ΔΔCt</sup>, sendo significativa a expressão que apresentasse p-valor ≤0,05 (teste T), e log (2) >1 ou <-1.**



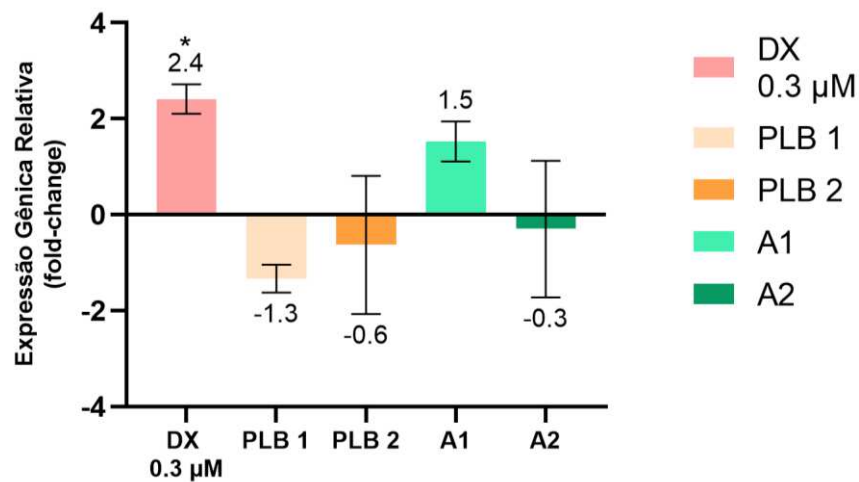
**Figura S3 – Expressão Gênica Relativa de Genes Envolvidos nas Vias de Regulação do Ciclo Celular (2D) em células HepG2/C3A tratadas por 24h com DOX e PLB.** DX = IC<sub>25</sub> Doxorubicina (0,3 μM); PLB 1 = ½ IC<sub>50</sub> Plumbagina (9,2 μM); PLB 2 = IC<sub>50</sub> Plumbagina (18,4 μM); Associação 1 (A1) = IC<sub>25</sub> DX + ½ IC<sub>50</sub> PLB; Associação 2 (A2) = IC<sub>25</sub> DX + IC<sub>50</sub> PLB. Análise realizada por 2<sup>-ΔΔCt</sup>, sendo significativa a expressão que apresentasse p-valor ≤0,05 (teste T), e log (2) >1 ou <-1.



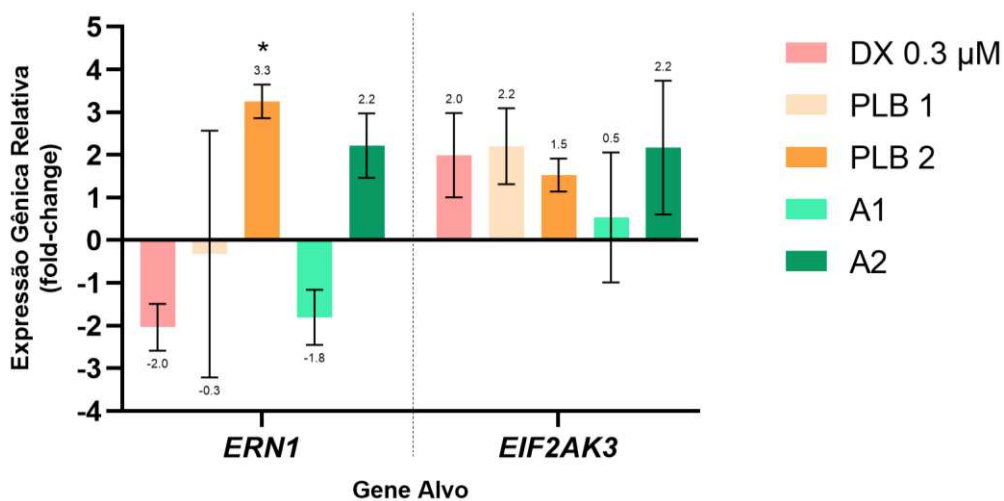
**Figura S4 – Expressão Gênica Relativa de Genes Envolvidos nas Vias de Reparo do DNA (2D) em células HepG2/C3A tratadas por 24h com DOX e PLB.** DX = IC<sub>25</sub> Doxorubicina (0,3  $\mu$ M); PLB 1 =  $\frac{1}{2}$  IC<sub>50</sub> Plumbagina (9,2  $\mu$ M); PLB 2 = IC<sub>50</sub> Plumbagina (18,4  $\mu$ M); Associação 1 (A1) = IC<sub>25</sub> DX +  $\frac{1}{2}$  IC<sub>50</sub> PLB; Associação 2 (A2) = IC<sub>25</sub> DX + IC<sub>50</sub> PLB. Análise realizada por  $2^{-\Delta\Delta Ct}$ , sendo significativa a expressão que apresentasse p-valor  $\leq 0,05$  (teste T), e  $\log(2) > 1$  ou  $< -1$ .



