



UNIVERSIDADE FEDERAL DA PARAÍBA
CENTRO DE BIOTECNOLOGIA
PROGRAMA DE PÓS GRADUAÇÃO EM
BIOTECNOLOGIA



**DERIVADO DO CARVACROL COM PROPRIEDADES
ANTITUMORAIS VIA MODULAÇÃO DE CANAIS DE SÓDIO
DEPENDENTES DE VOLTAGEM.**

ALINY PEREIRA DE VASCONCELOS

JOÃO PESSOA

2023

ALINY PEREIRA DE VASCONCELOS

**DERIVADO DO CARVACROL COM PROPRIEDADES
ANTITUMORAIS VIA MODULAÇÃO DE CANAIS DE SÓDIO
DEPENDENTES DE VOLTAGEM.**

Tese submetida ao Programa de Pós
Graduação em Biotecnologia, da Rede
Nordeste de Biotecnologia, do Centro de
Biotecnologia da Universidade Federal
da Paraíba, para obtenção do grau de Doutora.

Orientador

Dr. Demetrius Antonio Machado de Araújo

Coorientador (a)

Dr^a Bruna Braga Dantas

JOÃO PESSOA

2023

**Catálogo na publicação Seção de
Catálogo e Classificação**

V331d Vasconcelos, Aliny Pereira de.

Derivado do carvacrol com propriedades antitumorais via modulação de canais de sódio dependentes de voltagem / Aliny Pereira de Vasconcelos. - João Pessoa, 2023.

100 f. : il.

Orientação: Demetrius Antonio Machado de Araújo. Coorientação: Bruna Braga Dantas.

Tese (Doutorado) - UFPB/CBiotec.

UFPB/B

CDU 60(043)



Coordenação Ponto Focal do Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia
Universidade Federal da Paraíba
Centro de Biotecnologia
Cidade Universitária, Campus I. CEP:58051-900, João Pessoa, PB.
Telefone : (83) 3216.7173 E-mails: secrenorbio@cbiotec.ufpb.br
Homepage: <http://www.renorbio.org>

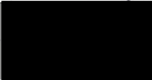
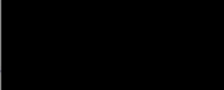
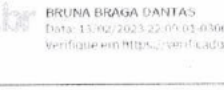


FOLHA DE APROVAÇÃO – DEFESA DE TESE

ALUNA: ALINY PEREIRA DE VASCONCELOS

TÍTULO DO PROJETO: “DERIVADO DO CARVACROL COM PROPRIEDADES ANTITUMORAIS VIA MODULAÇÃO DE CANAIS DE SÓDIO DEPENDENTES DE VOTAGEM”.

PROFESSOR ORIENTADOR: Prof. Dr. Demetrius Antonio Machado de Araújo

	CONCEITO	ASSINATURA
BANCA EXAMINADORA:		
Prof. Dr. Demetrius Antonio Machado de Araújo (Orientador/Presidente)	<u>APROVADA</u>	
Prof. Dr. Júlio Santos Rebouças (Examinador interno)	<u>APROVADA</u>	
Prof. Dr. Samuel Paulo Cibulski (Examinador externo)	<u>Aprovada</u>	
Profa. Dra. Bruna Braga Dantas (Coorientadora)	<u>APROVADA</u>	
Profa. Dr ^a Gardênia Carmem Gadelha Militão (Examiadora externa a UFPB)	<u>APROVADA</u>	
Prof. Dr. Enéas Ricardo de Moraes Gomes (Examinador interno)	<u>APROVADO</u>	

LOCAL: Sala Virtual Plataforma Google Meet
DATA DA APROVAÇÃO: 09 de fevereiro de 2023
HORÁRIO: 14h00min.



Documento assinado digitalmente
GARDENIA CARMEN GADELHA MILITAO
Data: 10/02/2023 10:53:51-0300
Verifique em <https://verificador.ufpb.br>

*Dedico este trabalho aos meus pais Ana e Paulo,
ao meu irmão Bruno e a minha filha Julie.*

Agradecimentos

A minha gratidão a...

Deus pela dádiva da vida, que me possibilita acordar todos os dias e viver!

A minha família por sempre ter me apoiado ao longo dessa jornada.

A Universidade Federal da Paraíba - UFPB, a Rede Nordeste de Biotecnologia (RENORBIO) e as agências de fomento CAPES e CNPq, que tornaram este trabalho possível.

Ao programa CAPES/PRINT que tornou possível o sonho de conhecer outro país e vivenciar a rotina de pesquisa no Canadá. Meus especiais agradecimentos ao Professor Dr Júlio Rebouças por toda paciência e dedicação como coordenador do programa, sou sua fã.

Aos meus amigos Lucas Lima e Matheus Fabião (UofM), companheiros de todas as horas, O 21 foi minha segunda casa.

Ao meu sempre Professor/Orientador Dr. Demétrius Araújo que me ensinou a amar a pesquisa (talvez até demais)! Que dádiva ter te conhecido.

A minha coorientadora/amiga Dra Bruna Braga Dantas, foram muitos os momentos juntas, muito trabalho, cafés (ela não toma, mas come) e risadas. Obrigada por ter me acolhido.

Ao Dr Samuel Cibulski, com você eu aprendi que pra tudo se tem um jeito. A sua positividade e animação para trabalhar contagia a todos a sua volta.

Ao Professor Enéas que com suas perguntas me ensinou a organizar melhor as ideias antes de executá-las.

Ao Professor Cláudio e o pessoal do Laboratório de Síntese e Química Medicinal que tornaram esse trabalho possível por meio dos derivados do carvacrol.

Ao trio da microbiologia (Adrielly, Renata e Ubiratan), vocês são como uma família pra mim, sentirei muitas saudades de vocês e das bactérias voadoras. Quantas madrugadas de experimentos passamos, e apesar do cansaço tudo terminava em bons resultados e claro! pizza na maioria das vezes.

A todos os membros do LBCM, foram muitas pessoas especiais que eu tive o privilégio de conhecer ao longo desses anos (desde a iniciação científica). A frase “Escolha um trabalho que você ame e não terá que trabalhar um único dia em sua vida”, traduz o meu sentimento diário ao acordar e ir para o lab. Quanta honra ter feito parte desse laboratório!

Sou muito grata as muitas experiências que pude vivenciar ao longo desses anos, muitas delas desafiadoras, mas que me fizeram crescer e me tornar a Aliny que sou hoje.

Resumo

Na patologia do câncer os canais iônicos desempenham um papel importante nos processos de regulação da proliferação, iniciação e progressão tumoral. Cânceres com alta expressão de canais de sódio dependentes de voltagem tendem a ter uma maior capacidade metastática, a exemplo dos neuroblastomas. Os produtos naturais, derivados de plantas, têm se destacado no ramo da química medicinal, com relação às suas propriedades medicinais intrínsecas. A exemplo do carvacrol que além de modular canais iônicos possui atividade antitumoral. Assim, inspirado no produto natural carvacrol para a síntese de seus derivados, este estudo propôs investigar o potencial antitumoral de derivados semissintéticos do carvacrol com atividade sobre os canais de sódio dependentes de voltagem subtipo 1.7 (Nav1.7). Para isso foi avaliado o efeito de doze compostos Derivados do Carvacrol (DC) por meio da técnica de *Patch Clamp*, sendo realizadas medições de corrente de Nav1.7 (INav1.7) em células CHO-hNav1.7. Destacando-se o composto DC6 com melhor efeito, apresentando CI_{50} de 39,26 μM para o bloqueio de Nav1.7. A toxicidade do DC6 foi avaliada em náuplios de *Artemia salinas* e a avaliação toxicológica comportamental foi realizada em camundongos *Swiss* por meio do teste de Irwin, o composto apresentou baixa toxicidade em ambos os modelos experimentais. O efeito citotóxico do DC6 foi avaliado pelo método de redução do MTT nas linhagens de neuroblastoma, SH-SY5Y, Neuro-2A, IMR-32 e SH-EP, apresentando valores de CI_{50} para os tempos de 24 h de 23,36 μM , 26,29 μM , 0,35 μM e 50 μM respectivamente. Nas linhagens não tumorais HUVEC e L929 a CI_{50} do composto foi maior que 100 μM em ambos os tipos celulares. Em concentrações sub-tóxicas o DC6 apresentou atividade antiproliferativa em neuroblastomas. O ensaio de migração celular foi realizado a fim de verificar o efeito do composto DC6 sobre a motilidade de células SH-SY5Y, em que a taxa de migração celular foi reduzida no tempo de 48 h. A fim de correlacionar o bloqueio de Nav1.7 com a redução da migração celular apresentada pelo DC6, avaliou-se a migração em células CHO-hNav1.7 na presença do DC6 e de 300 nM de Tetrodotoxina (TTX). A taxa de migração celular após 72h de incubação com 300 nM de TTX foi de 42,79% e para 8 μM do DC6 foi de 34,59%. Indicando que a redução na migração celular observada com o tratamento do DC6 ocorre majoritariamente via bloqueio de Nav1.7. Para avaliação do mecanismo de morte celular foi realizado o teste de indução da apoptose por citometria de fluxo em neuroblastomas, em que o DC6 promoveu a indução da morte celular de forma concentração dependente, via apoptose tardia e necrose. A análise morfológica por microscopia de fluorescência foi realizada na linhagem SH-SY5Y e após 24 h de incubação com o DC6 observou-se uma expressiva desorganização dos filamentos do citoesqueleto, mais especificamente dos filamentos de actina, apresentando um efeito dependente de concentração do DC6. Em modelo tridimensional de metástase in vitro, o DC6 inibiu a formação dos esferoides celulares na linhagem de neuroblastoma SH-SY5Y. Assim, foi demonstrado que o DC6 tem um efeito duplo tratando-se de modulação tumoral, por apresentar em concentrações sub-tóxicas, a capacidade de induzir morte celular e reduzir a migração das células tumorais via modulação de Nav1.7, bem como apresentando baixa toxicidade em modelos não cancerígenos in vivo e in vitro.

Palavras-chave: Neuroblastomas, derivados do carvacrol, canais de sódio dependentes de voltagem, Nav1.7, migração celular.

Abstract

In cancer pathology, ion channels play an important role in the regulation of cell proliferation, tumor initiation, and progression. Cancers with high expression levels of functional voltage-gated ion channels tend to have a higher metastatic capacity, like neuroblastomas. Natural products, plant derivatives, have stood out in the field of medicinal chemistry because of their intrinsic medicinal properties. An example is carvacrol which, in addition to modular ion channels, has antitumor activity. The natural product carvacrol was used as a base for the drug design of the semi-synthetic carvacrol derivatives compounds. This study proposed to investigate the anticancer potential of carvacrol derivatives, which has previously shown an inhibition effect on voltage-gated sodium channels subtype 1.7 (Nav1.7). The effect of the twelve compounds Derivatives of Carvacrol (DC) was evaluated through the Patch Clamp technique in which Nav1.7 currents ($I_{Nav1.7}$) were obtained in CHO-hNav1.7 cells. Derivative of Carvacrol 6 (DC6) with better effect, presenting IC_{50} of 39.26 μ M for blocking Nav1.7. The toxicity of DC6 was evaluated in nauplii of *Artemia Salinas*, and the behavioral toxicological evaluation was performed in Swiss mice using the Irwin test, the compound has shown low toxicity in both experimental models. The cytotoxic effect of DC6 was evaluated by the MTT reduction method in the neuroblastoma cell lines, SH-SY5Y, Neuro-2A, IMR-32M, and SH-EP, presenting IC_{50} values for the 24 h times of 23.36 μ M, 26.29 μ M, 0.35 μ M, and 50 μ M respectively. In normal cell lines, HUVEC and L929 the IC_{50} of the compound were higher than 100 μ M in both cell types. In sub-toxic concentrations, DC6 presented antiproliferative activity in neuroblastomas. Cell migration assay was performed to verify the effect of DC6 on SH-SY5Y cell motility, in which the cell migration rate was reduced within 48 h. To understand the correlation between Nav1.7 blockade and the reduction of cell migration presented by DC6, migration in CHO-hNav1.7 cells was evaluated in the presence of DC6 and 300 nM of tetrodotoxin (TTX). The cell migration rate after 72h of incubation with 300 nM of TTX was 42.79% and for 8 μ M of DC6, it was 34.59%. Suggesting that the decrease in cell migration observed with DC6 treatment occurs mainly via Nav1.7 blockade. To evaluate the mechanism of cell death, the induction of apoptosis test by flow cytometry in neuroblastomas was performed, in which DC6 promoted the induction of cell death in a concentration-dependent manner, via late apoptosis and necrosis. Morphological analysis by fluorescence microscopy was performed on the SH-SY5Y cell line, and after 24 h of incubation with DC6, expressive disorganization of the cytoskeletal filaments was observed, more specifically of the actin filaments, showing an effect dependent on the concentration of DC6. In a three-dimensional model of in vitro metastasis, DC6 inhibited the formation of cellular spheroids in the neuroblastoma cell line SH-SY5Y. Thus it has been shown that DC6 has a double effect when it comes to tumor modulation, as it presents, in sub-toxic concentrations, the ability to induce cell death and reduce the migration of tumor cells via Nav1.7 modulation, as well as showing low toxicity in non-carcinogenic in vivo and in vitro models.

Keywords: Neuroblastomas, carvacrol derivatives, voltage-gated sodium channels, Nav1.7, cellular migration.

Lista de figuras

Figura 1: Marcadores tumorais. Fonte: Adaptado de HANAHAN e WEINBERG, 2011.....	19
Figura 2: Desenvolvimento de neuroblastoma a partir da crista neural. Fonte: Adaptado de (JOHNSEN; DYBERG; WICKSTRÖM, 2019).....	22
Figura 3: Cascata metastática. Fonte: Adaptado de (ONKAL; DJAMGOZ, 2009).....	27
Figura 4: Esquema ilustrativo da estrutura do canal de sódio dependente de voltagem. Fonte: Adaptado de (FRASER et al., 2014).....	28
Figura 5: Retroalimentação positiva de Nav1.7 em células tumorais. Fonte: (FRASER et al., 2014) (LUO et al., 2020).....	30
Figura 6: Estrutura química dos compostos semissintéticos Derivados do Carvacrol.....	36
Figura 7: <i>Setup</i> de eletrofisiologia celular – <i>Patch Clamp</i> do laboratório de biotecnologia celular e molecular (LBCM).....	44
Figura 8: Técnica de <i>patch clamp</i> modo <i>whole-cell voltage clamp</i> , adaptado de Cell Physiology Source Book, 2012.....	46
Figura 9: Protocolo experimental técnica de <i>patch clamp</i> modo <i>whole-cell voltage clamp</i>	46
Figura 10: Efeito de Derivados do Carvacrol DC1, DC2, DC3, DC4, DC5, DC6, DC7, DC8, DC9, DC10, DC11, DC12 100 μ M (A-M) e Carvacrol 300 μ M (N) na amplitude de correntes de sódio subtipo 1.7.....	57
Figura 11: Avaliação da dependência de concentração dos Derivados do Carvacrol sobre a inibição de correntes de Nav1.7 com os respectivos valores de CI_{50} para o DC6, DC7, DC8 e DC9.....	60
Figura 12: Registros representativos de correntes de sódio subtipo 1.7 (pA) nas situações controle e após perfusão com os derivados do carvacrol DC6, DC7, DC8 e DC9 (A-D) ao lado das respectivas estruturas químicas.....	61
Figura 13: CI_{50} derivado do carvacrol 6 em células CHO-hNav1.7.....	62

Figura 14: Decurso temporal de inibição de correntes de Nav1.7. A) DC6 40 μ M B) Carvacrol 300 μ M.....	62
Figura 15: Efeito de Derivados do Carvacrol 6, 7, 8 e 9 na mortalidade de <i>Artemia salina</i> , após 24h de incubação com os compostos.....	64
Figura 16: Citotoxicidade do DC6 em linhagens celulares de neuroblastomas SH-SY5Y e Neuro-2A.....	67
Figura 17: Citotoxicidade da Doxorrubicina na linhagem SH-SY5Y, avaliada pelo método de MTT, após 24h de tratamento.....	68
Figura 18: Efeito do DC6 na proliferação de células SH-SY5Y.....	71
Figura 19: Imagens representativas do ensaio de migração de células SH-SY5Y, nos tempos 0 h e 48 h, na situação controle e após incubação com 2 μ M, 4 μ M e 8 μ M do DC6.....	74
Figura 20: Efeito do DC6 na migração de células SH-SY5Y no tempo de 48 h. Os dados estão representados como média $\pm$ DP, n = 3. * #p < 0,0001.....	75
Figura 21: A) Imagens representativas do ensaio de migração em células CHO-Nav1.7, nos tempos 0 h e 72 h, na situação controle e após incubação com 300 nM de TTX e 8 μ M do DC6.....	76
Figura 22: Efeito do DC6 na migração de células CHO-Nav1.7 no tempo de 72 h, na situação controle e após incubação com 300 nM de TTX e 8 μ M do DC6. Os dados estão representados como média $\pm$ DP, n = 3. * #p < 0,0001.....	77
Figura 23: A) Imagens representativas do ensaio de migração em células SH-SY5Y, nos tempos 0 h e 48 h, nas situações controle, após incubação com 8 μ M do DC6, 200 μ M de Lidocaína e a combinação de ambos.....	79
Figura 24: Efeito do DC6 na migração de células SH-SY5Y, nos tempos 0 h e 48 h, nas situações controle, após incubação com 8 μ M do DC6, 200 μ M de Lidocaína e a combinação de ambos.....	80
Figura 25: Indução de apoptose quantificada por citometria de fluxo na linhagem SH-SY5Y após 24 h de incubação com o DC6 (6,25; 12,5 e 25 μ M) ou com Doxorrubicina (0,6 μ M).....	83

Figura 26: Análise morfológica de célula SH-SY5Y incubada com DC6 nas concentrações de 6,25µM, 12,5µM e 25µM.....85

Figura 27: A) Imagem representativa de esferoides tumorais da linhagem de neuroblastoma SH-SY5Y na situação controle e DC6 25 µM nos tempos de 0 h, 24 h e 48 h. B) Porcentagem de migração relativa dos esferoides na situação controle e DC6.87

Lista de tabelas

Tabela 1: Sistema de Estadiamento Internacional para Neuroblastoma (LUCENA et al., 2018).....	23
Tabela 2: Linhagens celulares utilizadas e especificações de cultivo.....	41
Tabela 3: Solução Externa para medição de correntes de sódio subtipo 1.7 em células CHO-hNav1.7.....	45
Tabela 4: Solução Interna para medição de correntes de sódio subtipo 1.7 em células CHO-hNav1.7.....	45
Tabela 5: Parâmetros avaliados na triagem psicofarmacológica.....	52
Tabela 6: Efeito de Derivados do Carvacrol (DC) 100 μ M e do Carvacrol 300 μ M sobre a inibição de correntes de sódio subtipo 1.7. O delta de inibição de corrente foi calculado por INav1.7 controle - INav1.7 para cada composto testado.....	59
Tabela 7: Valores de CI_{50} para citotoxicidade do DC6 nas linhagens celulares testadas pelo método de MTT, após 24h e 72h de tratamento. Os dados estão representados como média $\pm$ EPM de três experimentos independentes.....	66
Tabela 8: Triagem farmacológica experimental com o derivado do carvacrol 6 por meio do teste de Irwin.....	89

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	16
2	REFERENCIAL TEÓRICO	18
2.1	CÂNCER	18
2.2	CARCINOGENESE	18
2.3	NEUROBLASTOMAS	20
2.3.1	<i>Origem dos neuroblastomas</i>	<i>20</i>
2.3.2	<i>Classificação dos neuroblastomas</i>	<i>22</i>
2.3.3	<i>Tratamento para neuroblastomas.....</i>	<i>24</i>
2.3.4	<i>Neuroblastoma e canais iônicos.....</i>	<i>24</i>
2.4	MORTE CELULAR	25
2.5	ENVOLVIMENTO DOS CANAIS DE SÓDIO DEPENDENTES DE VOLTAGEM NA METÁSTASE. 26	
2.6	DESENVOLVIMENTO DE NOVAS DROGAS	31
2.7	CARVACROL E SEUS DERIVADOS CANDIDATOS A FÁRMACOS	31
3	OBJETIVOS.....	33
4	MATERIAIS E MÉTODOS	34
4.1	COMPOSTOS.....	34
4.1.1	<i>Derivados do carvacrol.....</i>	<i>34</i>
4.1.2	<i>Carvacrol</i>	<i>35</i>
4.1.3	<i>Doxorrubicina</i>	<i>35</i>
4.1.4	<i>Tetrodotoxina</i>	<i>35</i>
4.1.5	<i>Lidocaína.....</i>	<i>35</i>
4.2	MODELOS BIOLÓGICOS EXPERIMENTAIS	40
4.2.1	<i>Linhagens Celulares Imortalizadas.....</i>	<i>40</i>
4.3	MÉTODOS EXPERIMENTAIS	42
4.3.1	<i>Técnica de Patch Clamp modo whole-cell.....</i>	<i>42</i>
4.3.2	<i>Avaliação da atividade citotóxica dos derivados do carvacrol pelo método de redução do sal de tetrazólio (MTT)</i>	<i>47</i>
4.3.3	<i>Ensaio de proliferação celular</i>	<i>48</i>

4.3.4	<i>Ensaio de migração celular</i>	48
4.3.5	<i>Formação de esferoides tumorais</i>	49
4.3.6	<i>Análise da indução de apoptose por citometria de fluxo</i>	49
4.3.7	<i>Análise morfológica em célula única por microscopia de fluorescência</i>	50
4.3.8	<i>Toxicidade do DC6 em náuplios de Artemia salina</i>	51
4.3.9	<i>Teste de Irwin</i>	51
4.4	ANÁLISE DE DADOS	53
5	RESULTADOS E DISCUSSÃO	54
5.1	EFEITO DE DERIVADOS DO CARVACROL SOBRE CORRENTES DE NAV1.7.	54
5.2	ANÁLISE TOXICOLÓGICA.	62
5.3	DETERMINAÇÃO DA CITOTOXICIDADE DO DERIVADO DO CARVACROL 6.	64
5.3.1	<i>Efeito citotóxico do DC6 em células tumorais</i>	64
5.3.2	<i>Efeito citotóxico da Doxorubicina em neuroblastomas</i>	68
5.3.3	<i>Efeito citotóxico do DC6 em células não tumorais</i>	69
5.4	EFEITO DO DC6 NA PROLIFERAÇÃO CELULAR DE NEUROBLASTOMAS	70
5.5	AVALIAÇÃO DO EFEITO DO DC6 NA MIGRAÇÃO CELULAR	72
5.5.1	<i>Efeito do DC6 na migração celular</i>	72
5.5.2	<i>Efeito da Lidocaína na migração de células SH-SY5Y</i>	78
5.6	ANÁLISE DA INDUÇÃO DE APOPTOSE	81
5.7	ANÁLISE MORFOLÓGICA EM CÉLULA ÚNICA POR MICROSCOPIA DE FLUORESCÊNCIA.	84
5.8	EFEITO DO DC6 EM ESFEROIDES CELULARES DE NEUROBLASTOMAS (CULTURA 3D)	86
5.9	TESTE DE IRWIN	88
6	CONCLUSÕES	90
7	PERSPECTIVAS	91
8	REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	92
9	APÊNDICES	99
9.1	APÊNDICE 1	99
9.2	APÊNDICE 2	100
9.3	APÊNDICE 3	101

1 INTRODUÇÃO

A farmacoterapia disponível para uso clínico na terapia contra o câncer ainda é muito limitada. Principalmente por se tratar de fármacos com baixa seletividade, atuando potencialmente em células cancerosas, mas com elevada citotoxicidade para células saudáveis. Como resultante disso, tem-se os vastos efeitos colaterais inerentes ao tratamento, comprometendo a qualidade de vida dos pacientes submetidos ao tratamento com quimioterápicos. A busca por quimioterapias mais eficazes e seletivas para o tratamento do câncer motiva pesquisadores e têm despertado o interesse comercial da indústria farmacêutica nos últimos anos.

Tratando-se de uma coleção altamente diversa de mais de 200 doenças, o câncer pode ser encontrado em quase todos os tipos celulares que compartilham de pelo menos uma semelhança, a desregulação do crescimento celular levando à proliferação anormal de células (STOLETOV; BEATTY; LEWIS, 2020).

O neuroblastoma é um tumor neuroendócrino pediátrico que surge de forma persistente de progenitores da crista neural durante o desenvolvimento do sistema nervoso simpático, correspondendo a cerca de 15% de todos os cânceres relacionados a morte na infância (FLETCHER et al., 2018) (ALMSTEDT et al., 2020). Possui um curso clínico heterogêneo em que a doença pode apresentar-se de forma localizada ou com regressão espontânea, sendo o único entre os cânceres humanos com propensão a sofrer regressão espontânea (AYGUN, 2018). Porém em mais de 50% dos pacientes, os neuroblastomas ocorrem de forma amplamente metastática, criando uma dificuldade adicional ao tratamento (QIU; MATTHAY, 2022).

Na patologia do câncer, os canais iônicos desempenham um papel importante nos processos de regulação da proliferação, bem como na iniciação e progressão tumoral (RAO et al., 2015). O aumento da expressão de canais de sódio dependentes de voltagem (Navs) funcionais está diretamente relacionado a progressão de metástases. No caso dos neuroblastomas o canal de sódio dependente de voltagem subtipo 1.7 (Nav1.7) é um dos mais expressos seguido pelo canal de sódio dependente de voltagem subtipo 1.3, ambos sensíveis a tetrodotoxina (TTX-S) (VETTER et al., 2012).

Os canais de sódio dependentes de voltagem (Nav) destacam-se como um alvo importante para a terapia anticâncer, proporcionando a possibilidade do uso de terapias direcionadas, por meio de drogas bloqueadoras de Nav com potencial antimetastático (DJAMGOZ; FRASER; BRACKENBURY, 2019).

O monoterpeno carvacrol, 2-metil-5-(propano-2-il)fenol, é um composto orgânico encontrado em óleos essenciais de muitas plantas com atividade anticâncer já descrita na literatura (FAN et al., 2015) (KHAN et al., 2018) (MARI et al., 2021), atuando também como bloqueador de canais de sódio dependentes de voltagem (JOCA et al., 2015a), servindo de molécula base para a síntese de novos candidatos à fármacos.

Assim, este estudo propôs avaliar a atividade antitumoral de derivados do carvacrol à base de aduto de Morita-Baylis-Hillman por meio da modulação de canais de sódio dependentes de voltagem 1.7 em neuroblastomas.

