



UNIVERSIDADE FEDERAL DO CEARÁ

FACULDADE DE MEDICINA

DEPARTAMENTO DE FISIOLOGIA E FARMACOLOGIA

PÓS-GRADUAÇÃO EM FARMACOLOGIA

EVELYNE ALVES DOS SANTOS

**ESTUDO DA ATIVIDADE CITOTÓXICA DA ALFA-LAPACHONA E SEU
DERIVADO TETRAHIDROPIRANO**

FORTALEZA

2012

EVELYNE ALVES DOS SANTOS

ESTUDO DA ATIVIDADE CITOTÓXICA DA ALFA-LAPACHONA E SEU DERIVADO
TETRAHIDROPIRANO

Dissertação submetida à Coordenação do Programa de Pós-Graduação em Farmacologia, do Departamento de Fisiologia e Farmacologia, da Faculdade de Medicina da Universidade Federal do Ceará, como parte dos requisitos para obtenção do título de mestre em Farmacologia.

Orientadora: Prof^a Dr^a. Leticia Veras Costa-Lotufo

Co-orientadora: Prof^a Dr^a. Raquel Carvalho Montenegro

FORTALEZA

2012

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação
Universidade Federal do Ceará
Biblioteca de Ciências da Saúde

S234e Santos, Evelyne Alves dos.
Estudo da atividade citotóxica da alfa-lapachona e seu derivado tetrahidropirano/
Evelyne Alves dos Santos. – 2012.
96 f. : il.

Dissertação (Mestrado) - Universidade Federal do Ceará. Faculdade de Medicina.
Programa de Pós-Graduação em Farmacologia, Fortaleza, 2012.
Orientação: Profª Drª. Letícia Veras Costa-Lotufo.

1. Naftoquinonas. 2. Morte Celular. I.Título.

CDD 615.1

EVELYNE ALVES DOS SANTOS

ESTUDO DA ATIVIDADE CITOTÓXICA DA ALFA-LAPACHONA E SEU DERIVADO
TETRAHIDROPIRANO

Dissertação de Mestrado submetida à
Coordenação do Programa de Pós-
Graduação em Farmacologia, da
Faculdade de Medicina, Universidade
Federal do Ceará, como requisito parcial
para a obtenção do título de Mestre em
Farmacologia

Aprovada em ___/___/_____

BANCA EXAMINADORA

Prof.a. Dr.a. Letícia Veras Costa-Lotufo (Orientadora)
Universidade Federal do Ceará

Prof.a. Dr.a. Raquel Carvalho Montenegro (Co-orientadora)
Universidade Federal do Pará

Prof.a. Dr.a. Flávia Almeida Santos
Universidade Federal do Ceará

Prof. Dr. Alexandre Havt Bindá
Universidade Federal do Ceará

À Deus, meus pais, amigos e familiares,
por todo o apoio.

AGRADECIMENTOS

À meus pais, por estarem presentes em todos os momentos, dedicados e por sempre incentivarem meus estudos;

À Profa. Dra. Letícia Veras Costa-Lotufo, pela orientação deste trabalho e ensinamentos dados;

À Prof. Dra. Raquel Carvalho Montenegro, pela co-orientação deste trabalho, e pela oportunidade a mim dada, a fazer parte do laboratório de Oncologia Experimental, além da compreensão, amizade e paciência;

Aos professores do Laboratório de Oncologia Experimental, Prof. Dr. Cláudia Pessoa, Prof. Dr. Manoel Odorico de Moraes, pelos ensinamentos, e empenho em oferecer as melhores condições de trabalho;

À Prof. Dra. Ana Paula Negreiro Nunes Alves, pela colaboração neste trabalho e a sempre disposição em nos ajudar;

Aos amigos de laboratório: Marcília, Daniel Pascoalino, Bruno Soares, Adriana Carvalho, Assuero, Bruno Cavalcanti, Cecília Carvalho, Danilo Damasceno, Deisy, Diego Veras, Elthon Gois, Felipe Rocha, Gabriela, Igor, Paula Jimenez, Paula Abreu, Washington Barros, Patrícia Marçal, pela convivência diária, amizade e ajuda nos experimentos. Especialmente, agradeço a Ana Jérsia Araújo, Arinice Costa e Delano Marinho, por toda a ajuda no desenvolvimento deste trabalho, pelos ensinamentos, amizade e companheirismo;

Às secretárias Adelânia Roque e Sheyla Prado, pela disposição em sempre ajudar, às técnicas Silvana França, Erivanda França, D. Rogéria, pela convivência e dedicação ao laboratório;

Aos professores, Flávia Almeida e Alexandre Havt que aceitaram fazer parte desta banca;

Às instituições que contribuíram para a realização deste trabalho: Universidade Federal do Ceará, Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de nível superior (CAPES) e Fundação Cearense de Apoio ao Científico e Tecnológico (FUNCAP).

RESUMO

As quinonas são metabólitos de ampla distribuição na natureza que possuem diversas atividades farmacológicas de importância clínica. A naftoquinona α -lapachona demonstrou potencial como protótipo para o desenvolvimento de substâncias com propriedades anticâncer, como relatado pelo nosso grupo de pesquisa, em que o seu derivado tetrahidropirano (THP) apresentou citotoxicidade e seletividade significativa contra a linhagem de melanoma MDA-MB-435. Assim, o objetivo deste trabalho foi avaliar o mecanismo de ação envolvido na citotoxicidade da α -lapachona e derivado THP em células de melanoma MDA-MB-435. Inicialmente, avaliou-se a citotoxicidade da alfa-lapachona e derivado THP em 8 linhagens tumorais de mama e melanoma, através do ensaio do MTT, mostrando CI_{50} de 1,37 e 8,18 μ M, respectivamente, após 72 horas de incubação. A seletividade do derivado THP no ensaio de Alamar Blue, demonstrou que este se apresentou 2,6 vezes menos citotóxico para células normais quando comparado às células tumorais. Estudos do mecanismo de morte celular na linhagem tumoral MDA-MB-435 indicaram que o derivado THP causou redução de células viáveis associado com o aumento de células não-viáveis por indução da perda de integridade da membrana plasmática nas concentrações de 5 e 10 μ M após 24 horas de incubação. A atividade citotóxica do derivado THP não está relacionada a uma fase específica do ciclo celular, ativação de caspases efetoras e formação de espécies reativas de oxigênio, sugerindo a ocorrência de um processo necrótico a partir de 6 horas de tratamento, demonstrado pela avaliação da integridade de membrana. Assim, os resultados exibidos sugerem que a introdução do radical tetrahidropirano na molécula da α -lapachona aumenta a citotoxicidade em células de melanoma MDA-MB-435, via necrose, o que reforça a importância de naftoquinonas, como protótipo para o desenvolvimento de novos compostos sintéticos com atividade antitumoral.

Palavras-chave: Naftoquinona. α -lapachona. Morte Celular.

ABSTRACT

Quinone metabolites are widely distributed in nature showing various pharmacological activities of clinical importance. The naphthoquinone α -lapachone has been shown to be suitable as a prototype for the development of substances with anticancer properties, as reported by our group to tetrahydropyran derivative (THP), which demonstrated significant cytotoxicity and selectivity against MDA-MB-435 melanoma line. The aim of the present work was to evaluate the mechanism of action involved in the cytotoxicity of α -lapachone and its THP derivative against MDA-MB-435 melanoma cells. Initially, we evaluated the cytotoxicity of α -lapachone and its THP derivative against 8 cell lines, by the MTT assay, showing IC_{50} of 1.37 and 8.18 μ M to breast and melanoma lines, respectively, after 72 hours of incubation. The selectivity of the THP derivative in Alamar Blue assay, demonstrated that THP is 2.6 times less cytotoxic to normal cells as compared to tumor cells. Studies on the mechanism of cell death in MDA-MB-435 tumor line showed that the THP derivative caused a reduction on viable cells associated with an increase of non-viable cells by inducing loss of membrane integrity in concentrations of 5 and 10 μ M. The cytotoxic activity of THP was independent of cell cycle, activation of effector caspases and formation of reactive oxygen species, suggesting the occurrence of a necrotic process after 6 hours of treatment, demonstrated by evaluation of membrane integrity. Thus, the data suggest that a tetrahydropyran group introduction in α -lapachone molecule enhances the cytotoxicity of MDA-MB-435 in melanoma cells, via necrosis, which reinforces the importance of naphthoquinones as prototypes for the development of new synthetic compounds with antitumor activity.

Keywords: Naphthoquinone. α -lapachone. Cell death.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Ilustração esquemática da tumorigênese.....	14
Figura 2. Alterações fisiológicas comuns a maioria dos tipos de câncer.....	15
Figura 3. Tipos de morte celular.....	18
Figura 4. Via de apoptose extrínseca.....	20
Figura 5. Via de apoptose intrínseca.....	21
Figura 6. Exemplos de agentes anticâncer derivados de produtos naturais.	26
Figura 7. Fármacos antitumorais derivados de produtos naturais.....	27
Figura 8. Estruturas de quinonas utilizadas no tratamento do câncer.	29
Figura 9. Ilustração esquemática do ciclo redox das quinonas.	30
Figura 10. Estruturas químicas das naftoquinonas, lapachol, β -lapachona e α -lapachona.....	32
Figura 11. Estruturas dos compostos: α -lapachona, e seu derivado tetrahidropirano (THP).37	
Figura 12. Morfologia das células de melanoma (MDA-MB-435) tratadas com α -lapachona e derivado THP após 6 horas de incubação.	54
Figura 13. das células de melanoma (MDA-MB-435) tratadas com α -lapachona e derivado THP após 12 horas de incubação.....	55
Figura 14. Morfologia das células de melanoma (MDA-MB-435) tratadas com α -lapachona e derivado THP após 24 horas de incubação	56

LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Atividade citotóxica in vitro da α -lapachona e seu derivado THP em 8 linhagens tumorais após 72 horas de incubação.	49
Tabela 2. Atividade citotóxica da α -lapachona e seu derivado THP na linhagem tumorais de mama e melanoma e em células mononucleares do sangue periférico (CMSP) após 24 horas de incubação.....	50
Tabela 3. Atividade citotóxica da α -lapachona e seu derivado THP em células de melanoma MDA-MB-435 após 24 horas de incubação, pré-tratadas com N-acetilcisteína (5mM). Valores de CI50 representados em $\mu\text{g}/\text{mL}$ (μM) e seus respectivos intervalos de confiança.....	63

LISTA DE GRÁFICOS

- Gráfico 1. Efeito da α -lapachona (ALFA) e seu análogo THP na viabilidade de células de melanoma (MDA-MB-435) determinado por exclusão de azul de tripan após 6, 12 e 24 horas de exposição.....52
- Gráfico 2. Avaliação dos efeitos da α -lapachona (ALFA) na concentração de 10 μ M e seu análogo THP (2,5, 5 e 10 μ M) na integridade da membrana plasmática e densidade em células de melanoma (MDA-MB-435) após 6, 12 e 24 horas de exposição, analisadas por citometria de fluxo utilizando o corante iodeto de propídio58
- Gráfico 3. Avaliação dos efeitos da α -lapachona (ALFA) na concentração de 10 μ M e seu análogo THP (2,5, 5 e 10 μ M) na progressão do ciclo celular e fragmentação internucleossomal de DNA em células de melanoma (MDA-MB-435) após 6, 12 e 24 horas de exposição, analisadas por citometria de fluxo utilizando solução de lise composta por iodeto de propídeo, Triton X-100 (0,1%) e citrato de sódio (0,1%).....60
- Gráfico 4. Avaliação dos efeitos da α -lapachona (ALFA) na concentração de 10 μ M e seu análogo THP (2,5, 5 e 10 μ M) na potencial transmembrânico mitocondrial em células de melanoma (MDA-MB-435) determinado por citometria de fluxo utilizando rodamina 123, após 24 horas de incubação.....61
- Gráfico 5. Avaliação dos efeitos da α -lapachona (ALFA) na concentração de 10 μ M e seu análogo THP (2,5, 5 e 10 μ M) na ativação de caspases 3/7 em células de melanoma (MDA-MB-435) determinado por citometria de fluxo, após 24 horas de incubação.....62

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

ANOVA	Análise de variância
CMSP	Células Mononucleares de Sangue Periférico
DISC	Complexo de sinalização indutor de morte
DMSO	Dimetilsulfóxido
DR	Receptores de Morte (do inglês, Death receptor)
E.P.M.	Erro Padrão da Média
EROs	Espécies reativas de Oxigênio
FADD	Domínio de morte associado ao Fas
IAP	Inibidores de apoptose
IMDM	Meio de Dulbecco modificado por Iscove (do inglês, Iscove's Modified Dulbecco's Medium)
MTT	3-(4,5-dimetil-2-tiazol)-2,5-difenil-2-H-brometo de tetrazólio
NAC	N-acetilcisteína
PARP	Poli (ADP-ribose) polimerase
PBS	Tampão Fosfato (do inglês, Phosphate Buffer Solution)
PI	Iodeto de propídeo
RPMI	Meio Roswell Park Memorial Institute
TNF	Fator de necrose tumoral
TNFR	Receptores do fator de necrose tumoral
TRAIL	Ligante indutor de apoptose relacionado ao TNF (do inglês TNF-related apoptosis-inducing ligand)

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	13
1.1 Câncer	13
1.2 Morte celular	17
1.3 Produtos Naturais e Sintéticos na Farmacoterapia do câncer.....	24
1.4 Quinonas.....	27
2 OBJETIVOS.....	36
2.1 Objetivo Geral.....	36
2.2 Objetivos específicos.....	36
3 MATERIAIS E MÉTODOS	37
3.1 Materiais utilizados	37
3.2 Animais	37
3.3 Métodos.....	37
3.3.1 Obtenção de naftoquinonas	37
3.3.2 Linhagens celulares tumorais	38
3.3.2.1 Cultivo das células tumorais	38
3.3.3 Ensaio para a determinação da atividade citotóxica in vitro pelo ensaio do MTT.....	38
3.3.4 Atividade Hemolítica em eritrócitos de camundongo.....	39
3.3.5 Avaliação da atividade antiproliferativa em células mononucleares do sangue periférico (CMSP– Alamar Blue.....	41
3.3.6 Avaliação do mecanismo de ação em células de melanoma (MDA-MB-435) ..	42
3.3.6.1 Avaliação da viabilidade celular – Exclusão por azul de tripan	42
3.3.6.2 Análise da Morfologia celular – Coloração por corante panótico rápido.....	43
3.3.6.3 Determinação da Integridade de membrana celular por citometria de fluxo..	44
3.3.6.4 Análise do ciclo celular e da fragmentação do DNA por citometria de fluxo..	44
3.3.6.5 Determinação do potencial transmembrânico da mitocôndria por citometria de fluxo.....	45
3.2.6.6 Determinação da ativação de caspases efetoras 3 e 7	46

3.2.6.7	Análise de dados dos ensaios de citometria de fluxo	47
3.2.6.8	Avaliação da presença de espécies reativas de oxigênio (EROs)	47
4	RESULTADOS	48
4.1	Atividade citotóxica da α-lapachona e seu derivado tetrahidropirano (THP) pelo ensaio do MTT e ensaio de seletividade pelo método do Alamar blue.	48
4.2	Atividade hemolítica em eritrócitos de camundongos <i>Mus musculus Swiss</i>	50
4.3	Viabilidade celular pelo método de exclusão por azul de tripan.....	51
4.4	Análise da morfologia celular	53
4.4.1	Coloração diferencial por corante panótico	53
4.5	Citometria de fluxo	57
4.5.1	Integridade de membrana celular e concentração de células determinada por citometria de fluxo	57
4.5.2	Análise do ciclo celular e da fragmentação de DNA determinada por citometria de fluxo.....	59
4.5.3	Determinação do Potencial Transmembrânico de Mitocôndria	61
4.5.4	Determinação da ativação da caspases 3/7	61
4.5.5	Avaliação da presença de espécies reativas de oxigênio (EROs)	63
5	DISCUSSÃO	64
6	CONCLUSÃO	72
	REFERÊNCIAS.....	73

1 INTRODUÇÃO

1.1 Câncer

O câncer pode ser caracterizado como uma doença proliferativa. A proliferação celular está envolvida em numerosos processos fisiológicos e patológicos, incluindo crescimento, cicatrização e desenvolvimento de tumores (RANG *et al.*, 2003; COTRAN; KUMAR; COLLINS, 2000).

