
Expressão de AKR1B10 e os efeitos citotóxicos da 22 β -hidroxitingenona em carcinoma de células escamosas

AKR1B10 expression and the cytotoxic effects of 22 β -hydroxytingenone in squamous cell carcinoma

Krísicia Maria Albuquerque Parente

ORCID: <https://orcid.org/0009-0006-5582-5044>

Universidade Federal do Amazonas, Brasil

E-mail: krisciaparente@gmail.com

Leilane de Sousa Mendonça

ORCID: <https://orcid.org/0000-0001-7827-6056>

Universidade Federal do Amazonas, Brasil

E-mail: leilane.bentes@gmail.com

Tallita Marques Machado

ORCID: <https://orcid.org/0000-0003-3452-5756>

Universidade Federal do Amazonas, Brasil

E-mail: tallita.machado@yahoo.com.br

Élenn Suzany Pereira Aranha

ORCID: <https://orcid.org/0000-0002-8758-5464>

Universidade Federal do Amazonas, Brasil

E-mail: elenn_suzany@yahoo.com.br

Héctor Henrique Ferreira Koolen

ORCID: <https://orcid.org/0000-0002-0181-348X>

Universidade do Estado do Amazonas, Brasil

E-mail: hectorkoolen@gmail.com

Raquel Carvalho Montenegro

ORCID: <https://orcid.org/0000-0002-3861-293X>

Universidade Federal do Ceará, Brasil

E-mail: rcm.montenegro@gmail.com

Marne Carvalho de Vasconcellos

ORCID: <https://orcid.org/0000-0001-7785-4029>

Universidade Federal do Amazonas, Brasil

E-mail: marne@ufam.edu.br

RESUMO

O câncer de língua provocado por carcinoma de células escamosas é um tipo de tumor de alta letalidade. Análises in silico demonstraram que genes como o AKR1B10 estão associados a mal prognóstico, portanto, substâncias inibidoras de AKR1B10 podem ser vantajosas. As espécies do gênero *Salacia* apresentam potencial ação anticâncer, diante disto, o objetivo desse estudo foi avaliar a ação da 22 β -hidroxitingenona (22-HTG) contra as células cancerosas da língua e sua capacidade de inibir a expressão de AKR1B10. A triagem virtual da 22-HTG apontou interação da 22-HTG com o gene AKR1B10. O ensaio Alamar blue avaliou o efeito citotóxico contra CAL-27, o valor de IC₅₀ foi de 5,15, 3,01 e 1,69 μ M após 24, 48 e 72 h de incubação, respectivamente. Assim, 2,5 μ M de 22-HTG foi usada para avaliar alterações na morfologia celular. Após o tratamento de CAL-27 com 22-HTG, foi observado a redução ($p < 0.05$) de células viáveis e o aumento ($p < 0.05$) de células em apoptose. Os dados sugerem que a 22-HTG é possível inibidor do gene AKR1B10, servindo como agente terapêutico ou como um modelo para o desenvolvimento de novas estruturas químicas que sejam úteis no tratamento de câncer da cavidade oral.

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

ABSTRACT

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

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

INTRODUÇÃO

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

O tratamento sistêmico com quimioterápico cisplatina é o tratamento de primeira escolha, visando a diminuição da massa tumoral e de metástases, bem como, preservar o órgão e conter a mortalidade, já que não há grande vantagem em realizar radioterapia e cirurgia. Contudo, nesse tipo de tumor apresenta grande resistência a quimioterapia (GU, 2018; WU, 2019), tornando-se necessário a busca por novo tratamento eficaz, de baixo custo e toxicidade contra essas células cancerígenas (WU, 2019).

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

A expressão do oncogene AKR1B10 está relacionada a eliminação de compostos químicos do organismo, o aumento da divisão celular, ao processo carcinogênico e a sua

terapêutica (KO et al., 2018). Devido ao seu envolvimento no processo carcinogênico de tumores orais humanos, substâncias inibidoras de AKR1B10 podem ser vantajosas em ensaios contra esses cânceres, representando um novo alvo para suprir eventual lacuna que exista na terapia com quimioterápicos já existentes e base molecular teórica para o tratamento e prognóstico (CHANG et al., 2019; KO et al., 2018; LIU et al., 2021).