2 REFERENCIAL TEÓRICO

2.1 Câncer

O câncer aflige seres vivos multicelulares a mais de 200 milhões de anos, e há evidências da sua presença entre os ancestrais dos humanos modernos a mais de um milhão de anos atrás (CHENE et al., 2016) (HAUSMAN, 2019). Caracterizado como uma doença na qual as células de um tecido específico não respondem mais totalmente aos sinais que regulam a diferenciação, proliferação e morte celular. Como resultado, essas células acumulam-se no tecido, causando danos e inflamação locais (HANAHAN; WEINBERG, 2011) (PHAN; CROUCHER, 2020).

De acordo com a Organização Mundial da Saúde (OMS), estima-se que o número de novos casos de câncer atinja a marca dos 28,9 milhões em 2025. Sendo essa doença responsável por cerca de 10 milhões de mortes por ano em todo o mundo. No Brasil, a estimativa para cada ano do triênio 2023-2025 aponta que ocorrerão 704 mil casos novos de câncer (INCA, 2022).

Em 2019, 416.500 crianças de 0 a 14 anos morreram de câncer em todo o mundo. Cerca de 80% das crianças com câncer que vivem em países de alta renda tendem a sobreviver 5 anos a mais após o diagnóstico, em comparação com aproximadamente 40% em países de média e baixa renda (KATTNER et al., 2019a). No Brasil, a estimativa de novos casos de câncer infantil é de 8.460, sendo 4.310 para o sexo masculino e 4.150 para o sexo feminino (2020 - INCA). Em 2019, o número de mortes em crianças em decorrência do câncer foi de 2.554, sendo 1.423 para o sexo masculino e 1.131 para o sexo feminino.

2.2 Carcinogênese

Durante o processo de carcinogênese ocorrem mudanças dinâmicas no genoma por meio de mutações que levam ao ganho de função em oncogenes, enquanto os genes supressores tumorais sofrem perda de função. A carcinogênese é um processo de múltiplas etapas e dentre essas etapas as alterações genéticas impulsionam o processo de transformação de células humanas saudáveis em células cancerosas.

A ampla diversidade de alterações genotípicas que levam ao desenvolvimento de células tumorais se dá por meio de alterações essenciais na fisiologia celular que juntas são capazes de promover o crescimento tumoral maligno, tais como: potencial de replicação ilimitado, autossuficiência à sinais de crescimento, insensibilidade a sinais anticrescimento, instabilidade genômica, evasão a apoptose, reprogramação do metabolismo energético, evasão da resposta imune, angiogênese sustentada e capacidade de invadir locais secundários e causar metástase (figura 1) (HANAHAN; WEINBERG, 2000) (HANAHAN; WEINBERG, 2011) (CURTIUS; WRIGHT; GRAHAM, 2017) (CHEN; VERBEEK; WOLSTENCROFT, 2021)



Figura 1: Marcadores tumorais. Fonte: Adaptado de HANAHAN e WEINBERG, 2011.

2.3 Neuroblastomas

O neuroblastoma é o câncer de origem embrionária mais frequente em crianças especialmente até os 5 anos de idade, representa o segundo tumor sólido mais comum na infância depois dos tumores de sistema nervoso central em todo o mundo (AYGUN, 2018). Pacientes quimioresistentes, ao apresentarem recaídas apresentam uma taxa de sobrevida que dificilmente chega a 40% (PONZONI et al., 2022). Esse tumor embrionário, é considerado um importante desafio aos profissionais de saúde, por estar associado a 15% da mortalidade relacionada à oncologia pediátrica (LUCENA et al., 2018).

2.3.1 Origem dos neuroblastomas

Na figura 2 observa-se o processo de desenvolvimento de neuroblastomas a partir da crista neural. Este processo inicia-se durante a embriogênese, quando as células da crista neural sofrem transição epitelial-mesenquimal (EMT), permitindo que as células se dividam, migrem e se diferenciem em vários tipos de células que contribuem para as estruturas anatômicas do organismo. Este processo é regulado por um conjunto complexo de sinalização externa, ativação de programas transcricionais e eventos epigenéticos. A desregulação dos fatores envolvidos neste processo pode induzir mudanças na especificação celular, migração desregulada e diferenciação celular, dando origem a lesões neoplásicas que podem eventualmente resultar em neuroblastoma. Esses eventos podem ocorrer durante diferentes estágios de maturação da crista neural, sendo o proto-oncogene MYCN, importante para o desenvolvimento do neuroblastoma.

A família de proto-oncogenes MYC (*V-myc avian myelocytomatosis viral oncogene homolog*) incluindo: c-MYC, MYCN e MYCL, situados em cromossomos diferentes e expressos em momentos específicos durante o desenvolvimento, codificam proteínas com domínios funcionais semelhantes, incluindo os domínios transativadores e de ligação ao DNA. A família MYC e sua extensa rede de proteínas são importantes na regulação de processos, como crescimento celular, diferenciação e apoptose. A regulação aberrante do MYC pode levar ao aumento da proliferação

celular e é comumente observada em cânceres (HUANG; WEISS, 2013)(RUIZ-PÉREZ; HENLEY; ARSENIAN-HENRIKSSON, 2017).

Os neuroblastomas são tumores heterogêneos podendo apresentar diferentes anormalidades cromossômicas, tais como: amplificação de MYCN (*V-myc avian myelocytomatosis viral oncogene neuroblastoma derived homolog*), desbalanços envolvendo o cromossomo 17, aneuploidia, entre outras alterações genéticas. A amplificação de MYCN ocorre em cerca de 18-38% dos casos de neuroblastoma (JOHNSEN; DYBERG; WICKSTRÖM, 2019).

A expressão desregulada de MYCN é o impulsionador oncogênico mais poderoso para o desenvolvimento de neuroblastomas, promovendo a indução da proliferação e inibição a apoptose de células da linhagem simpático-adrenal. A quinase de linfoma anaplásico (ALK) e o homeobox pareado 2B (PHOX2B) são mutações germinativas encontradas no neuroblastoma. A sinalização de Rho é crucial para a migração de células da crista neural, controlando a inibição de contato da locomoção entre as células da crista neural. Os complexos SWI/SNF são supressores tumorais que coordenam diversas alterações da cromatina que influenciam a produção transcricional, a replicação e o reparo do DNA (MATTHAY et al., 2016) (JOHNSEN; DYBERG; WICKSTRÖM, 2019).

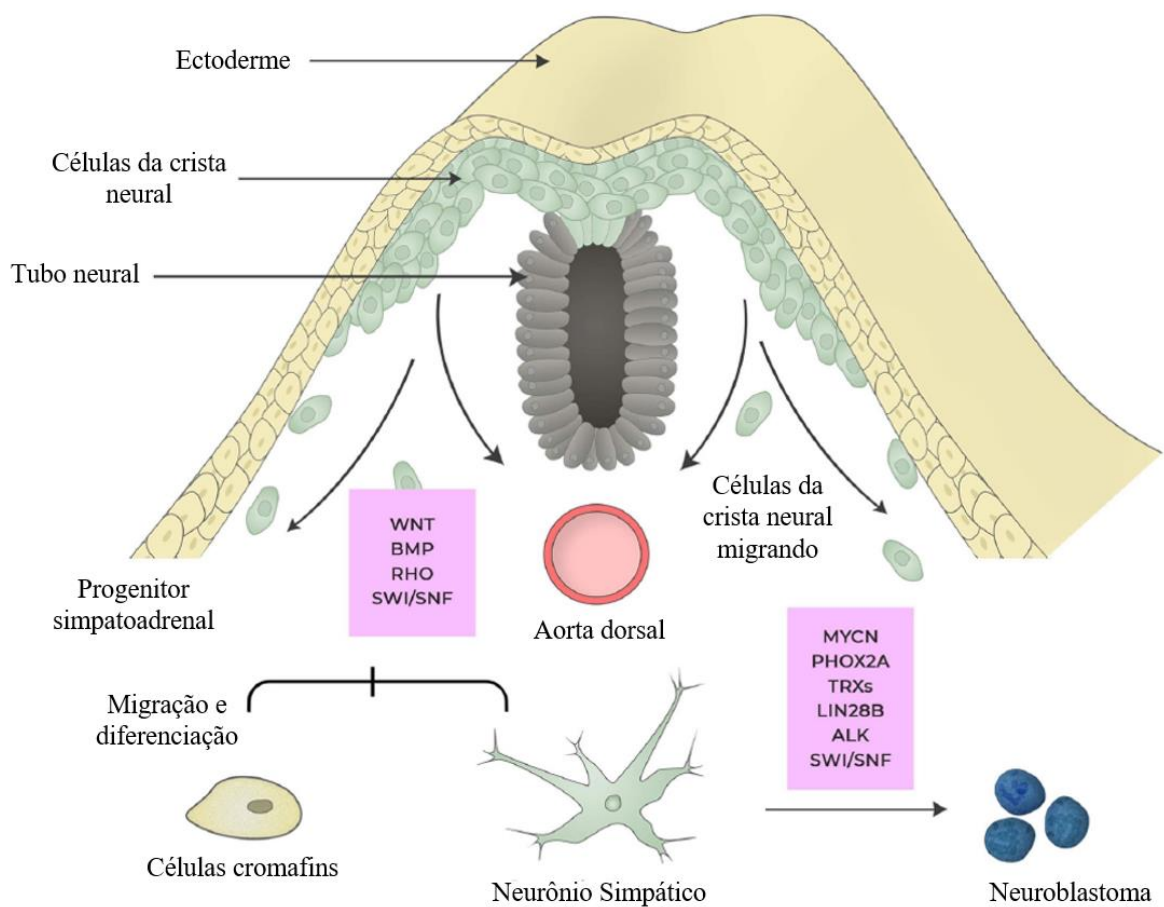


Figura 2: Desenvolvimento de neuroblastoma a partir da crista neural. Fonte: Adaptado de (JOHNSEN; DYBERG; WICKSTRÖM, 2019)

2.3.2 Classificação dos neuroblastomas

Por meio do Sistema de Estadiamento Internacional para Neuroblastoma (INSS), os tumores de neuroblastomas podem ser classificados de acordo com os estádios 1, 2A, 2B, 3, 4 e 4S baseado em critérios múltiplos tais como grau de excisão cirúrgica do tumor primário, envolvimento de linfonodos, disseminação para órgãos distantes, grau de envolvimento da medula óssea e idade da criança (tabela 1). A amplificação de MYCN é um fator de péssimo prognóstico em neuroblastomas, mesmo em casos de tumores localizados sendo utilizado como um biomarcador para estratificação de pacientes, pois está fortemente associada a metástases de pulmão, seguido de medula óssea, ossos e metástases de pele (NAKAGAWARA et al., 2018).

Curiosamente, pacientes bebês com neuroblastoma 4S, com metástases na pele, fígado e medula óssea, podem apresentar uma impressionante involução natural e regressão dos tumores, após mínima ou nenhuma intervenção médica. A regressão espontânea também ocorre em alguns pacientes afetados por outros estágios do neuroblastoma. Entretanto, ainda não se sabe exatamente o mecanismo pelo qual isso ocorre (RUIZ-PÉREZ; HENLEY; ARSENIAN-HENRIKSSON, 2017).

Tabela 1: Sistema de Estadiamento Internacional para Neuroblastoma (LUCENA et al., 2018).

Estádio	Definição
1	Tumor localizado, completamente ressecado com ou sem doença residual microscópica; representativos linfonodos ipsilaterais negativos (nódulos aderidos e removidos com o tumor podem ser positivos).
2A	Tumor localizado com ressecção incompleta; representativos linfonodos ipsilaterais não aderidos negativos para o tumor microscopicamente.
2B	Tumor localizado com ou sem ressecção completa com linfonodos ipsilaterais não aderidos positivos para o tumor; linfonodos aumentados contralaterais devem ser negativos microscopicamente.
3	Tumor unilateral irressecável, estendendo-se pela linha média, com ou sem envolvimento linfonodal regional, tumor unilateral com envolvimento de linfonodos regionais contralaterais, ou tumor de linha média com extensão bilateral por meio de infiltração (irressecável) ou de envolvimento linfonodal.
4	Qualquer tumor primário com disseminação para linfonodos a distância, osso, medula óssea, fígado, pele, ou outros órgãos (exceto como definido no estágio 4S).
4S	Tumor primário localizado (como definido para os estádios 1, 2A ou 2B) com disseminação limitada à pele, ao fígado ou à medula óssea (limitado a crianças menores de 1 ano de idade).

2.3.3 Tratamento para neuroblastomas

Pacientes com neuroblastomas de alto risco requerem terapias multimodais intensivas incluindo quimioterapia, cirurgia, radioterapia, além de quimioterapia de alta dose com resgate de células-tronco autólogas, e irradiação do tumor local. Porém, em quase 90% dos casos essas terapias ainda são ineficazes (LOUIS; SHOHET, 2015). Os quimioterápicos convencionais utilizados para tratar neuroblastomas podem incluir: cisplatina, vincristina, doxorrubicina, etoposídeo, carboplatina e ciclofosfamida, porém a maior parte destes fármacos está associada aos desagradáveis efeitos adversos que acompanham o tratamento e muitas vezes resistência a múltiplas drogas (TRAN et al., 2015) (JOHNSEN; DYBERG; WICKSTRÖM, 2019).

O atual paradigma de tratamento inicial usado pela maioria das equipes inclui três fases de terapia: 1) A fase de indução: baseada em quimioterapia múltipla intensiva e cirurgia de ressecção do tumor primário para reduzir o tumor tanto quanto possível. Com as abordagens atuais, aproximadamente 80% dos pacientes têm pelo menos uma resposta à indução, embora apenas 20% dos pacientes têm uma resposta completa de indução final. 2) A fase de consolidação: nesta fase de tratamento utiliza-se quimioterapia de alta dose com resgate autólogo de células-tronco seguido de radioterapia. 3) A fase de pós-consolidação: incorpora o uso de terapias alvo incluindo imunoterapia anticorpo monoclonal dirigido contra o alvo GD2 da superfície celular e isotretinoína como agente diferenciador. A duração total do tratamento é de aproximadamente 1,5 ano (DUBOIS; MACY,; HENDERSON, 2022).

2.3.4 Neuroblastoma e canais iônicos

Quanto a expressão de canais iônicos os neuroblastomas apresentam uma gama de canais iônicos dependentes de voltagem, tais como: canais de sódio, canais de potássio, canais de cálcio, bem como receptores de potencial transiente (TRPs) (GINSBORG; MARTIN; PATMORET, 1991a) (PANNER; WURSTER, 2006) (LOUHIVUORI et al., 2009) (NAMKAEW et al., 2018) (LANGE; KOSTER; KOOMOA, 2019) (KRABBENDAM et al., 2020).

Ao que se refere aos canais de sódio dependentes de voltagem os neuroblastomas tendem a apresentar uma expressão elevada dos subtipos Nav1.3 e Nav1.7, ambos caracterizados como sensíveis à tetrodotoxina (TTX-S), o que pode estar correlacionado a alta capacidade metastática dos neuroblastomas (VETTER et al., 2012).

2.4 Morte celular

A morte celular é um processo essencial para a manutenção da homeostase nos tecidos, caracterizada por processos de morte distintos como: apoptose, piroptose, autofagia e necrose (D'ARCY, 2019).

A apoptose ou morte celular programada é um processo coordenado e muitas vezes dependente de energia que envolve a ativação de um grupo de proteases de cisteína chamadas “caspases” compondo uma cascata complexa de eventos que ligam os estímulos iniciais à morte final da célula. Os sinais de morte são retransmitidos através de vias de sinalização que levam à ativação de caspases responsáveis pela execução da destruição celular. Sendo uma das formas mais conhecidas de morte celular regulada, pode ser ativada quando os receptores de morte como o Fas, são ativados por seus ligantes (via extrínseca) ou quando as proteínas pró-apoptóticas da família BCL-2 levam a permeabilização da membrana mitocondrial externa (a via intrínseca), ambas convergem para a fase de execução da apoptose (ELMORE, 2007; XU; LAI; HUA, 2019; LOSSI, 2022).

A morte de uma célula ou grupo de células, geralmente devido a um estado patológico, é conhecida como necrose. Pode ser dividida em dois estágios: a morte da célula como resultado de sua incapacidade de manter a homeostase e sua subsequente degeneração. De forma geral, envolve um número significativo de células e está ligada a uma resposta inflamatória (D'ARCY, 2019). Ao contrário da apoptose, a necrose é uma forma alternativa descontrolada de morte celular induzida por lesão externa, como hipóxia ou inflamação. Este processo geralmente envolve a regulação positiva de várias proteínas e compostos pró-inflamatórios, como o fator nuclear κ B, resultando na ruptura da membrana celular, causando uma cascata de inflamação e dano tecidual. A célula geralmente responde por inchaço (um processo

conhecido como oncofobia), pois falha em manter a homeostase (MAJNO; JORIS, 1995)(BERGHE et al., 2014).

2.5 Envolvimento dos canais de sódio dependentes de voltagem na metástase.

Em tumores sólidos, células cancerosas podem permanecer no local primário da lesão, espalham-se localmente ou causam metástase. O câncer metastático é responsável por cerca de 90% de todas as mortes relacionadas ao câncer. Sendo este o principal fator determinante entre cânceres tratáveis de baixo risco e cânceres de alto risco com padrão altamente metastático. A disseminação de células tumorais a partir de locais distantes é um processo extremamente dinâmico, assíncrono e depende tanto das características do tumor quanto de fatores intrínsecos ao hospedeiro. A inibição de marcadores tumorais metastáticos, tais como os canais de sódio dependentes de voltagem, podem trazer benefícios em qualquer estágio da doença, sendo um importante alvo terapêutico (STOLETOV; BEATTY; LEWIS, 2020).

O processo de metástase consiste nas seguintes etapas: (I) as células cancerosas dissociam-se entre elas destacando-se da matriz extracelular, (II) migram a partir do tecido de origem, invadem a membrana basal, (III) acessam a corrente sanguínea ou a circulação linfática, (IV) aderem-se novamente há um local distante e extravasam a circulação até formarem tumores secundários depois de proliferarem e induzirem angiogênese. O movimento celular é influenciado por diversos fatores tais como, moléculas de adesão (caderinas e integrinas), enzimas que degradam a matriz extracelular e seus inibidores, citocinas que estimulam o processo de migração e proliferação, componentes do citoesqueleto e atividade de canais iônicos, além da concentração iônica intracelular e extracelular (WOODHOUSE; CHUAQUI, 1997) (GUMUSHAN AKTAS; AKGUN, 2018).

Particularmente, os canais de sódio dependentes de voltagem (Nav) controlam várias etapas da cascata metastática, sendo estes diretamente associados a agressividade de tumores, como evidenciado pelos altos níveis de expressão em carcinomas de péssimo prognóstico (figura 3) (ONKAL; DJAMGOZ, 2009).

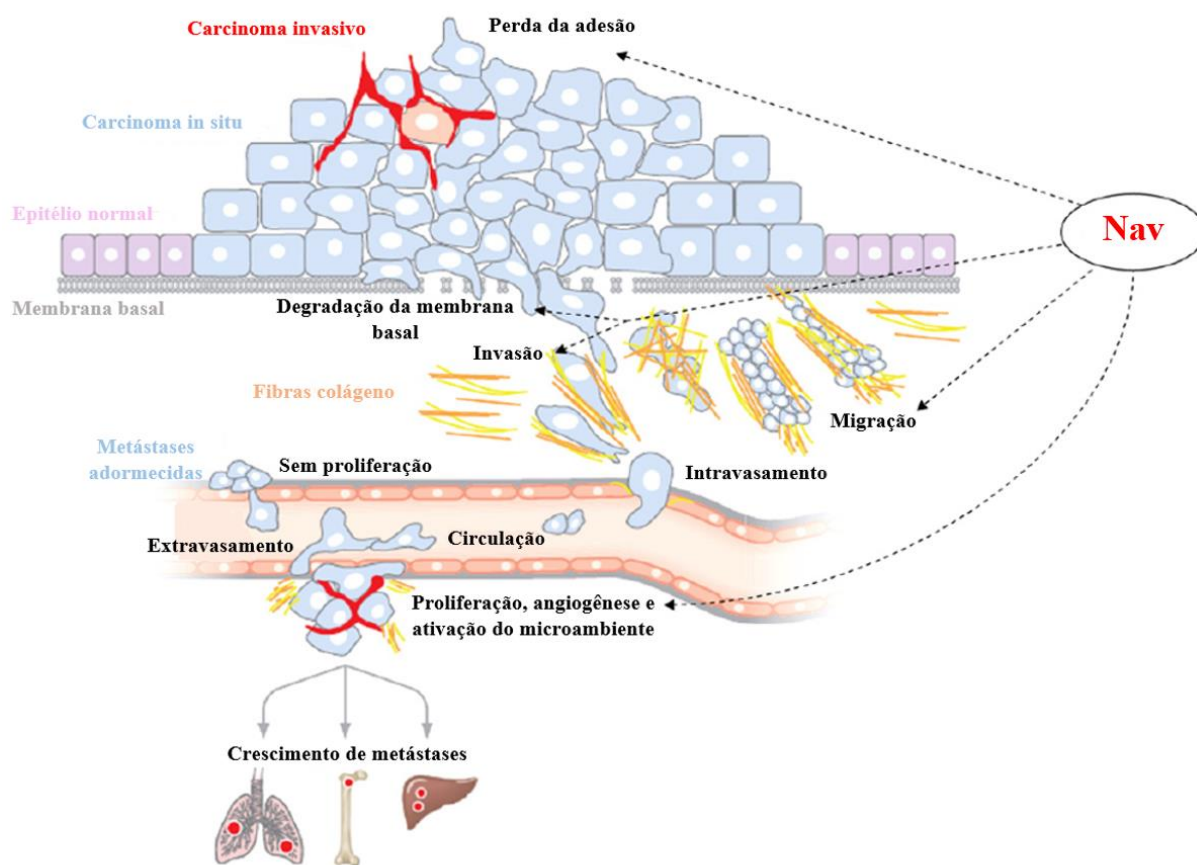


Figura 3: Cascata metastática. Fonte: Adaptado de (ONKAL; DJAMGOZ, 2009)

Os canais de sódio dependentes de voltagem estão diretamente associados a condução do impulso elétrico em células excitáveis, porém também estão presentes em vários tipos de células epiteliais. A expressão anormal de canais iônicos vem sendo correlacionada com alterações na adesão, proliferação, apoptose, migração, invasão e metástase de células, particularmente durante a progressão tumoral. Especificamente, células invasivas com grande potencial metastático apresentam um maior número de canais de sódio dependentes de voltagem (FRASER et al., 2005) (LIU et al., 2019) (DJAMGOZ; FRASER; BRACKENBURY, 2019) (WANG et al., 2019).

O aumento da expressão de canais de sódio dependentes de voltagem (Nav) funcionais, e o consequente aumento do influxo de corrente de sódio em células cancerosas corrobora diretamente para a progressão da metástase. Principalmente via alterações no potencial de repouso da membrana de células altamente metastáticas que tendem a ser mais despolarizantes. (ROGER; BESSON; LE GUENNEC, 2003) (FRASER; DISS; CHIONI, 2005). As membranas de células

metastáticas tornam-se potencialmente “excitáveis”, devido ao comportamento hiperativo em virtude da superexpressão de Nav (BLANDINO et al., 1995).

A família dos canais de sódio dependentes de voltagem é composta por nove subtipos de subunidades α (Nav1.1 à Nav1.9), codificados pelos genes SCN1A – SCN11A, além de quatro subunidades β auxiliares que podem se associar a subunidade α modulando a expressão e a cinética do canal iônico na membrana plasmática (figura 4). Cada subunidade α de um canal de sódio dependente de voltagem (220-260 kDa) forma um poro iônico funcional com particular sensibilidade a tetrodotoxina (TTX), propriedades farmacológicas e distribuição tecidual. Por exemplo, a TTX é aproximadamente 1000 vezes mais potente para os canais Nav1.1 – 1.4, Nav1.6 e Nav1.7, chamados de sensíveis a TTX (TTX-S), em comparação com o grupo resistente (TTX-R) Nav1.5, Nav1.8 e Nav1.9 bloqueados por concentrações de TTX na ordem de micro molar (HILLE, 1992) (PLUMMER; MEISLER, 1999) (CATTERALL, 2017)

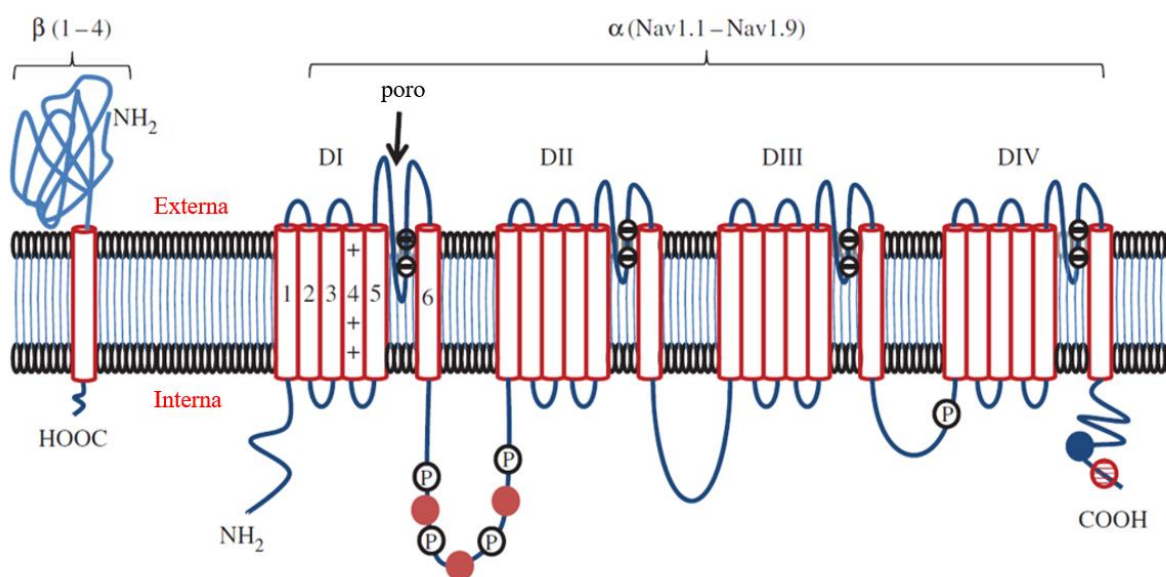


Figura 4: Esquema ilustrativo da estrutura do canal de sódio dependente de voltagem. A subunidade α apresenta quatro domínios (DI-DIV) com seis segmentos transmembranares. O segmento 4 contém aminoácidos carregados positivamente, sendo composto o sensor de voltagem do canal, a alça entre o segmento 5 e 6 é negativamente carregada e forma a região do poro do canal. A subunidade β está localizada de forma acessória podendo estrategicamente modular a cinética do canal. Fonte: Adaptado de (FRASER et al., 2014)

Estes canais estão super expressos em diferentes tipos de carcinomas estimulando o redirecionamento da maquinaria celular para a progressão da metástase (FRASER et al., 2014) (WANG et al., 2019). Interessantemente, dos nove subtipos de Navs, em carcinomas, os dois mais prevalentes são Nav1.5 e Nav1.7 (DJAMGOZ; FRASER; BRACKENBURY, 2019). Há evidências de que os níveis do eletrólito sódio em tecidos tumorais estão demasiadamente aumentados em relação a tecidos saudáveis, o que corrobora com o aumento da expressão de canais de sódio dependentes de voltagem (DJAMGOZ; FRASER; BRACKENBURY, 2019).