Tecidos normais controlam a produção e liberação de sinais promotores do crescimento que regulam a entrada e progressão do ciclo celular, assegurando assim a homeostase e manutenção da arquitetura e função do tecido. Em células tumorais, estes sinais são desregulados, e em grande parte, se ligam a receptores que emitem sinais que regulam a progressão do ciclo celular e o tamanho da célula (COTRAN; KUMAR; COLLINS, 2000).

A manutenção e o acúmulo dessas células formam os tumores malignos, que podem adquirir a capacidade de se desprenderem do tumor inicial e proliferarem em órgãos distantes do organismo, originando as metástases (NCI, 2012; BROOKS *et al.*, 2010).

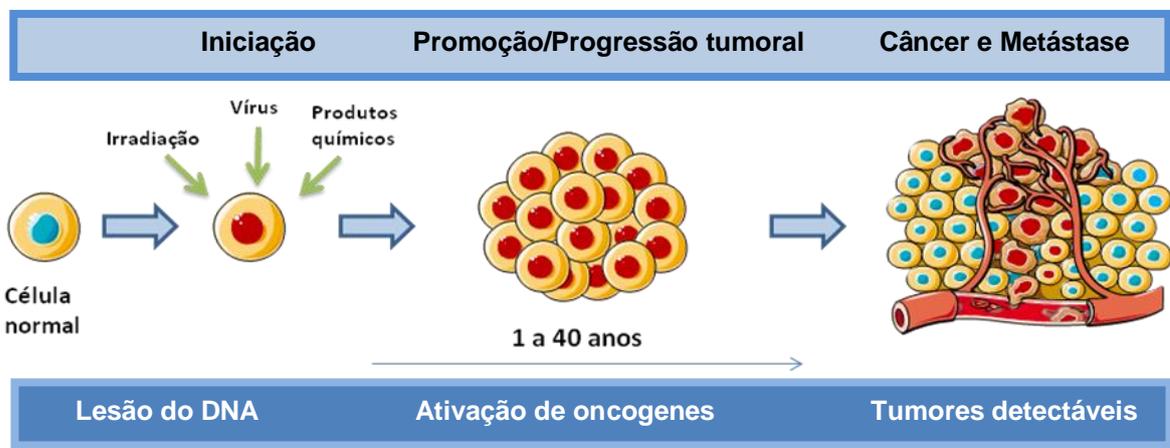
Existem diversos mecanismos envolvidos na evolução de uma célula normal para uma célula potencialmente maligna, e a maior parte deles interfere no ciclo celular, onde células com DNA danificado, que normalmente seriam mortas, progridem através do ciclo celular, acumulando mutações e transmitindo as alterações moleculares às células-filhas (ALMEIDA *et al.*, 2005; FOSTER, 2008).

Assim, o câncer é considerado uma doença genética, resultado de mutações em células somáticas, e surge quando a taxa de crescimento excede a taxa de morte celular, de modo que as células se dividem incontrolavelmente (BERGMAN; HARRIS, 1997).

O início da tumorigênese pode ocorrer isoladamente após breve exposição a agente carcinogênico, denominado agente iniciador, causando dano genético à célula. Em seguida, a exposição prolongada do agente promotor favorece

a expansão de populações de células portadoras de uma mutação inicial, processo denominado promoção, caracterizado por instabilidade genômica, podendo levar a novos danos genéticos (ALBERTS, 2009; RUDDON, 2007). O último estágio, denominado progressão tumoral, caracteriza-se pela proliferação celular descontrolada, sendo um processo irreversível. Nesta fase, observam-se as primeiras manifestações clínicas da doença (SPENCE; JONHSTON, 2001; KUMMAR; ABBAS; FAUSTO, 2007; JUNG; BRABLETZ; KIRCHNER, 2006; SPANDIDOS, 2007) (Figura 1).

Figura 1. Ilustração esquemática da tumorigênese.



A neoplasia maligna possui várias características como: autossuficiência na sinalização de fatores de crescimento, insensibilidade à sinais de inibição do crescimento, invisibilidade a imunovigilância, evasão da morte celular programada, potencial de replicação ilimitado, angiogênese, capacidade de invasão e produção de metástase a distância, instabilidade genética e desregulação da energia celular (HANAHAN; WEINBERG, 2011) (Figura 2).

Figura 2. Alterações fisiológicas comuns a maioria dos tipos de câncer.



Fonte: Hanahan e Weinberg, 2011.

O microambiente inflamatório tumoral, por sua vez, também é participante ativo na tumorigênese, no recrutamento de linfócitos, macrófagos e células dendríticas, contribuindo para o desenvolvimento e expressão de certas habilidades do tumor, que são adquiridas de forma progressiva (COLLOTA, 2009; HANAHAN; WEINBERG, 2011).

Existem quatro classes principais de reguladores implicados na carcinogênese que levam ao câncer. Os proto – oncogenes, que estimulam o crescimento, genes supressores do crescimento, os que regulam a morte por apoptose e os genes que regulam a reparação do dano do DNA. (HANAHAN; WEINBERG, 2000)

Os genes supressores de tumor atuam diminuindo a proliferação celular e, geralmente, as alterações nesses genes estão associadas a perda de função. Já, os proto-oncogenes estão envolvidos na regulação positiva da proliferação celular. Seus mutantes, as formas hiperreativas, quando alterados ou amplificados no genoma, passam a ser denominados oncogenes, e promovem o crescimento celular na ausência de sinais mitogênicos (ALBERTS *et al.*, 2009; MENDELSON *et al.*, 1995).

As causas da neoplasia podem ser externas ou internas ao organismo. As causas externas relacionam-se com o meio-ambiente como: radiação, exposição a agentes químicos, agentes infectantes e hábitos sociais. As causas internas podem ocorrer por defeitos no sistema imune e predisposição genética do indivíduo (RUDDON, 2007; SCHOTTENFELD; BEEBE-DIMMER, 2005).

Mesmo após importantes avanços no entendimento das neoplasias, o câncer apresenta-se como a segunda causa de morte por doença no mundo (SCHOTTENFELD; BEEBE-DIMMER, 2005). A Organização Mundial de Saúde (OMS) estimou que, no ano 2030, pode-se esperar 27 milhões de casos incidentes de câncer. O maior efeito desse aumento vai incidir em populações de países de baixa e média rendas (OMS; INCA, 2012).

Na população brasileira, o câncer se apresenta como a segunda causa de morte, precedido apenas pelas mortes de doenças cardiovasculares. Em 2012, o Ministério da Saúde, juntamente com o Instituto Nacional de Câncer, apontam a ocorrência de aproximadamente 518.510 casos novos de câncer (INCA, 2012).

O tratamento da maioria dos cânceres consiste na combinação de diferentes abordagens terapêuticas. A quimioterapia, cirurgia e radioterapia, representam as principais modalidades terapêuticas utilizadas (KUMMAR; ABBAS; FAUSTO, 2007; INCA, 2012). Mais recentemente, tem-se utilizado como terapia, a fotorradiação e imunoterapia (KUSUZAKI, 2007; HERR; MORALES, 2008).

A quimioterapia tem como principal objetivo, a erradicação das células neoplásicas, sem prejudicar os tecidos normais. Entretanto, a maioria dos agentes quimioterápicos não satisfazem esse critério, atuando de forma não-específica, lesando tanto células malignas quanto normais, particularmente as células de rápido

crescimento, como as gastrointestinais, capilares e as do sistema imunológico, o que explica a maior parte dos efeitos colaterais do tratamento quimioterápico (KATZUNG, 2003; KUMMAR; ABBAS; FAUSTO, 2007).

Diante deste cenário, faz-se necessária a contínua pesquisa de novos fármacos com maior especificidade para células tumorais e conseqüentemente, menos efeitos adversos.

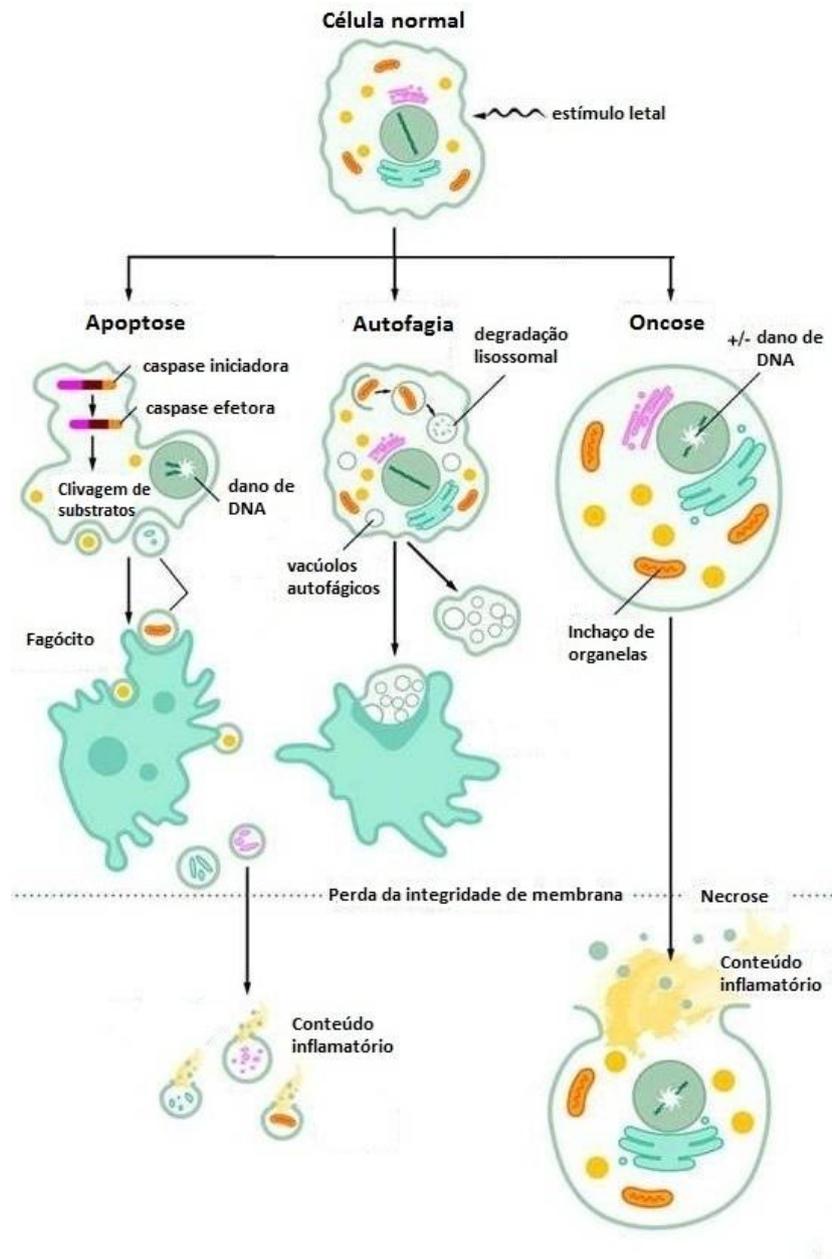
1.2 Morte celular

O reconhecimento de que a morte celular pode ocorrer por processos geneticamente controlados permitiu avanços em desvendar os mecanismos de muitas doenças e o desenvolvimento de agentes farmacológicos que iniciam ou inibem a morte celular programada (HOTCHKISS, 2009).

Assim, agentes utilizados na terapia do câncer, como radiação e drogas citotóxicas são tipicamente indutores potentes de morte celular programada, como apoptose, e da parada do ciclo celular (BUNZ, 2001). Por outro lado, a possibilidade de que outros processos de morte celular desempenham também um papel importante na regressão de tumores sólidos após tratamento medicamentoso deve ser considerada (HOUGHTON, 1999).

A morte celular pode ser classificada de acordo com a sua morfologia (definida por apoptose, necrose, autofagia ou catástrofe mitótica), critério enzimológico (com ou sem o envolvimento de nucleases ou classes distintas de proteases, como caspases e catepsinas), aspectos funcionais (programada ou acidental, fisiológica ou patológica) ou características imunológicas (imunogênica ou não imunogênica) (MELINO, 2001; OKADA; MAK, 2004; GALLUZI *et al.*, 2009).

Figura 3. Tipos de morte celular.



Fonte: Adaptado de Fink e Cookson, 2005.

A apoptose, antes referida como morte celular programada (KERR; WYLLIE; CURRIE, 1972), é responsável, em grande parte, pela manutenção da homeostase, sendo responsável pelo controle da população celular (LOURO *et al.*, 2002).

As alterações morfológicas que definem a apoptose incluem condensação da cromatina (picnose), redução do volume celular, que causa perda da aderência com a matriz extracelular e células vizinhas, e fragmentação nuclear (cariorrexe). As

células apoptóticas formam prolongamentos citoplasmáticos chamados “blebbings”, seguidas de formação de corpos apoptóticos contendo organelas citoplasmáticas e fragmentos nucleares. Os corpos apoptóticos, por sua vez, são fagocitados rapidamente por macrófagos, sem causar estímulo pró-inflamatório, diferentemente da necrose (KROEMER *et al.*, 2009; ZIEGLER; GROSCURTH, 2004).

Em relação às alterações bioquímicas, destacam-se a clivagem de proteases aspartato-específicas, chamadas caspases, externalização de fosfatidilserina, que permite o reconhecimento dos macrófagos para a fagocitose dos corpos apoptóticos. Pode ocorrer perda do potencial da membrana mitocondrial devido a alterações na sua permeabilidade, com liberação de proteínas pró-apoptóticas presentes do espaço intermembranar, tendo como maior representante o citocromo c (HANAYAMA *et al.*, 2004, HENGARTNER, 2000; KROEMER; REED, 2000; RICH; WATSON; WYLLIE, 1999).