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

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

O efeito da 22-HTG em células tumorais já foi mencionado em outros estudos, como Cevaterem e colaboradores (2016), onde os autores descreveram a indução de apoptose em células de câncer de mama. Aranha e colaboradores, 2020, 2021 descreveram a redução da proliferação, migração e invasão celular, com mecanismo inibitório de metaloproteinases e da via MAPK em células de melanoma humano. Apesar do conhecimento científico quanto ao potencial anticancer de 22-HTG, ainda não foi investigado o efeito dessa substância contra carcinoma de células escamosas (CAL27) e são ausentes na literatura parâmetros farmacocinéticos e toxicológicos para 22-HTG.

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

MÉTODOS

Triagem virtual

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

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

Docking molecular

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

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

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

Cultivo e cultura de células

As células MRC5 (fibroblastos humanos), HACAT (queratinócitos humanos) e CAL27 (linhagem de carcinoma de células escamosas da língua) foram cultivadas em meio Dulbecco's Modified Eagle's Medium (DMEM) suplementado com 10% de soro fetal bovino, estreptomicina 100 µg/ml e 100 U/ml penicilina, e incubado a 37°C com 5% de CO₂ atmosfera.

Citotoxicidade usando o ensaio do Alamar Blue

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

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

Análise da morfologia celular

CAL27 ($0,5 \times 10^5$ células/poço) foram semeadas em placa de 24 poços e após 24h foram tratadas com 22-HTG (2,5 e 5,0 µM), durante 48 horas. Após o período, as células foram coradas com um kit de corante panóptico rápido LaborClin® (MONSMANN, 1983).

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

Análise morfológica usando microscópio de fluorescência

Células de carcinoma de células escamosas da língua (CAL27) foram tratadas com 22-HTG por 48h. Em seguida, as células foram sedimentadas e ressuspensas em 25

ml solução salina tamponada com fosfato (PBS). Depois disso, 1ml de solução aquosa de laranja de acridina/brometo de etídio (AO/EB, 100 mg/ml) foi adicionado e os tipos de células foram observadas sob um microscópio de fluorescência (Zeiss Microscopy) (RIBBLE, et al., 2005).

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

RESULTADOS

Triagem virtual

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

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

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

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

Fonte: Autoria Própria (2023)

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

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

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

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

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

Fonte: Autoria Própria (2023)

Análise de parâmetros toxicológicos in silico estão demonstrados na tabela 3. A 22-HTG não apresenta efeitos tóxicos indesejáveis, sendo sugerido como não mutagênico, corroborando com o parâmetro de carcinogenicidade que foi de baixa

probabilidade. A toxicidade oral aguda foi III sugerindo que seja um composto considerado não tóxico em absorção oral.

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

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

Fonte: Autoria Própria (2023)

Ancoragem molecular

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

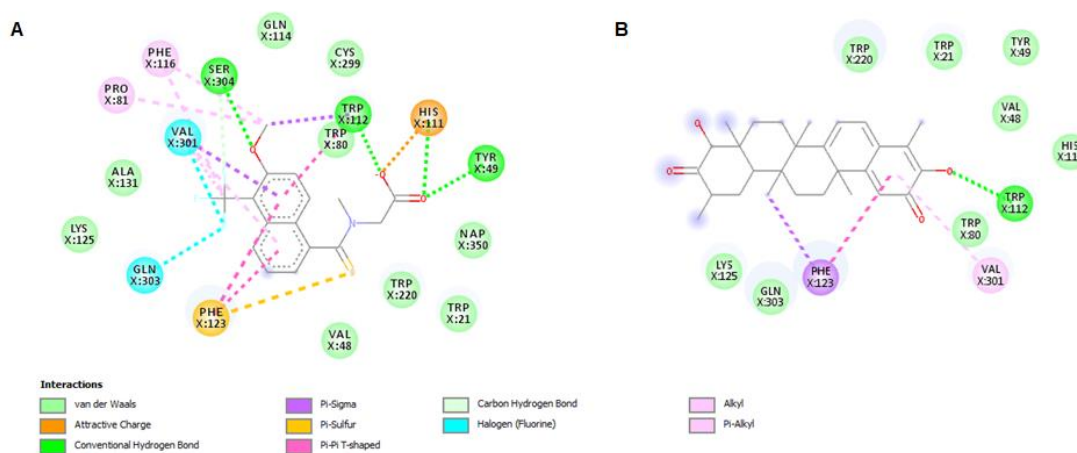
Tabela 4. Energia de interação (Kcal/mol) entre compostos e enzimas avaliadas in silico.