Alterações na homeostase iônica (Na^+ , Ca^{2+} e H^+) podem subsequentemente ativar proteína quinase A (PKA), proteína quinase C (PKC), que podem vir a modular proteínas do citoesqueleto, aumentar o transporte vesicular, secreção, migração e invasão em cânceres altamente metastáticos (ONKAL; DJAMGOZ, 2009). As correntes de sódio geradas por meio do canal Nav1.7 estimulam a fosforilação da proteína quinase A (PKA), o que leva ao aumento dos níveis de RNAm para Nav1.7, mas não afeta os níveis de proteína total, pois os níveis proteicos de Nav1.7 aumentam na membrana plasmática e diminuem a nível citoplasmático. A externalização do Nav1.7 então potencializa o processo de invasão e migração em células tumorais. O aumento dos níveis de Nav1.7 na membrana levam ao aumento de correntes de Na^+ , assim gerando uma retroalimentação positiva (figura 5) (FRASER et al., 2014).

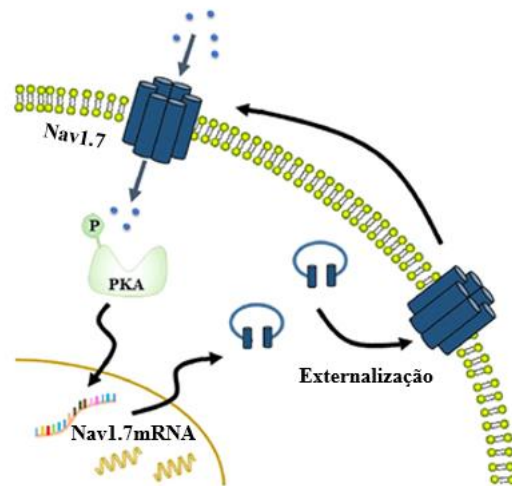


Figura 5: Retroalimentação positiva de Nav1.7 em células tumorais. Fonte: (FRASER et al., 2014) (LUO et al., 2020)

2.6 Desenvolvimento de novas drogas

A busca ainda é incessante por novos compostos com potencial antitumoral, apesar dos avanços em relação ao tratamento do câncer ainda é preocupante a escassez de drogas atuando em alvos moleculares específicos. Tendo em vista que, os quimioterápicos disponíveis atualmente ainda apresentam baixa especificidade com relação as células saudáveis resultando em numerosos efeitos colaterais.

Na pesquisa por novas drogas com propriedades anticâncer, os métodos mais comuns de triagem envolvem a realização de testes de citotoxicidade, frente a um painel de células tumorais e não tumorais. A fim de avaliar o potencial citotóxico seletivo do composto em questão bem como o escalonamento de tal composto para estudos visando o desenvolvimento de futuros candidatos fármacos (RISS; MORAVEC; NILES, 2013) (RISS et al., 2004).

Os canais de sódio dependentes de voltagem estão se tornando uma nova classe de alvos moleculares para identificação seletiva do potencial metastático ou do bloqueio da sua progressão. A expressão de canais de sódio dependentes de voltagem tem potencial tanto clínico quanto diagnóstico, sendo um importante alvo para o desenvolvimento de drogas antitumorais com propriedades antimetastáticas (HORNE; MANSUR; BAO, 2021).

2.7 Carvacrol e seus derivados candidatos a fármacos

Os produtos naturais têm se destacado no ramo da química medicinal, com relação às suas propriedades medicinais intrínsecas e também quanto ao seu potencial em servir de molécula base para numerosas reações de síntese de novos compostos, possibilitando o desenvolvimento de fármacos mais direcionados quanto ao alvo terapêutico (KATZ; BALTZ, 2016) (THOMFORD et al., 2018).

O monoterpreno carvacrol, 2-metil-5-(propano-2-il)fenol, é um composto orgânico encontrado em óleos essenciais de muitas plantas com um amplo perfil farmacológico, e serviu de base estrutural para o desenvolvimento dos compostos semissintéticos estudados neste trabalho.

Dentre as atividades do carvacrol já descritas na literatura destacam-se a modulação de canais iônicos por meio do bloqueio dos canais de sódio dependentes de voltagem (JOCA et al., 2015a), canais de cálcio dependentes de voltagem (DANTAS et al., 2015), TRPM2 e TRPV4 (NAZIROĞLU, 2022), e TRPM7 (CAI et al., 2021).

O carvacrol apresenta efeito antitumoral em diferentes tipos de câncer, dentre os quais em células de câncer de mama via modulação de TRPM7, induzindo apoptose a partir de 300 µM nas linhagens BT-483, BT-474, MCF-7, MDA-MB- 231, e MDA-MB-453 (LI et al., 2021). Também está descrita na literatura a atividade do carvacrol em gliomas, câncer de hepático, leucemia, câncer de cólon, dentre outros (ZIELIŃSKA-BŁAJET; PIETRUSIAK; FEDER-KUBIS, 2021).

Com base na atividade antitumoral do carvacrol já descrita na literatura, o surgimento de compostos derivados do carvacrol modulando células de câncer tem aumentado. Cui e colaboradores sintetizaram derivados do carvacrol contendo 5-fenil-2-furano e observaram que os substituintes nas posições orto e para aumentaram significativamente sua atividade anticancerígena em comparação com aqueles na posição meta (ZIELIŃSKA-BŁAJET; PIETRUSIAK; FEDER-KUBIS, 2021).

O complexo de cobre(II) de uma base de Schiff derivada do carvacrol inibiu a inibiu a proliferação e migração da linhagem de câncer de pulmão A549 de maneira dose-dependente, ativando os mecanismos de apoptose pela via intrínseca (BANSAL et al., 2022).

Os resultados obtidos neste trabalho foram com compostos inéditos derivados do carvacrol à base de aduto de morita-baylis-hillman.

3 OBJETIVOS

GERAL:

- Investigar o potencial antitumoral de derivados semissintéticos do carvacrol com atividade sobre canais de sódio dependentes de voltagem subtipo 1.7 (Nav1.7).

ESPECÍFICOS:

- Realizar uma triagem do efeito dos compostos derivados do carvacrol sobre correntes de sódio de Nav1.7;
- Investigar o efeito dependente de concentração dos derivados do carvacrol previamente selecionados frente ao bloqueio de Nav1.7.
- Determinar a toxicidade dos derivados de carvacrol pré-selecionados, através do modelo com *Artemia salina*.
- Estudar a citotoxicidade em células tumorais e não tumorais do derivado do carvacrol com destacável atividade sobre o Nav1.7 (Derivado do Carvacrol 6 – DC6);
- Avaliar a influência do DC6 na proliferação celular;
- Investigar o efeito do DC6 em modular a taxa de migração celular correlacionando-o com o Nav1.7;
- Investigar o efeito do DC6 na indução da apoptose;
- Analisar o efeito do DC6 em modelo tridimensional de metástase in vitro;
- Avaliação toxicológica comportamental do DC6 em camundongos por meio do teste de Irwin.

4 MATERIAIS E MÉTODOS

4.1 Compostos

4.1.1 Derivados do carvacrol

Os compostos derivados do carvacrol (DC) testados nesse estudo, cujas estruturas químicas estão representadas na figura 6, foram produzidos no Laboratório de Síntese e Química Medicinal, situado no Departamento de Química, da Universidade Federal da Paraíba, sob coordenação dos Professores Dr. Cláudio Gabriel Lima Júnior e Dr. Mário Luiz A. A. Vasconcellos.

Foi preparada uma solução estoque de 1M dos DC (listados baixo) em DMSO (Dimetilsulfóxido) e congelada em pequenas alíquotas. Diluições foram realizadas no momento do experimento, sendo estas em solução externa (tabela 2, seção 4.2) para os experimentos de eletrofisiologia celular e em meio de cultura para os demais ensaios. Em todos os casos, a concentração máxima de DMSO utilizada foi de 0,5% (XAVIER, 2018). O Apêndice 1 resume brevemente o planejamento inicial dos estudos com estes compostos e apresenta algumas observações sobre a reprodutibilidade de dados de diferentes bateladas e considerações sobre a estabilidade dos compostos derivados do carvacrol.

DC1: 2-metil-5-(propan-2-il)fenil 2-[hidroxi(fenil)metil]prop-2-enoato

DC2: 2-metil-5-(propan-2-il)fenil 2-[hidroxi(2-nitrofenil)metil]prop-2-enoato

DC3: 2-metil-5-(propan-2-il)fenil 2-[hidroxi(3-nitrofenil)metil]prop-2-enoato

DC4: 2-metil-5-(propan-2-il)fenil 2-[hidroxi(4-nitrofenil)metil]prop-2-enoato

DC5: 2-metil-5-(propan-2-il)fenil 2-[hidroxi(naftalen-1-il)metil]prop-2-enoato

DC6: 2-metil-5-(propan-2-il)fenil 2-[hidroxi(naftalen-2-il)metil]prop-2-enoato

DC7: 2-metil-5-(propan-2-il)fenil 2-[(4-fluorofenil)(hidroxi)metil]prop-2-enoato

DC8: 2-metil-5-(propan-2-il)fenil 2-[(4-clorofenil)(hidroxi)metil]prop-2-enoato

DC9: 2-metil-5-(propan-2-il)fenil 2-[(4-bromofenil)(hidroxi)metil]prop-2-enoato

DC10: 2-metil-5-(propan-2-il)fenil 2-[hidroxi(4-metoxifenil)metil]prop-2-enoato

DC11: 2-metil-5-(propan-2-il)fenil 2-[(2,5-dimetoxifenil)(hidroxi)metil]prop-2-enoato

DC12: 2-metil-5-(propan-2-il)fenil prop-2-enoato.

4.1.2 Carvacrol

A fim de aumentar a solubilidade aquosa do Carvacrol (Sigma Aldrich/Brasil) foi preparada uma solução concentrada de 1 M em DMSO, a partir desta foram realizadas diluições nas concentrações teste em solução externa (tabela 2).

4.1.3 Doxorrubicina

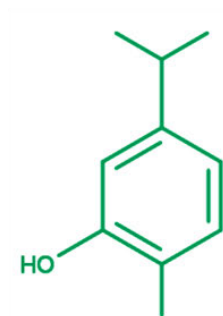
Alíquotas de Doxorrubicina (Sigma Aldrich/Brasil) à 10 mM foram armazenadas à -20°C ao abrigo da luz, sendo as diluições realizadas em meio de cultura no momento do experimento.

4.1.4 Tetrodotoxina

Partindo de uma solução estoque de 500 µM foram realizadas diluições em solução externa para os ensaios de eletrofisiologia celular ou em meio de cultura sem adição de soro fetal bovino.

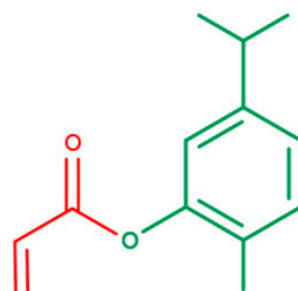
4.1.5 Lidocaína

Uma solução estoque de Cloridrato de Lidocaína (Sigma Aldrich/Brasil) à 5 mM foi preparada em água ultra purificada estéril e armazenada em geladeira. Foram realizadas diluições em meio de cultura no momento do experimento.



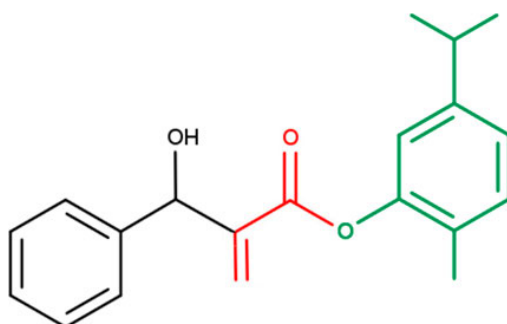
Carvacrol

2-metil-5-(propan-2-il)fenol



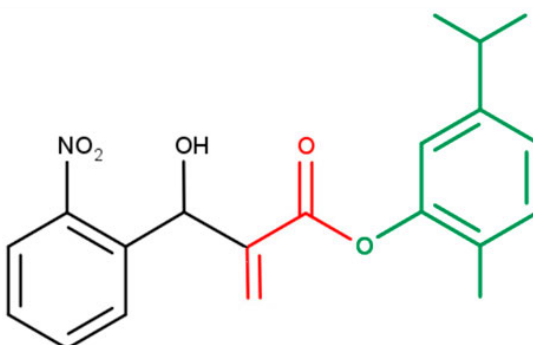
DC12

2-metil-5-(propan-2-il)fenil prop-2-enoato



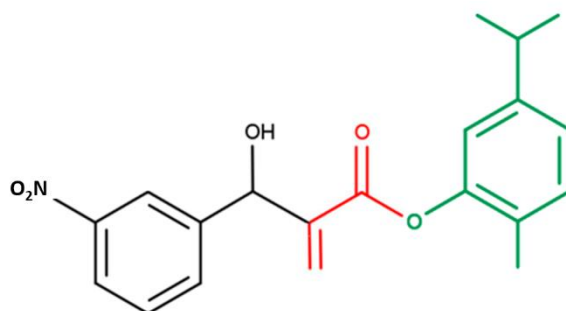
DC1

2-metil-5-(propan-2-il)fenil 2-[hidroxi(fenil)metil]prop-2-enoato



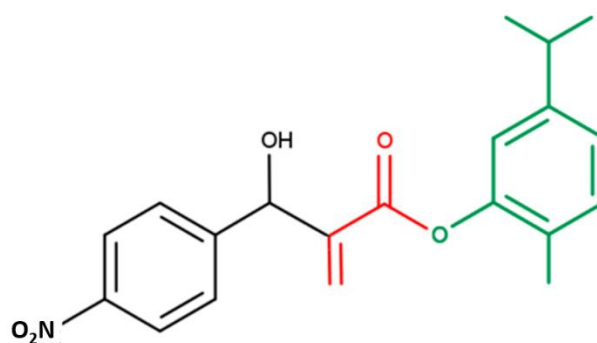
DC2

2-metil-5-(propan-2-il)fenil 2-[hidroxi(2-nitrofenil)metil]prop-2-enoato



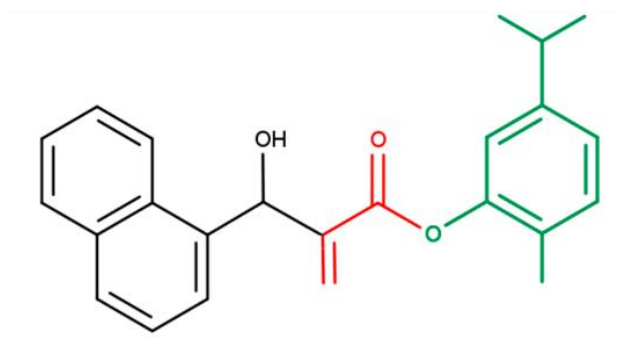
DC3

2-metil-5-(propan-2-il)fenil 2-[hidroxi(3-nitrofenil)metil]prop-2-enoato



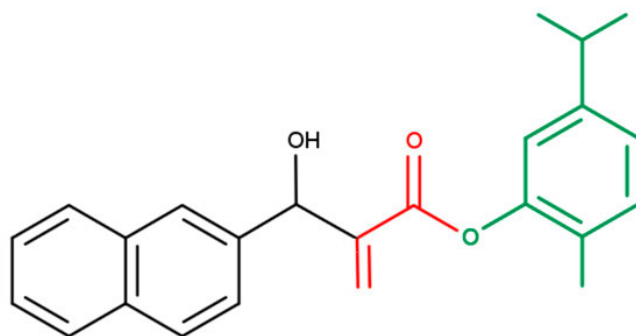
DC4

2-metil-5-(propan-2-il)fenil 2-[hidroxi(4-nitrofenil)metil]prop-2-enoato



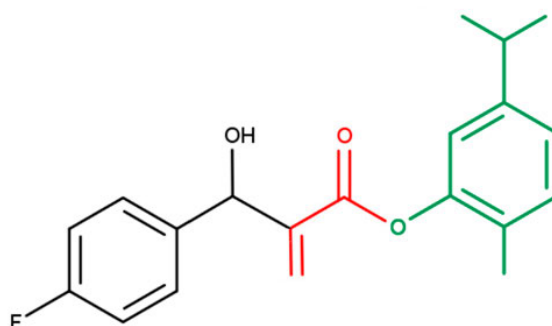
DC5

2-metil-5-(propan-2-il)fenil 2-[hidroxi(naftalen-1-il)metil]prop-2-enoato



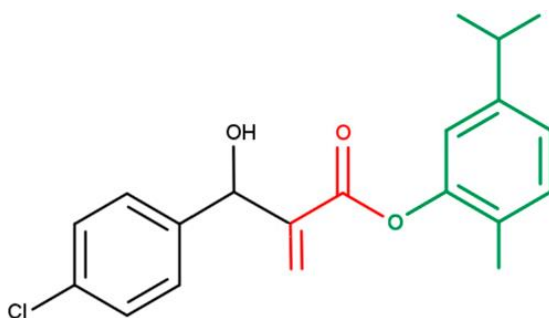
DC6

2-metil-5-(propan-2-il)fenil 2-[hidroxi(naftalen-2-il)metil]prop-2-enoato



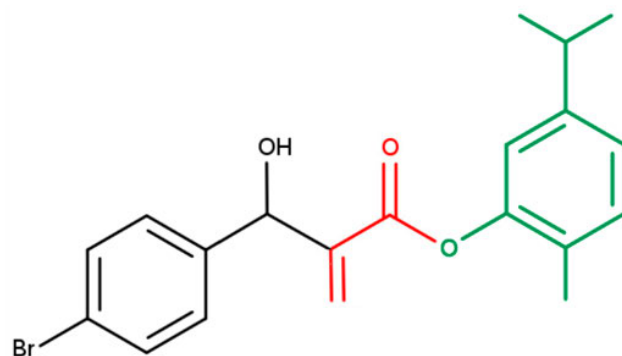
DC7

2-metil-5-(propan-2-il)fenil 2-[(4-fluorofenil)(hidroxi)metil]prop-2-enoato



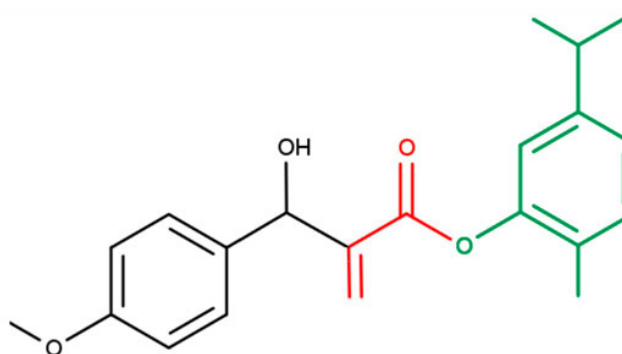
DC8

2-metil-5-(propan-2-il)fenil 2-[(4-clorofenil)(hidroxi)metil]prop-2-enoato



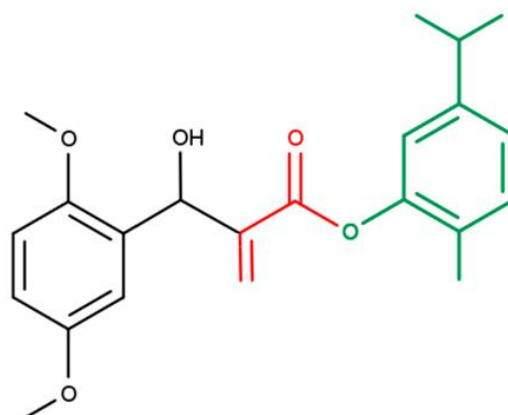
DC9

2-metil-5-(propan-2-il)fenil 2-[(4-bromofenil)(hidroxi)metil]prop-2-enoato



DC10

2-metil-5-(propan-2-il)fenil 2-[hidroxi(4-metoxifenil)metil]prop-2-enoato



DC11

2-metil-5-(propan-2-il)fenil 2-[(2,5-dimetoxifenil)(hidroxi)metil]prop-2-enoato

Figura 6: Compostos semissintéticos Derivados do Carvacrol. Estrutura química do Carvacrol representada em Verde, DC12 representado em vermelho e verde, demais grupos R em preto.

4.2 Modelos Biológicos Experimentais

4.2.1 Linhagens Celulares Imortalizadas

Células CHO-hNav1.7

As células CHO-hNav1.7 foram gentilmente cedidas pelo professor Dr. Paulo Sérgio Lacerda Beirão - Universidade Federal de Minas Gerais. As células provenientes da linhagem celular derivada de Ovário de Hamster Chines (CHO) foram transfectadas permanentemente com a subunidade α do canal de sódio dependente de voltagem subtipo 1.7 (Nav1.7) humano. As células foram cultivadas em frascos de cultura utilizando o meio DMEM (4,5 g/L glicose) acrescido de 0,5 mg/mL de G418 (geneticina) e suplementado com 10% de soro bovino fetal. O tempo de duplicação médio das células CHO é de 24 h.

Todas as linhagens celulares utilizadas (tabela 2) foram manipuladas em ambiente estéril, sob fluxo laminar e mantidas em estufa contendo 5% de CO₂ à 37 °C. O crescimento celular foi acompanhado a cada 24 horas com auxílio de microscópio invertido. Amostras de cultura mantidas em estoque foram criopreservadas em nitrogênio líquido.

Tabela 2: Linhagens celulares utilizadas e especificações de cultivo.

Linhagem celular	Tipo	Tempo de duplicação	Meio de cultura
SH-SY5Y	Neuroblastoma humano - Derivado de local metastático - medula óssea	55 h	DMEM/F12, Penicilina 10.000 U/mL, Estreptomicina 10 mg/mL, 1% de piruvato de sódio, 1% de aminoácidos não essenciais e 10% de soro bovino fetal.
Neuro-2A	Neuroblastoma de rato	70 h	DMEM (4,5 g/L glicose), Penicilina 10.000 U/mL, Estreptomicina 10 mg/mL e 10% de soro bovino fetal.
IMR-32	Neuroblastoma humano	20 h	RPMI, acrescidos de penicilina 10.000 U/mL, estreptomicina 10 mg/mL e suplementado com 10% de soro bovino fetal.
SH-EP	Neuroblastoma humano	44 h	RPMI, acrescidos de penicilina 10.000 U/mL, estreptomicina 10 mg/mL e suplementado com 10% de soro bovino fetal.
U87	Glioblastoma humano - astrocitoma	24 h	DMEM (4,5 g/L glicose), Penicilina 10.000 U/mL, Estreptomicina 10 mg/mL, 1% de Glutamax e 10% de soro bovino fetal.
U373MG	Glioblastoma humano - astrocitoma	40 h	DMEM (4,5 g/L glicose), Penicilina 10.000 U/mL, Estreptomicina 10 mg/mL, 1% de Glutamax e 10% de soro bovino fetal.
L929	Fibroblasto de rato	14 h	RPMI, acrescidos de penicilina 10.000 U/mL, estreptomicina 10 mg/mL e suplementado com 10% de soro bovino fetal.
HEK 293	Rim humano	30 h	DMEM (4,5 g/L glicose), Penicilina 10.000 U/mL, Estreptomicina 10 mg/mL e 10% de soro bovino fetal.

Fonte: cellosaurus.org

4.3 Métodos Experimentais

4.3.1 Técnica de Patch Clamp modo whole-cell

Para avaliarmos a influência dos derivados do carvacrol sobre os canais de sódio dependentes de voltagem subtipo 1.7 em células CHO-hNav1.7, foi utilizado a técnica de *patch-clamp*, no modo *whole-cell voltage-clamp* (figura 7), como descrito previamente (HAMILL; NEHER; SIGWORTH, 1981).

As células foram estudadas sobre a plataforma de um microscópio invertido (Carl Zeiss, Alemanha), posicionado sobre uma mesa antivibratória com suspensão pneumática (TMC, EUA), para obtenção dos registros eletrofisiológicos. Um micromanipulador hidráulico de alta precisão (Narishige, Japão) foi utilizado para movimentação do eletrodo responsável pelo registro das correntes, e outro micromanipulador foi utilizado para posicionar a pipeta de perfusão, contendo a solução controle ou o composto testado. Todo o sistema esteve livre de interferências elétricas, por meio do uso de uma gaiola de Faraday (TMC, EUA).

As correntes foram obtidas por meio de um amplificador (HEKA 10, Alemanha), filtradas por filtro passa-baixa a 3,0 kHz, convertidas em sinais digitais com frequência de 10 kHz, sendo armazenadas em computador para posterior análise. Correntes de vazamento (*leakage*) foram removidas, utilizando o protocolo P/4 no qual quatro pulsos de amplitude igual a $\frac{1}{4}$ do pulso teste foram aplicados e a resposta de corrente foi somada e subtraída da corrente do pulso teste. Os transientes capacitivos foram subtraídos em todos os experimentos. As células que apresentaram valores altos para resistência em série (acima de 5 M Ω) ou que não permaneceram estáveis, não foram utilizadas para análise.

As correntes foram adquiridas e analisadas em um computador PC-compatível por meio do software Patch Master (HEKA Elektronik, Alemanha). As células CHO-hNav1.7 aderidas em lamínulas de vidro foram banhadas por uma solução extracelular (tabela 3) adequada para a medição de correntes de sódio. Micropipetas de vidro as quais foram preenchidas conforme a tabela 4 para os registros de correntes de Nav1.7, foram produzidas por meio de um estirador (*puller*) vertical de 2 estágios (Narishige, Japão).