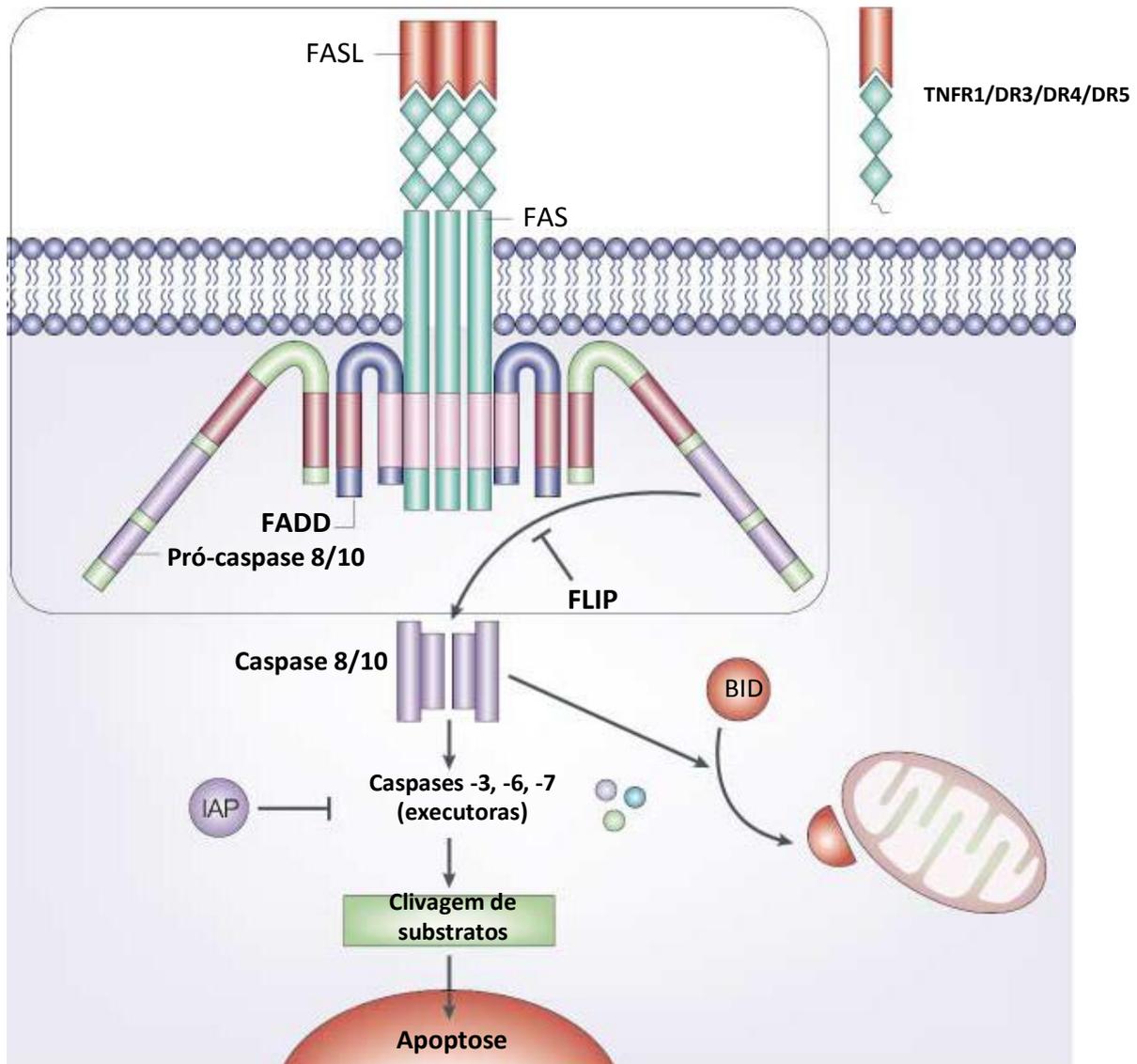
As caspases são sintetizadas como pró-enzimas com baixa atividade intrínseca e, portanto, necessitam de ativação, quer pela maturação proteolítica ou pela interação com um ativador alostérico. Componentes estruturais, como lamininas nucleares e as proteínas do citoesqueleto, são alvos de caspases, causando as principais alterações morfológicas características de apoptose (ORRENIUS; NICOTERA; ZHIVOTOVSKY, 2011).

Este processo pode ser desencadeado por duas vias distintas, porém convergentes: via extrínseca, por receptor de morte e via intrínseca ou mitocondrial. A via extrínseca é mediada por receptores de morte, representados por membros da família TNF (FAS, TNFR1 e DR3, DR4 e DR5) e seus ligantes que incluem TNF- α , TRAIL e ligante Fas (FasL) (LOCKSLEY; KILLEEN; LENARDO, 2001; ITOH; NAGATA, 1993; ADAM-KLAGES *et al.*, 2005). Ao se ligarem, há formação do complexo indutor de sinalização de morte (DISC), resultando na ativação de caspases iniciadoras 8 ou 10 (RICCI; ZONG, 2006).

Em células do tipo I, a caspase-8 ativa diretamente a pró-caspase-3, que cliva proteínas-alvo, levando a apoptose. Em células do tipo II, a caspase-8 cliva BID (*BH3-interacting domain death agonist*) que, por sua vez, induz a translocação, oligomerização, e inserção de Bax (*BCL-2-associated X protein*) e/ou Bak (*BCL-2-associated X protein*) para o exterior da membrana mitocondrial, ativando a via intrínseca e permitindo a liberação de vários fatores a partir do espaço intermembranar mitocondrial, incluindo citocromo c, que após ser liberado, forma um

complexo com APAF-1 (*apoptotic protease-activating factor 1*) e pró-caspase-9 na presença de ATP. Isto resulta na autoclivagem de pró-caspase-9, que desencadeia a ativação de caspases efetoras 3, 6 ou 7 (ORRENIUS; ZHIVOTOVSKY; NICOTERA, 2003; ORRENIUS; NICOTERA; ZHIVOTOVSKY, 2011).

Figura 4. Via de apoptose extrínseca.



Fonte: Adaptado de Igney e Kramer, 2002.

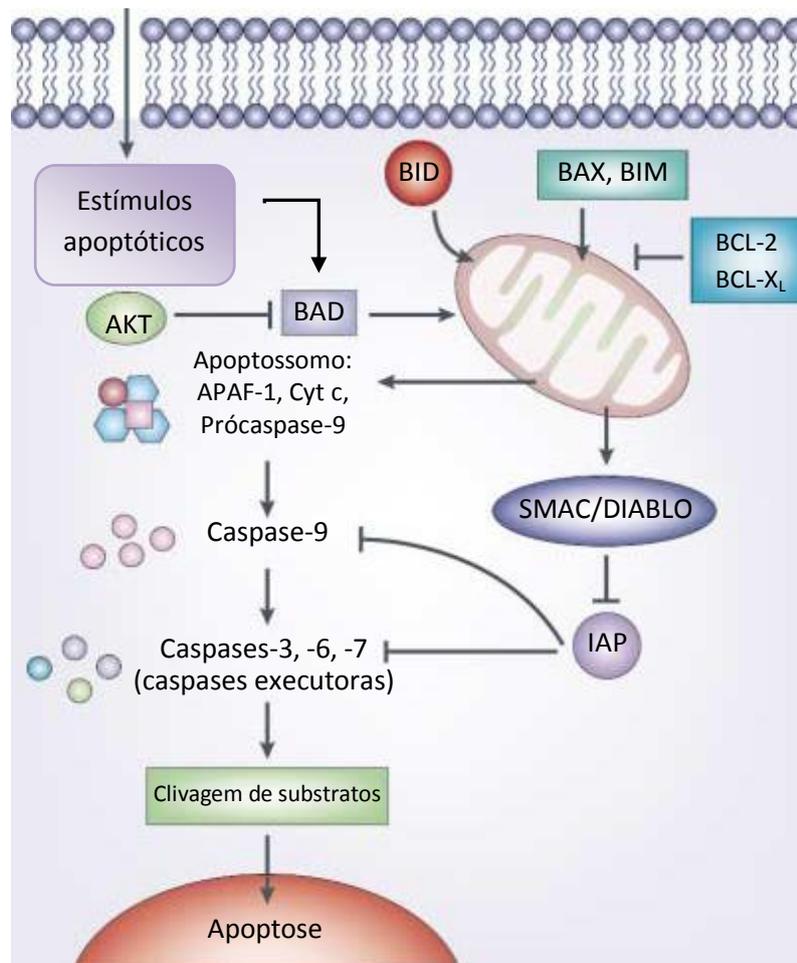
Na via mitocondrial, os sinais de morte atuam diretamente ou indiretamente na mitocôndria para provocar a liberação de proteínas pró-apoptóticas do espaço intermembranar (ORRENIUS; NICOTERA; ZHIVOTOVSKY, 2011). Os iniciadores deste processo incluem agentes quimioterápicos, radiação ionizante,

choque térmico, espécies reativas de oxigênio, dano no DNA e privação de fatores de crescimento. (HENGARTNER, 2000).

A permeabilização da membrana mitocondrial induz a formação de poros por onde são liberadas pequenas moléculas do seu espaço intermembranar, que incluem citocromo c (LIU et al.,1996), Smac/DIABLO (DU et al., 2000), AIF (Fatores de indução de apoptose) (SUSIN *et al.*, 2000) e endonucleases (LI et al., 2001), resultando em apoptose.

A via intrínseca também pode operar através de mecanismos independentes de caspases, que envolve a liberação a partir da mitocôndria e translocação para o núcleo de pelo menos duas proteínas, fator de indução de apoptose (AIF) e endonuclease G (EndoG) (ORRENIUS; NICOTERA; ZHIVOTOVSKY, 2011).

Figura 5. Via de apoptose intrínseca.



Fonte: Adaptado de Igney e Kramer, 2002.

O balanço pró e anti-apoptótico é controlado pela família Bcl-2 . As proteínas antiapoptóticas (BCL-2, BCL-XL, BCL-W, MCL-1, A1), localizadas na membrana externa da mitocôndria, no citosol ou na membrana do retículo endoplasmático são responsáveis pelo bloqueio da MOMP (do inglês, *mitochondrial outer membrane permeabilization*). As proteínas pró-apoptóticas BAX e BAK são responsáveis pela formação dos poros na membrana externa mitocondrial, possibilitando a liberação de diversos fatores pró-apoptóticos (CHIPUK; GREEN, 2008).

Enquanto a apoptose envolve a rápida destruição de estruturas e organelas, a autofagia, também considerada tipo de morte programada, é um processo lento, espacialmente restrito, em que ocorre na ausência de condensação da cromatina acompanhado por vacúolos com membrana dupla, que são finalmente, digeridos por hidrolases lisossomais (KLIONSKY; EMR, 2000; KROEMER; JAATTELA, 2005).

Consiste em uma resposta adaptativa a um estresse subletal, como a privação de nutrientes e fatores de crescimento (BAEHRECKE *et al.*, 2005) . Porém, também desempenha um papel na supressão do crescimento do tumor, eliminação de microorganismos intracelulares e apresentação de antígeno (KLIONSKY, 2007; KROEMER; JAATTELA, 2005; LEVINE; DERETIC, 2007)

O termo catástrofe mitótica foi empregado para a morte celular que ocorre durante ou logo após uma falha na mitose. Resulta de uma combinação entre a deficiência nos checkpoints do ciclo celular e dano celular (CASTEDO *et al.*, 2004). Morfologicamente, as células apresentam alterações nucleares grosseiras como, micro e multinucleação, condensação nuclear incompleta, defeito no alinhamento dos cromossomos e dano no DNA (BRUIN; MEDEMA, 2008). O dano que leva a catástrofe mitótica pode ser induzido por fármacos quimioterápicos como agentes da hiperpolimerização dos microtúbulos (paclitaxel), agentes despolimerizantes de microtúbulos (vinblastina e vincristina) e inibidores de checkpoint quinase 1 (Chk1) (7-hidroxiestaurosporina) (RICCI; ZONG, 2006).

A necrose é definida como um tipo de dano celular, associado frequentemente com processos patológicos, como: doença vascular-oclusiva, doenças neurodegenerativas, infecção, doenças inflamatórias, exposição a toxinas, e câncer (MAJNO; JORIS, 1995; PROSKURYAKOV; KONOPLYANNIKOV; GABAI,

2003; YUAN; LIPINSKI; DEGTEREV, 2003). Envolve perda inicial da integridade da membrana plasmática, culminando no extravasamento do conteúdo celular, causando danos às células vizinhas e reação inflamatória local, presumivelmente através da liberação de fatores que alertam o sistema imune inato (EDINGER; THOMPSON, 2004; FESTJENS; VANDEN BERGHE; VANDENABEELE, 2006; ZITVOGEL *et al.*, 2004).

Alterações que acompanham a necrose são: superprodução de EROs, inchaço celular, depleção de ATP, quebra de DNA randômica, disfunção da homeostase do cálcio, aumento de organelas, ativação de proteases (calpains e catepsinas), ruptura lisossomal e finalmente, perda da integridade da membrana plasmática (ZONG *et al.*, 2004).

Um acúmulo de evidências sugere a existência de um curso programado de eventos na célula necrótica, processo tradicionalmente considerada como uma forma acidental de morte celular. A morte celular com uma aparência necrótica pode contribuir para o desenvolvimento embrionário e homeostase do tecido adulto; pode ser induzida por ligantes que se ligam a receptores específicos de membrana, e também pode ser regulada por fatores genéticos, epigenéticos e farmacológicos (GOLSTEIN; KROEMER, 2006).

Dependendo do estímulo letal, tipo celular e concentração, muitas substâncias podem induzir apoptose, necrose, ou autofagia. (ORRENIUS; ZHIVOTOVSKY, 2006). Por exemplo, células tumorais de mama MCF-7, tratadas com o agente tamoxifeno resultou na lise de quase todas as células dentro de 24 horas. No entanto, a incubação transitória de 1 hora com a mesma concentração, causou autofagia (BURSCH *et al.*, 2008).

Pesquisadores começaram a considerar a eficácia do tratamento do câncer através da indução de morte celular por necrose. Abordagens relatam agentes capazes de induzir necrose em células tumorais, incluindo o tratamento fotodinâmico (PDT) e agentes alquilantes de DNA. Outros agentes, tais como beta-lapachona, apoptolidina, e honokil também parecem induzir a morte de células tumorais através de necrose (LI *et al.*, 1999; SALOMON *et al.*, 2003; TAGLIARINO *et al.* 2001; BAI *et al.*, 2003).

1.3 Produtos Naturais e Sintéticos na Farmacoterapia do câncer

Os primeiros registros da utilização de produtos naturais como agentes medicinais datam de milhares de anos. Os registros mais antigos são da Mesopotâmia de aproximadamente 2600 a.C. (NEWMAN; CRAGG; SNADER, 2000). Desde então, os produtos naturais têm servido como fonte de descoberta e inspiração para a atual farmacopéia, desempenhando um importante papel no tratamento e prevenção de doenças humanas (BAKER, 2007; BUTLER, 2008, NEWMAN; CRAGG, 2009; KINGSTON, 2011).

Embora as estimativas variem de acordo com a definição do que é considerada droga derivado de produto natural, sabe-se que entre 25 a 50% dos medicamentos atualmente comercializados devem sua origem a produtos naturais (KINGSTON, 2011). Segundo Newman e Cragg (2012), no período de 1981 a 2010, aproximadamente 50% dos medicamentos introduzidos no mercado foram originados de produtos naturais, provenientes de diversas fontes, incluindo plantas, organismos terrestres, marinhos e microorganismos.

Entre os primeiros princípios ativos a serem isolados de fontes naturais estão a estricnina, morfina, quinina, colchicina, dentre outros (NEWMAN; CRAGG; SNADER, 2000).