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

Fonte: Aatoria Própria (2023)

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

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



Fonte: Aatoria Própria (2023)

Citotoxicidade in vitro

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

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

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

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

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

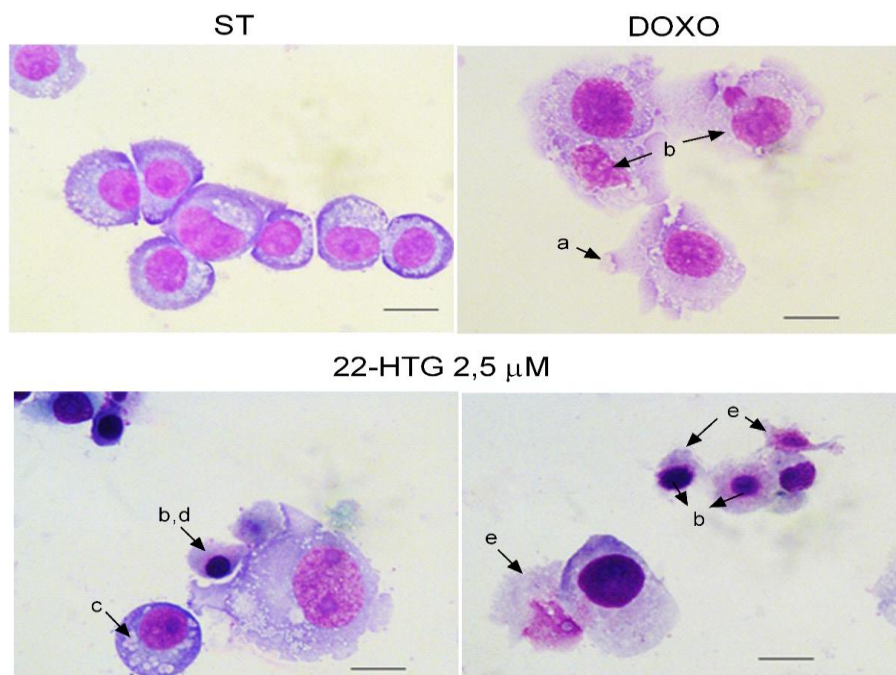
Fonte: Aatoria Própria (2023)

Morfologia celular

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

morfológicas descritas levam a hipótese de que 22-hidroxitingenona cause apoptose em células da linhagem CAL27.

Figura 2. Alterações morfológicas na linhagem de carcinoma de células escamosas (CAL27) após 48h de tratamento com 22-HTG 2,5 μM . As letras indicam: a) Irregularidades da membrana plasmática (não tem a letra a indicada na 22-HTG); b) Condensação e/ou fragmentação nuclear; c) Vacúolo intracelular; d) condensação celular; e) Perda da integridade da membrana plasmática. Escala 50 μM ; Aumento 100x.



Fonte: Autoria Própria (2023)