As resistências das micropipetas mediam valores entre 3,0 - 4,0 M Ω . Um fino fio de prata/cloreto de prata (Ag/AgCl) foi introduzido na micropipeta, no qual o conjunto foi acoplado a um pré-amplificador (*headstage*) que, por sua vez, estava conectado à entrada do amplificador.

Todas as soluções foram submetidas a um filtro com porosidade de 0,22 μ m. Os “gigaselos” foram obtidos por meio de uma suave sucção feita no interior da micropipeta, e em seguida as células foram submetidas a uma sucção mais vigorosa que permitiu romper o pequeno fragmento de membrana. O aumento brusco do transiente capacitivo indicava a obtenção da configuração *Whole-cell* (figura 8).

Em todos os registros realizados, as células foram submetidas a um sistema de perfusão (Dagan, EUA) que consistiu de uma pipeta de vidro com aproximadamente 100 μ m de diâmetro interno, que estava conectada à saída de uma válvula solenoide, alimentada por reservatórios de 10 mL, um deles contendo solução fisiológica sem adição dos compostos teste e outros compartimentos contendo a solução externa adicionada com concentrações testes dos derivados do carvacrol. A válvula solenoide permitia selecionar os compartimentos que ficaram ligados à pipeta de perfusão. Os fluxos ($\sim$ 0,1 mL/min) foram impulsionados pela força da gravidade. A osmolaridade das soluções foi ajustada com glicose, para valores de aproximadamente 310 mOsm (solução interna) e 330 mOsm (solução externa). Assim, foi possível avaliar o efeito dos derivados do carvacrol sobre as correntes de Na⁺ para os canais Nav1.7 (figura 9).

Os registros eletrofisiológicos foram normalizados em pA por pF, sendo obtido a média $\pm$ desvio padrão com um N = 7 células para cada concentração testada dos compostos derivados do carvacrol. As diferenças estatísticas foram avaliadas por meio do teste t, em que valores de $p < 0,05$ indicaram diferença significativa. O programa utilizado para análise estatística dos dados foi o *GraphPad Prism* versão 8.0. Sendo os parâmetros eletrofisiológicos analisados por meio do programa *FitMaster/HEKA*.



Figura 7: *Setup* de eletrofisiologia celular – *Patch Clamp* do laboratório de biotecnologia celular e molecular (LBCM).

Tabela 3: Solução Externa para medição de correntes de sódio subtipo 1.7 em células CHO-hNav1.7.

Solução Externa – INav (mM)	
NaCl	40
KCl	3
TEA-Cl	20
CaCl ₂	1
MgCl ₂	1
CdCl ₂	1
Cloreto de colina	70
Glicose	10
pH=7,4 (NaOH)	

Tabela 4: Solução Interna para medição de correntes de sódio subtipo 1.7 em células CHO-hNav1.7

Solução Interna – INav (mM)	
NaCl	10
CsCl	100
HEPES	10
EGTA	11
TEA-Cl	10
MgCl ₂	5
pH=7,2 (CsOH)	

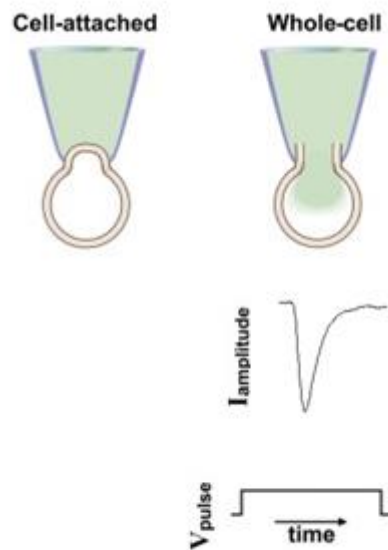


Figura 8: Técnica de *patch clamp* modo *whole-cell voltage clamp*, adaptado de Cell Physiology Source Book, 2012.

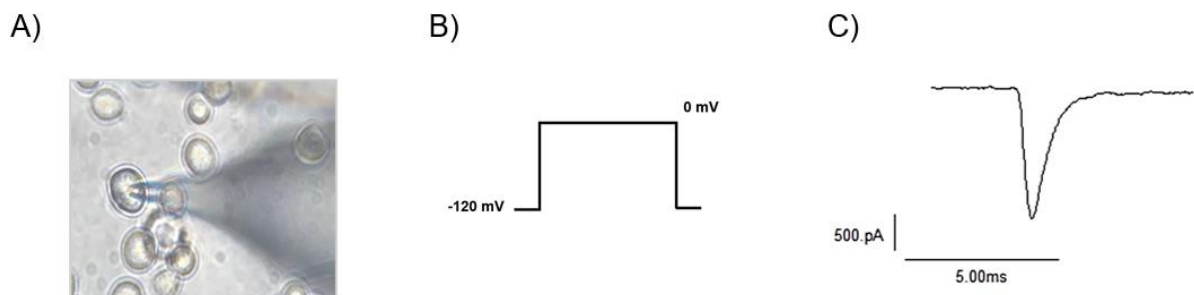


Figura 9: Protocolo experimental técnica de *patch clamp* modo *whole-cell voltage clamp*. A) Células CHO-hNav1.7 e micropipeta de patch clamp. B) Pulso teste utilizado para a avaliação das correntes de Nav1.7. C) Registro representativo de corrente de sódio subtipo $Na_v1.7$.

4.3.2 Avaliação da atividade citotóxica dos derivados do carvacrol pelo método de redução do sal de tetrazólio (MTT)

A redução do MTT (brometo de 3-(4,5-dimetil-2-tiazolil)-2, 5-difenil-2H-tetrazólio) é um ensaio colorimétrico que mede a atividade metabólica da célula, sendo amplamente utilizado para avaliação da viabilidade celular frente a compostos químicos. Este sal de coloração amarela é captado por um processo de endocitose, sendo convertido por células metabolicamente ativas em um composto formazam azul insolúvel, por meio da redução do anel heterocíclico de tetrazólio. Os cristais de formazam são dissolvidos e quantificados em espectrofotômetro, onde o valor da absorbância desse composto é proporcional ao número de células viáveis (LIU et al., 1997).

Foi realizado a contagem do número de células em câmaras de Neubauer com azul de tripam, somente os conjuntos de células com taxa de viabilidade superior a 95% foram utilizadas para os experimentos. Após contagem as células foram semeadas em placas com 96 poços na concentração de 3×10^4 células por poço. Em seguida foram incubadas em estufa de CO₂ por cerca de 24 h. Após adesão, as células foram tratadas com concentrações crescentes dos derivados do carvacrol, e as placas foram mantidas em estufa com 5% de CO₂ à 37°C de acordo com o período de incubação dos compostos. O MTT foi adicionado após o término do período de incubação, passados 4 horas foi adicionado uma solução de SDS/HCL afim de solubilizar os cristais de formazam. Após 24 h, foi realizada a leitura da placa em espectrofotômetro à 570 nm.

4.3.3 Ensaio de proliferação celular

As células SH-SY5Y foram semeadas em placas com 24 poços na densidade de 5×10^4 células por mL e incubadas em estufa de CO_2 de um dia para o outro à 37°C . Posteriormente, o meio foi renovado contendo $2\ \mu\text{M}$, $4\ \mu\text{M}$ e $8\ \mu\text{M}$ do DC6. Após decorrido os tempos 0, 24, 48 e 72 horas de incubação com a substância teste, foi adicionado à solução de MTT ($5\ \text{mg/mL}$), acrescidos por mais 4 horas de incubação para que ocorresse a metabolização do composto em azul de formazam. Em seguida o conteúdo do poço foi transferido para tubos cônicos e centrifugados para remoção do sobrenadante, em seguida foi adicionado $200\ \mu\text{L}$ de DMSO. A densidade óptica foi mensurada por meio de espectrofotômetro de placa à $570\ \text{nm}$.

4.3.4 Ensaio de migração celular

As células SH-SY5Y ou CHO-hNav1.7 foram semeadas em placas com 6 poços na concentração de 3×10^5 células por mL, uma vez atingida a confluência maior que 95%, foi realizado uma ranhura na monocamada de células utilizando uma ponteira de $10\ \mu\text{L}$. Em seguida, o meio foi retirado, e foram realizadas três lavagens com tampão de fosfato salina (PBS) para a remoção das células em suspensão, após as lavagens foi adicionado meio de cultura contendo o DC6 nas concentrações de $2\ \mu\text{M}$, $4\ \mu\text{M}$ e $8\ \mu\text{M}$ ou Lidocaína $200\ \mu\text{M}$ suplementadas com 1 % de SBF. Já nos ensaios realizados em células CHO-hNav1.7 acrescidos de $300\ \text{nM}$ de Tetrodotoxina (TTX), devido a interação da TTX com a albumina, não foram adicionados SBF ao meio de cultura, em todas as situações experimentais, controle e DC6 para devida comparação (MATSUMOTO et al., 2010). Posteriormente, foram tiradas fotos utilizando microscópio óptico (ZEISS AX10) em modo contraste de fase com ampliação de 50x. As imagens foram analisadas no software de análise ImageJ 1.52i (NIH, USA), considerando a área de migração a área da ferida no tempo 0, subtraído pela área da ferida após 48 h ou 72 h.

4.3.5 Formação de esferoides tumorais

Para a obtenção dos esferoides tumorais foi preparado uma suspensão de células SH-SY5Y na concentração de 5×10^3 células por 20 μL . Uma placa de Petri foi aberta e sobre a tampa foram depositadas gotas de 20 μL da suspensão de células, 10 mL de PBS foi adicionado a base da placa para manutenção da umidade. Em seguida a tampa da placa foi invertida rapidamente e colocada na base da placa de Petri, dessa forma as gotas se mantiveram suspensas formando uma superfície convexa. As placas foram mantidas em estufa por cerca de 4 dias, tempo necessário para a formação dos esferoides nessa linhagem celular. Em seguida os esferoides foram coletados e movidos para uma placa de 24 poços, acrescidos de 500 μL de meio de cultura (1 % SBF) nos poços controle e 25 μM do DC6 nos poços teste. Os esferoides tumorais foram fotografados em microscópio óptico invertido (ZEISS AX10) em modo contraste de fase com ampliação de 50x. As imagens foram analisadas no software de análise ImageJ 1.52i (NIH, USA), considerando a área de invasão a subtração da área da esfera pela área total (Invasão = área de invasão – área da esfera) (GILAZIEVA et al., 2020).

4.3.6 Análise da indução de apoptose por citometria de fluxo

Para detecção de apoptose foi utilizado o fluorocromo Alexa Fluor 488 que conjugado a anexina V interage com resíduos externalizados de fosfatidilserina presentes nas membranas de células em apoptose. O iodeto de propídeo (PI) é um corante catiônico que só entra nas células cujas membranas estão rompidas. A dupla marcação da amostra com anexina V e iodeto de propídeo permite a discriminação entre células viáveis (anexina V negativa/PI negativa), em apoptose precoce (anexina V positiva/PI negativa), em apoptose tardia (anexina V positiva/PI positiva) e células necróticas (anexina V negativa/PI positiva) (WLODKOWIC; SKOMMER; DARZYNKIEWICZ, 2009).

As células SH-SY5Y foram semeadas em placas com 24 poços na concentração de 5×10^5 células/poço e tratadas com o DC6 nas concentrações de 6,25 μM , 12,5 μM , 25 μM ou com Doxorubicina 0,6 μM por 24 horas.

Após os períodos de incubação, as células foram centrifugadas (500 x g por 5 minutos) e ressuspensas em 100 µL de tampão de ligação (10 mM HEPES, 140 mM NaOH, and 2.5 mM CaCl₂) e 1 µL de anexina V-Alexa Fluor 488 (Invitrogen, EUA) por 15 minutos, ao abrigo da luz. Posteriormente foram adicionados 400 µL do tampão de ligação e 1 µg/mL de iodeto de propídeo (Invitrogen, EUA), realizando-se a leitura em citômetro de fluxo (FACScalibur BD). A análise dos dados experimentais foi realizada no programa FlowJo_V10, seguido por análise de variância (ANOVA), pós teste de Bonferroni no *GraphPadPrism* versão 8.0. Os dados foram considerados significativos quando $p < 0,05$.

4.3.7 Análise morfológica em célula única por microscopia de fluorescência.

Para realização deste protocolo experimental amostras de células SH-SY5Y foram tratadas com 6,25 µM, 12,5 µM, 25 µM do composto DC6. Inicialmente as amostras foram lavadas duas vezes com PBS e fixadas em solução de 3,7 % de formaldeído em PBS por 15 minutos a temperatura ambiente. As amostras foram lavadas mais duas vezes com PBS e permeabilizadas com 0.1 % Triton™ X-100 por 15 minutos. Após isto lavou-se mais duas vezes com PBS. Uma solução estoque contendo faloidina fluorescente foi preparada a 400x em DMSO e para solução de uso 0,5 µL da solução estoque foi adicionado a cada 200 µL de PBS. A solução de faloidina fluorescente foi adicionada as lamínulas e em seguida as mesmas foram incubadas por 30 – 60 minutos à temperatura ambiente. Na sequência foi realizada uma lavagem em PBS por 5 minutos. Após esta etapa foi adicionado DAPI (0,1 µg/mL), 5 min no escuro. Uma última lavagem foi realizada com PBS durante 5 min. As lamínulas foram montadas em lâminas com *mounting medium vectashield*, as imagens foram obtidas a 63X em imersão a óleo em microscópio *AXIO imager Z2*. Em que foram registradas 30 seções em plano z com tamanho de 0,24 µm. As imagens foram deconvoluídas utilizando o algoritmo *constrain interactive* em força automática.

4.3.8 Toxicidade do DC6 em náuplios de *Artemia salina*

A toxicidade dos compostos DC6, DC7, DC8 e DC9 foi determinada em náuplios de *Artemia salina* (SORGELOOS; REMICHE-VAN DER WIELEN; PERSOONE, 1978). Cerca de 20 mg de cistos foram incubados em 1 L de água do mar estéril (Miramar, Brasil) sobre luz artificial à 28°C. Após incubação de até 48 h, os náuplios foram coletados e adicionados a placas com 96 poços em que cerca de 100 µL de água do mar foi adicionado a cada poço juntamente com até 10 náuplios. Em seguida os compostos previamente diluídos em água do mar foram adicionados aos poços teste. As placas foram incubadas em temperatura ambiente por 24 h e a contagem dos náuplios foi realizada em Lupa (Zeiss) e então a taxa de mortalidade foi avaliada frente a cada derivado do carvacrol testado.

4.3.9 Teste de Irwin

A triagem farmacológica por meio do teste de Irwin (CAMPBELL; RICHTER, 1967) (MATHIASSEN; MOSER, 2018) é um ensaio comportamental que permite avaliar os efeitos de diferentes doses de substâncias no sistema nervoso central. Todos os experimentos foram realizados de acordo com as recomendações do comitê de ética e uso animal (CEUA nº 3592221019). Para realização do teste os animais foram divididos em três grupos, com 3 camundongos em cada grupo: G1 – Grupo controle em que foram administrados solução salina por via oral, G2 – Grupo em que foram administrados por via oral 64 mg/kg do derivado 6 do carvacrol, G3 – Grupo em que foram administrados por via oral 128 mg/kg do derivado 6 do carvacrol. Os parâmetros comportamentais de acordo com a tabela 4 foram avaliados após administração do composto nos tempos de 30 min, 1 h, 2 h, 3 h e 4 h, 8 h, 24 h, 4 e 7 dias após o tratamento. Ao final dos 7 dias na ausência de mortalidade os animais foram eutanasiados, os órgãos coração, pulmão, fígado, baço, rins foram coletados, a massa dos mesmos foi verificada e os órgãos foram armazenados em formalina para análise histológica.

Tabela 5: Parâmetros avaliados na triagem psicofarmacológica.

ATIVIDADE FARMACOLÓGICA	Quantificação dos efeitos (0) sem efeito, (-) efeito diminuído, (+) efeito presente, (++) efeito intenso				
	Até 30'	1h	2h	3h	4h
1 – SNC					
a- Estimulante					
Agressividade					
Ambulação aumentada					
Andar em círculo					
Autolimpeza					
Bocejo					
Contorções abdominais					
Convulsões					
Escalar					
Estereotipia					
Irritabilidade					
Levantar					
Movimentação intensa das vibrissas					
Pedalar					
Sacudir a cabeça					
Saltos					
Tremores					
Vocalização					
b- Depressora					
Abdução das patas do trem posterior					
Ambulação diminuída					
Analgesia					
Anestesia					
Ataxia					
Catatonía					
Cauda de Straub					
Hipnose					
Perda do reflexo auricular					
Perda do reflexo corneal					
Ptoze palpebral					
Reflexo de endireitamento					
Resposta ao toque diminuída					
Sedação					
2- SNA					
Constipação					
Defecação					
Micção					
Lacrimejamento					
Salivação					
Respiração					
Cianose					
Piloereção					
Força para agarrar					
Tônus muscular					
3 - Morte					

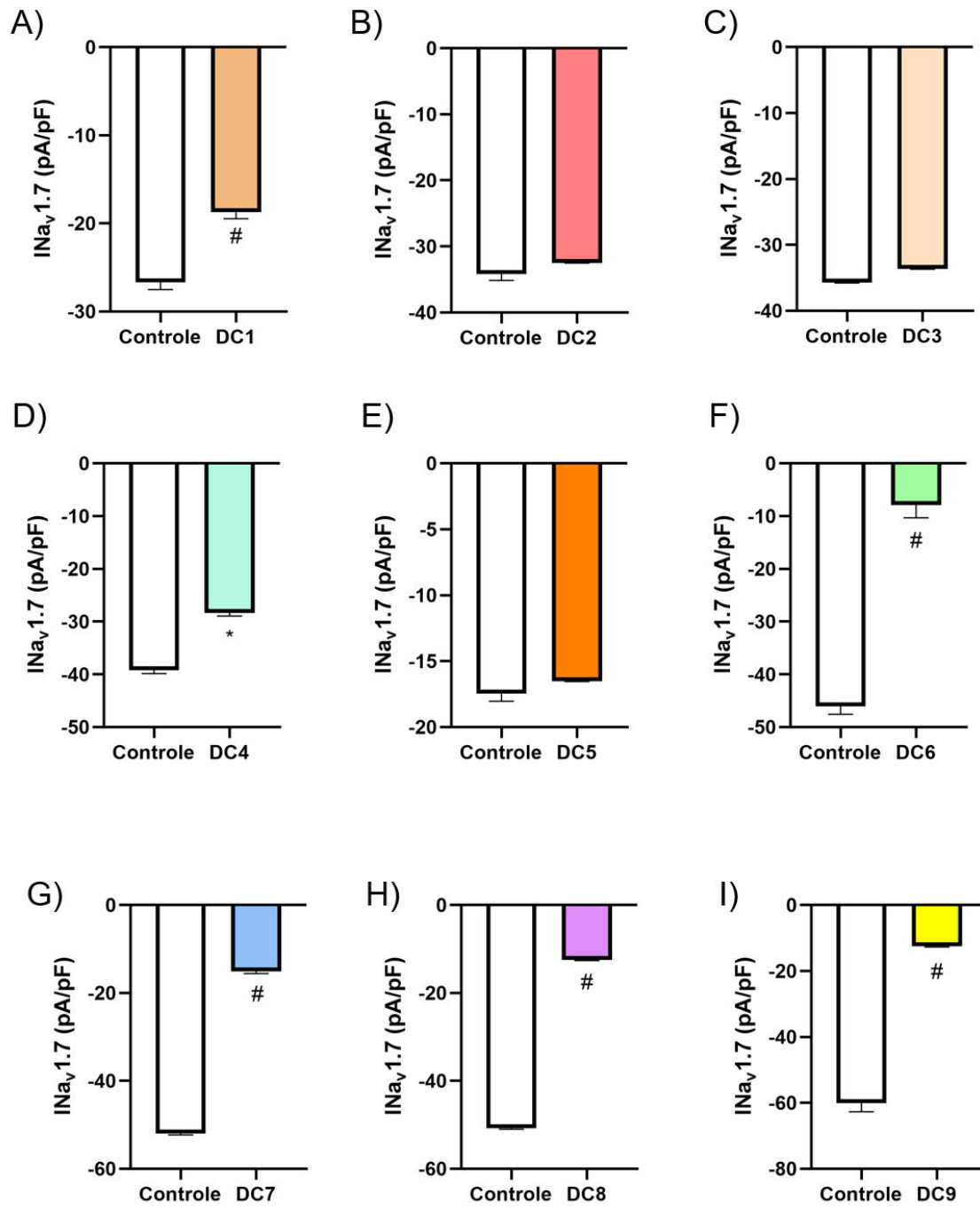
4.4 Análise de dados

Para análise estatística dos resultados experimentais e confecção dos gráficos foi utilizado o programa *GraphPadPrism* versão 8.0. Os experimentos de citotoxicidade, proliferação celular e migração celular foram obtidos por meio de três ensaios, onde cada concentração foi testada em triplicata, sendo os dados analisados por Análise de Variância ANOVA, seguida pelo teste de Bonferroni. Os dados foram considerados significativos quando $p < 0,05$.

5 RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.1 Efeito de derivados do carvacrol sobre correntes de Nav1.7.

Inicialmente foi avaliado o efeito de 12 Derivados do Carvacrol (DC), para tal foram realizadas medições de correntes de sódio subtipo 1.7 (INav1.7) em células CHO-hNav1.7, por meio da técnica de *Patch Clamp* modo *Whole cell Voltage-Clamp*, o potencial holding (V_h) utilizado foi de -90 mV, seguido de um pulso despolarizante de -120 mV para 0 mV durante 50 ms. Para a realização desta triagem experimental foi utilizado 100 μ M dos compostos semissintéticos derivados do carvacrol, como pode-se observar nas figuras 10F, 10G, 10H e 10I os compostos DC6, DC7, DC8 e DC9 reduziram a amplitude de corrente de Nav1.7 de forma mais expressiva quando comparados aos demais compostos testados, figuras 10A, 10B, 10C, 10D, 10E, 10J, 10L, 10M. A densidade de corrente de Nav1.7 em pA/pF, apresentada pelos derivados 6, 7, 8, e 9 foi reduzida de: $46,06 \pm 1,505$ para $-7,837 \pm 2,496$; de $-51,98 \pm 0,2879$ para $-15,08 \pm 0,4884$; de $-50,74 \pm 0,2322$ para $-12,45 \pm 0,1572$; de $-60,01 \pm 2,662$ para $-12,43 \pm 0,2853$ (pA/pF), respectivamente quando comparados com as correntes controle. Enquanto que para o carvacrol, na concentração de 300 μ M a redução foi de $-32,29 \pm 5,730$ para $-15,98 \pm 2,782$ em relação ao controle.



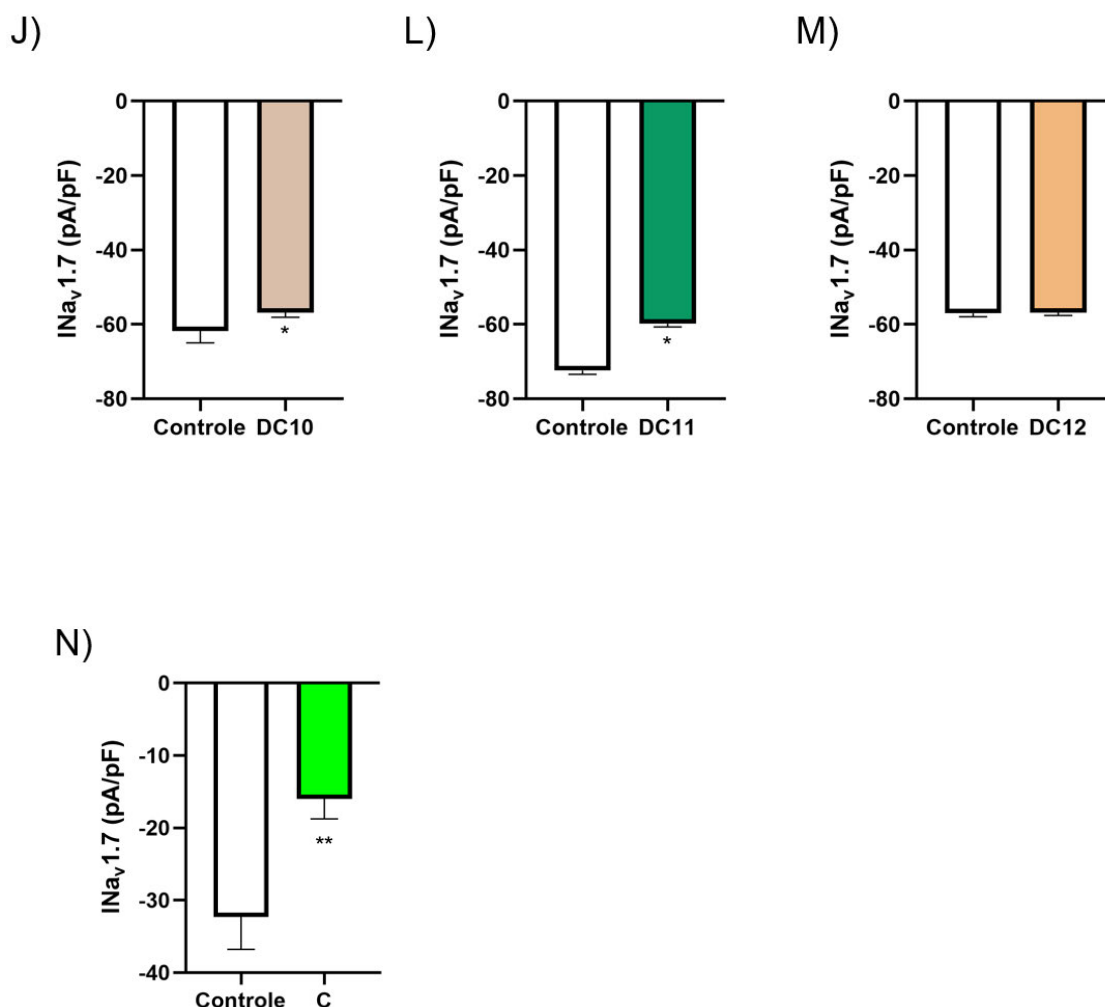


Figura 10: Efeito de Derivados do Carvacrol DC1, DC2, DC3, DC4, DC5, DC6, DC7, DC8, DC9, DC10, DC11, DC12 100 μ M (A-M) e Carvacrol 300 μ M (N) na amplitude de correntes de sódio subtipo 1.7. Os dados são expressos em densidade de corrente de Nav1.7 na situação controle e após perfusão com o composto testado, média $\pm$ DP, n=7. *p < 0,05; **p < 0,01; ***p < 0,001; e #p < 0,0001.