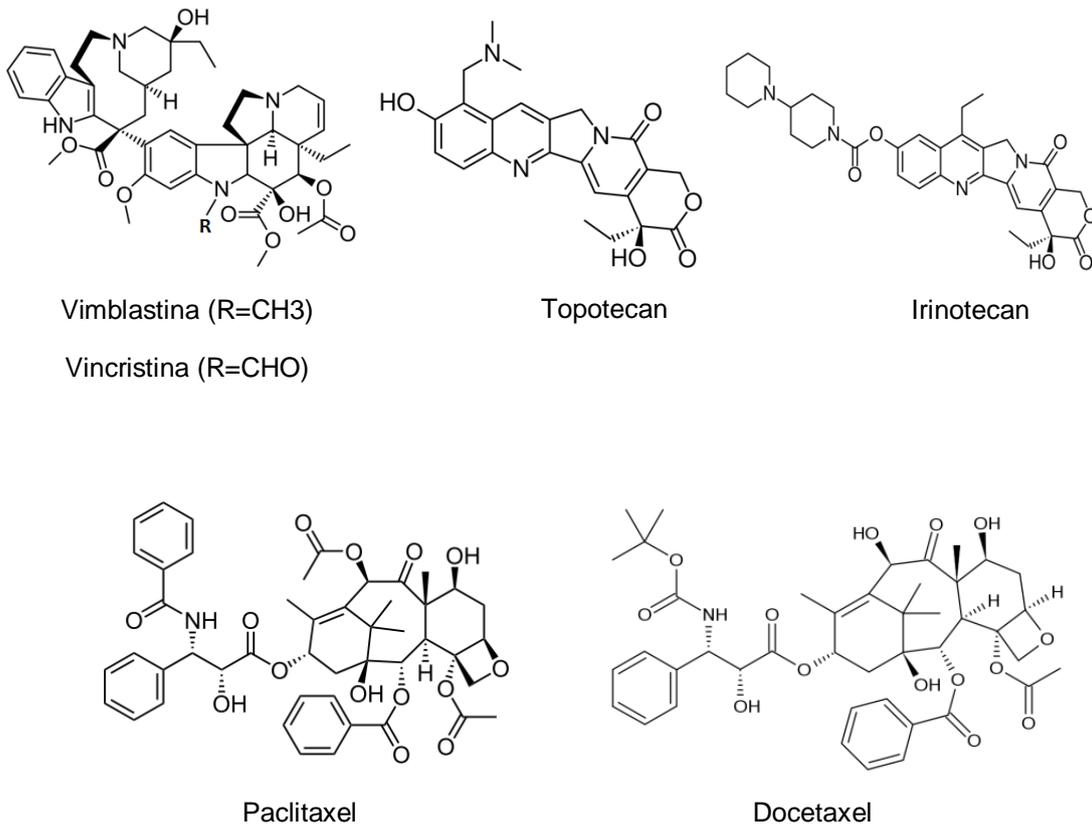
Existe um número substancial de agentes antitumorais utilizados na clínica derivados de produtos naturais, cujo montante foi de cerca de 48% de todas as drogas anticâncer disponíveis entre 1940 e 2011 (BUTLER, 2004; NEWMAN; CRAGG, 2012). Uma análise dos fármacos aprovados entre 1981 a 2010 apresentou um significativo número de agentes antineoplásicos, logo abaixo de medicamentos para o tratamento de doenças infecciosas (NEWMAN; CRAGG, 2012).

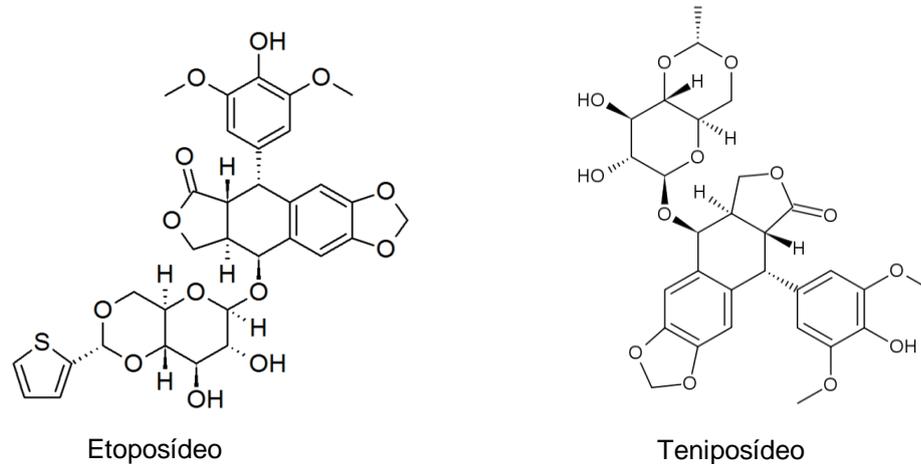
Os primeiros agentes anticâncer aprovados para uso clínico foram vimblastina e vincristina, isolados da planta *Catharanthus roseus* G. Don, utilizadas no tratamento de leucemias (NOBLE, 1990). Outros exemplos de fármacos antitumorais são etoposídeo e teniposídeo, que são derivados semi-sintéticos da epipodofilotoxina, originada da planta *Podophyllum peltatum*, ativos contra câncer de pulmão (LEE; XIAO, 2005).

Os taxóis Paclitaxel e Docetaxel (*Taxus brevifolia* L.) apresentam atividade contra tumores de mama e ovário. Os derivados Topotecan e Irinotecan (*Camptotheca acuminata* Decne), pertencentes à classe das camptotencinas, possuem atividade contra câncer colorretal e ovariano respectivamente, sendo aprovados para o uso clínico em vários países (BALUNAS; KINGHON, 2005; CRAGG; NEWMAN, 2005; VAN DER HEIJDEN *et al.*, 2004).

Como representantes de antibióticos antitumorais estão: antraciclina, como daunorrubicina, doxorrubicina, bleomicina, actinomicina e mitomicina (CRAGG; NEWMAN; WEISS, 1997; BINASCHI, *et al.*, 2000).

Figura 6. Exemplos de agentes anticâncer derivados de produtos naturais.





Fonte: Kingston, 2011.

Fármacos derivados de organismos marinhos também têm contribuído para o arsenal farmacêutico, como a trabectenina (Yondelis[®]), isolada do tunicado *Ecteinascidia turbinata*, utilizado no tratamento de sarcomas avançados de tecidos moles, e eribulina (Halaven[®]), derivado sintético da halicondrina, isolada da esponja marinha *Halichondria okadai* e aprovada pelo FDA em 2010 para o tratamento de câncer de mama metastático (CUEVAS; FRANCHESCH, 2009; NASTRUCCI; CESARIO; RUSSO, 2012).

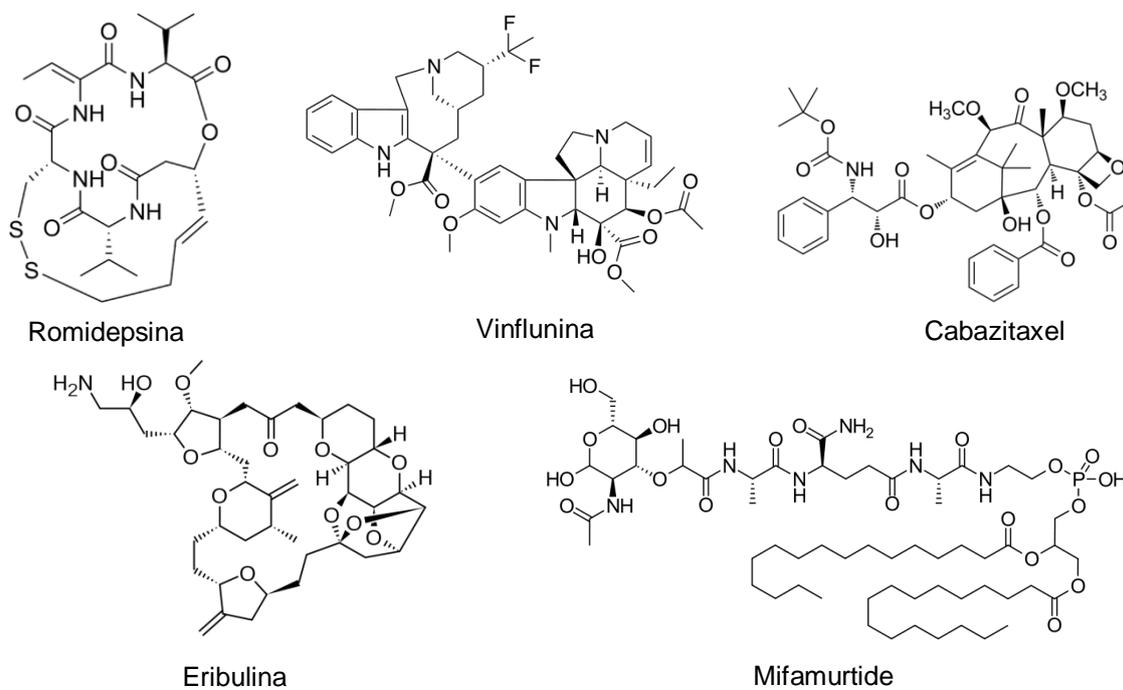
Entre as recentes descobertas de substâncias com potencial antitumoral provenientes de produtos naturais, pode-se citar o sorafenib (Nexavar[®]), aprovado pelo FDA em 2005 para o tratamento de carcinoma de células renais; o polyphenon E, aprovado em 2007, inicialmente para o tratamento de verrugas genitais ligadas ao vírus do papiloma humano (HPV), e atualmente está em fase clínica II para o tratamento de leucemia linfocítica e câncer de pulmão e bexiga (NEWMAN; CRAGG, 2012).

A romidepsina (Istodax[®]), aprovada em 2009, indicada para o tratamento de linfoma de células T, é um produto natural microbiano sem nenhuma modificação, obtida da bactéria *Chromobacterium violaceum* (NEWMAN; CRAGG, 2012).

Outros exemplos de compostos derivados de produtos naturais estão: a vinflunina, uma modificação da vimblastina para uso como agente antineoplásico com eficácia melhorada (BONFIL *et al.*, 2002), Cabazitaxel (Jevtana[®]), um derivado semi-sintético do taxol, aprovado em 2010, para o tratamento de câncer de próstata

e Mifamurtide (Mepact®), derivada do dipeptídeo muramyl, aprovada em 2009 para o tratamento de osteosarcoma (FDA, 2010).

Figura 7. Fármacos antitumorais derivados de produtos naturais.



Fonte: Newman e Cragg, 2012.

Problemas, como toxicidade e resistência a drogas, têm servido para estimular a pesquisa e descoberta de novos agentes antitumorais. Assim, os produtos naturais têm inspirado o desenvolvimento da química combinatória, utilizada como ferramenta na descoberta de compostos análogos com propriedades farmacológicas melhoradas (HARVEY, 2008; ROCHA; LOPES; SCHWARSTMANN, 2001).

1.4 Quinonas

Desde a antiguidade, plantas contendo quinonas têm sido utilizadas por suas atividades biológicas, e como fonte de corantes naturais, como a alizarina, uma antraquinona, obtida das raízes de *Rubia tinctorum*, conhecida no Antigo Egito, Pérsia e Índia, que também foi utilizada na alimentação de homens e animais (BUDAVARI, 1996).

Quinonas representam uma classe de metabólitos secundários de ocorrência natural, que são reduzidos a fenóis e apresentam dois grupos carbonílicos, formando um sistema conjugado com pelo menos duas ligações duplas C-C, geralmente, de cor amarela a vermelha. Assim, de acordo com a sua estrutura molecular, utilizando como critério o tipo de sistema aromático que sustenta o anel quinonoídico, as quinonas são divididas em: benzoquinonas, com um anel benzênico, naftoquinonas, com um anel naftoquinônico, antraquinonas, com um anel antracênico linear ou angular (SIMÕES *et al.*, 2004; SILVA; FERREIRA; SOUZA, 2003).

As quinonas possuem ampla distribuição na natureza, presentes em vegetais superiores, artrópodes, fungos, líquens, bactérias, algas e vírus (THOMSON, 1971, 1991).

Diversas atividades biológicas estão relacionadas à quinonas, como antitumorais (LIU; LI; SAKYA, 2004; ASCHE *et al.*, 2005; ZAKHAROVA *et al.*, 2011); moluscidas (SANTOS *et al.*, 2000, 2001; BARBOSA *et al.*, 2005), leishmanicidas (TEIXEIRA *et al.*, 2001; RIBEIRO *et al.*, 2009), anti-inflamatórias (ALMEIDA *et al.*, 1990; LAUBE *et al.*, 2009) antifúngicas (GARNIER *et al.*, 1996; TANDON *et al.*, 2010; IBIS *et al.*, 2011), tripanossomicidas (PINTO *et al.*, 2000; MOURA *et al.*, 2001; SILVA JÚNIOR *et al.*, 2012), antiprotozoárias (ZANI *et al.*, 1997; GRELLIER *et al.*, 2010) e inibidoras da enzima transcriptase reversa do vírus HIV-1 (STAGLIANO *et al.*, 2006). Assim, devido a grande variedade das propriedades farmacológicas, têm-se intensificado o interesse por estas substâncias nos últimos anos (FERREIRA *et al.*, 2010).

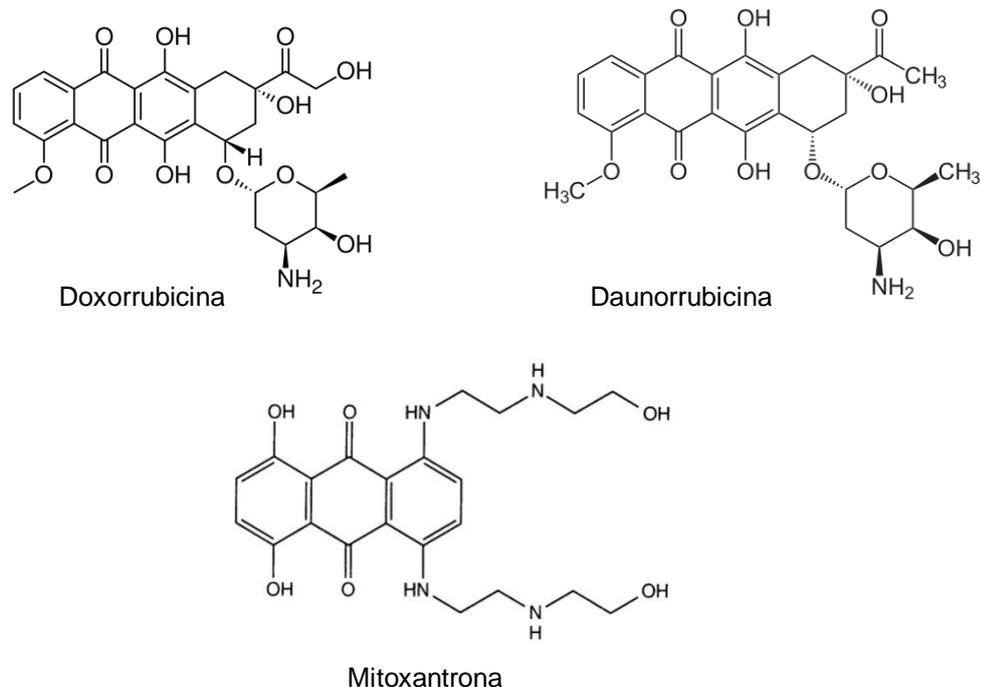
Estudos sobre o mecanismo de atuação biológica destacam a importância do grupo quinonoídico como o grupo farmacofórico imprescindível para a biorreatividade no nível das enzimas do tipo redutases, formando espécies reativas do oxigênio que induzem a apoptose (BARREIRO; FRAGA, 2001; FERREIRA *et al.*, 1996).

Dentre os fármacos com grupamento quinona utilizada na terapia antineoplásica, destacam-se as mitomicinas, antraciclina e mitoxantrona (FOYE, 1995). As mitomicinas, tendo como maior representante a mitomicina C, e

antraciclina, são produtos de fungos do gênero *Streptomyces* que possuem atividade antibiótica e antitumoral.