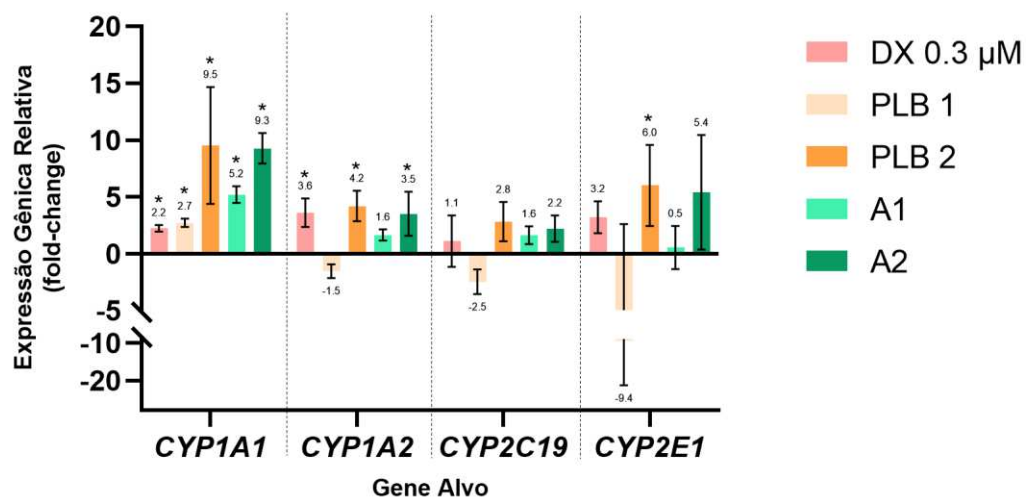
**Figura S5 – Expressão Gênica Relativa do Gene *GPX1* – Estresse Oxidativo (2D) em células HepG2/C3A tratadas por 24h com DOX e PLB.** DX = IC<sub>25</sub> Doxorubicina (0,3 μM); PLB 1 = ½ IC<sub>50</sub> Plumbagina (9,2 μM); PLB 2 = IC<sub>50</sub> Plumbagina (18,4 μM); Associação 1 (A1) = IC<sub>25</sub> DX + ½ IC<sub>50</sub> PLB; Associação 2 (A2) = IC<sub>25</sub> DX + IC<sub>50</sub> PLB. Análise realizada por 2<sup>-ΔΔCt</sup>, sendo significativa a expressão que apresentasse p-valor ≤0,05 (teste T), e log (2) >1 ou <-1.