Um panorama geral do efeito dos derivados do carvacrol na inibição de correntes de Nav1.7, pode ser melhor compreendida na tabela 6, cujo delta de inibição foi calculado por $IN_{Nav1.7}$ controle - $IN_{Nav1.7}$ para cada DC testado. Em que mais uma vez pode-se constatar os compostos DC6, DC7, DC8 e DC9 como sendo os derivados mais promissores para dar continuidade ao estudo. Apresentando valores de delta de inibição de $IN_{Nav1.7}$ de $38,23 \pm 0,991$; $36,9 \pm 0,200$; $38,29 \pm 0,075$ e $47,58 \pm 2,376$ para

100 μM dos compostos DC6, DC7, DC8 e DC9 e de $16,31 \pm 2,948$ para 300 μM do carvacrol.

Tabela 6: Efeito de Derivados do Carvacrol (DC) 100 μM e do Carvacrol 300 μM sobre a inibição de correntes de sódio subtipo 1.7. O delta de inibição de corrente foi calculado por $I_{\text{Nav1.7}} \text{ controle} - I_{\text{Nav1.7}}$ para cada composto testado.

Derivado do Carvacrol (DC)	Δ Inibição $I_{\text{Nav1.7}}$
1	$7,96 \pm 0,092$
2	$1,69 \pm 0,937$
3	$2,11 \pm 0,001$
4	$10,84 \pm 0,104$
5	$0,92 \pm 0,575$
6	$38,23 \pm 0,991$
7	$36,9 \pm 0,200$
8	$38,29 \pm 0,075$
9	$47,58 \pm 2,376$
10	$4,95 \pm 1,960$
11	$5,02 \pm 0,227$
12	$0,78 \pm 0,144$
Carvacrol	$16,31 \pm 2,948$

A atividade do carvacrol em bloquear canais de sódio dependentes de voltagem (Nav) está bem descrita na literatura (JOCA et al., 2012) (JOCA et al., 2015b). O efeito do carvacrol nos Nav ocorre de forma não seletiva, reduzindo a amplitude de correntes de sódio total ($I_{\text{Na}^+ \text{ total}}$), ou seja, atuando amplamente sobre diferentes subtipos de canais de sódio dependentes de voltagem com valores de CI_{50} em torno de 300 μM para inibição de $I_{\text{Na}^+ \text{ total}}$.

Em relação ao canal de sódio dependente de voltagem subtipo 1.7 observou-se uma redução na amplitude de corrente de cerca de 48% na presença de 300 μM do carvacrol (figura 10N). Corroborando o efeito observado por (HORISHITA et al., 2020)

na inibição de correntes de Nav1.7 após incubação com o carvacrol, apresentando valores de CI_{50} de aproximadamente 367 μM .

Na figura 11 foi avaliado o efeito dos compostos DC6, DC7, DC8 e DC9 na redução da amplitude de correntes de sódio de forma concentração dependente. Avaliou-se a inibição de correntes de Nav1.7, sobre perfusão com os derivados 6, 7, 8, e 9 cujos valores de CI_{50} obtidos foram de 39,26 μM ; 72,80 μM ; 75,30 μM e 74,30 μM , respectivamente. Ao que parece devido a similaridades estruturais, os compostos DC7, DC8 e DC9 apresentaram valores de CI_{50} semelhantes, sugerindo que os substituintes F, Cl e Br não alteram o mecanismo de interação destes compostos com os canais de sódio dependentes de voltagem subtipo 1.7. Como ilustrado na figura 12, registros representativos de correntes de Nav1.7 nas condições controle e após perfusão com 100 μM dos compostos. O derivado do carvacrol 6 destaca-se em relação a inibição de INav1.7 por apresentar menor valor de CI_{50} quando comparado com os demais (figura 13). Ademais o DC6 possui valor de CI_{50} cerca de 10 vezes menor do que o carvacrol, tornando-o assim o composto selecionado para dar prosseguimento aos estudos realizados neste trabalho.

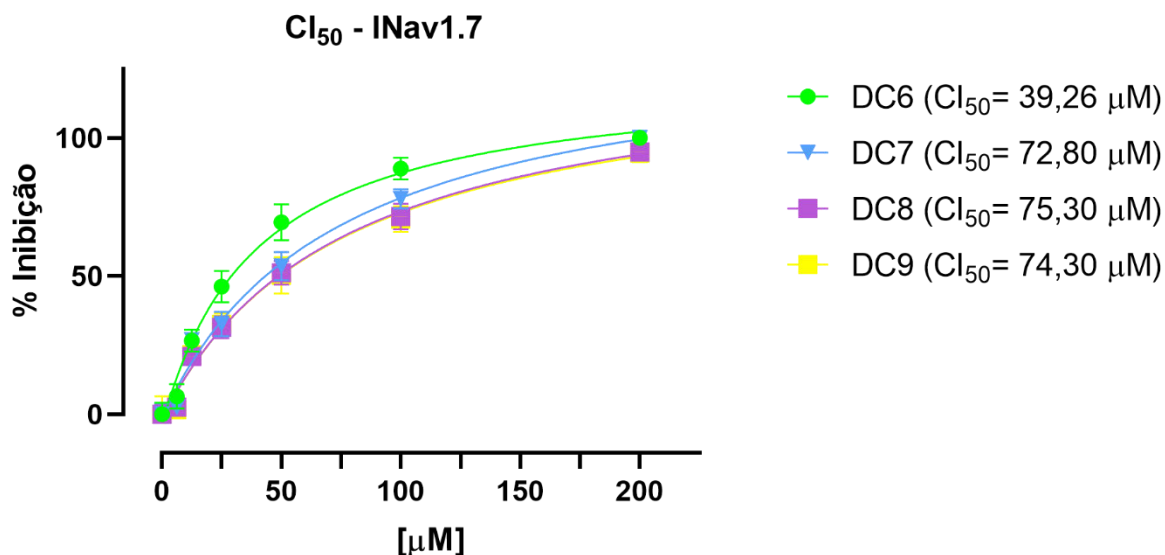


Figura 11: Avaliação da dependência de concentração dos Derivados do Carvacrol sobre a inibição de correntes de Nav1.7 com os respectivos valores de CI_{50} para o DC6, DC7, DC8 e DC9. $R^2 \geq 0,99$

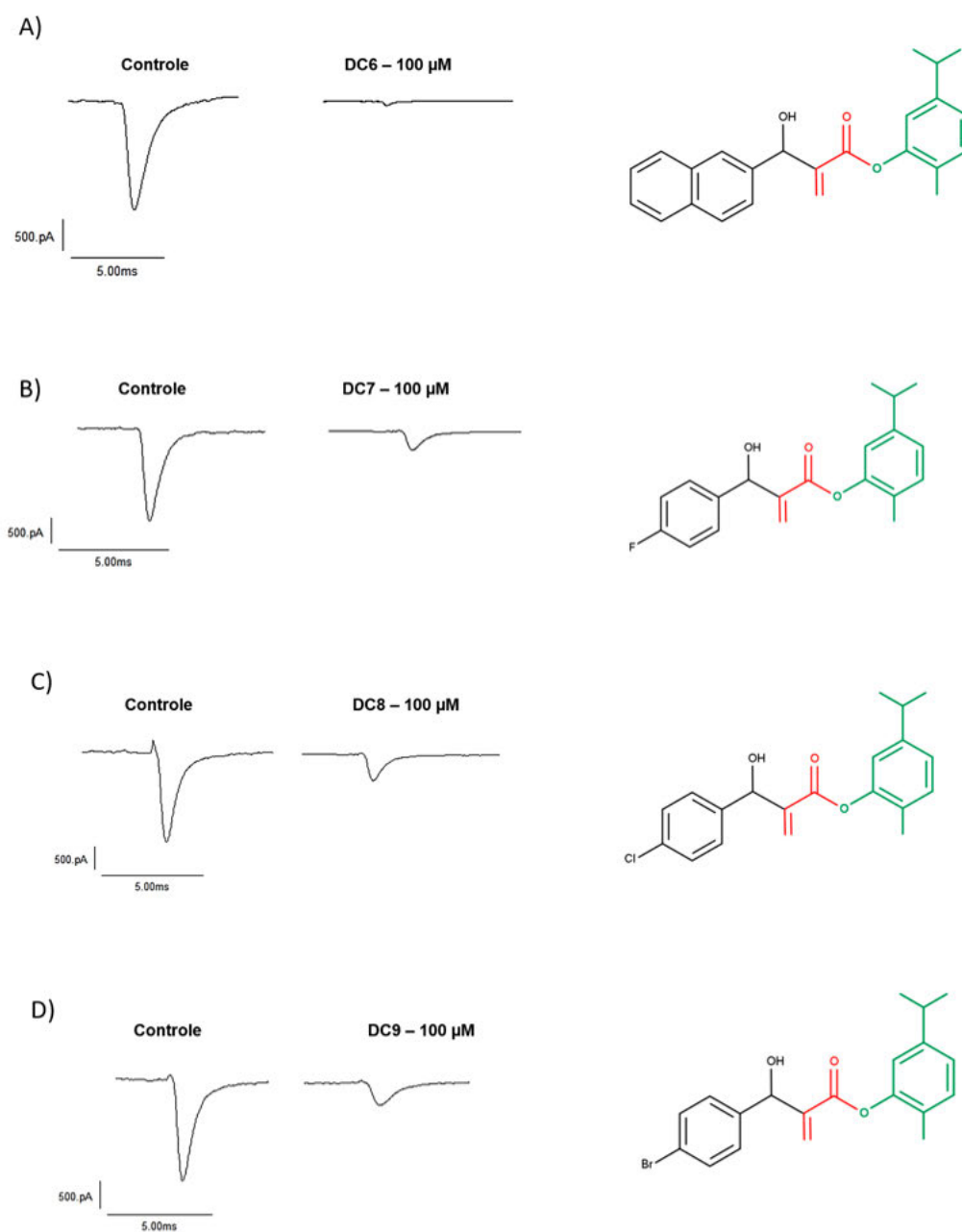


Figura 12: Registros representativos de correntes de sódio subtipo 1.7 (pA) nas situações controle e após perfusão com os derivados do carvacrol DC6, DC7, DC8 e DC9 (A-D) ao lado das respectivas estruturas químicas.

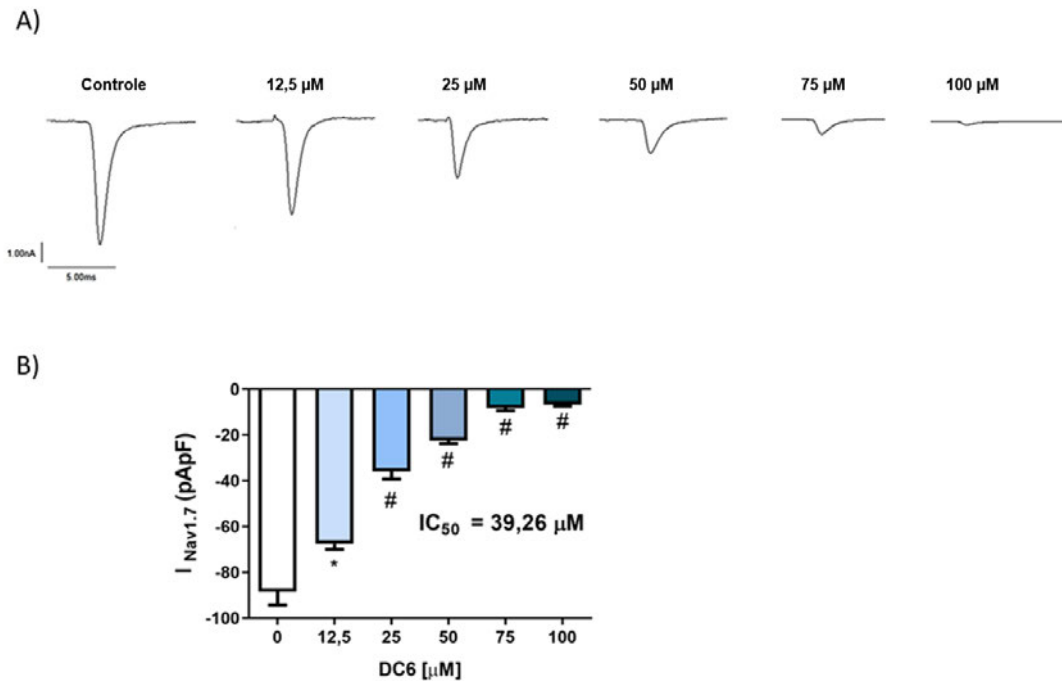


Figura 13: IC₅₀ derivado do carvacrol 6 em células CHO-hNav1.7 A) Registros representativos de corrente de sódio subtipo 1.7 na situação controle e após perfusão com diferentes concentrações do DC6. B) Densidade de corrente de Nav1.7 na situação controle e após perfusão com diferentes concentrações do composto, os valores estão expressos como média ± DP n=7 para cada concentração. *p < 0,05, #p < 0,0001.

Com base nos estudos realizados por (JOCA et al., 2015) sugere-se que o carvacrol seja um bloqueador de poro dos canais de sódio dependentes de voltagem, agindo de forma não-seletiva diminuindo a excitabilidade nervosa em neurônios do gânglio da raiz dorsal (DRG). Bloqueando indistintamente ambos os grupos de canais de sódio dependentes de voltagem, os sensíveis à tetrodotoxina (TTX-S) e os resistentes à tetrodotoxina (TTX-R). Corroborando o efeito do carvacrol em diferentes subtipos de canais de sódio foi demonstrado por (HORISHITA et al., 2020), por meio da super expressão de Nav1.2, Nav1.3, Nav1.6, Nav1.7 e Nav1.8 em ovócitos de *Xenopus*. Em que o carvacrol reduziu o pico das correntes de sódio de Nav1.2, Nav1.3, Nav1.6, Nav1.7, e Nav1.8 em cerca de 61 ± 3%, 30 ± 2%, 63 ± 1%, 45 ± 2%, e 16 ± 2% respectivamente. Confirmando a não seletividade do carvacrol dentre os

diferentes subtipos de Nav. Porém, o mecanismo de ação pelo qual o carvacrol bloqueia estes canais ainda não foi elucidado.

Na figura 14, observa-se o decurso temporal de inibição de correntes de Nav1.7 para o DC6 na concentração de 40 μM e para o Carvacrol na concentração de 300 μM . Cujas inibições de corrente exercidas pelo DC6 se dá de forma mais rápida, sendo a redução de amplitude de corrente de Nav1.7 iniciada aos 20 segundos, ao contrário do carvacrol em que o efeito se iniciou próximo aos 40 segundos, resultando em curvas de decurso temporal de inibição de INav1.7 com perfis diferentes. Sugere-se que possivelmente o mecanismo de ação pelo qual o DC6 exerce a inibição de correntes de Nav1.7 seja diferente do bloqueio de canais de sódio dependentes de voltagem exercido pelo carvacrol. Entretanto estudos adicionais se fazem necessários para melhor elucidação desta hipótese.

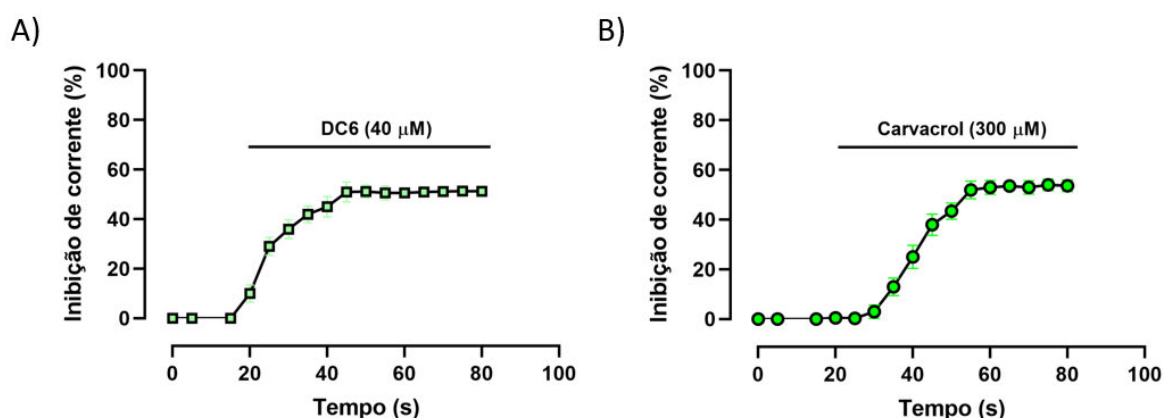


Figura 14: Decurso temporal de inibição de correntes de Nav1.7. A) DC6 40 μM B) Carvacrol 300 μM

Como observado até então, este trabalho contou com o estudo de doze compostos semissintéticos derivados do carvacrol à base de adutos de Morita-Baylis-Hillman que apresentaram um maior efeito inibitório sobre correntes de sódio subtipo 1.7 quando comparados ao carvacrol, apêndice 2.

5.2 Análise toxicológica.

A alta toxicidade apresentada pelos compostos anticâncer disponíveis na clínica limita o uso de vários medicamentos, o que por muitas vezes leva à redução da qualidade de vida do paciente, ajustes de dosagem, e até mesmo suspensão da administração, tornando a busca por novas terapias uma prioridade. Visando o desenvolvimento de novos fármacos com propriedades antitumorais, destaca-se o ensaio preliminar para avaliação da toxicidade de compostos por *Artemia salina*, sendo uma das maiores vantagens do teste o baixo custo e a simplicidade do ensaio (NTUNGWE N et al., 2020) (KACHENTON et al., 2019) (THIAGARAJAN et al., 2020) (CIBULSKI et al., 2021) (PECORARO et al., 2021).

Na figura 15 foi avaliado a toxicidade dos compostos DC6, DC7, DC8 e DC9 em náuplios de *Artemia salina*, nas concentrações de 0 μM à 100 μM . Em relação ao percentual de mortalidade, o DC6 não apresentou toxicidade em nenhuma das concentrações estudadas, com uma baixíssima taxa de mortalidade, enquanto que os demais compostos induziram mortalidade a partir da concentração de 50 μM , com um percentual de mortalidade acima de 60% na concentração máxima estudada (100 μM). Com base nos resultados obtidos, o composto DC6 destacou-se entre os derivados do carvacrol 7, 8, e 9 por apresentar uma baixa toxicidade em um organismo multicelular de baixa complexidade, sendo assim o composto mais adequado para dar continuidade às investigações.

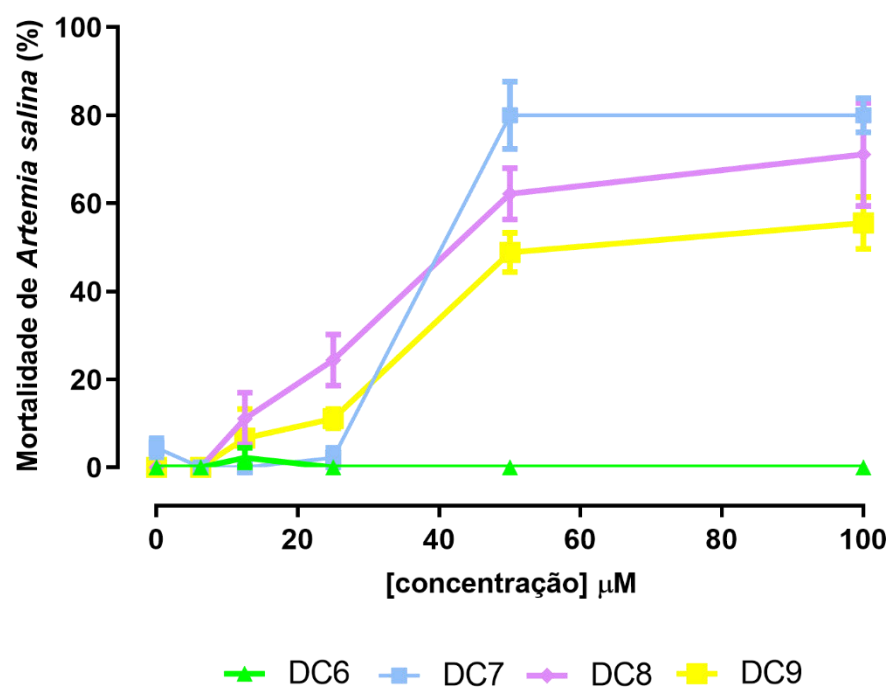


Figura 15: Efeito de Derivados do Carvacrol 6, 7, 8 e 9 na mortalidade de *Artemia salina*, após 24h de incubação com os compostos.

5.3 Determinação da citotoxicidade do Derivado do Carvacrol 6.

5.3.1 Efeito citotóxico do DC6 em células tumorais.

Visando o desenvolvimento de novos fármacos com potencial antitumoral, os ensaios de citotoxicidade são pioneiros, uma vez que o mecanismo de controle do câncer mais explorado atualmente é a indução da morte celular. Sem mencionar que os estudos de citotoxicidade podem ser feitos em células cancerosas e não cancerosas, explorando a discussão sobre seletividade e baixa reatividade tóxica as células de tecidos saudáveis (RISS; MORAVEC; NILES, 2013). O efeito citotóxico do DC6 foi avaliado pelo método de redução do MTT, em diferentes linhagens de neuroblastoma (SH-SY5Y, Neuro-2A, IMR-32 e SH-EP).

A citotoxicidade do DC6 frente as linhagens de neuroblastoma SH-SY5Y e Neuro-2A pode ser observada na figura 16. Para as linhagens SH-SY5Y os valores de CI_{50} foram de $23,36 \pm 1,05 \mu M$ e $8,7 \pm 2,06 \mu M$ nos tempos de 24 h e 72 h, respectivamente. Enquanto que para linhagem de neuroblastoma murino NEURO-2A, os valores de CI_{50} após 24 horas de incubação com o DC6 foi de $26,49 \pm 2,56 \mu M$ e de $12,00 \pm 2,79 \mu M$ no tempo de 72 horas. Enquanto que para as linhagens IMR-32 e SH-EP os valores de CI_{50} foram de $0,35 \pm 1,00$ e $50 \pm 1,08$ após 24 h de incubação com o DC6 (tabela 7).

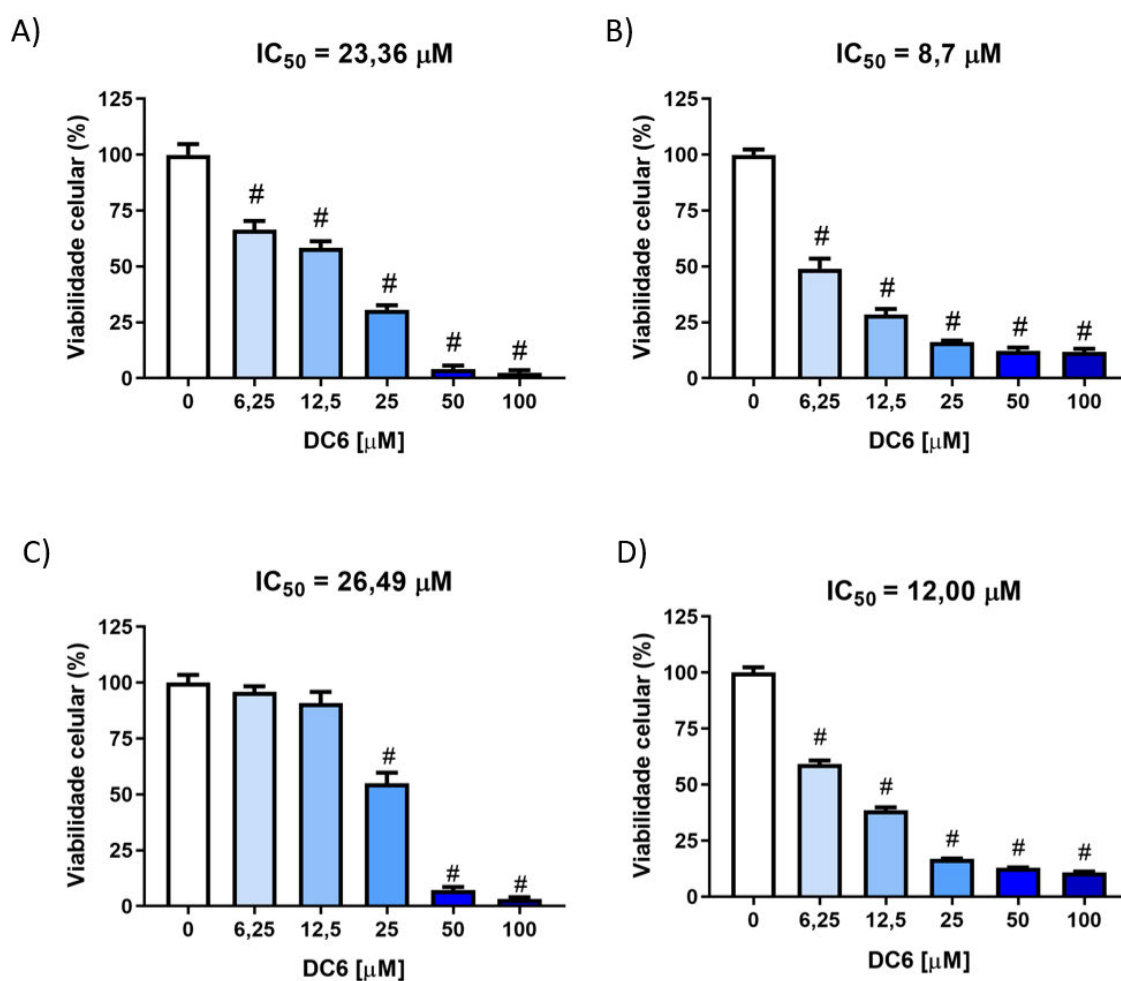


Figura 16: Citotoxicidade do DC6 em linhagens celulares de neuroblastomas SH-SY5Y e Neuro-2A. A-B, Células SH-SY5Y avaliadas pelo método de MTT, após 24h e 72h de tratamento, respectivamente. C-D, Células Neuro-2A avaliadas pelo método de MTT, após 24h e 72h de tratamento, respectivamente. Os dados estão representados como média $\pm$ EPM, n=3. #p < 0,0001.

Tabela 7: Valores de CI_{50} para citotoxicidade do DC6 nas linhagens celulares testadas pelo método de MTT, após 24h e 72h de tratamento. Os dados estão representados como média $\pm$ EPM de três experimentos independentes.