Os representantes mais conhecidos da classe das antraciclina são a daunorrubicina e a doxorubicina isoladas de *S. peuceoticus* e *S. coeruleorubidus*, respectivamente. Exibem um amplo espectro de atividade antitumoral, porém, a sua utilização é limitada pela indução de cardiotoxicidade dose-dependente, o que determinou o desenvolvimento de novos análogos com reduzido potencial cardiotoxico e índice terapêutico favorável, entretanto, a maioria dos compostos sintetizados não demonstrou atividade significativa comparada a doxorubicina (SAIFY *et al.*, 1999; SINGAL; ILISKOVIC, 1998).

Figura 8. Estruturas de quinonas utilizadas no tratamento do câncer.



Fonte: Almeida *et al.*, 2005.

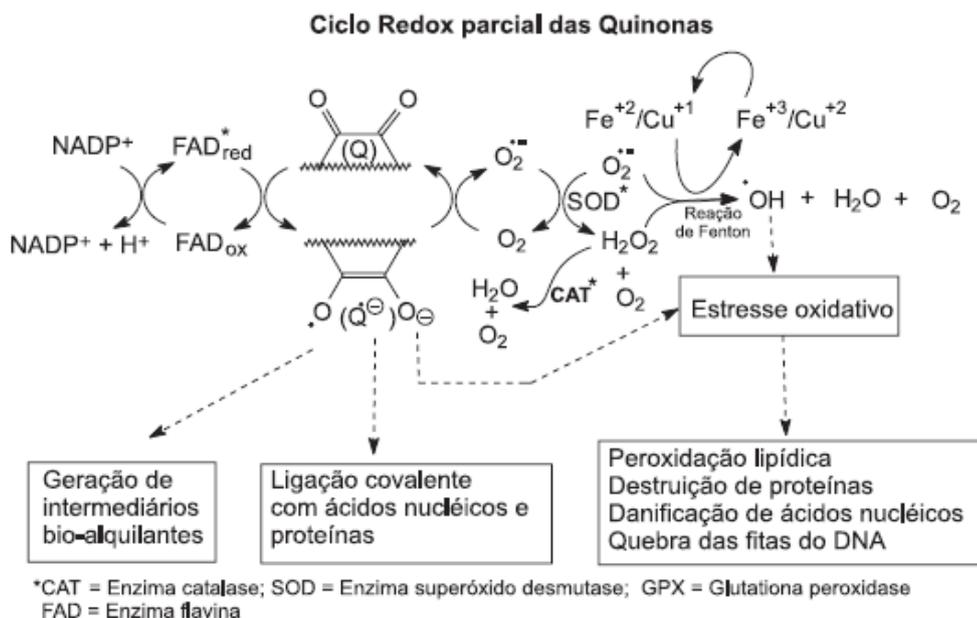
As quinonas exibem duas reações que descrevem sua interação com os sistemas biológicos. Podem reagir transferindo elétrons de um agente redutor, como o NADPH, ao oxigênio, o que gera espécies reativas de oxigênio (EROs), que oxidam grupos funcionais das proteínas. Em segundo lugar, podem reagir como eletrófilos, formando ligações covalentes com grupos funcionais nucleófilos em

moléculas biológicas, como proteínas e DNA (BOLTON *et al.*, 2000; KUMAGAI *et al.*, 2011).

O desequilíbrio entre a formação e a remoção dos radicais livres no organismo, decorrente da diminuição dos antioxidantes endógenos ou do aumento da geração de espécies oxidantes, leva a um estado pró-oxidante que favorece a ocorrência de lesões oxidativas em macromoléculas e estruturas celulares que podem provocar a morte celular (FRIDOVISC, 1998; ROVER JÚNIOR, 2001).

O processo de formação de EROs pelas naftoquinonas ocorre porque estes compostos são reduzidos enzimaticamente (Figura 11), formando o ânion semiquinona pelo ganho de um elétron. Esta se de auto-oxida e reage com o oxigênio para oxidar a quinona (JARABAK; JARABAK, 1995). Este processo normalmente é promovido pelo citocromo P-450 redutase. Por outro lado, as naftoquinonas também podem ser reduzidas pela DT-diaforase ou NAD(P)H:quinona oxirredutase. Neste caso, ocorre a transferência de dois elétrons, formando uma hidroquinona, que é menos reativa, sendo esta uma das formas de eliminação destes compostos (ZHOU *et al.*, 2003).

Figura 9. Ilustração esquemática do ciclo redox das quinonas.



Dentre as naftoquinonas naturais destaca-se o lapachol (2-hidróxi-3-(3-metil-2-butenil)1,4-naftalenodiona), isolada primeiramente por Paternó em 1882, do cerne da planta *Tabebuia avellanedae* (Bignoniaceae) e desde então, tem sido encontrado como constituinte de várias plantas das famílias Verbenaceae, Proteaceae, Leguminosae, Sapotaceae, Scrophulariaceae e Malvaceae (HUSSAIN, 2007; SILVA *et al.*, 2003).

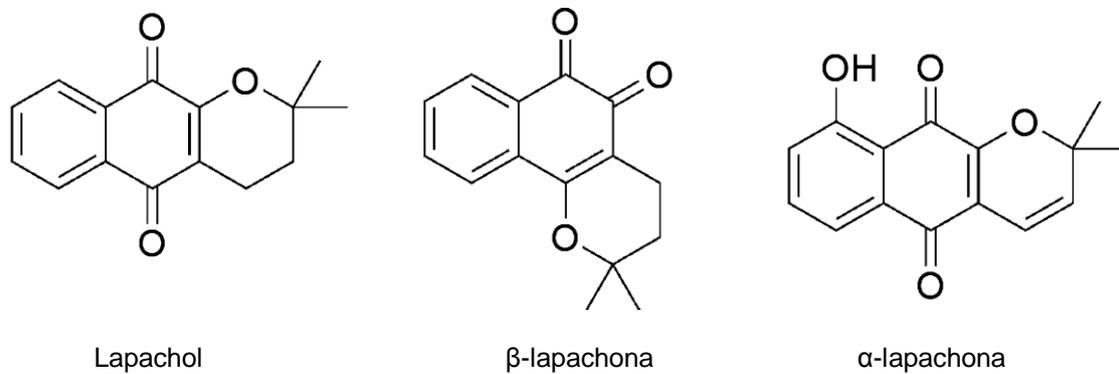
Diversas atividades farmacológicas foram atribuídas ao lapachol e a seus derivados semi-sintéticos, tais como atividade antimicrobiana e antifúngica contra espécies de *H. pylori*, *Staphylococcus*, *Streptococcus*, *Enterococcus*, *Bacillus* e *Clostridium*, *Mycobacterium tuberculosis*, além de efeito significativo contra *Candida albicans*, *Candida tropicalis*, *Candida glabrata*, *Cryptococcus neoformans*, similar a Anfotericina B e nistatina (GARNIER *et al.*, 1996; GUIRAUD *et al.*, 1994; COELHO *et al.*, 2010); atividade cercaricida, na prevenção da penetração de cercárias de *Schistosoma mansoni* na pele (AUSTIN *et al.*, 1974; PINTO *et al.*, 1977); ação moluscicida, contra caramujos *Biomphalaria glabrata*, hospedeiro intermediário do *Schistosoma mansoni* (SANTOS, 2000, 2001); leishmanicida, contra amastigotas de *Leishmania (viannia) braziliensis* (TEIXEIRA *et al.*, 2001; KAYSER *et al.*, 2000) tripanocida, contra a fase tripomastigota do *Trypanosoma cruzi* (GOULART *et al.*, 1997; PINTO *et al.*, 2000; SILVA JÚNIOR *et al.*, 2012) antimalárico, (CARVALHO *et al.*, 1988; ROBERT *et al.*, 2002; ANDRADE-NETO *et al.*, 2004; PÉREZ-SACAU, *et al.*, 2005); antiinflamatória (ALMEIDA *et al.*, 1990; LIU *et al.*, 1999; MOON *et al.*, 2007); e antimetastático (BALASSIANO *et al.*, 2005; KIM *et al.*, 2007).

O lapachol foi avaliado nos tratamentos de carcinoma de Walker-256 (RAO; McBRIDE; OLESON, 1968) e do sarcoma de Yoshida (SANTANA; SILVA, 1981) exibindo significante atividade antitumoral. Porém, em 1974, os ensaios clínicos desenvolvidos pelo NCI-USA, o desaprovaram em decorrência de efeitos colaterais, causando anemia, aumento do tempo de coagulação e problemas gastrintestinais em pacientes com câncer (BLOCK *et al.*, 1974)

Os primeiros análogos naturais do lapachol a serem isolados foram as 1,2 e 1,4 naftoquinonas β -lapachona e α -lapachona, respectivamente, presentes como constituintes minoritários na planta *Tabebuia avellanedae*, conhecida como ipê-preto, ipê-rosa, ipê-roxo, pau d'arco, tahebo ou lapacho (PIO CORREA; PENNA,

1969; NAGATA, 1998). O lapachol também serviu de protótipo para síntese destas substâncias no final do século XIX (HOOKER, 1892; SILVA *et al.*, 2002).

Figura 10. Estruturas químicas das naftoquinonas, lapachol, β -lapachona e α -lapachona.



Fonte: Ferreira *et al.*, 2010.

A β -lapachona (7,8-benzo-2,2-dimetil-3,4-diidro-5,6-oxo-2H cromeno) mostra uma diversificada ação farmacológica, desempenhando atividades como, antibacteriana, tripanossomicida, antiretroviral, antiinflamatória e antineoplásica (LI; AVERBOUKH; PARDEE, 1993; LOPES *et al.*; SCHUERCH; WEHRLI, 1978; GOIJMAN; STOPPANI, 1985; MANNA *et al.*, 1999).

Como agente anticâncer, a β -lapachona apresenta atividade contra uma variedade de linhagens tumorais como, melanoma, leucemia, câncer colorretal, pulmão, mama, cólon, próstata, dentre outros (LI *et al.*, 1999; PLANCHON *et al.*, 1995; 2001; PINK *et al.*, 2000a, 2000b; RIOS-LUCI, 2012).

Os mecanismos de ação da β -lapachona ainda não estão bem delineados, porém são reconhecidas diferentes atividades dependendo da célula estudada.

Na sua molécula, os grupos carbonílicos vizinhos configuram uma estrutura eletrônica que facilitam reações de oxidorredução, geradores de espécies reativas de oxigênio (EROs) (CHAU *et al.*, 1998), o que leva a morte celular por apoptose em linhagens tumorais de próstata (PLANCHON *et al.*, 2001), pulmão

(BEY *et al.*, 2007), e autofagia em células de glioma U87 MG (PARK; CHOI; KWON, 2011), mecanismos dependentes da enzima NAD(P)H: quinona oxirredutase-1 (NQO1), expressa em altas concentrações em vários tipos de tumores e responsável por catalisar a redução de quinonas a hidroquinonas, evitando a formação do intermediário altamente reativo semiquinona e aumentando a sua toxicidade (MARIN *et al.*, 1997; MALKINSON *et al.*, 1992; BELINSKY; JAISWAL, 1993; JOSEPH *et al.*, 1994; PINK *et al.*, 2000; GUTIERREZ, 2000).

A β -lapachona também foi relatada como inibidora das enzimas topoisomerasas I e II, responsáveis pela manutenção da integridade do DNA, resultando na inibição do crescimento e morte celular por apoptose (LI; AVERBOUKH; PARDEE, 1993; KRISHNAN, 2001).

Boothman, Greer e Pardee (1987) e Boothman e Pardee (1989) descreveram a ação rádio-sensibilizadora da β -lapachona em células de câncer de laringe e melanoma humanos e, mais recentemente, também foram descritos para linhagens tumorais de próstata, pulmão e cólon (CHOI *et al.*, 2007; KIM *et al.*, 2005; SUZUKI *et al.*, 2006) aumentando a eficiência da radiação sobre os tumores, por causar apoptose mitocondrial, via ativação de proteínas Jun-N-terminal quinases (JNK) em células neoplásicas dependentes de NQO1, sugerindo a utilização desta substância na radioterapia (PARK; CHOI; KWON, 2011).

O uso combinado de β -lapachona com outros fármacos que atuam por diferentes mecanismos como o taxol mostrou-se efetiva contra tumores humanos de ovário e próstata (LI *et al.*, 1999). Sob o código ARQ 501, a β -lapachona em combinação com a gemcitabina, encontra-se em fase clínica II, em uma formulação com hidroxipropil- β -ciclodextrina (HP β CD), para o tratamento do câncer de pâncreas e carcinoma de cabeça e pescoço (KHONG *et al.*, 2007; KAWECKI *et al.*, 2007; FERREIRA *et al.*, 2010).

A α -lapachona (2,2-dimetil-3,4-diidro-5,10-dioxo-2H benzo[g]cromeno) possui uma atividade biológica promissora, porém com menor potencial citotóxico que seu congênere β -lapachona. O anel di-hidropirano presente em sua estrutura, atuando como substituintes 2-alcóxi e 3-álquil na porção quinona fornecem, a este

composto, propriedades redox mais leves e menor toxicidade, quando comparados a outras 1,4 naftoquinonas (NETTO-FERREIRA *et al.*, 2008).

Em estudo desenvolvido por Oliveira *et al.* (1990), foram testadas naftoquinonas contra formas eritrocíticas do *Plasmodium falciparum*, destacando-se a α e β -lapachona, por inibirem o crescimento do parasita, onde a α -lapachona apresentou uma CI_{50} (concentração inibitória em 50% das células) menor que seu congênere β -lapachona.

Estudos de estrutura-atividade em compostos derivados da α -lapachona mostraram que modificações no anel da estrutura química levam a mudanças nas suas bioatividades, mostrando-se relevante para o desenvolvimento de novos compostos com maior potencial farmacológico e com menor toxicidade (BONIFAZI *et al.*, 2010; WEI *et al.*, 2008).

Relataram-se atividades tripanossomicidas de derivados sintéticos da α -lapachona, destacando-se a epoxy- α -lapachona com atividade tripanossomicida similar com o observado para β -lapachona, porém, sem o alto perfil tóxico da mesma (BOURGUIGNON *et al.*, 2009, 2011; FERREIRA *et al.*, 2006; JORQUEIRA *et al.*, 2006; SALAS *et al.*, 2008; SILVA JÚNIOR *et al.*, 2008).

Estudos desenvolvidos por Krishnan *et al.* (2000, 2001), demonstraram que a α -lapachona é um efetivo inibidor da topoisomerase-II e um potencial composto para o desenvolvimento de fármacos para o tratamento de tumores resistentes à múltiplas drogas (MDR) associada a reduzida expressão de topoisomerase II.

Salustiano *et al.* (2009) descreveram atividade significativa de 1,4 naftoquinonas pentacíclicas, com estruturas relacionadas ao lapachol e α -lapachona, contra leucemias resistentes a multidrogas. Mais tarde, esta atividade também foi descrita para quinonas com estrutura baseada em pterocarpanos (NETTO *et al.*, 2010).

Em 2011, foi demonstrada uma atividade antivascolar para o composto dehidro- α -lapachona (xiloidina), em que afeta a adesão celular, inibe a regeneração

de vasos em peixe-zebra e reduz a densidade vascular em tumores de camundongos. Estes resultados sugerem que esta molécula pode servir como protótipo para o desenvolvimento de novos compostos com ações antiangiogênicas (GARKAVTSEV *et al.*, 2011).

Desse modo, a modelagem estrutural de novos compostos a partir da α -lapachona, revela-se importante no sentido de buscar novos fármacos para atuar com melhor eficácia e menor toxicidade no tratamento do câncer.