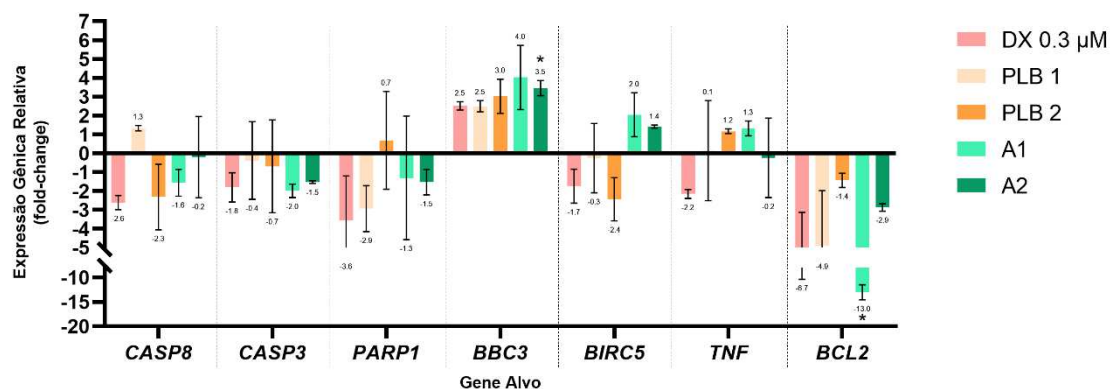
**Figura S6 – Expressão Gênica Relativa de Genes Envolvidos na Via de Estresse no Retículo Endoplasmático (2D) em células HepG2/C3A tratadas por 24h com DOX e PLB.** DX = IC<sub>25</sub> Doxorubicina (0,3 μM); PLB 1 = ½ IC<sub>50</sub> Plumbagina (9,2 μM); PLB 2 = IC<sub>50</sub> Plumbagina (18,4 μM); Associação 1 (A1) = IC<sub>25</sub> DX + ½ IC<sub>50</sub> PLB; Associação 2 (A2) = IC<sub>25</sub> DX + IC<sub>50</sub> PLB. Análise realizada por 2<sup>-ΔΔCt</sup>, sendo significativa a expressão que apresentasse p-valor ≤0,05 (teste T), e log (2) >1 ou <-1.



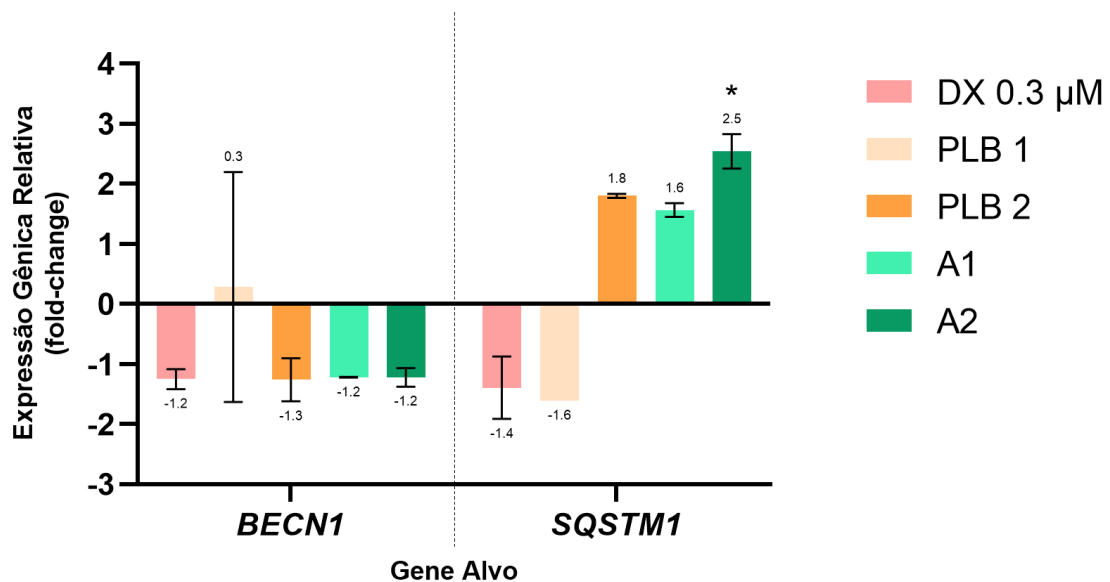
**Figura S7 – Expressão Gênica Relativa de Genes Envolvidos na Vias de Metabolismo (2D) em células HepG2/C3A tratadas por 24h com DOX e PLB. DX = IC<sub>25</sub> Doxorubicina (0,3 μM); PLB 1 = ½ IC<sub>50</sub> Plumbagina (9,2 μM); PLB 2 = IC<sub>50</sub> Plumbagina (18,4 μM); Associação 1 (A1) = IC<sub>25</sub> DX + ½ IC<sub>50</sub> PLB; Associação 2 (A2) = IC<sub>25</sub> DX + IC<sub>50</sub> PLB. Análise realizada por 2<sup>-ΔΔCt</sup>, sendo significativa a expressão que apresentasse p-valor ≤0,05 (teste T), e log (2) >1 ou <-1.**



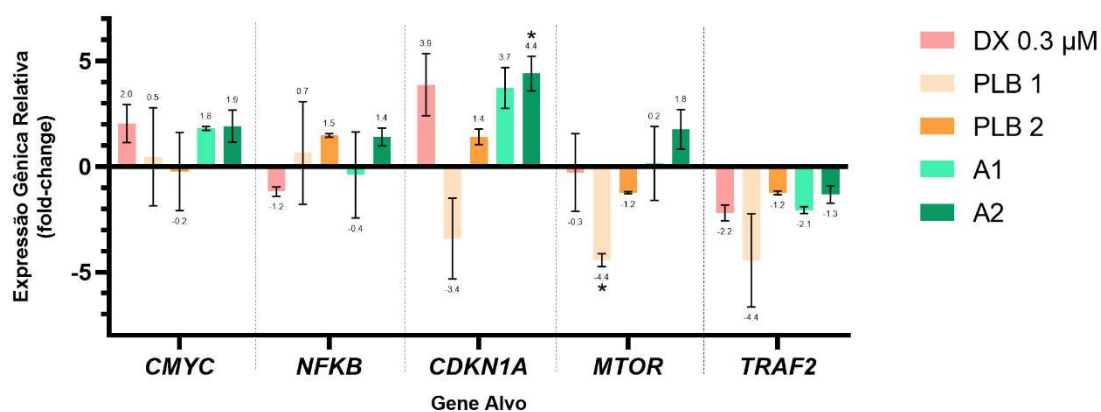