Linhagens Tumorais	CI_{50} 24 h (μM)	CI_{50} – 72 h (μM)
<i>SH-SY5Y</i>	23,36 $\pm$ 1,05	8,7 $\pm$ 2,06
<i>Neuro-2A</i>	26,49 $\pm$ 2,56	12,00 $\pm$ 2,79
<i>IMR-32</i>	0,35 $\pm$ 1,00	-
<i>SH-EP</i>	50 $\pm$ 1,08	-
<i>U87</i>	-	> 100
<i>U373MG</i>	-	> 100
Linhagens Não Tumorais		
<i>L929</i>	> 100	> 100
<i>HEK 293</i>	> 100	> 100

Uma característica geral das linhagens de neuroblastoma é a elevada expressão de canais iônicos dependentes de voltagem, dentre estes membros da família de canais para cálcio e canais para potássio e essencialmente canais para sódio dependentes de voltagem, compondo assim a maquinaria celular necessária para conferir excitabilidade elétrica a estas células neuronais. A linhagem celular SH-SY5Y expressa consideravelmente canais de sódio dependentes de voltagem subtipo 1.7 em suas membranas (VETTER et al., 2012). Assim como para as linhagens Neuro-2A (CHIBA et al., 2022) e IMR-32 (GINSBORG; MARTIN; PATMORET, 1991b) (EP 1 534 311 B1), cuja composição celular de Navs é majoritariamente de Nav1.7.

Para a linhagem SH-EP ainda não se tem uma literatura consistente a respeito da expressão de canais iônicos. Estudos adicionais se fazem necessários para validação. Porém com base nos resultados de citotoxicidade obtidos nas demais linhagens de neuroblastomas estudadas SH-SY5Y, Neuro-2A e IMR-32 e sabendo-se que o DC6 é um bloqueador de Nav1.7, possivelmente o efeito citotóxico do DC6 nestas células pode estar correlacionado à expressão de Nav1.7.

Corroborando a esta hipótese foi avaliado o efeito citotóxico do DC6 em células de gliomas humanos U87 e U373MG que possuem uma expressão baixíssima de Nav1.7 (SCHREY et al., [s.d.]). Como observado na tabela 7, após tratamento com DC6 por 72 h ambos os gliomas apresentaram valores de CI_{50} acima de 100 μ M. Destacando-se o efeito do composto DC6 sobre células com níveis de expressão de Nav1.7 elevados (SHERGALIS et al., 2018). Reforçando o envolvimento do Nav1.7 no mecanismo de ação do DC6.

5.3.2 Efeito citotóxico da Doxorrubicina em neuroblastomas.

A doxorrubicina é um dos quimioterápicos mais amplamente utilizados na terapêutica de múltiplos tipos de câncer, podendo também ser utilizada para o tratamento de neuroblastomas (TRAN et al., 2015) (NAMKAEW et al., 2018). Assim, avaliou-se o efeito citotóxico da doxorrubicina na linhagem de neuroblastoma SH-SY5Y, no tempo de 24 h apresentando valores de IC_{50} menor que $0,625 \mu M$ (figura 17). (ZHANG et al., 2012) (BAKIREL et al., 2017) (FRACZKOWSKA et al., 2018) (LV et al., 2020). Apesar do efeito citotóxico da doxorrubicina em células tumorais, seu uso é limitado por fatores como resistência a drogas, toxicidade e insuficiência cardíaca congestiva relatada em alguns pacientes (PETER et al., 2022). Porém, o efeito terapêutico da doxorrubicina ainda sobressai aos efeitos colaterais, possivelmente devido à escassez de fármacos apropriados para o tratamento do câncer.

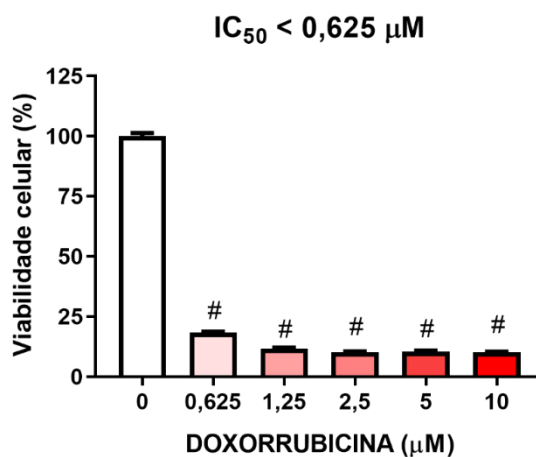


Figura 17: Citotoxicidade da Doxorrubicina na linhagem SH-SY5Y, avaliada pelo método de MTT, após 24h de tratamento. Os dados estão representados como média $\pm$ EPM, $n=3$. # $p < 0,0001$.

5.3.3 Efeito citotóxico do DC6 em células não tumorais.

O surgimento de novas terapias para o tratamento do câncer cresce diariamente, porém a falta de moléculas que possam atuar em alvos direcionados ainda é preocupante. Considerando cânceres pediátricos como o neuroblastoma, este problema é ainda mais grave, já que a disponibilidade de drogas direcionadas para este grupo é mínima (MATTIUZZI; LIPPI, 2019b) (KATTNER et al., 2019b).

A avaliação da citotoxicidade de futuros candidatos a fármacos em células saudáveis é extremamente relevante, sendo a etapa responsável por inviabilizar o investimento dos estudos em grande parte das moléculas. Assim, a citotoxicidade do DC6 foi avaliada nas linhagens celulares não tumorais, HEK-293 e L929, nos tempos de 24h e 72h. Para ambas os valores de CI_{50} obtidos foram maiores que 100 μ M, como observado na tabela 7, indicando a baixa citotoxicidade do DC6 em células não cancerosas (apêndice 3).

Com base nos resultados obtidos, observa-se que o composto DC6 apresenta uma maior seletividade para linhagens tumorais do tipo neuroblastoma com elevada expressão de Nav1.7 (SH-SY5Y, Neuro-2A e IMR-32) quando comparadas as linhagens celulares não tumorais. Corroborando o resultado observado em náuplios de *Artemias salinas*, tornando o composto um candidato relevante para se prosseguir com os ensaios experimentais visando o desenvolvimento de um candidato à fármaco com atividade antitumoral.

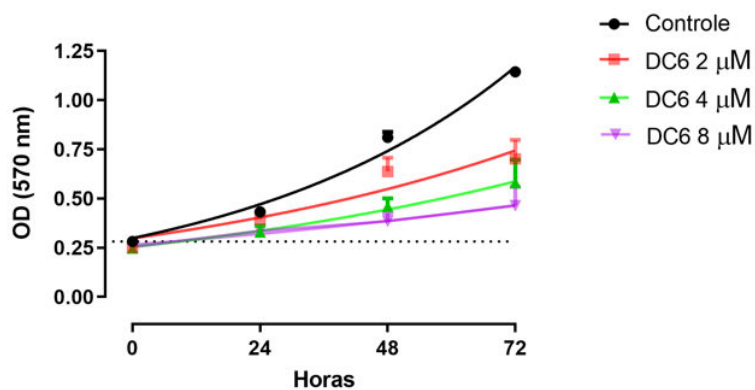
5.4 Efeito do DC6 na proliferação celular de neuroblastomas

Os neuroblastomas são tumores muito agressivos com alta taxa proliferativa. O conhecimento sobre os mecanismos de proliferação desse tipo de câncer contribui para a compreensão da sua origem e propagação (PONZONI et al., 2022). Drogas capazes de modular essa etapa da progressão tumoral apresentam relevância clínica.

Neste estudo foi realizada a avaliação do efeito antiproliferativo do DC6 em células SH-SY5Y, tratadas com concentrações sub-tóxicas 2 μ M, 4 μ M e 8 μ M em diferentes tempos de incubação. Na figura 18A observa-se que o DC6 reduziu a taxa de crescimento celular desde a menor concentração estudada a partir de 48 h de incubação. Na figura 18B observa-se a porcentagem de inibição da proliferação em relação ao controle no período de 72 h de tratamento com o DC6, em que os valores de inibição do crescimento celular foram de 39,62%, 50,13% e 60,14% nas concentrações de 2 μ M, 4 μ M e 8 μ M do DC6, respectivamente.

O controle da taxa proliferativa com o uso de concentrações sub-tóxicas traz benefícios para o tratamento deste tipo de câncer, devido ao rápido crescimento tumoral já citado, a dificuldade é inerente a todas as escalas do tratamento, afetando até mesmo, a incisão cirúrgica do tumor quando aplicável (LOUIS; SHOHET, 2015) (TSUBOTA; KADOMATSU, 2018).

A)



B)

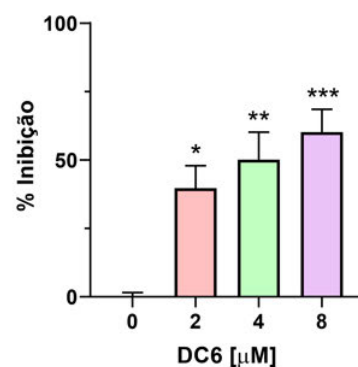


Figura 18: Efeito do DC6 na proliferação de células SH-SY5Y. A) Avaliação da proliferação em células SH-SY5Y após tratamento com o DC6 durante o período de 72h. B) Porcentagem de inibição da proliferação após tratamento de 72h com o DC6. Os dados estão representados como média $\pm$ DP, $n=3$. * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$; *** $p < 0,001$.

5.5 Avaliação do efeito do DC6 na migração celular

5.5.1 Efeito do DC6 na migração celular

O neuroblastoma é um câncer altamente metastático em que grande parte dos casos de morte estão relacionados a progressão metastática da doença. Porém para que a cascata metastática tenha início e a célula deixe o tumor primário migrando para outros sítios, faz-se necessário uma série de alterações no microambiente tumoral. (ARA; DECLERCK, 2006; STOLETOV; BEATTY; LEWIS, 2020). Modificações estas que se tornaram alvo para o desenvolvimento de novos candidatos à fármacos.

Sabendo da importância dos canais de sódio dependentes de voltagem na cascata metastática e progressão tumoral. Foi investigado o efeito do DC6, bloqueador de Nav1.7 estudado neste trabalho, sobre a motilidade de células SH-SY5Y. As células foram tratadas com 2 μ M, 4 μ M e 8 μ M do DC6 por 48 h. A partir da menor concentração testada nota-se uma redução da motilidade celular de forma concentração dependente após o tratamento (figura 19). A taxa de migração celular no tempo de 48 h foi de: 45,16%; 39,99% e 19,13% para as concentrações de 2 μ M, 4 μ M e 8 μ M do composto respectivamente, quando comparados com a taxa de migração controle de 100% (figura 20). Estes resultados sugerem que o bloqueio de Nav1.7 é capaz de reduzir a motilidade de células provenientes de neuroblastomas com expressão aumentada destes canais.

Para melhor esclarecimento da ação do DC6 na migração celular, foi investigado o efeito do composto na taxa de migração em células CHO transfectadas permanentemente com Nav1.7, utilizando-se adicionalmente da Tetrodotoxina, como ferramenta farmacológica para o bloqueio de Nav1.7. Como observado nas figuras 21 e 22 considerando o controle como 100% de migração, após 72 h de incubação com 300 nM de TTX a taxa de migração celular obtida foi de 42,79% e para 8 μ M de DC6 foi de 34,59%. Em que o DC6 apresentou efeito similar a TTX na redução da taxa de migração celular. Assim, a partir destes resultados sugere-se que a motilidade celular em neuroblastomas é reduzida pelo bloqueio de Nav1.7.

É importante ressaltar que a taxa de migração das células CHO-Nav1.7 na situação controle esteve com níveis basais reduzidos devido a impossibilidade de utilizar soro bovino fetal (SBF) neste ensaio, pois o mesmo iria reduzir a biodisponibilidade de TTX livre para bloquear os canais de sódio, devido interação da toxina com albumina presente no SBF (MATSUMOTO et al., 2010). Porém isto não comprometeu a importância do resultado, já que o SBF foi removido de todas as situações experimentais neste ensaio.

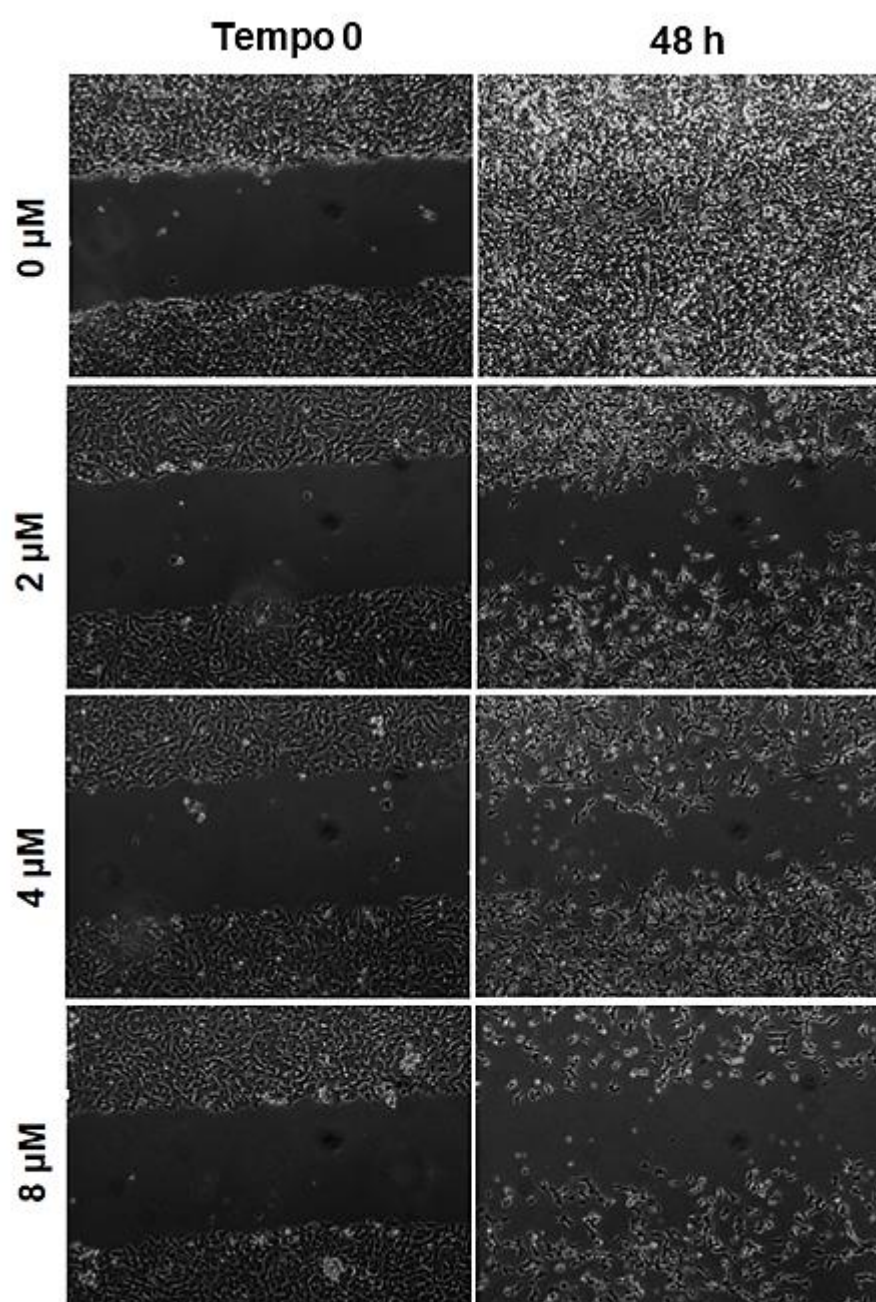


Figura 19: Imagens representativas do ensaio de migração de células SH-SY5Y, nos tempos 0 h e 48 h, na situação controle e após incubação com 2 μM , 4 μM e 8 μM do DC6.

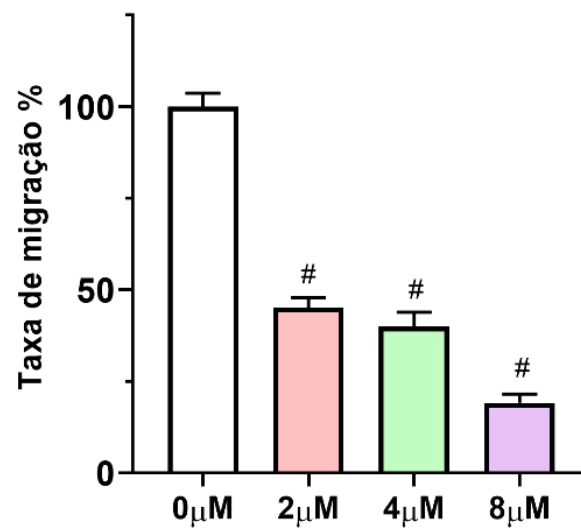


Figura 20: Efeito do DC6 na migração de células SH-SY5Y no tempo de 48 h. Os dados estão representados como média $\pm$ DP, $n = 3$. * # $p < 0,0001$.

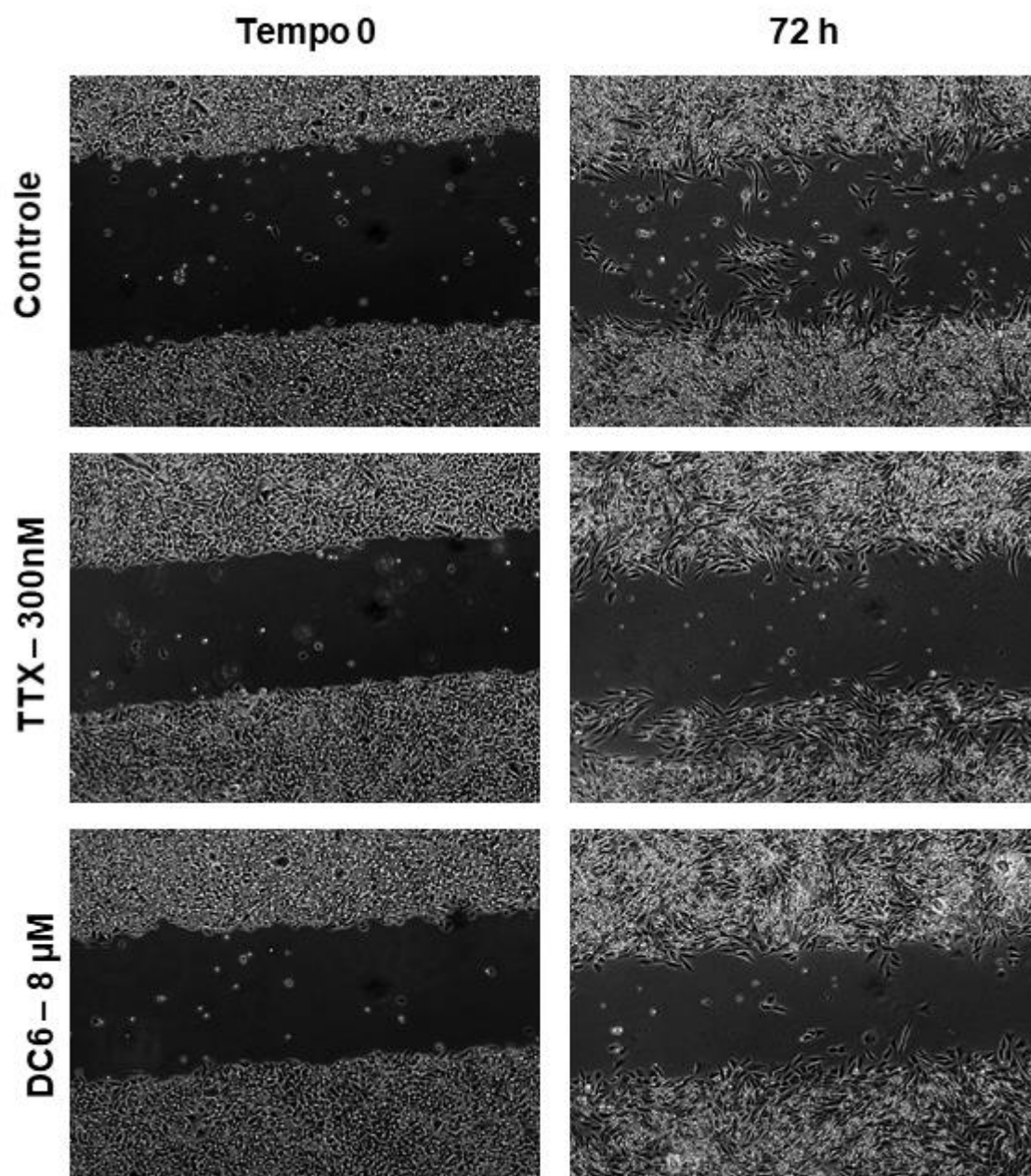


Figura 21: A) Imagens representativas do ensaio de migração em células CHO-Nav1.7, nos tempos 0 h e 72 h, na situação controle e após incubação com 300 nM de TTX e 8 μ M do DC6.

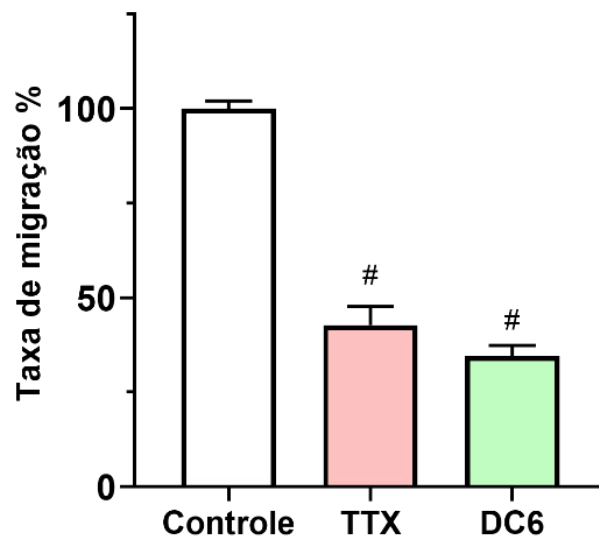


Figura 22: Efeito do DC6 na migração de células CHO-Nav1.7 no tempo de 72 h, na situação controle e após incubação com 300 nM de TTX e 8 μ M do DC6. Os dados estão representados como média $\pm$ DP, n = 3. * #p < 0,0001.

5.5.2 Efeito da Lidocaína na migração de células SH-SY5Y.

Inúmeros bloqueadores de canais de sódio vêm sendo testados visando à redução dos processos de migração em tumores com alta capacidade metastática, tais como a fenitoína (NELSON et al., 2015) e lidocaína (SHEETS; JARECKI; CUMMINS, 2011) (SUI et al., 2019) (SOTO; CALERO; NARANJO, 2020). Neste estudo investigamos o efeito da lidocaína na motilidade de células SH-SY5Y bem como uma provável correlação com o bloqueador de Nav1.7 DC6. A taxa de migração celular no tempo de 48 h após incubação com 4 μ M do DC6 foi de 38,87% e de 39,69% após incubação com 200 μ M de lidocaína, enquanto que para a combinação de Lidocaína/DC6 foi de 27,6%.

Na concentração testada a lidocaína bloqueia tanto os canais de sódio dependentes de voltagem TTX-S quanto TTX-R (SCHOLZ et al., 1998). Na linhagem SH-SY5Y há a expressão majoritária de Nav1.3 e Nav1.7 ambos pertencentes ao grupo de canais de sódio TTX-S. Na concentração testada a lidocaína reduziu a taxa de migração de forma equivalente ao efeito observado após incubação com 4 μ M do DC6. Entretanto para a combinação Lidocaína/DC6 a taxa de migração celular apresentou uma redução adicional quando comparada aos dados obtidos apenas com a Lidocaína. Estudos adicionais se fazem necessários para o melhor esclarecimento deste efeito, sugere-se o envolvimento de outros subtipos de canais de sódio dependentes de voltagem.

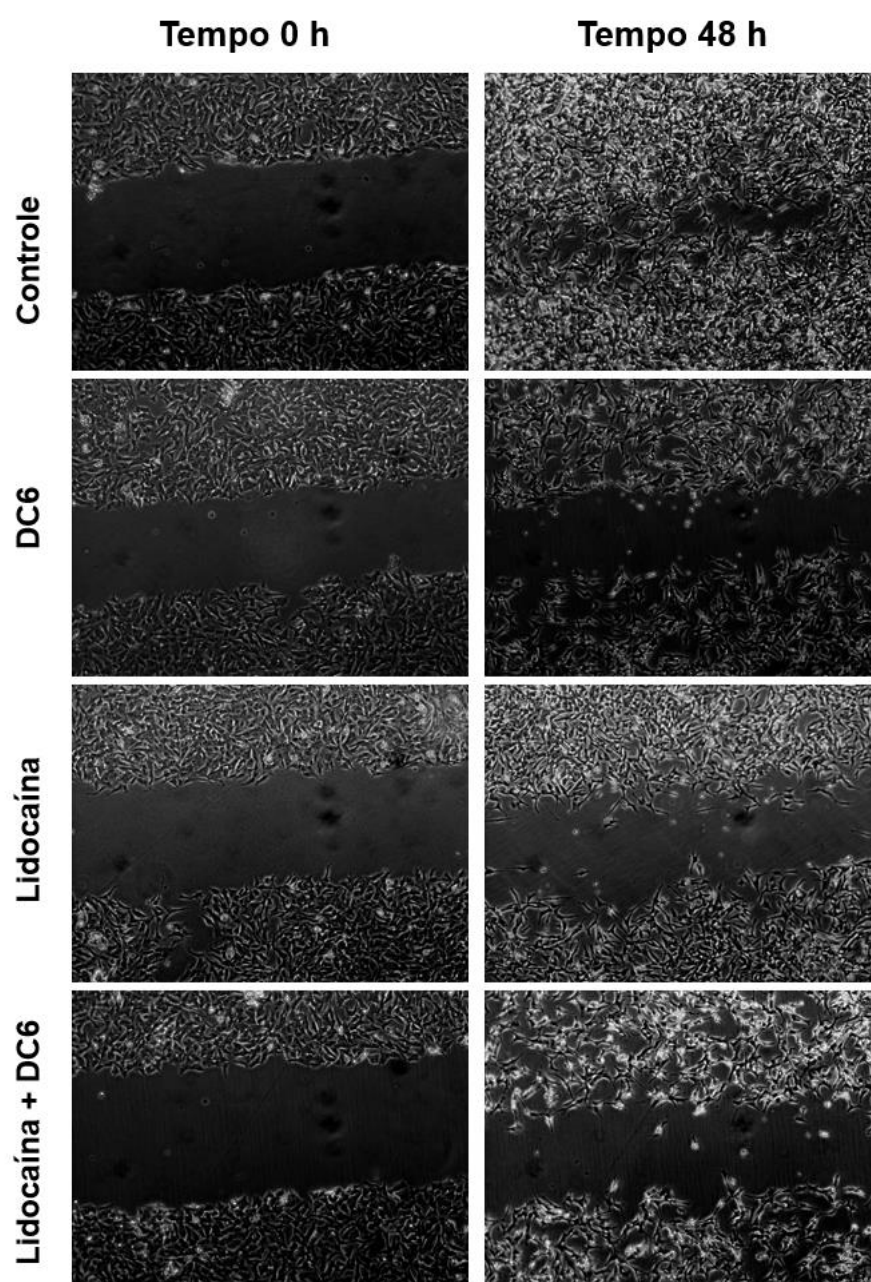


Figura 23: A) Imagens representativas do ensaio de migração em células SH-SY5Y, nos tempos 0 h e 48 h, nas situações controle, após incubação com 8 μ M do DC6, 200 μ M de Lidocaína e a combinação de ambos.