2 OBJETIVOS

2.1 Objetivo Geral

Avaliar a atividade citotóxica do derivado tetrahidropirano da alfa-lapachona *in vitro*.

2.2 Objetivos específicos

✓ Determinar o potencial citotóxico da α -lapachona e seu derivado tetrahidropirano em linhagens tumorais *in vitro*

✓ Determinar o potencial hemolítico da α -lapachona e seu derivado tetrahidropirano em eritrócitos de camundongo;

✓ Determinar a citotoxicidade do derivado tetrahidropirano em células mononucleares do sangue periférico humano;

✓ Estudar os mecanismos de ação de morte celular induzidos pela α -lapachona e seu derivado tetrahidropirano, através da observação da viabilidade celular, integridade de membrana, densidade celular, análise do ciclo celular, fragmentação nuclear, potencial transmembrânico mitocondrial, ativação de caspases, geração de espécies reativas de oxigênio, e morfologia celular em linhagem celular de melanoma humano MDA-MB-435.

3 MATERIAIS E MÉTODOS

3.1 Materiais utilizados

Os equipamentos, soluções, reagentes e fármacos utilizados estão listados no anexo A.

3.2 Animais

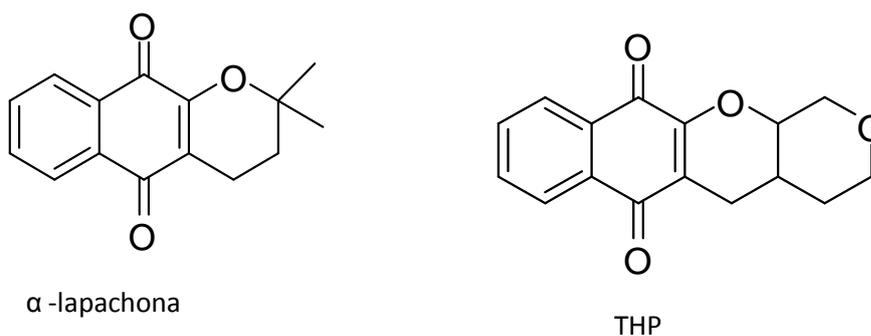
Os animais utilizados no ensaio de atividade hemolítica foram camundongos (*Mus musculus* var. albina L.) provenientes do biotério do Departamento de Fisiologia e Farmacologia, da Faculdade de Medicina, Universidade Federal do Ceará.

3.3 Métodos

3.3.1 Obtenção de naftoquinonas

Os compostos α -lapachona e derivado tetrahidropirano (THP) (Figura 12) foram sintetizados pela Dra. Sabrina Ferreira da Universidade Federal do Rio de Janeiro (UFRJ), sob orientação do Prof. Dr. Vítor Francisco Ferreira da Universidade Federal Fluminense (UFF), no Rio de Janeiro. As amostras foram dissolvidas em dimetilsulfóxido (DMSO P.A.) e mantidas a -20°C em soluções-estoque de 1mg/mL.

Figura 11. Estruturas dos compostos: α -lapachona, e seu derivado tetrahidropirano (THP).



3.3.2 Linhagens celulares tumorais

As linhagens celulares utilizadas no presente trabalho foram: MDA-MB-435 (melanoma humano), MDA-MB-231 (mama humana metastática), Hs578T (mama humana), B-16 (melanoma murino), B-16-F-10 (melanoma murino metastático), M-14 (melanoma humano), MALME-3M (melanoma humano metastático) e PC-3M (próstata humana metastática) cedidas pelo Instituto Nacional do Câncer (NCI, Bethesda, MD USA).

3.3.2.1 Cultivo das células tumorais

As células foram cultivadas em frascos de cultura celular, utilizando meio RPMI 1640 suplementado com 10% de soro fetal bovino e 1% de antimicrobianos (Penicilina-Estreptomicina), com exceção da linhagem MALME-3M, cultivada em meio IMDM suplementado com 20% de soro fetal bovino e 1% de antimicrobianos, manipulados em capela de fluxo laminar vertical. As células foram incubadas em estufa a 37°C, com atmosfera de 5% CO₂ e 95% de umidade com observação do crescimento celular por meio de microscópio invertido. Quando necessário, as células foram repicadas em novo meio de cultura. Para o desprendimento das células aderidas, utilizaram-se Tripsina-EDTA 0,5% diluída a 10X em tampão fosfato (PBS).

3.3.3 Ensaios para a determinação da atividade citotóxica in vitro pelo ensaio do MTT.

Os compostos α -lapachona e seu derivado THP foram investigados quanto à indução de citotoxicidade em células tumorais através do método do MTT. O ensaio do MTT consiste numa análise colorimétrica que quantifica indiretamente as células viáveis, baseada na conversão do sal amarelo, 3-(4,5-dimetil-2-tiazol)-2,5-difenil-2-H-brometo de tetrazolium (MTT), em azul de formazan, composto de coloração púrpura e insolúvel em água. Esta conversão é realizada a partir da enzima mitocondrial succinato desidrogenase, ativa em células viáveis (MOSMANN,

1983). Este ensaio foi utilizado com o intuito de avaliar a citotoxicidade dos compostos estudados nas linhagens celulares tumorais MDA-MB-435, MDA-MB-231, Hs578T, B-16, B-16F-10, M14, MALME-3M e PC-3M. Doxorrubicina foi utilizada como controle positivo.

Procedimento Experimental

As células (MDA-MB-435, MDAMB-231, HS578T, B-16, B-16F-10, M14, MALME-3M, PC-3M) foram plaqueadas na concentração de $0,1 \times 10^6$ células/mL.

Os compostos foram acrescidos em diferentes concentrações, que variaram entre 0,01 – 5µg/mL (0,04 – 20,64 µM), em placas de 96 poços. Em seguida, incubaram-se por 24 ou 72 horas em estufa a 5% de CO₂ a 37°C. Antes do término do período de incubação, as placas são centrifugadas (1500 rpm/15 min) e o sobrenadante removido. Em seguida, adicionou-se 100µL da solução de MTT (10% em meio RPMI 1640) em cada poço, sendo reincubada por 3 horas, a fim de completar o tempo de incubação previsto.

Após este período, as placas foram centrifugadas (3000 rpm/10 min), o sobrenadante foi novamente desprezado, o formazan foi ressuspensionado com a adição de 150µL de dimetilsulfóxido (DMSO P.A.). As absorbâncias foram lidas em espectrofotômetro de placa no comprimento de onda de 595nm.

Análise dos dados

A concentração inibitória média capaz de provocar 50% do efeito máximo (CI₅₀) e seus respectivos intervalos de confiança (IC 95%) foi obtida a partir de regressão não-linear utilizando o programa GraphPad Prism versão 5.0.

3.3.4 Atividade Hemolítica em eritrócitos de camundongo

O ensaio de hemólise baseia-se na observação de substâncias causarem lise em eritrócitos de camundongos, sugerindo-se que o mecanismo do composto estudado pode ser através da lise de membrana celular, fato observado na morte

celular por necrose (BERLINCK *et al.*, 1996). Assim, realizou-se o determinado ensaio para todas as substâncias-teste.

Procedimento Experimental

O sangue foi coletado em camundongos (*Mus musculus*, Swiss) pela via orbital e diluído em 30 volumes de solução salina e cálcio (8,5 g de NaCl (0,85%), 1,11 g de CaCl₂ 10mM, q.s.p. H₂O 1000mL de solução). Os eritrócitos foram lavados 2 vezes por centrifugação (1500 rpm / 3min.) para redução da contaminação plasmática e ressuspensos em solução salina para obtenção de suspensão de eritrócitos (SE) a 2%. Em multiplaca de 96 poços adicionou-se 100 µL de solução salina na primeira fileira; na segunda fileira, cada poço recebeu 50 µL de solução salina e 50 µL de DMSO 10% (veículo de diluição da substância teste). Na terceira fileira em diante, foram adicionadas 100 µL da solução salina e 100 µL das substâncias teste em triplicata, na concentração de 5 mg/mL (concentração máxima: 250 µg/mL), exceto a última fileira, que recebeu 80 µL de solução salina e 20 µL de Triton X-100 1%.

Em seguida, 100 µL da SE 2% foi adicionada, seguida de incubação por 1 hora sob agitação e posterior centrifugação a 1500 rpm por 10 minutos. Em seguida, transferiu-se o sobrenadante para outra placa e realizou-se a leitura em espectrofotômetro no comprimento de onda de 450 nm. Triton X-100 (0,5%) e DMSO foram utilizados como controle positivo e negativo respectivamente.

Análise dos dados

O experimento foi analisado segundo suas médias e desvios padrão. A concentração média capaz de provocar 50% do efeito máximo (CE₅₀) e seu respectivo intervalo de confiança (IC 95%) para cada amostra foi obtida a partir da regressão não-linear no programa GraphPad Prism versão 5.0.

3.3.5 Avaliação da atividade antiproliferativa em células mononucleares do sangue periférico (CMSP) – Alamar Blue

A técnica do Alamar blue consiste em um método colorimétrico, com maior sensibilidade que o MTT. O Alamar blue ou resazurina (O'BRIEN *et al.*, 2000), de coloração azul, é um indicador de óxido-redução, que sofre redução por meio de enzimas mitocondriais de células viáveis, formando a resorufina de cor rósea e bastante fluorescente (ZHI-JUN *et al.*, 1997). Este ensaio foi realizado com o intuito de avaliar a seletividade de ação dos compostos em células humanas normais, quando comparadas com células tumorais (COMEPE- Protocolo n° 281/09).

Procedimento Experimental

As substâncias foram testadas em células mononucleares do sangue periférico (CSMP) durante 72h de exposição. Cerca de 5 mL de sangue heparinizado foi coletado de voluntários sadios acrescidos 5 mL de solução PBS. Adicionou-se 3 mL de Ficoll-Hypaque, seguida de centrifugação (1500 rpm/30 min). Em seguida, retiraram-se as células mononucleares da parte intermediária do tubo ("nuvem de linfócitos"). As células foram transferidas para outro tubo e adicionou-se PBS até o volume de 11 mL e centrifugou-se a 1000 rpm por 20 minutos. O sobrenadante foi descartado e o precipitado formado foi ressuspenso em meio RPMI 1640 suplementado com 20% de soro fetal bovino, 1% de antibióticos, 3% de fitohemaglutinina.

Em seguida, as células foram plaqueadas na concentração de $0,3 \times 10^6$ células/mL em placa de 96 poços. Após 24 horas de incubação, em estufa a 37°C com atmosfera de 5% de CO₂ e 95 % de umidade, adicionaram-se as substâncias teste em concentrações seriadas (0,01 – 5µg/mL). Após 48 horas de incubação, adicionou-se 10 µL da solução de Alamar blue (0,31 mg/mL). Todas as etapas de manipulação das células foram realizadas em capela de fluxo laminar. A absorbância foi lida nos comprimentos de onda de 570nm (estado oxidado) e 595nm (estado reduzido), utilizando o espectrofotômetro de placas.

Análise de dados

A porcentagem de Alamar blue reduzido (células viáveis) foi calculada segundo a fórmula: % reduzido = $A_{LW} - (A_{HW} \times R_O) \times 100$, onde: A_{LW} e A_{HW} representam as absorvâncias do estado oxidado e reduzido, respectivamente. O R_O representa a divisão AO_{LW} / AO_{HW} , em que, AO_{LW} e AO_{HW} são as absorvâncias do meio isolado subtraído da absorvância do meio com Alamar blue nos comprimentos de onda maior e menor. As análises estatísticas e valores de CI_{50} foram obtidas por regressão não linear utilizando o programa Graphpad Prism versão 5.0, com intervalo de confiança de 95%.

3.3.6 Avaliação do mecanismo de ação em células de melanoma (MDA-MB-435)

As concentrações utilizadas na avaliação do mecanismo citotóxico das substâncias-teste foram baseadas na CI_{50} após 24 horas de incubação em células MDA-MB-435, logo, as concentrações escolhidas foram: 2,5, 5 e 10 μM , para o derivado THP e 10 μM para α -lapachona.

3.3.6.1 Avaliação da viabilidade celular – Exclusão por azul de tripan

O ensaio de exclusão por azul de tripan permite diferenciar as células viáveis daquelas não-viáveis, a fim de avaliar a cinética de crescimento celular da linhagem MDA-MB-435 após o tratamento com as substâncias-teste. O corante azul de tripan penetra em todas as células, porém, as células viáveis bombeiam para o meio extracelular o corante, não ocorrendo o mesmo com células metabolicamente não-viáveis, apresentando coloração azulada (PERES; CURI, 2005).

Procedimento Experimental

Células da linhagem tumoral MDA-MB-435 foram plaqueadas na concentração de $0,1 \times 10^6$ células/mL, em placas de 24 poços, e incubadas por 6, 12 e 24 horas em estufa a 5% CO_2 a 37°C. A seguir, as células foram tratadas nas

concentrações de 2,5, 5 e 10 μM para o derivado THP e 10 μM para α -lapachona. Após o período de incubação, uma alíquota de 90 μL foi retirada, e adicionada a 10 μL do corante azul de tripan. Em seguida, uma alíquota de 10 μL foi transferida para câmara de Neubauer e realizada a contagem celular diferencial nos quatro quadrantes externos, diferenciando células não-viáveis (azuis) das células metabolicamente viáveis.

Análise dos dados

A análise dos dados foi realizada a partir da média e desvio padrão de 3 experimentos independentes em triplicata ($n=3$). Para a verificação de diferenças significativas entre os grupos, os dados foram comparados por análise de variância (ANOVA) seguida do teste de Dunnet, utilizando o programa GraphPad Prism versão 5.0, com significância de 5% ($p<0,05$).

3.3.6.2 Análise da Morfologia celular – Coloração por corante panótico rápido

O corante panótico (Kit InstantProv) foi utilizado por ser satisfatório em evidenciar a morfologia celular, diferenciando os diferentes tipos de estruturas celulares.

Assim, a coloração através de corante panótico rápido foi utilizada com o intuito de verificar alterações morfológicas celulares que são observados nos tipos de morte celular (apoptose e necrose), na linhagem tumoral MDA-MB-435 após incubação de 6, 12 e 24 horas com os compostos estudados.

Procedimento Experimental

Células MDA-MB-435 foram plaqueadas na concentração de $0,1 \times 10^6$ células/mL, incubadas por 6, 12 e 24 horas com α -lapachona e seu derivado THP. Após o período de incubação, as células são retiradas da placa com tripsina-EDTA e foram confeccionadas lâminas com adição de 50 μL da suspensão de células à centrifuga de lâminas. As lâminas foram secas a temperatura ambiente, fixadas com

metanol por 1 minuto e coradas com o corante panótico por aproximadamente 10 segundos.

Análise dos resultados

As lâminas foram observadas no microscópio ótico para avaliação das características morfológicas, comparadas com o grupo controle (sem tratamento) e as alterações celulares registradas por fotografias.

3.3.6.3 Determinação da Integridade de membrana celular por citometria de fluxo

Este ensaio consiste na capacidade do iodeto de propídio (PI), um corante hidrofílico, em se intercalar com o DNA penetrar das células que possuam a membrana plasmática rompida (células em necrose e apoptose tardia), emitindo alta fluorescência vermelha quando excitado por laser de argônio (488 nm), enquanto as células com membrana íntegra (células viáveis) emitem baixa fluorescência.