**Figura S8 – Expressão Gênica Relativa de Genes Envolvidos nas Vias de Morte Celular (3D) em células HepG2/C3A tratadas por 24h com DOX e PLB. DX = IC<sub>25</sub> Doxorubicina (0,3 μM); PLB 1 = ½ IC<sub>50</sub> Plumbagina (9,2 μM); PLB 2 = IC<sub>50</sub> Plumbagina (18,4 μM); Associação 1 (A1) = IC<sub>25</sub> DX + ½ IC<sub>50</sub> PLB; Associação 2 (A2) = IC<sub>25</sub> DX + IC<sub>50</sub> PLB. Análise realizada por 2<sup>-ΔΔCt</sup>, sendo significativa a expressão que apresentasse p-valor ≤0,05 (teste T), e log (2) >1 ou <-1.**



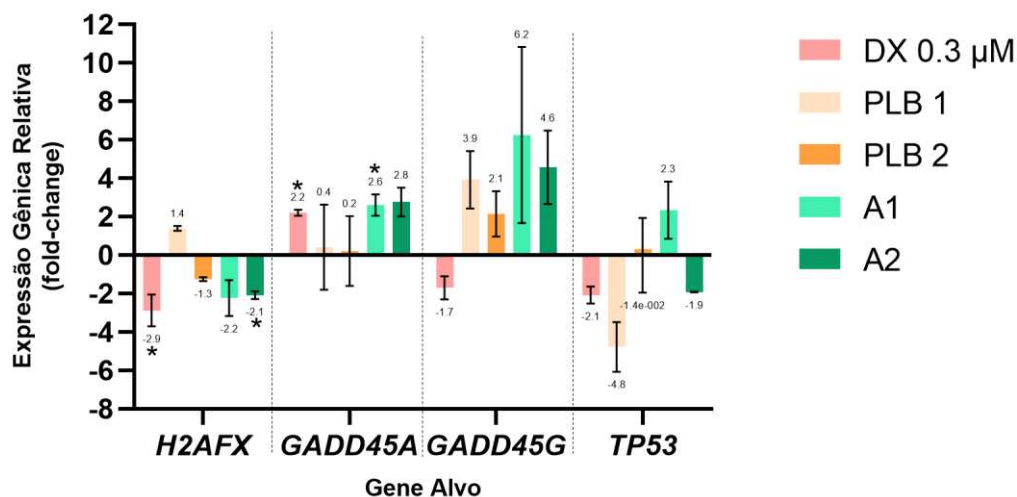
**Figura S9 – Expressão Gênica Relativa de Genes Envolvidos nas Vias Autofágicas (3D) em células HepG2/C3A tratadas por 24h com DOX e PLB.** DX = IC<sub>25</sub> Doxorubicina (0,3 μM); PLB 1 = ½ IC<sub>50</sub> Plumbagina (9,2 μM); PLB 2 = IC<sub>50</sub> Plumbagina (18,4 μM); Associação 1 (A1) = IC<sub>25</sub> DX + ½ IC<sub>50</sub> PLB; Associação 2 (A2) = IC<sub>25</sub> DX + IC<sub>50</sub> PLB. Análise realizada por 2<sup>-ΔΔCt</sup>, sendo significativa a expressão que apresentasse p-valor ≤0,05 (teste T), e log (2) >1 ou <-1.



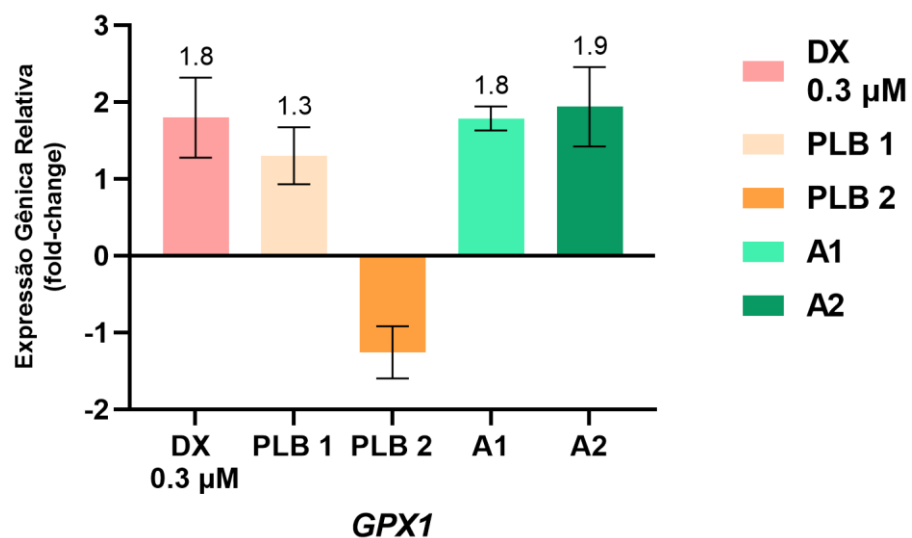