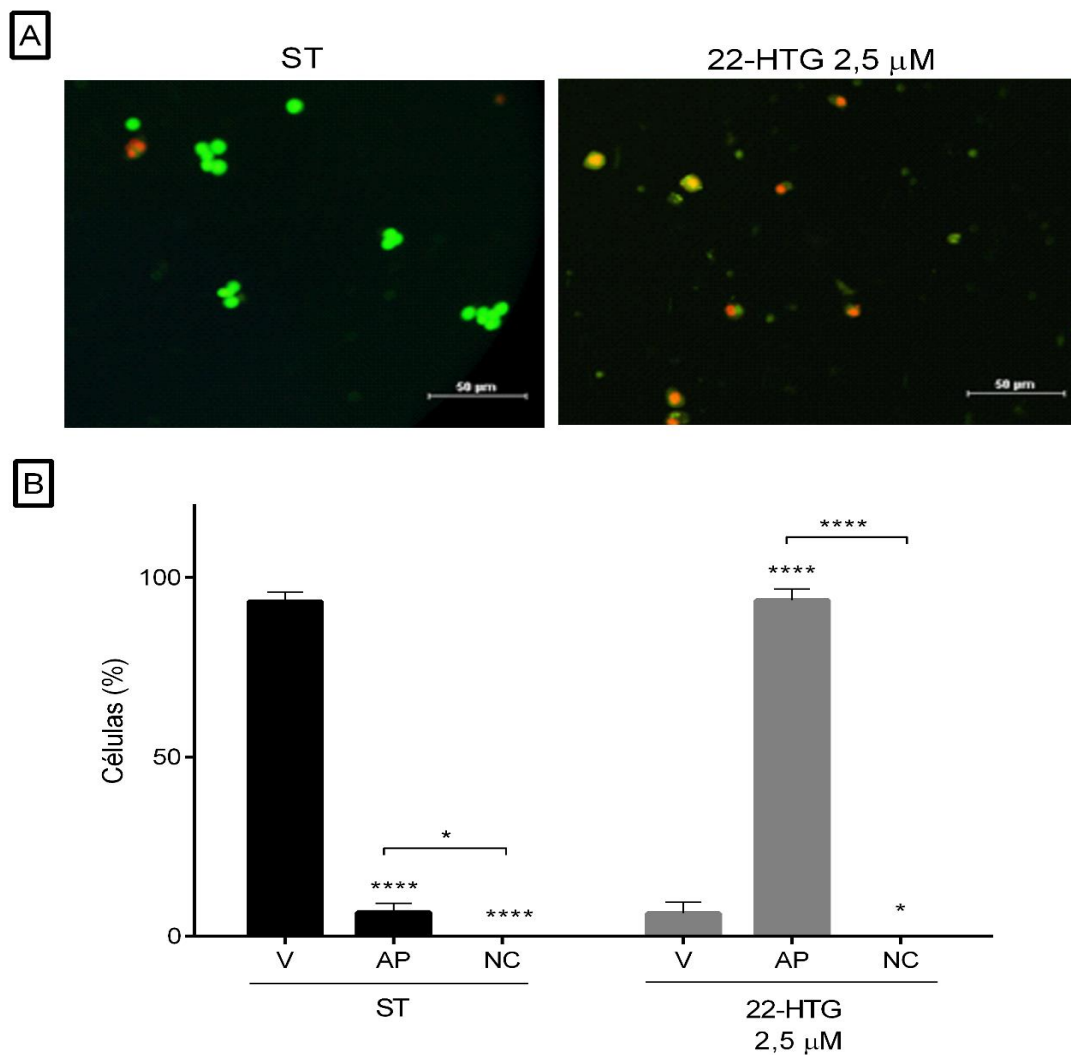
Análise do tipo de morte celular pelo ensaio de Acridina Orange e Brometo de Etídio

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

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

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

AO: Acridina Orange; BE: Brometo de Etídio. Escala das imagens: 50 μm .



Fonte: Autoria Própria (2023)

DISCUSSÃO

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

A triagem virtual mostrou ser uma ferramenta de grande utilidade para a descoberta de fármacos, podendo selecionar os perfis químicos mais promissores de candidatos a fármacos, antes da síntese em laboratório. Isso agrega valor ao processo de novas substâncias, tornando-o mais otimizado e direcionado, com uma redução considerável do tempo de trabalho e um aumento notável na eficiência (NASTASĂ et al., 2019).

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

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

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

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

Outros autores já demonstraram o efeito citotóxico de 22-HTG contra diferentes linhagens celulares e propuseram a indução de apoptose como o mecanismo de morte

celular (CEVATEMRE et al., 2016; ARANHA et al., 2021), o que também foi demonstrado no presente estudo para a linhagem CAL-27. Os autores Cevatemre et al. 2016; Aranha 2021 justificaram a indução de apoptose causada pela substância 22-HTG devido a disfunção mitocondrial, sugerindo a indução de apoptose pela via intrínseca.