Procedimento Experimental

Células MDA-MB-435 foram plaqueadas em placas de 24 poços, numa concentração de $0,1 \times 10^6$ células/mL e incubadas com as substâncias por períodos de 6, 12 e 24 horas. Após a incubação, as células foram tripsinizadas e uma alíquota de 100 μ L foi adicionada a 15 μ L da solução de PI (50 μ g/mL). Após um período de 5 minutos, as amostras foram analisadas no citômetro de fluxo através do programa Guava Express Plus, onde cinco mil eventos foram contados em cada replicata.

3.3.6.4 Análise do ciclo celular e da fragmentação do DNA por citometria de fluxo

Neste teste, o PI liga-se ao DNA das células previamente lisadas por um detergente. Assim, células com o DNA íntegro emitirão alta fluorescência, enquanto núcleos condensados e fragmentados emitirão baixa fluorescência ao incorporarem

menos PI. Pode-se mensurar, também, as fases do ciclo celular através da quantidade de DNA presente em cada fase.

Procedimento experimental

Células MDA-MB-435 foram plaqueadas na concentração de $0,1 \times 10^6$ células/mL e incubadas com as substâncias – teste por 6, 12 e 24 horas. Após o período de incubação, as células foram tripsinizadas e uma alíquota de 50 μ L da suspensão de células foi transferida para um *ependorff* e incubada por 30 minutos na presença de 100 μ L da solução de lise contendo PI (50 μ g/mL), Triton X-100 (0,1%) e citrato de sódio (0,1%). As amostras foram analisadas no citômetro de fluxo, onde 5000 eventos foram contados e histogramas com a quantidade de células com o DNA fragmentado (NICOLETTI *et al.*, 1991).

Análise dos dados

Os dados foram analisados através de algoritmos desenvolvidos para a análise do ciclo celular no programa ModFit (Verity Software House). A porcentagem das células na fragmentação nuclear (sub-G1) foram expressos como média e erro padrão de 3 experimentos independentes (n=3). Para verificação de ocorrência de diferenças significativas entre os diferentes grupos, os dados foram comparados por análise de variância (ANOVA) seguida do teste de Dunnett ($p < 0,05$).

3.3.6.5 Determinação do potencial transmembrânico da mitocôndria por citometria de fluxo

O corante rodamina 123 tem a capacidade de ser sequestrado para o interior da mitocôndria, quando esta apresenta potencial transmembrânico inalterado, emitindo, por sua vez, alta fluorescência quando atingidas pelo laser do citômetro de fluxo. Processos de morte celular por apoptose alteram o potencial mitocondrial transmembrânico levando ao efluxo da rodamina de dentro da mitocôndria emitindo menor fluorescência.

Procedimento Experimental

Uma alíquota de 50µL de suspensão de células tratadas e não tratadas foi incubada com 100µL de uma solução de solução de rodamina 1 µg/mL. Após 15 minutos de incubação no escuro, as amostras foram centrifugadas a 2000rpm/5min. O sobrenadante foi então descartado, 100 µL de PBS foram adicionados e incubados por 30 minutos no escuro. Após este período, e as amostras foram analisadas no citômetro de fluxo (CURY-BOAVENTURA; POMPEIA; CURI, 2004).

3.2.6.6 Determinação da ativação de caspases efetoras 3 e 7

As caspases 3 e 7 são caspases homólogas pertencentes a família de proteases cisteína-aspartato, cuja ativação desempenha um papel central na execução da apoptose, sendo responsáveis pela clivagem de vários componentes celulares relacionados ao reparo e ao controle do DNA (OLSSON; ZHIVOTOVSKY, 2011). Assim, a quantificação destas caspases permite avaliar os mecanismos de indução apoptótica.

Procedimento Experimental

A detecção das caspases 3 e 7 foi analisada por citometria de fluxo utilizando o Kit FAM de caspases 3 e 7 após 24 horas de incubação com o alfa-lapachona na concentração de 10 µM e o seu derivado THP nas concentrações de 2,5, 5 e 10 µM comparadas ao controle negativo (grupo não-tratado). As células ($0,1 \times 10^6$ /mL) foram incubadas com marcador fluorescente (FLICA) e mantidas por uma 1 hora a 37°C em uma incubadora de CO₂. Após a incubação, 80 µL de tampão de lavagem foram adicionados e então, as células centrifugadas a 2000 rpm por 5 minutos. O precipitado resultante foi resuspendido em 200 µL de tampão de lavagem e centrifugado novamente. Em seguida as células foram resuspendidas em uma solução contendo iodeto de propídeo e tampão de lavagem e analisadas imediatamente utilizando citometria de fluxo.

3.2.6.7 *Análise de dados dos ensaios de citometria de fluxo*

Em cada experimento foram contados 5000 eventos. Os dados foram expressos como a média \pm erro padrão da média de três experimentos independentes realizados em triplicata. Para verificação da ocorrência de diferenças significativas entre os diferentes grupos, os dados foram comparados por análise de variância (ANOVA) seguida por Teste de Dunnet, com nível de significância de 5% ($p < 0,05$).

3.2.6.7 *Avaliação da presença de espécies reativas de oxigênio (EROs)*

Para avaliar a contribuição do estresse oxidativo no efeito antiproliferativo das substâncias-teste, realizou-se o pré-tratamento das células MDA-MB-435 com N-acetilcisteína (NAC), um doador de cisteína para a síntese de glutathione, que, por sua vez, reduz a formação de EROs.

Procedimento Experimental

Células MDA-MB-435 foram plaqueadas na concentração de $0,1 \times 10^6$ cél./mL e incubadas por 1 hora com N-acetil-cisteína (NAC) na concentração de 5 mM. Em seguida, adicionaram-se as substâncias-teste, nas concentrações que variaram entre 0,01 – 25 $\mu\text{g}/\text{mL}$, em placas de 96 poços. O restante do ensaio se dá igualmente ao teste do MTT, previamente demonstrados no item 3.3.3.

4 RESULTADOS

4.1 Atividade citotóxica da α -lapachona e seu derivado tetrahidropirano (THP) pelo ensaio do MTT e ensaio de seletividade pelo método do Alamar blue

Inicialmente, foi determinado o efeito citotóxico dos compostos α -lapachona e seu derivado THP em células de linhagens tumorais humanas (MDA-MB-231, MDA-MB-435, M-14, MALME-3M, Hs578T, PC-3M) e murinas (B-16, B-16-F-10) através do método do MTT, após 72 horas de exposição e em células mononucleares de sangue periférico de voluntários saudáveis. Os valores de CI_{50} estão representados na tabela 1.

Como apresentados na tabela 1, ambos os compostos apresentaram efeito inibitório sobre a proliferação celular nas linhagens testadas, com CI_{50} variando de 1,37 a 34,26 μ M. O derivado tetrahidropirano (THP) destacou-se por apresentar atividade citotóxica seletiva para linhagens de melanoma, com valor de CI_{50} igual a 1,37 μ M, semelhante à doxorrubicina (CI_{50} = 1,52 μ M), enquanto seu protótipo apresentou CI_{50} de 8,18 μ M para a linhagem MDA-MB-435. Esses dados demonstram que a adição do grupo THP no anel pirânico da molécula α -lapachona induziu o aumento da atividade e a seletividade sobre células de melanoma.

Em seguida, realizou-se o ensaio de MTT após 24 horas de exposição com as substâncias-teste nas linhagens de melanoma que apresentaram CI_{50} abaixo de 2 μ M após 72h de tratamento. O derivado THP apresentou valores de CI_{50} , variando de 5,18 a 17,87 μ M, enquanto seu protótipo exibiu valores de 20,04 e 45,90 μ M nas linhagens MDA-MB-435 e MALME-3M, respectivamente (Tabela 2).

Tabela 1. Atividade citotóxica in vitro da α -lapachona e seu derivado THP em 8 linhagens tumorais e em células mononucleares do sangue periférico (CMSP) após 72 horas de incubação. Valores de CI_{50} (concentração efetiva em que a substância-teste causa morte em 50% das células) expressos em $\mu\text{g/mL}$ (μM). Doxorrubicina foi utilizada como controle positivo.

Linhagem tumoral	Origem	α -lapachona	THP	Doxorrubicina
MDA-MB-435	Melanoma	1,98 (8,18)	0,37 (1,37)	0,88 (1,52)
		1,52 – 2,59	0,32 – 0,43	(0,62 – 1,21)
MDA-MB-231	Mama	19,72 (81,40)	8,25 (30,52)	0,34 (0,59)
		7,38 – 22,37	7,15 – 9,53	0,28 – 0,41
Hs578T	Mama	>5 (>20,66)	>5 (>18,50)	Nd
B-16	Melanoma murino	4,81 (19,88)	2,45 (9,06)	0,03 (0,06)
		4,08 – 5,67	2,04 – 2,94	0,02 – 0,04
B-16-F-10	Melanoma murino	2,69 (11,11)	1,59 (5,88)	Nd
		2,25 – 3,22	1,29 – 1,96	
MALME-3M	Melanoma	2,64 (10,90)	1,77 (6,55)	0,21
		2,17 – 3,22	1,4 – 2,25	0,19 – 0,23
M 14	Melanoma	4,77 (19,69)	2,8 (10,36)	0,24 (0,41)
		4,07 – 5,59	nd	0,21 – 0,29
PC-3M	Próstata	8,30 (34,26)	7,44 (27,53)	0,17 (0,29)
		6,37 – 10,82	5,8 – 9,53	0,10 – 0,28
CMSP	Células normais	6,32 (26,12)	3,03 (11,21)	>5 (>8,62)
		4,53 – 8,82	2,46 – 3,72	

nd = não determinado

Para analisar a seletividade dos compostos testados sobre as células tumorais, foi realizado o ensaio antiproliferativo do Alamar Blue com células mononucleares de sangue periférico de voluntários sadios (CMSP), onde os compostos estudados apresentaram valores de CI_{50} de 26,12 e 11,2 μM para α -lapachona e seu derivado tetrahidropirano, respectivamente (Tabela 1).

Ao avaliar a citotoxicidade em células mononucleares do sangue humano, o composto derivado tetrahidrofurano apresentou maior seletividade que seu protótipo, com valor de CI_{50} cerca de 8 vezes maior (11,21 μM) que observada em células MDA-MB-435 (1,37 μM) no mesmo tempo de incubação.

Tabela 2. Atividade citotóxica da α -lapachona e seu derivado THP na linhagem tumorais de mama e melanoma após 24 horas de incubação. Valores de CI_{50} representados em $\mu\text{g/mL}$ (μM) e seus respectivos intervalos de confiança. Doxorrubicina foi utilizado como controle positivo.

Linhagem tumoral	Origem	α -lapachona	THP	Doxorrubicina
MDA-MB-231	Mama	>25 (> 103,19)	14,32 (52,98) 11,75 - 17,47	>5 (> 8,62)
B-16F-10	Melanoma	4,78 (17,68)	3,22 (13,30)	Nd
	murino	4,11 – 5,56	2,28 – 3,60	
MDA-MB-435	Melanoma	4,85 (20,04)	1,4 (5,18)	1,71 (2,95)
		4,36 – 5,40	1,17 – 1,68	1,39 – 2,09
MALME-3M	Melanoma	12,10 (49,94)	5,61 (20,76)	Nd
		10,63 – 13,76	4,26 – 7,39	
M 14	Melanoma	>5 (> 20,66)	3,63 (13,43)	0,52 (0,90)
			2,82 – 4,66	0,34 -0,82

nd = não determinado

Tendo em vista o maior efeito citotóxico do derivado THP na linhagem tumoral de melanoma MDA-MB-435 em 24 e 72 horas de exposição, realizaram-se ensaios para avaliar o mecanismo de morte desta substância comparada ao seu protótipo α -lapachona. As concentrações utilizadas foram baseadas no valor de CI_{50} após 24 horas de incubação (2,5, 5 e 10 μM).

4.2 Atividade hemolítica em eritrócitos de camundongos *Mus musculus Swiss*

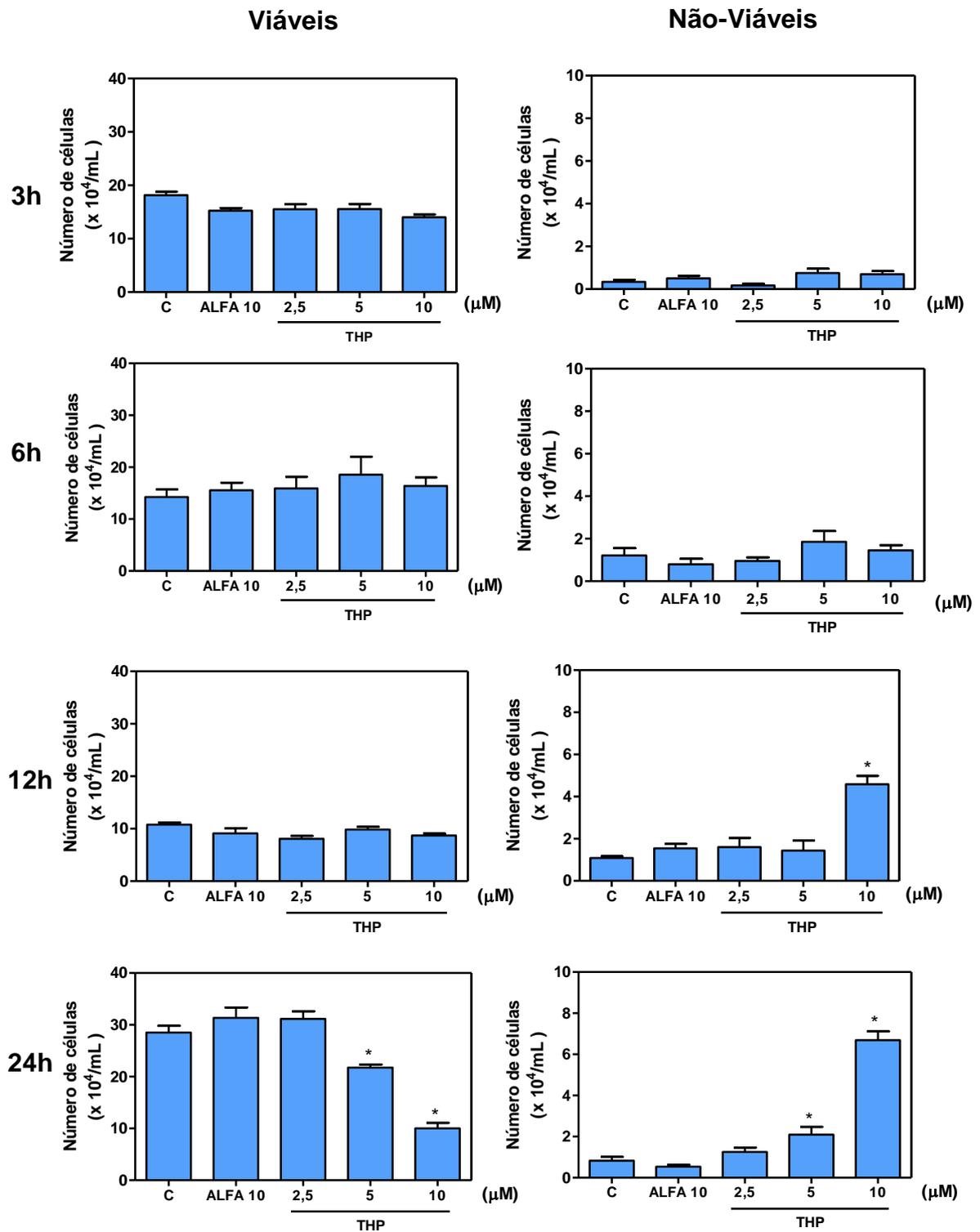
Os efeitos hemolíticos da α -lapachona e seu derivado tetrahidropirano (THP) foram avaliados em eritrócitos de camundongos *Mus musculus*. Neste ensaio, observou-se ausência de atividade hemolítica nas concentrações testadas (250 $\mu\text{g/ml}$) para ambos compostos. Neste ensaio, consideram-se ativas, substâncias que apresentam $CE_{50} < 250 \mu\text{g/ml}$.