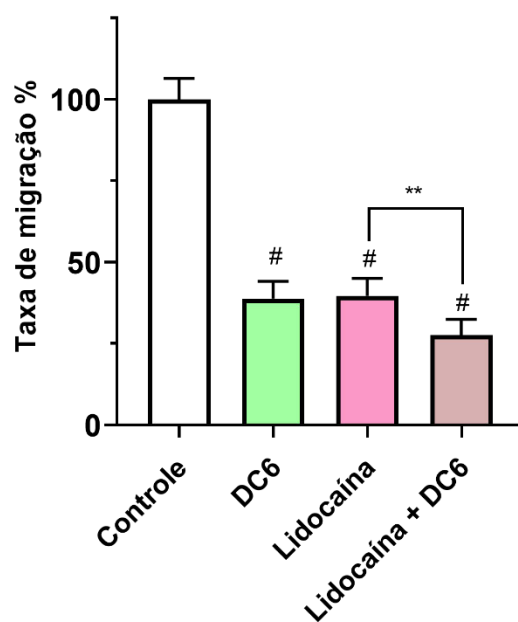


Figura 24: Efeito do DC6 na migração de células SH-SY5Y, nos tempos 0 h e 48 h, nas situações controle, após incubação com 8 μ M do DC6, 200 μ M de Lidocaína e a combinação de ambos. Os dados estão representados como média $\pm$ DP, n = 3. **p < 0,01 * #p < 0,0001.

5.6 Análise da Indução de apoptose

Para investigar o mecanismo de morte celular pelo qual o composto DC6 reduz a viabilidade celular em neuroblastomas, foi realizado o ensaio de detecção da externalização da fosfatidilserina por citometria de fluxo. As células SH-SY5Y foram tratadas com concentrações crescentes do DC6 (6,25 μ M; 12,5 μ M e 25 μ M) ou com 0,6 μ M de doxorubicina por 24 h. Como mostra a figura 25 o DC6 promoveu um aumento dos percentuais de apoptose tardia com valores de 1,39% na situação controle e de 6,83%; 8,85% e 21,3% nas concentrações de 6,25 μ M; 12,5 μ M e 25 μ M, respectivamente e de 23,37% para 0,6 μ M de Doxorubicina.

O percentual de necrose também foi concentração dependente sendo 2,71% na condição controle e de 5,4%; 8,6% e 18,6% nas concentrações de 6,25 μ M; 12,5 μ M e 25 μ M do DC6, respectivamente e de 62,70% para 0,6 μ M de Doxorubicina (figura 25). O valor máximo de apoptose precoce foi de 0,1% em 25 μ M do DC6. Assim, verificou-se que a morte celular promovida pelo DC6 foi concentração dependente, destacando-se os mecanismos de morte celular apoptose tardia e necrose. Sendo o percentual de necrose para doxorubicina cerca de 4 vezes maior do que o DC6.

A necrose é geralmente observada como um ponto final, se tratando de cultura de células pela presença de fragmentos celulares no meio, o que é descrito em muitos casos em um ambiente de cultura de células como necrose podem ser os restos de células apoptóticas tardias, cujos corpos apoptóticos perderam a integridade. Em condições *in vivo* esses corpos apoptóticos seriam fagocitados pelo patrulhamento de glóbulos brancos, porém, em condições de cultivo celular isso não ocorre, podendo confundir o diagnóstico do exato mecanismo de morte celular (D'ARCY, 2019).

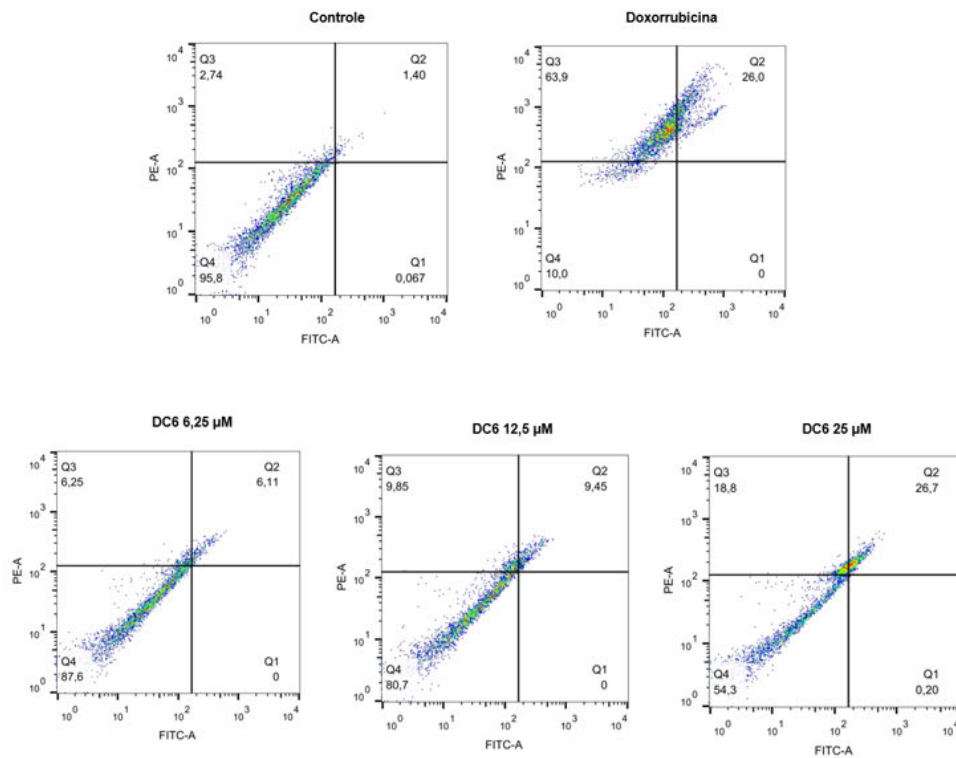
Em alguns casos é o tipo de estímulo e/ou o grau de estímulo que determina se as células morrem por apoptose ou necrose. Em doses baixas, uma variedade de estímulos nocivos, como calor, radiação, hipóxia e drogas anticancerígenas citotóxicas, podem induzir a apoptose, mas esses mesmos estímulos podem resultar em necrose em doses mais altas (ELMORE, 2007).

Apesar da farmacoterapia da doxorrubicina está bem estabelecida na clínica para o tratamento de vários tipos de câncer, os muitos efeitos colaterais devido à ausência de seletividade para células cancerosas e à alta toxicidade principalmente para o coração, cérebro, fígado e rins, ainda são preocupantes e muitas vezes limitam o uso do fármaco (TACAR; SRIAMORNSAK; DASS, 2013). Uma outra característica da doxorrubicina é apresentar múltiplos mecanismos de ação como: apoptose, autofagia, senescência e necrose (MEREDITH; DASS, 2016). Porém, a sua importância para o tratamento do câncer é incontestável (SHIN et al., 2015).

O Carvacrol é descrito na literatura por apresentar atividade antitumoral, promovendo morte celular por apoptose em linhagens de câncer de ovário SKOV-3 (ELBE et al., 2020), câncer de colón linhagens HCT116 e LoVo (FAN et al., 2015) e câncer de mama na linhagem MCF-7 (MARI et al., 2021). Importante mencionar que para todas as linhagens celulares tumorais acima citadas os valores de CI_{50} para a citotoxicidade do carvacrol foi acima de 200 μ M. Alguns derivados do carvacrol como os complexados com cobre/base de Schiff descritos por (BANSAL et al., 2022) induziram a morte celular por apoptose na linhagem de câncer de pulmão A549, apresentando valores de IC_{50} para a viabilidade de células A549 foram de 278.3 ± 4.33 , 492.79 ± 4.05 , e 233.49 ± 4.18 μ g/mL, para o aldeído de carvacrol, a base de Schiff e o complexo de base de cobre-Schiff, respectivamente.

.

A)



B)

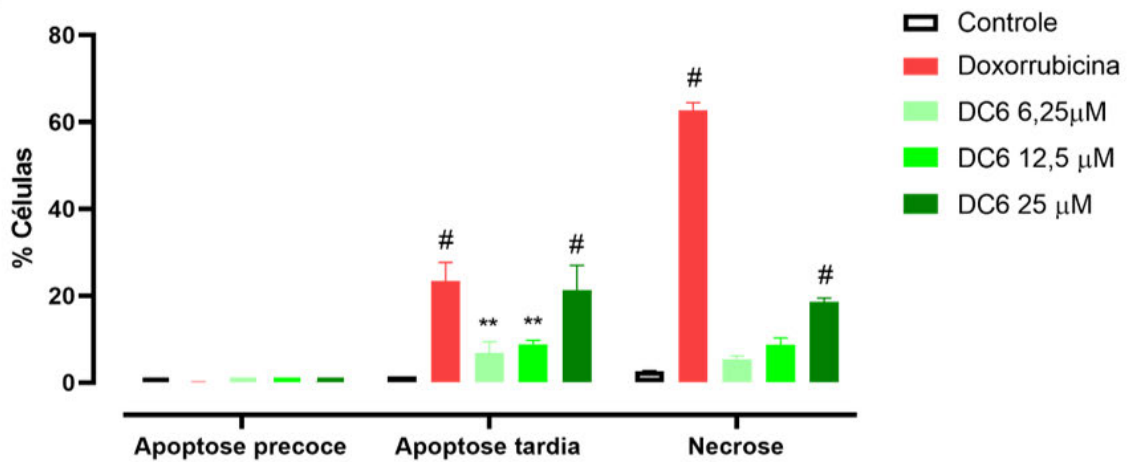


Figura 25: Indução de apoptose quantificada por citometria de fluxo na linhagem SH-SY5Y após 24 h de incubação com o DC6 (6,25; 12,5 e 25 μ M) ou com Doxorubicina (0,6 μ M). A) Quadrante inferior esquerdo: % células viáveis. Quadrante inferior direito: % células em apoptose precoce. Quadrante superior direito: % de células em apoptose tardia. Quadrante superior esquerdo: % células em necrose. B) % células em apoptose precoce, apoptose tardia e necrose frente ao DC6 (6,25; 12,5 e 25 μ M) ou Doxorubicina. **p < 0,01; #p < 0,0001

5.7 Análise morfológica em célula única por microscopia de fluorescência.

Na figura 26 observa-se a análise morfológica da linhagem de neuroblastoma SH-SY5Y incubada durante 24 h com o composto DC6 nas concentrações de 6,25 μM , 12,5 μM e 25 μM . Nota-se uma expressiva desorganização dos filamentos do citoesqueleto (F-actina marcada com faloidina-alexafluor 680), mais especificamente dos filamentos de actina, apresentando um efeito dependente de concentração do DC6. Além disso pode-se observar uma completa fragmentação do citoesqueleto, condensação e compartimentação de cromatina (marcada com DAPI) na concentração de 25 μM do DC6. Um indicativo de que o DC6 está promovendo morte celular em neuroblastomas.

Já é bem descrito na literatura que a reorganização das estruturas do citoesqueleto é um dos marcadores morfológicos chave da morte celular por apoptose bem como a condensação e compartimentalização de cromatina (CARUSO et al., 2019) (HARRIS; BOLANOS-GARCIA; MARLES-WRIGHT, 2020). Corroborando os resultados observados pelo ensaio de detecção da externalização da fosfatidilserina por citometria de fluxo, por meio da análise de célula única tem-se um indicativo de morte celular por apoptose.

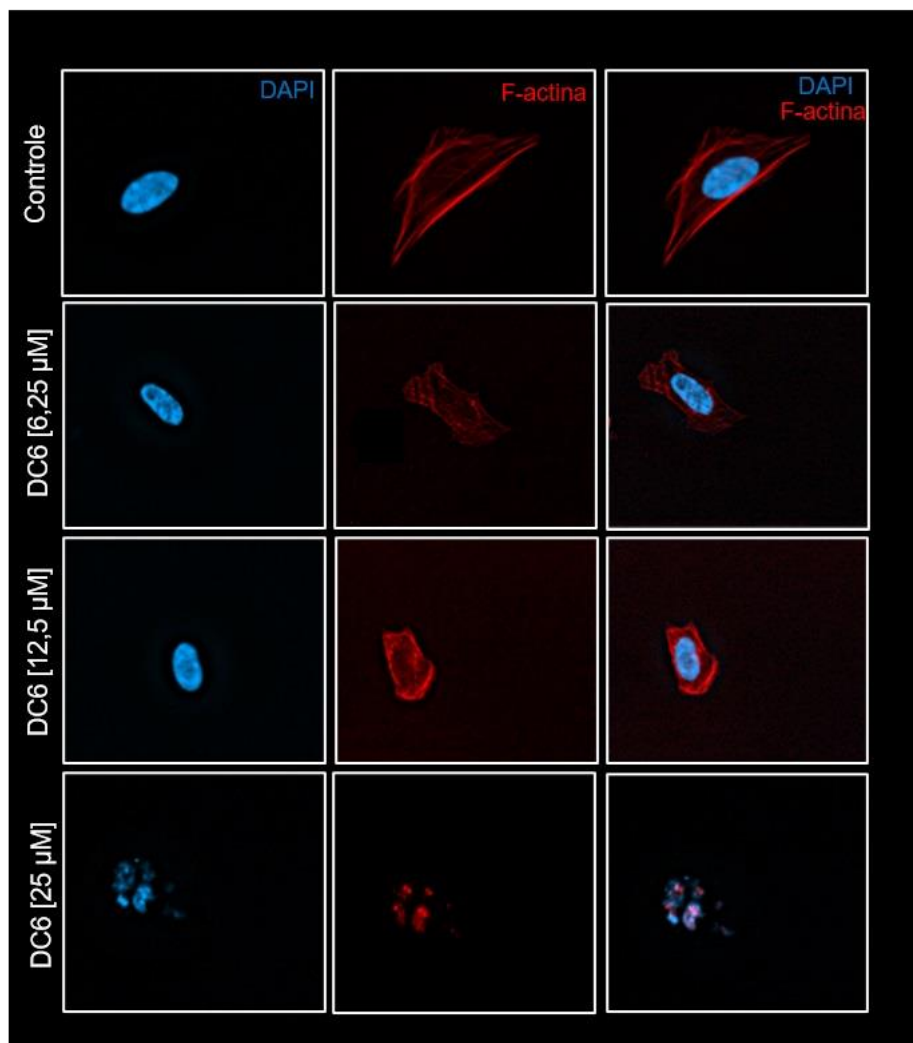


Figura 26: Análise morfológica de célula SH-SY5Y incubada com DC6 nas concentrações de 6,25µM, 12,5µM e 25µM. A desorganização dos filamentos de citoesqueleto (F-actina marcada com faloidina-alexafluor 680) intensificou-se à medida que foram aumentadas as concentrações do DC6. A fragmentação completa do citoesqueleto e condensação e compartimentação de cromatina foi observada na concentração de 25µM do DC6. As imagens foram obtidas a 63X em imersão a óleo.

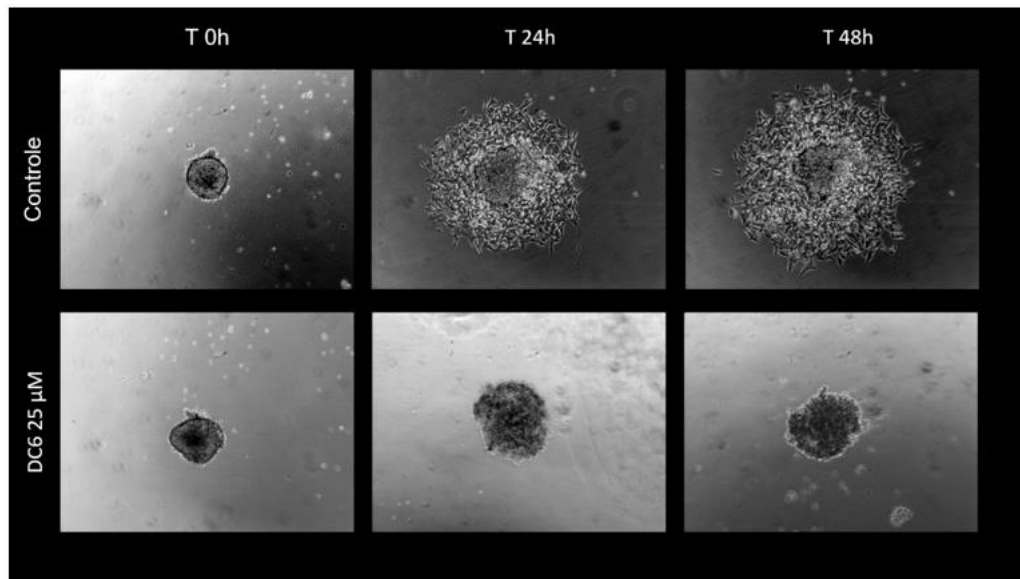
5.8 Efeito do DC6 em esferoides celulares de neuroblastomas (cultura 3D)

Para avaliar se o composto DC6 inibe a invasão celular, sendo esta caracterizada pela perda de adesão célula-célula, adesão a nova matriz, bem como aumento da motilidade celular. Foi utilizado um modelo tridimensional de metástase in vitro. Na figura 27A observa-se que o DC6 25 μ M inibiu a formação dos esferoides celulares na linhagem de neuroblastoma SH-SY5Y. Na figura 27B a taxa de migração relativa a partir de 24 h reduziu de 60,38% na situação controle para 7,40% após incubação com DC6, enquanto que no tempo de 48 h os valores foram de 6,02% quando comparados ao controle 100%.

Modelos tridimensionais a partir de células tumorais apresentam como principal vantagem a mimetização do microambiente tumoral com as zonas necrótica, de senescência e de proliferação. Com a possibilidade de recriar as interfaces tecido-tecido e um microambiente físico dinâmico, apresentando condições mais próximas da realidade clínica (GILAZIEVA et al., 2020; ISHIGURO et al., 2017; WEISWALD; BELLET; DANGLES-MARIE, 2015).

O derivado do carvacrol estudado apresentou uma inibição quase que completa na taxa de migração relativa em modelo de esferoides quando comparado com o controle.

A)



B)

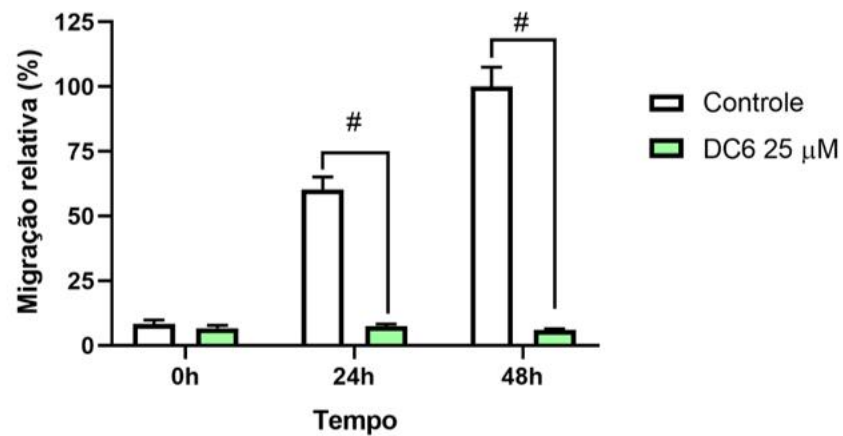


Figura 27: A) Imagem representativa de esferoides tumorais da linhagem de neuroblastoma SH-SY5Y na situação controle e DC6 25 μM nos tempos de 0 h, 24 h e 48 h. B) Porcentagem de migração relativa dos esferoides na situação controle e DC6. Os dados estão representados como média ± DP, n = 3 experimentos independentes #p < 0,0001 em relação ao controle.

5.9 Teste de Irwin

A tabela 8 mostra o resultado da triagem farmacológica experimental realizada por meio do teste de Irwin em que duas doses do derivado do carvacrol 6 foram administradas em camundongos por via oral. De acordo com os parâmetros analisados na tabela 5 para os grupos I (controle), II (DC6 1,3 mg/camundongo) e III (DC6 2,57 mg/camundongo) não foram observadas alterações comportamentais nos camundongos, o DC6 não exerceu nenhum efeito neurotóxico nos animais e doses testados. Após sete dias de análises comportamentais os animais de todos os grupos experimentais se mantiveram vivos, assim realizou-se a eutanásia dos mesmos. Posteriormente os órgãos coração, fígado, baço, rins e pulmão foram coletados, pesados e armazenados em solução de formalina para análise histológica posterior. Quanto a massa dos órgãos, não foram observadas alterações nos grupos II e III quando comparados com o controle tabela 8.

A determinação das concentrações de DC6 testadas foram estimadas pela DL_{50} do carvacrol, pois ainda não se tem a DL_{50} para o composto. Sendo a DL_{50} do carvacrol 471,2 mg/kg (AZIZI et al., 2012), a dosagem máxima utilizada do DC6 foi de 2,57 mg/camundongo, ou seja, 128,5 mg/kg.

Tabela 8: Triagem farmacológica experimental com o derivado do carvacrol 6 por meio do teste de Irwin.

Grupo	Coração (g)	Fígado (g)	Baço (g)	Rins (g)	Pulmão (g)
Controle	0.105 ± 0.021	0.997 ± 0.011	0.089 ± 0.030	0.246 ± 0.018	0.999 ± 0.013
DC6 1,3 mg/camundongo	0.111 ± 0.013	1.006 ± 0.026	0.090 ± 0.010	0.235 ± 0.011	1,101 ± 0.011
DC6 2,57 mg/camundongo	0.118 ± 0.017	0.998 ± 0.022	0.091 ± 0.022	0.233 ± 0.025	1,106 ± 0.017

6 CONCLUSÕES

- O composto DC6 bloqueia canais de sódio dependentes de voltagem subtipo 1.7 com atividade dependente de concentração.
- O DC6 apresentou citotoxicidade seletiva sobre células tumorais provenientes de neuroblastomas humanos com baixa citotoxicidade em células saudáveis.
- O DC6 reduz a proliferação em células de neuroblastomas SH-SY5Y.
- O DC6 reduz os processos de migração celular por meio do bloqueio de canais de sódio dependentes de voltagem subtipo 1.7 em células de neuroblastomas SH-SY5Y.
- O DC6 induziu morte celular por apoptose tardia e necrose em neuroblastomas.
- O DC6 inibiu a progressão de esferoides tumorais em culturas tridimensionais de neuroblastomas.
- O DC6 possui baixa atividade toxicológica.

7 PERSPECTIVAS

- Realizar as análises histológicas dos órgãos coletados dos camundongos após tratamento com o DC6;
- Analisar a expressão gênica de canais de sódio dependentes de voltagem na linhagem SH-SY5Y após tratamento com DC6;
- Calcular a DL_{50} do DC6 em camundongos;
- Avaliar o efeito do DC6 em modelo animal de neuroblastoma.

8 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ARA, T.; DECLERCK, Y. A. Mechanisms of invasion and metastasis in human neuroblastoma. **Cancer and Metastasis Reviews**, v. 25, n. 4, p. 645–657, 2006.
- ALMSTEDT, E. et al. Integrative discovery of treatments for high-risk neuroblastoma. **Nature Communications**, v. 11, n. 1, 1 dez. 2020.
- AYGUN, N. Biological and Genetic Features of Neuroblastoma and Their Clinical Importance. **Current Pediatric Reviews**, v. 14, n. 2, p. 73–90, 30 jan. 2018.
- AZIZI, Z. et al. Cognitive-enhancing activity of thymol and carvacrol in two rat models of dementia. **Behavioural Pharmacology**, v. 23, n. 3, p. 241–249, jun. 2012.
- BANSAL, A. et al. Synthesis of Carvacrol Derivatives as Potential New Anticancer Agent against Lung Cancer. **Molecules**, v. 27, n. 14, 2022.
- BERGHE, T. VANDEN et al. Regulated necrosis: The expanding network of non-apoptotic cell death pathways. **Nature Reviews Molecular Cell Biology**, v. 15, n. 2, p. 135–147, 2014.
- BAKIREL, T. et al. Response of cultured normal canine mammary epithelial cells to deracoxib-doxorubicin combination. **Acta Veterinaria Hungarica**, v. 65, n. 3, p. 366–381, 1 set. 2017.
- BLANDINO, J. K. W. et al. Membrane Biology Voltage-dependent Sodium Channels in Human Small-Cell Lung Cancer Cells: Role in Action Potentials and Inhibition by Lambert-Eaton Syndrome IgGJ. **Membrane Biol**, jun. 1995.
- BRADFORD, M. M. A Rapid and Sensitive Method for the Quantitation of Microgram Quantities of Protein Utilizing the Principle of Protein-Dye Binding. **ANALYTICAL BIOCHEMISTRY**. dez. 1976.
- CAI, S. et al. Carvacrol alleviates liver fibrosis by inhibiting TRPM7 and modulating the MAPK signaling pathway. **European Journal of Pharmacology**, v. 898, n. February, p. 173982, 2021.
- CHIBA, O. et al. State-Dependent Inhibition of Voltage-Gated Sodium Channels in Neuroblastoma Neuro-2A Cells by Arachidonic Acid from *Halichondria okadai*. **Chemical Research in Toxicology**, 2022.
- CAMPBELL, D. E. S.; RICHTER, W. An Observational Method Estimating Toxicity and Drug Actions in Mice applied to 68 Reference Drugs. **Acta Pharmacologica et Toxicologica**, v. 25, n. 3, p. 345–363, 1967.
- CARUSO, S. et al. Defining the role of cytoskeletal components in the formation of apoptopodia and apoptotic bodies during apoptosis. **Apoptosis**, v. 24, n. 11–12, p. 862–877, 1 dez. 2019.
- CATTERALL, W. A. Forty Years of Sodium Channels: Structure, Function, Pharmacology, and Epilepsy. **Neurochemical Research**, v. 42, n. 9, p. 2495–2504, 1 set. 2017.