**Figura S10 – Expressão Gênica Relativa de Genes Envolvidos nas Vias de Regulação do Ciclo Celular (3D) em células HepG2/C3A tratadas por 24h com DOX e PLB. DX = IC<sub>25</sub> Doxorubicina (0,3 μM); PLB 1 = ½ IC<sub>50</sub> Plumbagina (9,2 μM); PLB 2 = IC<sub>50</sub> Plumbagina (18,4 μM); Associação 1 (A1) = IC<sub>25</sub> DX + ½ IC<sub>50</sub> PLB; Associação 2 (A2) = IC<sub>25</sub> DX + IC<sub>50</sub> PLB. Análise realizada por 2<sup>-ΔΔCt</sup>, sendo significativa a expressão que apresentasse p-valor ≤0,05 (teste T), e log (2) >1 ou <-1.**



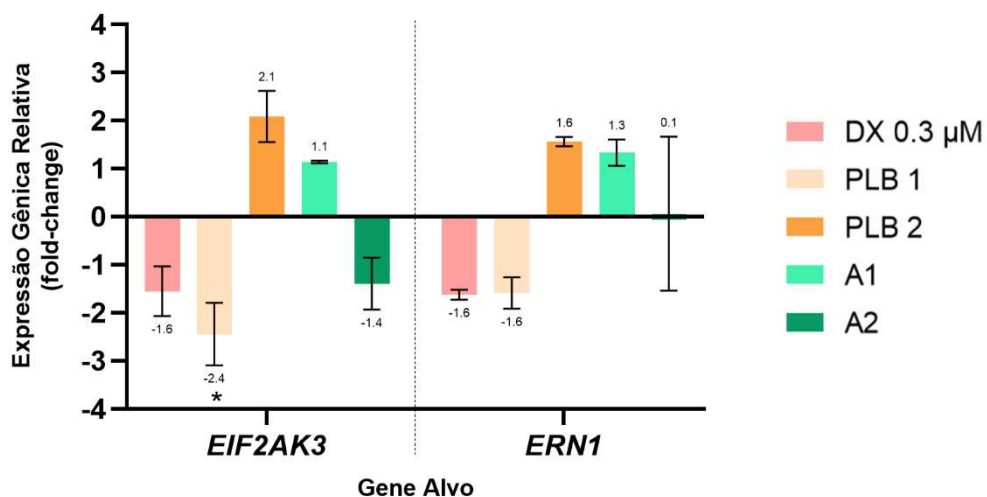
**Figura S11 – Expressão Gênica Relativa de Genes Envolvidos nas Vias de Reparo do DNA (3D) em células HepG2/C3A tratadas por 24h com DOX e PLB. DX = IC<sub>25</sub> Doxorubicina (0,3 μM); PLB 1 = ½ IC<sub>50</sub> Plumbagina (9,2 μM); PLB 2 = IC<sub>50</sub> Plumbagina (18,4 μM); Associação 1 (A1) = IC<sub>25</sub> DX + ½ IC<sub>50</sub> PLB; Associação 2 (A2) = IC<sub>25</sub> DX + IC<sub>50</sub> PLB. Análise realizada por 2<sup>-ΔΔCt</sup>, sendo significativa a expressão que apresentasse p-valor ≤0,05 (teste T), e log (2) >1 ou <-1.**



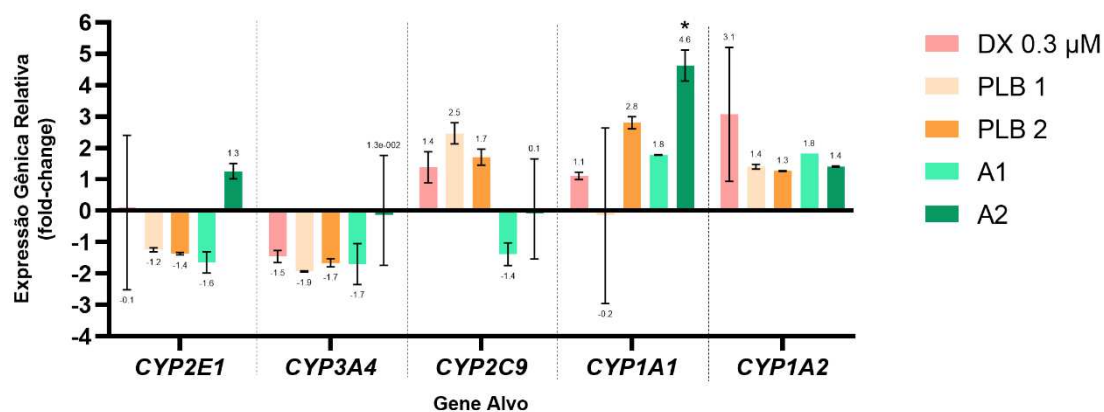
**Figura S12 – Expressão Gênica Relativa do Gene *GPX1* – Estresse Oxidativo (3D) em células HepG2/C3A tratadas por 24h com DOX e PLB. DX = IC<sub>25</sub> Doxorrubicina (0,3  $\mu$ M); PLB 1 =  $\frac{1}{2}$  IC<sub>50</sub> Plumbagina (9,2  $\mu$ M); PLB 2 = IC<sub>50</sub> Plumbagina (18,4  $\mu$ M); Associação 1 (A1) = IC<sub>25</sub> DX +  $\frac{1}{2}$  IC<sub>50</sub> PLB; Associação 2 (A2) = IC<sub>25</sub> DX + IC<sub>50</sub> PLB. Análise realizada por  $2^{-\Delta\Delta Ct}$ , sendo significativa a expressão que apresentasse p-valor  $\leq 0,05$  (teste T), e  $\log(2) > 1$  ou  $< -1$ .**



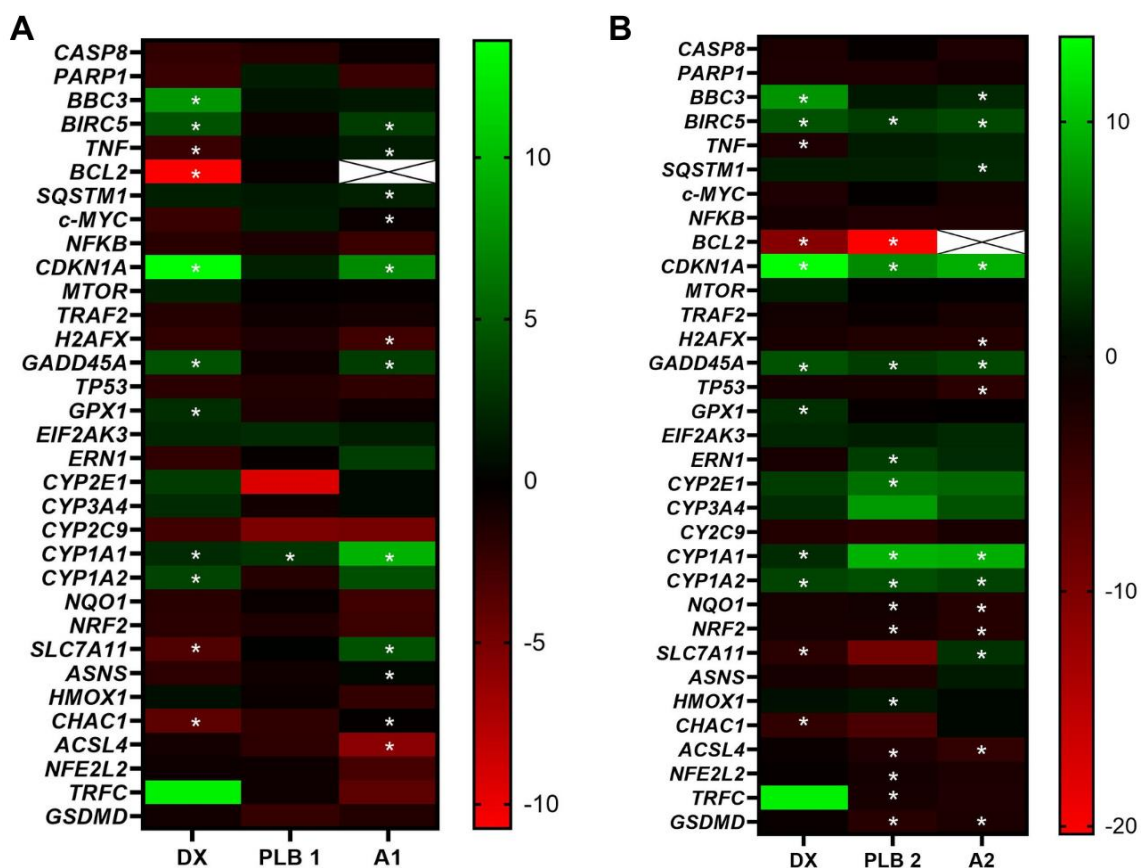
**Figura S13 – Expressão Gênica Relativa de Genes Envolvidos na Via de Estresse no Retículo Endoplasmático (3D) em células HepG2/C3A tratadas por 24h com DOX e PLB. DX = IC<sub>25</sub> Doxorubicina (0,3 μM); PLB 1 = ½ IC<sub>50</sub> Plumbagina (9,2 