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

CONCLUSÃO

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

REFERÊNCIAS

AHMED SA, GOGAL RM, JR, WALSH JE. A new rapid and simple non-radioactive assay to monitor and determine the proliferation of lymphocytes: an alternative to [3H]thymidine incorporation assay. *J Immunol Methods* 1994;170:211–24. Disponível em: <https://www.sciencedirect.com/science/article/abs/pii/0022175994903964>

ARANHA ESP, DA SILVA EL, MESQUITA FP, DE SOUSA LB, DA SILVA FMA, ROCHA WC, LIMA ES, KOOLEN HFF, DE MORAIS MEA, MONTENEGRO RC, de Vasconcellos, MC. 22 β -hydroxytingenone reduces proliferation and invasion of human melanoma cells. *In Vitro Toxicology* 2020, 6 Disponível em: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0887233319307015>

ARANHA, ESP, DE SOUSA PORTILHO AJ, DE SOUSA LB, DA SILVA EL, MESQUITA FP, ROCHA WC, DA SILVA FMA, LIMA ES, ALVES APNN, KOOLEN HHF, MONTENEGRO RC, DE VASCONCELLOS MC. 22 β -hydroxytingenone induces apoptosis and suppresses invasiveness of melanoma cells by inhibiting MMP-9 activity and MAPK signaling. *Journal of Ethnopharmacology* 2021, 267, 113605. Disponível em: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0378874120334930>

CAMPBELL BR, NETTERVILLE JL, SINARD RJ, MANNION K, ROHDE SL, LANGERMAN A, ET AL. Early onset oral tongue cancer in the United States: A literature review. *Oral Oncology* 2018 Dec;87:1-7. Disponível em: <https://www.sciencedirect.com/science/article/abs/pii/S1368837518303634>

CAO DF, CHUNG SS. Identification and characterization of a novel human aldose reductase-like gene. *J Biol Chem*. Disponível em: 1998;273:11429-11435. [https://www.jbc.org/article/S0021-9258\(19\)89339-0/fulltext](https://www.jbc.org/article/S0021-9258(19)89339-0/fulltext)

CEVATEMRE B, BOTTA B, MORIM, BERARDOZZI S, INGALLINA C, ULUKAYA E. The plant-derived triterpenoid tingenin B is a potent anticancer agent due to its cytotoxic activity on cancer stem cells of breast cancer in vitro. *Chemico-Biological Interactions* 2016, 260, 248-255. Disponível em: <https://www.sciencedirect.com/science/article/abs/pii/S0009279716304239>

CHANG WM, CHANG YC, YANG YC, LIN SK, CHANG PMH, HSIAO M. AKR1C1 controls cisplatin-resistance in head and neck squamous cell carcinoma through cross-talk with the STAT1/3 signaling pathway. *Journal of Experimental & Clinical Cancer Research* (2019) 38:245. Disponível em: <https://jeccr.biomedcentral.com/articles/10.1186/s13046-019-1256-2>

KO, HH, PENG, HH, CHENG, SJ E KUO, MYP. Increased salivary AKR1B10 level: association with progression and poor prognosis of oral squamous cell carcinoma. *Head & Neck* 2018, 40 (12), 2642-2647. Disponível em: <https://onlinelibrary.wiley.com/doi/abs/10.1002/hed.25370>

DAINA A, MICHIELIN O, ZOETE V. SwissADME: a free web tool to evaluate pharmacokinetics, drug-likeness and medicinal chemistry friendliness of small molecules. *Scientific reports* 2017, 7(1), 42717. Disponível em: <https://www.nature.com/articles/srep42717>

FANG WY, KUO YZ, CHANG JY, HSIAO, J.-R.; KAO, H.-Y.; TSAI, S.-T.; WU, L.-W. The Tumor Suppressor TGFBR3 Blocks Lymph Node Metastasis in Head and Neck Cancer. *Cancers* 2020, 12, 1375. Disponível em: <https://www.mdpi.com/2072-6694/12/6/1375>

GALI-MUHTASIB H, HMADI R, KAREH M, TOHME R, DARWICHE N. Cell death mechanisms of plant-derived anticancer drugs: beyond apoptosis. *Apoptosis* 2015, 20, 1531–1562. Disponível em: <https://link.springer.com/article/10.1007/s10495-015-1169-2>