CHEN, Y.; VERBEEK, F. J.; WOLSTENCROFT, K. Establishing a consensus for the hallmarks of cancer based on gene ontology and pathway annotations. **BMC Bioinformatics**, v. 22, n. 1, 1 dez. 2021.

CHENE, G. et al. Le(s) cancer(s) de Lucy : une origine préhistorique ? **Gynecologie Obstetrique et Fertilité**, v. 44, n. 12, p. 690–700, 1 dez. 2016.

CIBULSKI, S. et al. IMXQB-80: A Quillaja brasiliensis saponin-based nanoadjuvant enhances Zika virus specific immune responses in mice. **Vaccine**, v. 39, n. 3, p. 571–579, 15 jan. 2021.

CURTIUS, K.; WRIGHT, N. A.; GRAHAM, T. A. An evolutionary perspective on field cancerization. **Nature Reviews Cancer** Nature Publishing Group, 20 dez. 2017.

DANTAS, B. P. V. et al. Participation of the TRP channel in the cardiovascular effects induced by carvacrol in normotensive rat. **Vascular Pharmacology**, v. 67, p. 48–58, 1 abr. 2015.

D'ARCY, M. S. Cell death: a review of the major forms of apoptosis, necrosis and autophagy. **Cell Biology International**, v. 43, n. 6, p. 582–592, 2019.

DJAMGOZ, M. B. A.; FRASER, S. P.; BRACKENBURY, W. J. In vivo evidence for voltage-gated sodium channel expression in carcinomas and potentiation of metastasis. **Cancers** MDPI AG, 1 nov. 2019.

DUBOIS, S. G.; MACY, M. E.; HENDERSON, T. O. High-Risk and Relapsed Neuroblastoma: Toward More Cures and Better Outcomes. **American Society of Clinical Oncology Educational Book**, n. 42, p. 768–780, 2022.

ELBE, H. et al. Comparison of ultrastructural changes and the anticarcinogenic effects of thymol and carvacrol on ovarian cancer cells: which is more effective? **Ultrastructural Pathology**, v. 44, n. 2, p. 193–202, 2020.

ELMORE, S. Apoptosis: A Review of Programmed Cell Death. **Toxicologic Pathology**, v. 35, n. 4, p. 495–516, 2007.

FAN, K. et al. Carvacrol inhibits proliferation and induces apoptosis in human colon cancer cells. **Anti-Cancer Drugs**, v. 26, n. 8, p. 813–823, 2015.

FLETCHER, J. I. et al. Too many targets, not enough patients: Rethinking neuroblastoma clinical trials. **Nature Reviews Cancer** Nature Publishing Group, , 1 jun. 2018.

FRACZKOWSKA, K. et al. Alterations of biomechanics in cancer and normal cells induced by doxorubicin. **Biomedicine and Pharmacotherapy**, v. 97, p. 1195–1203, 1 jan. 2018.

FRASER, S. P. et al. **5381 Cancer Research Clin Cancer Res**. Jan, 2005. Disponível em: <www.aacrjournals.org>.

FRASER, S. P. et al. Regulation of voltage-gated sodium channel expression in cancer: Hormones, growth factors and auto-regulation *Philosophical Transactions of the Royal Society B: Biological Sciences*. Royal Society, 19 mar. 2014.

FRASER, S. P.; DISS, J. K. J.; CHIONI, A.-M. of Human Breast Cancer Metastasis Voltage-Gated Sodium Channel Expression and Potentiation E-mail alerts. **Clin**

- Cancer Res.** 2019. Disponível em: <<http://clincancerres.aacrjournals.org/content/11/15/5381>>.
- GILAZIEVA, Z. et al. Promising applications of tumor spheroids and organoids for personalized medicine. **Cancers**, v. 12, n. 10, p. 1–19, 2020.
- GINSBORG, B. L.; MARTIN, R. J.; PATMORET, L. ON THE SODIUM AND POTASSIUM CURRENTS OF A HUMAN NEUROBLASTOMA CELL LINE. **Journal of Physiology**, 1991.
- GUMUSHAN AKTAS, H.; AKGUN, T. Naringenin inhibits prostate cancer metastasis by blocking voltage-gated sodium channels. **Biomedicine and Pharmacotherapy**, v. 106, p. 770–775, 1 out. 2018.
- HAMILL, O.; NEHER, E.; SIGWORTH, F. J. Article in Pflügers Archiv European **Journal of Physiology**. 1981. Disponível em: <<https://www.researchgate.net/publication/27266726>>.
- HANAHAN, D.; WEINBERG, R. A. The Hallmarks of Cancer. **Cell** Jun, 2000.
- HANAHAN, D.; WEINBERG, R. A. Hallmarks of cancer: The next generation. **Cell**, 4 mar. 2011.
- HARRIS, J. R.; BOLANOS-GARCIA, V.; MARLES-WRIGHT, J. **Volume 97 Series Editor**. 2020. Disponível em: <<http://www.springer.com/series/6515>>.
- HAUSMAN, D. M. What is cancer? **Perspectives in Biology and Medicine**, v. 62, n. 4, p. 778–784, 1 set. 2019.
- HILLE, B. **Ionic channels of excitable membranes**. Sinauer Associates Inc., Sunderland, MA, 1992.
- HORNE, J.; MANSUR, S.; BAO, Y. Sodium ion channels as potential therapeutic targets for cancer metastasis. **Drug Discovery Today**, v. 26, n. 5, p. 1136–1147, 2021.
- HORISHITA, T. et al. Carvacrol inhibits the neuronal voltage-gated sodium channels Nav1.2, Nav1.6, Nav1.3, Nav1.7, and Nav1.8 expressed in Xenopus oocytes with different potencies. **Journal of Pharmacological Sciences**, v. 142, n. 4, p. 140–147, 1 abr. 2020.
- HUANG, M.; WEISS, W. A. Neuroblastoma and MYCN. **Cold Spring Harbor Perspectives in Medicine**, v. 3, n. 10, 2013.
- ISHIGURO, T. et al. Tumor-derived spheroids: Relevance to cancer stem cells and clinical applications. **Cancer Science**, v. 108, n. 3, p. 283–289, 2017.
- JOCA, H. C. et al. Carvacrol decreases neuronal excitability by inhibition of voltage-gated sodium channels. **Journal of Natural Products**, v. 75, n. 9, p. 1511–1517, 28 set. 2012.
- JOCA, H. C. et al. Carvacrol modulates voltage-gated sodium channels kinetics in dorsal root ganglia. **European Journal of Pharmacology**, v. 756, p. 22–29, 5 jun. 2015.
- JOHNSEN, J. I.; DYBERG, C.; WICKSTRÖM, M. Neuroblastoma—A neural crest derived embryonal malignancy. **Frontiers in Molecular Neuroscience** Frontiers Media S.A., , 12 fev. 2019.

KACHENTON, S. et al. Cytotoxicity and histopathological analysis of titanium nanoparticles via *Artemia salina*. **Environmental Science and Pollution Research**, v. 26, n. 15, p. 14706–14711, 1 maio 2019.

KATTNER, P. et al. Compare and contrast: pediatric cancer versus adult malignancies. **Cancer and Metastasis Reviews Springer**, 1 dez. 2019.

KATZ, L.; BALTZ, R. H. Natural product discovery: past, present, and future. **Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology**. Springer Verlag, , 1 mar. 2016.

KHAN, I. et al. In vitro and in vivo antitumor potential of carvacrol nanoemulsion against human lung adenocarcinoma A549 cells via mitochondrial mediated apoptosis. **Scientific Reports**, v. 8, n. 1, 1 dez. 2018.

KRABBENDAM, I. E. et al. SK channel activation potentiates auranofin-induced cell death in glio- and neuroblastoma cells. **Biochemical Pharmacology**, v. 171, 1 jan. 2020.

LANGE, I.; KOSTER, J.; KOOMOA, D. L. T. Calcium signaling regulates fundamental processes involved in Neuroblastoma progression. **Cell Calcium Elsevier Ltd**, 1 set. 2019.

LI, L. et al. Carvacrol affects breast cancer cells through TRPM7 mediated cell cycle regulation. **Life Sciences**, v. 266, p. 118894, 2021.

LIU, J. et al. The voltage-gated sodium channel Nav1.7 associated with endometrial cancer. **Journal of Cancer**, v. 10, n. 20, p. 4954–4960, 2019.

LIU, Y. et al. Mechanism of Cellular 3-(4,5-Dimethylthiazol-2-yl)-2,5-Diphenyltetrazolium Bromide (MTT) Reduction. [s.l: s.n.].

LOUHIVUORI, L. M. et al. Differentiation dependent expression of TRPA1 and TRPM8 channels in IMR-32 human neuroblastoma cells. **Journal of Cellular Physiology**, v. 221, n. 1, p. 67–74, out. 2009.

LOSSI, L. The concept of intrinsic versus extrinsic apoptosis. **Biochemical Journal**, v. 479, n. 3, p. 357–384, 2022.

LOUIS, C. U.; SHOHET, J. M. Neuroblastoma: Molecular pathogenesis and therapy. **Annual Review of Medicine**, v. 66, p. 49–63, 14 jan. 2015.

LUCENA, J. N. et al. ASPECTOS CLÍNICOS, EPIDEMIOLÓGICOS E SOBREVIVÊNCIA DE CRIANÇAS COM NEUROBLASTOMA: 21 ANOS DE EXPERIÊNCIA DO INSTITUTO DE ONCOLOGIA PEDIÁTRICA, SÃO PAULO. **Revista Paulista de Pediatria**, v. 36, n. 3, p. 254–260, 10 jul. 2018.

LUO, Q. et al. The Functional Role of Voltage-Gated Sodium Channel Nav1.5 in Metastatic Breast Cancer. **Frontiers in Pharmacology Frontiers Media S.A.**, , 23 jul. 2020.

LV, H. et al. Doxorubicin contributes to thrombus formation and vascular injury by interfering with platelet function. **Am J Physiol Heart Circ Physiol**, v. 319, p. 133–143, 2020.

MATHIASSEN, J. R.; MOSER, V. C. The Irwin Test and Functional Observational Battery (FOB) for Assessing the Effects of Compounds on Behavior, Physiology, and

Safety Pharmacology in Rodents. **Current Protocols in Pharmacology**, v. 83, n. 1, 1 dez. 2018.

MATTHAY, K. K. et al. Neuroblastoma. **Nature Reviews Disease Primers**, v. 2, 10 nov. 2016.

MATTIUZZI, C.; LIPPI, G. Current cancer epidemiology. **Journal of Epidemiology and Global Health**, v. 9, n. 4, p. 217–222, 1 dez. 2019.

NAZIROĞLU, M. A novel antagonist of TRPM2 and TRPV4 channels: Carvacrol. **Metabolic Brain Disease**, v. 37, n. 3, p. 711–728, 2022.

NAKAGAWARA, A. et al. Neuroblastoma Japanese. **Journal of Clinical Oncology**. Oxford University Press, 1 mar. 2018.

NAKAJIMA, T. et al. Eicosapentaenoic acid inhibits voltage-gated sodium channels and invasiveness in prostate cancer cells. **British Journal of Pharmacology**, v. 156, n. 3, p. 420–431, fev. 2009.

NAMKAEW, J. et al. Combined effects of curcumin and doxorubicin on cell death and cell migration of SH-SY5Y human neuroblastoma cells. **In Vitro Cellular and Developmental Biology - Animal**, v. 54, n. 9, p. 629–639, 1 out. 2018.

NELSON, M. et al. The sodium channel-blocking antiepileptic drug phenytoin inhibits breast tumour growth and metastasis. **Molecular Cancer**, v. 14, n. 1, 27 jan. 2015.

NTUNGWE N, E. et al. Artemia species: An Important Tool to Screen General Toxicity Samples. **Current Pharmaceutical Design**, v. 26, n. 24, p. 2892–2908, 2020.

ONKAL, R.; DJAMGOZ, M. B. A. Molecular pharmacology of voltage-gated sodium channel expression in metastatic disease: Clinical potential of neonatal Nav1.5 in breast cancer European. **Journal of Pharmacology**, 25 dez. 2009.

PANNER, A.; WURSTER, R. D. T-type calcium channels and tumor proliferation. **Cell Calcium**, v. 40, n. 2, p. 253–259, 2006.

PECORARO, R. et al. Artemia salina: A microcrustacean to assess engineered nanoparticles toxicity. **Microscopy Research and Technique**, v. 84, n. 3, p. 531–536, 1 mar. 2021.

PHAN, T. G.; CROUCHER, P. I. The dormant cancer cell life cycle. **Nature Reviews Cancer**. Nature Research, , 1 jul. 2020.

PLUMMER, N. W.; MEISLER, M. H. MINIREVIEW Evolution and Diversity of Mammalian Sodium Channel. **Genes**. [s.l.: s.n.]. Disponível em: <<http://www.informatics.jax.org/>>.

RAO, V. R. et al. Voltage-gated ion channels in cancer cell proliferation. **Cancers MDPI AG**, , 22 maio 2015.

RISS, T. et al. **Cytotoxicity Assays: In Vitro Methods to Measure Dead Cells**. 2004. Disponível em: <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/>>.

RODRIGUES, T. et al. Counting on natural products for drug design. **Nature Chemistry** Nature Publishing Group, 1 jun. 2016.

ROGER, S.; BESSON, P.; LE GUENNEC, J. Y. Involvement of a novel fast inward sodium current in the invasion capacity of a breast cancer cell line. **Biochimica et Biophysica Acta - Biomembranes**, v. 1616, n. 2, p. 107–111, 13 out. 2003.

SCHREY, M. et al. Molecular characterization of voltage-gated sodium channels in human gliomas. **Glial cells Neuro Report**, 2002.

SHEETS, P. L.; JARECKI, B. W.; CUMMINS, T. R. Lidocaine reduces the transition to slow inactivation in Na v1.7 voltage-gated sodium channels. **British Journal of Pharmacology**, v. 164, n. 2 B, p. 719–730, set. 2011.

SHERGALIS, A. et al. Current challenges and opportunities in treating glioblastomas. **Pharmacological Reviews**, v. 70, n. 3, p. 412–445, 1 jul. 2018.

SORGELOOS, P.; REMICHE-VAN DER WIELEN, C.; PERSOONE, G. The Use of Artemia Nauplii for Toxicity Tests-A Critical Analysis. **ECOTOXICOLOGY AND ENVIRONMENTAL SAFETY**. [s.l.] Harwich and Scott, 1978.

SOTO, G.; CALERO, F.; NARANJO, M. Lidocaine in oncological surgery: the role of blocking in voltage-gated sodium channels. A narrative review. **Brazilian Journal of Anesthesiology** Elsevier Editora Ltda, , 1 set. 2020.

STOLETOV, K.; BEATTY, P. H.; LEWIS, J. D. Novel therapeutic targets for cancer metastasis. **Expert Review of Anticancer Therapy** Taylor and Francis Ltd, 1 fev. 2020.

SUI, H. et al. Lidocaine inhibits growth, migration and invasion of gastric carcinoma cells by up-regulation of miR-145. **BMC Cancer**, v. 19, n. 1, 15 mar. 2019.

THIAGARAJAN, V. et al. Combined effects of nano-TiO₂ and hexavalent chromium towards marine crustacean Artemia salina. **Aquatic Toxicology**, v. 225, 1 ago. 2020.

THOMFORD, N. E. et al. Natural products for drug discovery in the 21st century: Innovations for novel drug discovery. **International Journal of Molecular Sciences** MDPI AG, , 1 jan. 2018.

TRAN, H. C. et al. Oxaliplatin and doxorubicin for relapsed or refractory high-risk neuroblastoma. **Pediatric Hematology and Oncology**, v. 32, n. 1, p. 26–31, 1 fev. 2015.

TSUBOTA, S.; KADOMATSU, K. Origin and initiation mechanisms of neuroblastoma. **Cell and Tissue Research** Springer Verlag, 1 maio 2018.

VETTER, I. et al. Characterisation of Na v types endogenously expressed in human SH-SY5Y neuroblastoma cells. **Biochemical Pharmacology**, v. 83, n. 11, p. 1562–1571, 1 jun. 2012.

WANG, J. et al. Evaluation of the anticancer and anti-metastasis effects of novel synthetic sodium channel blockers in prostate cancer cells in vitro and in vivo. **Prostate**, v. 79, n. 1, p. 62–72, 1 jan. 2019.

WOODHOUSE, E. C.; CHUAQUI, R. F. Skeletal Complications of Malignancy mors-including breast, prostate, and lung-frequently metastasize. **Cancer**. [s.l.] American Cancer Society, 1997.

WEISWALD, L. B.; BELLET, D.; DANGLES-MARIE, V. Spherical Cancer Models in

Tumor Biology. **Neoplasia (United States)**, v. 17, n. 1, p. 1–15, 2015.

WLODKOWIC, D.; SKOMMER, J.; DARZYNKIEWICZ, Z. Flow cytometry-based apoptosis detection. **Methods in molecular biology (Clifton, N.J.)**, v. 559, n. 0, p. 19–32, 2009.

XAVIER, Francisco José Seixas. Síntese e avaliação in vitro da atividade Leishmanicida de novos adutos de Morita-Baylis- Hillman (AMBH) híbridos com os constituintes Eugenol - Carvacrol e timol. Tese (Doutorado). Departamento de Química, Universidade Federal da Paraíba, João Pessoa, 2018.

XU, X.; LAI, Y.; HUA, Z. C. Apoptosis and apoptotic body: Disease message and therapeutic target potentials. **Bioscience Reports**, v. 39, n. 1, p. 1–17, 2019.

ZIELIŃSKA-BŁAJET, M.; PIETRUSIAK, P.; FEDER-KUBIS, J. Selected monocyclic monoterpenes and their derivatives as effective anticancer therapeutic agents. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 22, n. 9, 2021.

ZHANG, S. et al. Identification of the molecular basis of doxorubicin-induced cardiotoxicity. **Nature Medicine**, v. 18, n. 11, p. 1639–1642, nov. 2012.

9 APÊNDICES

9.1 Apêndice 1

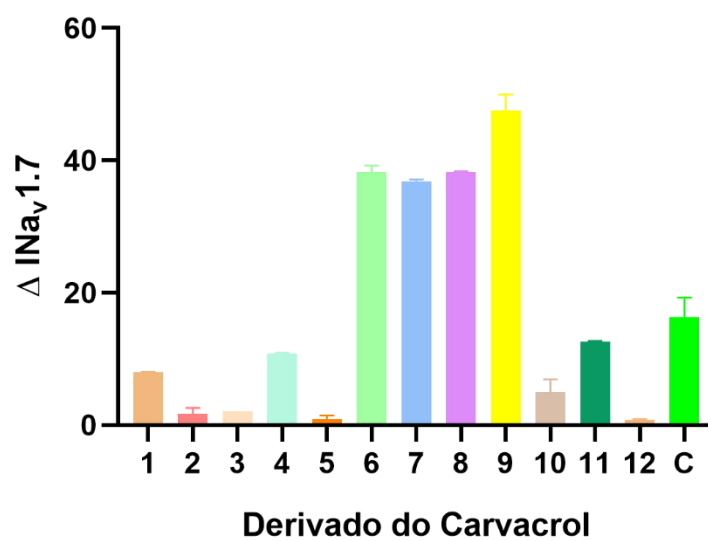
Os derivados do carvacrol foram inicialmente idealizados visando a prospecção de uma substância com atividade antitumoral. Porém, em discussão interna decidimos avaliar previamente a atividade dos derivados do carvacrol sobre os diferentes subtipos de canais de sódio dependentes de voltagem. Isso porque a atividade do carvacrol em bloquear canais de sódio de forma não-seletiva em neurônios DRG bem como a diminuição da excitabilidade nervosa periférica já havia sido demonstrada na literatura, inclusive com participação do nosso grupo de pesquisa.

Assim, traçamos o delineamento experimental e iniciamos investigando o efeito dos doze compostos derivados do carvacrol sobre a inibição de correntes de Nav1.7, dentre os quais destacando-se o DC6. Almejávamos avaliar a atividade dos compostos nos demais subtipos de canais de sódio, Nav1.1 – Nav1.9, porém por questões financeiras não foi possível. Estudos posteriores devem ser realizados para investigar a seletividade dos compostos a nível de canais iônicos.

Para a realização dos ensaios experimentais os compostos disponibilizados pelo grupo do Professor Cláudio Gabriel de Lima Júnior, foram preparados em diferentes bateladas ao longo desses anos de estudo. Os mesmos foram armazenados em freezer -20 °C (solução estoque – DMSO) e diluídos no momento do experimento. Os compostos não são termolábeis ou fotossensíveis, bem como não foi observada nenhuma alteração por inspeção visual.

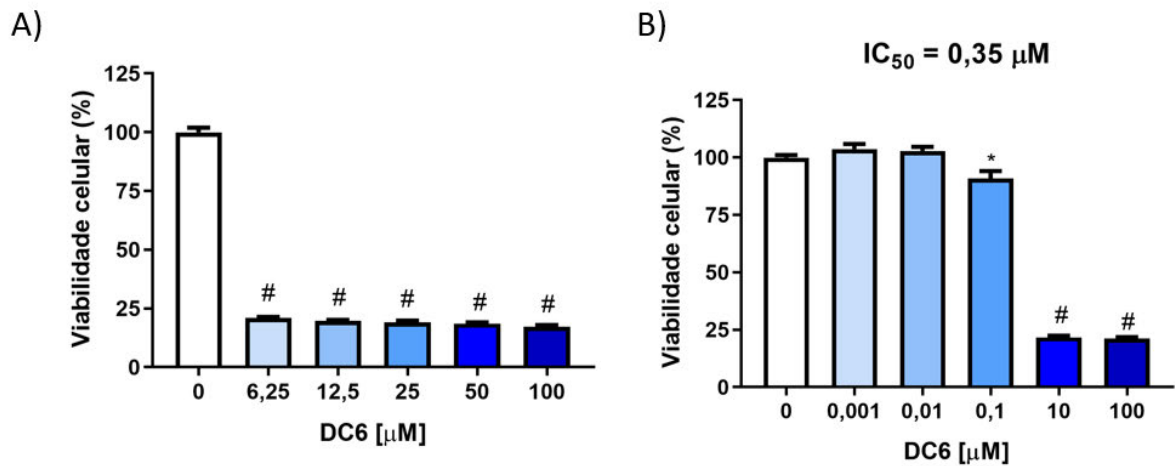
Importante destacar que parte dos experimentos foram realizados na Universidade de Manitoba – Ca, os compostos foram transportados do Brasil para o Canadá, há forte indicio de que as características químicas dos compostos foram preservadas. Também foram realizados ensaios de repetição como testes de citotoxicidade em que os valores de IC₅₀ obtidos no Canadá foram os mesmos previamente obtidos no Brasil, respaldando a estabilidade química dos derivados do carvacrol.

9.2 Apêndice 2

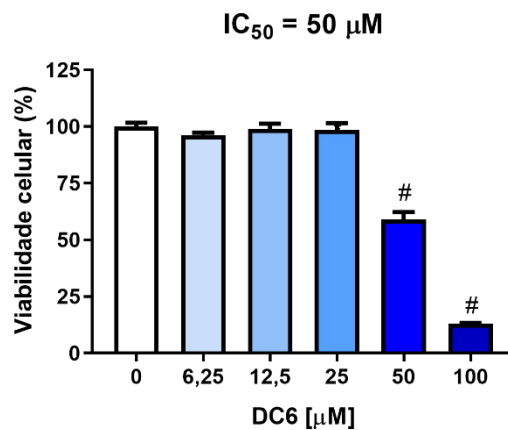


Efeito de Derivados do Carvacrol (DC) 100 µM e do Carvacrol 300 µM sobre a inibição de correntes de sódio subtipo 1.7. O delta de inibição de corrente foi calculado por $INav1.7 \text{ controle} - INav1.7$ para cada composto testado.

9.3 Apêndice 3

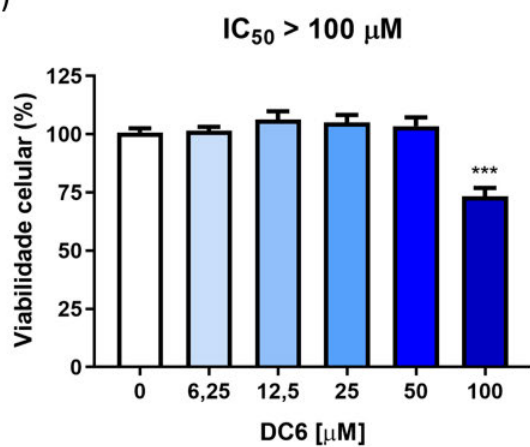


Citotoxicidade do DC6 em linhagens celulares de neuroblastomas IMR-32. (A e B) avaliadas pelo método de MTT, após 24h de tratamento. Os dados estão representados como média $\pm$ EPM, $n=3$. * $p < 0,05$ e # $p < 0,0001$.

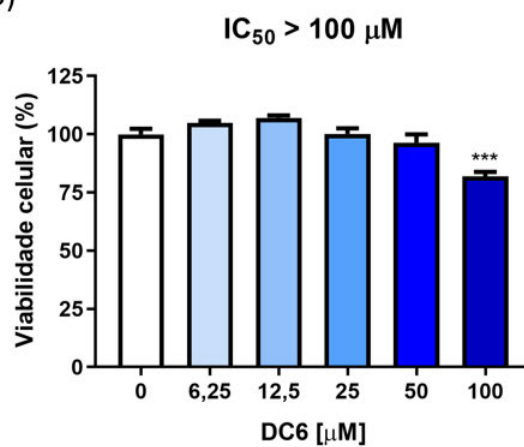


Citotoxicidade do DC6 na linhagem celular SH-EP avaliada pelo método de MTT, após 24h de tratamento. Os dados estão representados como média $\pm$ EPM, $n=3$. # $p < 0,0001$.

A)



B)



Citotoxicidade do DC6 em linhagens celulares de gliomas U-87 (A) e U-373MG (B) avaliadas pelo método de MTT, após 72h de tratamento. Os dados estão representados como média $\pm$ EPM, $n=3$, *** $p < 0,001$.