μM); PLB 2 = IC<sub>50</sub> Plumbagina (18,4 μM); Associação 1 (A1) = IC<sub>25</sub> DX + ½ IC<sub>50</sub> PLB; Associação 2 (A2) = IC<sub>25</sub> DX + IC<sub>50</sub> PLB. Análise realizada por 2<sup>-ΔΔCt</sup>, sendo significativa a expressão que apresentasse p-valor ≤0,05 (teste T), e log (2) >1 ou <-1.**



**Figura S14 – Expressão Gênica Relativa de Genes Envolvidos na Vias de Metabolismo (3D) em células HepG2/C3A tratadas por 24h com DOX e PLB** DX = IC<sub>25</sub> Doxorubicina (0,3 μM); PLB 1 = ½ IC<sub>50</sub> Plumbagina (9,2 μM); PLB 2 = IC<sub>50</sub> Plumbagina (18,4 μM); Associação 1 (A1) = IC<sub>25</sub> DX + ½ IC<sub>50</sub> PLB; Associação 2 (A2) = IC<sub>25</sub> DX + IC<sub>50</sub> PLB. Análise realizada por 2<sup>-ΔΔCt</sup>, sendo significativa a expressão que apresentasse p-valor ≤0,05 (teste T), e log (2) >1 ou <-1.



**Figura S15 – Expressão Gênica Relativa (2D) em HepG2/C3A após 24h de tratamento. (A)** Dados referentes à associação 1 (A1) com DX 0,3  $\mu$ M e PLB 1. **(B)** Dados referente à associação 2 (A2) com DX 0,3  $\mu$ M e PLB 2. DX = IC<sub>25</sub> Doxorubicina (0,3  $\mu$ M); PLB 1 =  $\frac{1}{2}$  IC<sub>50</sub> Plumbagina (9,2  $\mu$ M); PLB 2 = IC<sub>50</sub> Plumbagina (18,4  $\mu$ M); Associação 1 (A1) = IC<sub>25</sub> DX +  $\frac{1}{2}$  IC<sub>50</sub> PLB; Associação 2 (A2) = IC<sub>25</sub> DX + IC<sub>50</sub> PLB. Análise realizada por  $2^{-\Delta\Delta Ct}$ , sendo significativa a expressão que apresentasse p-valor  $\leq 0,05$  (teste T), e  $\log(2) > 1$  ou  $< -1$



**Figura S16 – Expressão Gênica Relativa (3D) em HepG2/C3A após 24h de tratamento. (A)** Dados referentes à associação 1 (A1) com DX 0,3  $\mu$ M e PLB 1. **(B)** Dados referente à associação 2 (A2) com DX 0,3  $\mu$ M e PLB 2. DX = IC<sub>25</sub> Doxorubicina (0,3  $\mu$ M); PLB 1 =  $\frac{1}{2}$  IC<sub>50</sub> Plumbagina (9,2  $\mu$ M); PLB 2 = IC<sub>50</sub> Plumbagina (18,4  $\mu$ M); Associação 1 (A1) = IC<sub>25</sub> DX +  $\frac{1}{2}$  IC<sub>50</sub> PLB; Associação 2 (A2) = IC<sub>25</sub> DX + IC<sub>50</sub> PLB. Análise realizada por  $2^{-\Delta\Delta C_t}$ , sendo significativa a expressão que apresentasse p-valor  $\leq 0,05$  (teste T), e  $\log(2) > 1$  ou  $< -1$