GFELLER D, GROSDIDIER A, WIRTH M, DAINA A, MICHIELIN O, ZOETE V. SwissTargetPrediction: um servidor web para previsão de alvos de pequenas moléculas bioativas. *Pesquisa de ácidos nucleicos* 2014, 42, 32-38. Disponível em: <https://academic.oup.com/nar/article/42/W1/W32/2435215?login=false>

GU Y, LIU H, KONG F, YEI J, JIA X, ZHANG Z, LI N, YIN J, ZHENG G, HE Z. miR-22/KAT6B axis is a chemotherapeutic determiner via regulation of PI3k-Akt-NF-kB pathway in tongue squamous cell carcinoma. *Journal of Experimental & Clinical Cancer Research* 2018, 37:164. Disponível em: <https://jeccr.biomedcentral.com/articles/10.1186/s13046-018-0834-z>

HUI-HSIN KO, SHIH-LUNG CHENG, JANG-JAER LEE, HSIN-MING CHEN, DDS, MS, PHD, MARK YEN-PING KUO, DDS, PHD, SHIH-JUNG CHENG. Expression of AKR1B10 as an independent marker for poor prognosis in human oral squamous cell carcinoma. *Journal of the sciences and specialties of the head and neck* 2017, 39(7):1327-1332. Disponível em: <https://onlinelibrary.wiley.com/doi/abs/10.1002/hed.24759>

JANK BJ, LENZ T, HAAS M, KADLETZ-WANKE L, CAMPION NJ, SCHNOELL J, HEIDUSCHKA G, MACFELDA K. Radiosensitizing effect of galunisertib, a TGF- β receptor I inhibitor, on head and neck squamous cell carcinoma in vitro. *Invest New Drugs* 40, 478–486 (2022). Disponível em: <https://link.springer.com/article/10.1007/s10637-021-01207-1>

KIM Y, KANG H, JANG S, KO J. Celastrol inhibits breast cancer cell invasion via suppression of NF-kB -mediated matrix metalloproteinase-9 expression. *Cell. Physiol. Biochem* 2011. 701, 175–184. Disponível em: https://web.archive.org/web/20190502130254id_/https://www.karger.com/Article/Pdf/31729

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

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

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

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

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

MAHNASHI, MH, ALQAHTANI, YS, ALQARNI AO, ALYAMI BA, JAN MS, AYAZ M, ULLAH F, RASHID U, SADIQ A. Crude extract and isolated bioactive compounds

from *Notholirion thomsonianum* (Royale) Stapf as multitargets antidiabetic agents: in-vitro and molecular docking approaches. *BMC Complement Med Ther* 2021, 21, 270. Disponível em: <https://link.springer.com/article/10.1186/s12906-021-03443-7>

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

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

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

RODRIGUES ACBDC, DE OLIVEIRA FP, DIAS RB, SALES CB, ROCHA CA, SOARES MB, COSTA EV, DA SILVA FMA, ROCHA WC, KOOLEN HHF, BEZERRA DP. In vitro and in vivo anti-leukemia activity of the stem bark of *Salacia impressifolia* (Miers) AC Smith (Celastraceae). *Journal of ethnopharmacology* 2019, 231, 516-524. Disponível em: <https://bmcbiotechnol.biomedcentral.com/articles/10.1186/1472-6750-5-12>

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

PENNING TM. The aldo-keto reductases (AKRs): overview. *Chem Biol Inter- act.* 2015; 234:236-246. Disponível em: <https://www.sciencedirect.com/science/article/abs/pii/S0009279714002737>

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

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

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

TROTT O, OLSON AJ. AutoDock Vina: improving the speed and accuracy of docking with a new scoring function, efficient optimization, and multithreading. J Comput Chem 2010, 30;31(2):455-61. Disponível em: <https://onlinelibrary.wiley.com/doi/abs/10.1002/jcc.21334>

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

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

WU Y, WANG J, ZHAO J, ZHANG Y, SUN Y, CHEN J, WANG J. Gene regulation analysis of the effects of evodiamine on tongue squamous cell carcinoma. Journal of Cell Biochem 2019, 120:15933-15940. Disponível em: <https://onlinelibrary.wiley.com/doi/full/10.1002/jcb.28869>

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

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