4.3 Viabilidade celular pelo método de exclusão por azul de tripan

O ensaio de viabilidade celular de exclusão por azul de tripan permitiu a comparação do padrão de crescimento das células tratadas e não-tratadas pela contagem diferencial de células viáveis e não-viáveis.

A avaliação da viabilidade celular na linhagem MDA-MB-435 após 3, 6, 12 e 24 horas, demonstrou que a partir de 12 horas de exposição com o derivado THP, houve aumento de células não-viáveis na maior concentração testada (10 μ M). Após 24 horas de incubação, observou-se aumento de células não-viáveis e redução de células viáveis na concentrações de 5 μ M e 10 μ M em comparação com o controle, e esses efeitos parecem ocorrer de modo concentração - e tempo - dependentes. A α -lapachona não apresentou efeito antiproliferativo na concentração testada (10 μ M).

Gráfico 1. Efeito da α -lapachona (ALFA) e seu análogo THP na viabilidade de células de melanoma (MDA-MB-435) determinado por exclusão de azul de tripan após 6, 12 e 24 horas de exposição.



O controle negativo (C) foi tratado com o veículo utilizado na diluição das substâncias (DMSO). Os dados correspondem a média \pm E. P. M. de três experimentos independentes (n=3). * $p < 0.05$ comparado ao controle, seguida do teste de Dunnet.

4.4 Análise da morfologia celular

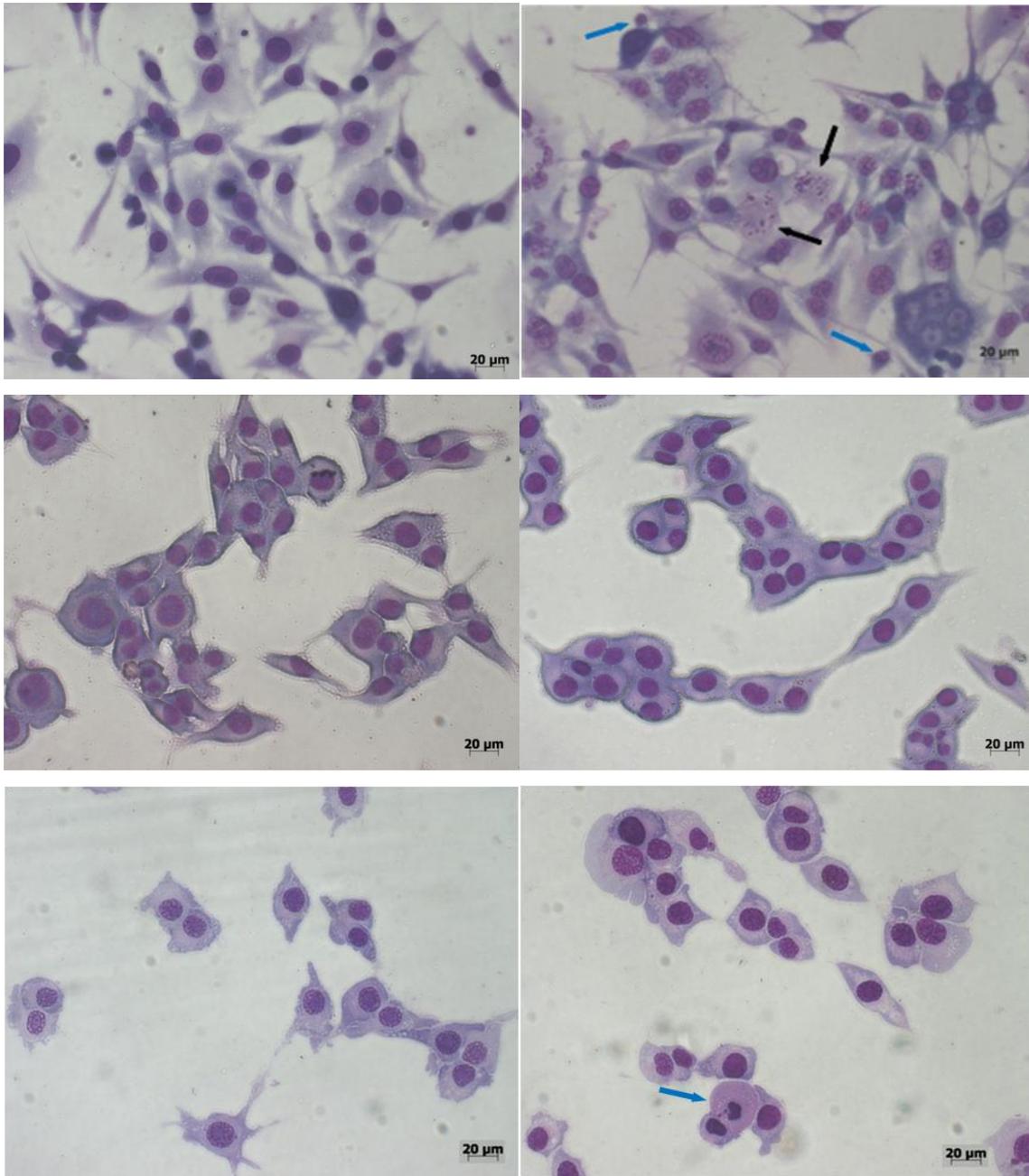
4.4.1 Coloração diferencial por corante panótico

Alterações morfológicas características de células em processo de morte por necrose ou apoptose, podem ser observadas por microscopia óptica. Assim, células de melanoma MDA-MB-435 foram analisadas por coloração diferencial com corante panótico, após 6, 12 e 24 horas de incubação com o composto α -lapachona, na concentração de 10 μM e seu derivado THP, nas concentrações de 2,5, 5 e 10 μM . Após 6, 12 e 24 horas em cultura, células MDA-MB-435 do grupo controle negativo exibiram uma morfologia típica de células aderidas com membrana plasmática íntegra e visualização nítida do citoplasma (com presença de grânulos) e núcleo.

Nas células tratadas com a α -lapachona, não foi observada características de processo de morte, na concentração testada (10 μM). O tratamento com o análogo THP, nas concentrações de 5 e 10 μM , apresentou alterações morfológicas comuns ao processo necrótico como, aumento do volume celular, degradação de organelas citoplasmáticas (vacuolização) e perda da integridade da membrana plasmática, a partir de 6 horas de incubação.

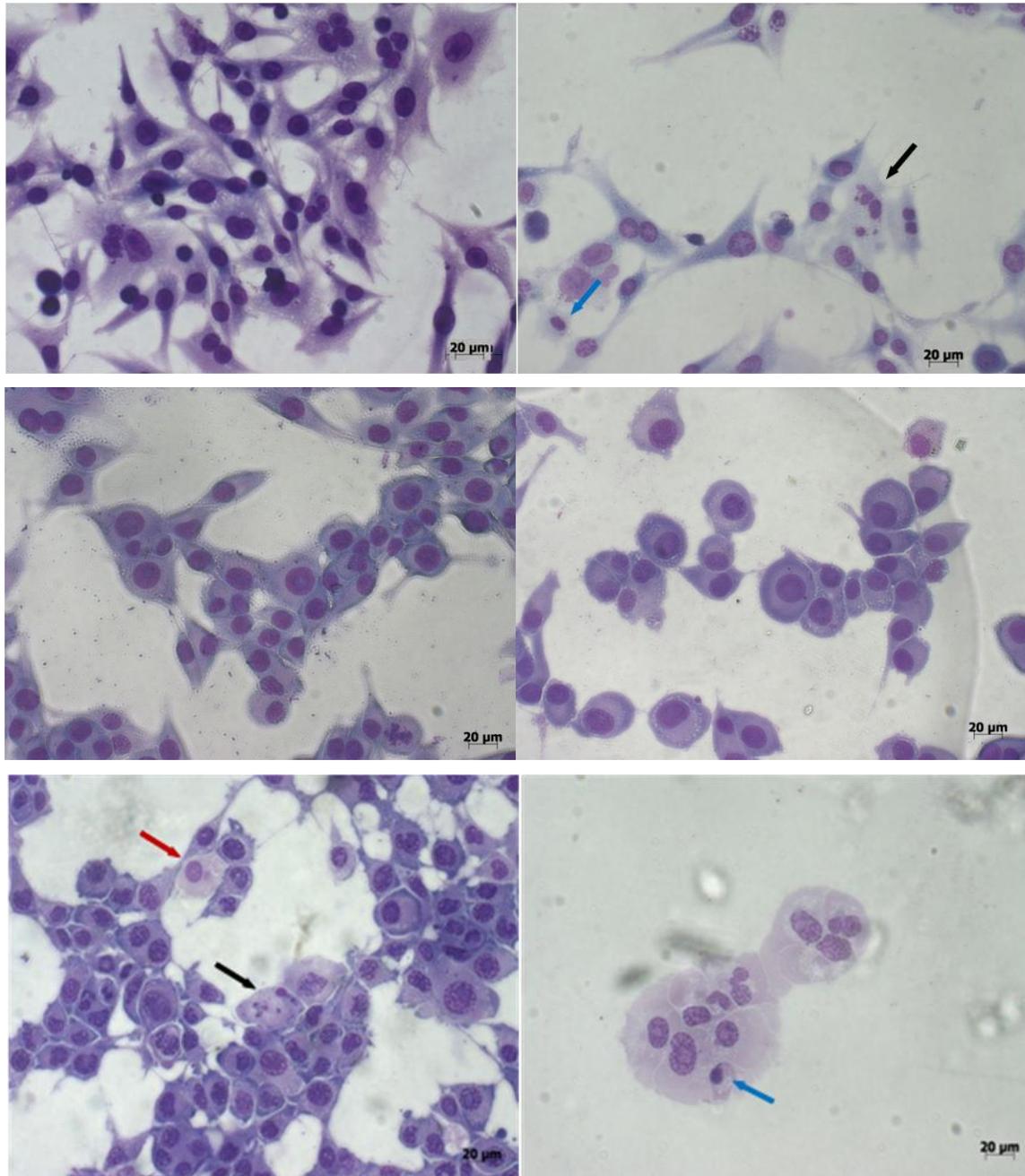
A doxorubicina (3 μM), utilizada como controle positivo, induziu redução do volume celular, condensação da cromatina e fragmentação nuclear, características condizentes com apoptose. Após 24 horas de incubação, foi possível observar também perda da integridade da membrana plasmática.

Figura 12. Morfologia das células de melanoma (MDA-MB-435) tratadas com α -lapachona e derivado THP após 6 horas de incubação e visualizadas por microscopia óptica.



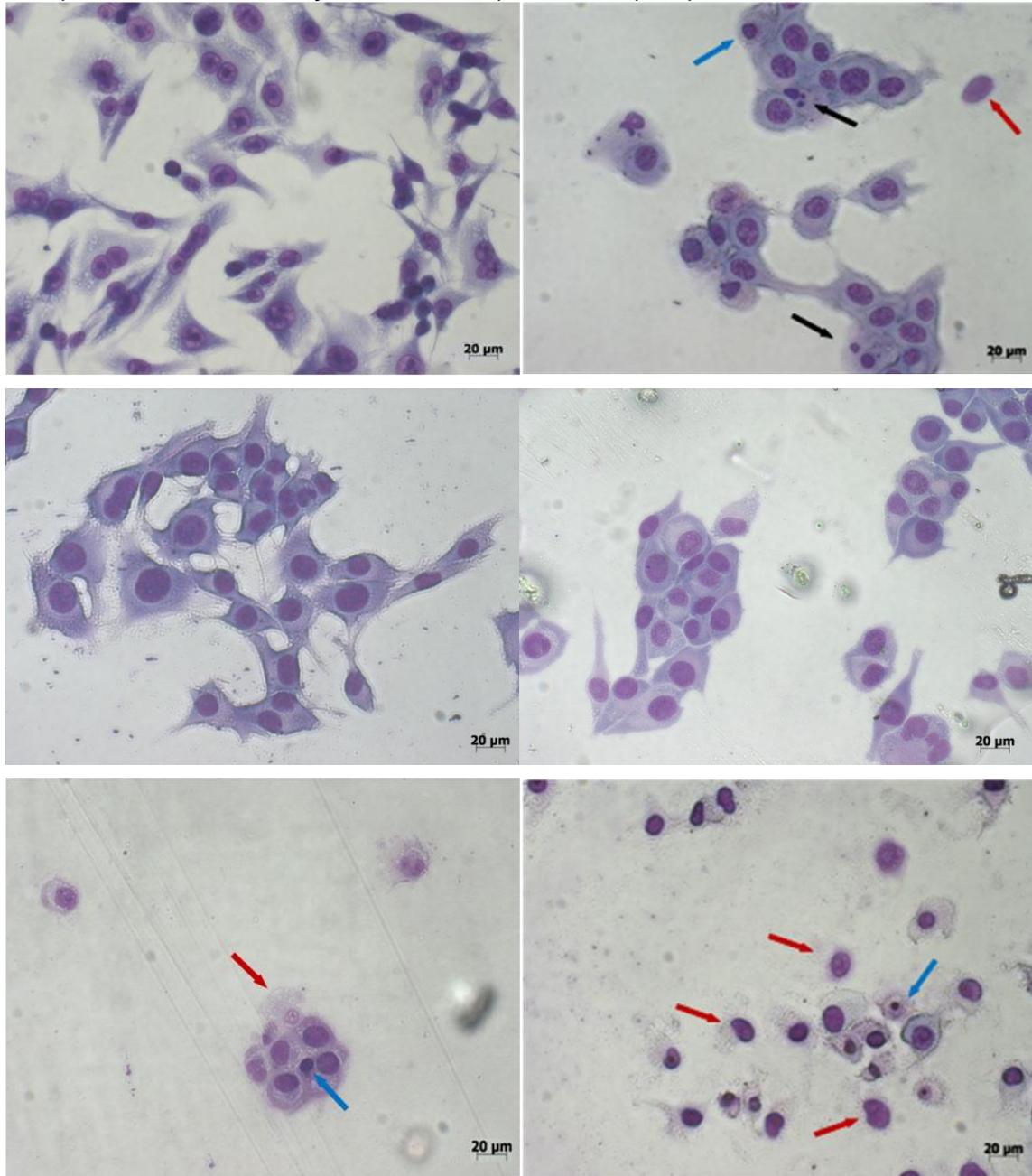
Aumento 100x. (A): Controle negativo tratado com veículo utilizado na diluição das substâncias (DMSO); (B): Células tratadas com doxorubicina (3 μ M). (C): Células tratadas com α -lapachona na concentração de 10 μ M. (D): Células tratadas com o derivado THP na concentração de 2,5 μ M. (E): Células tratadas com o derivado THP na concentração de 5 μ M. (F): Células tratadas com o derivado THP na concentração de 10 μ M. Setas pretas: fragmentação nuclear, setas azuis: redução do volume celular.

Figura 13. Morfologia das células de melanoma (MDA-MB-435) tratadas com α -lapachona e derivado THP após 12 horas de incubação visualizadas por microscopia óptica.



Aumento 100x. (A): Controle negativo tratado com veículo utilizado na diluição das substâncias (DMSO). (B): Células tratadas com doxorubicina (3 μ M) (C): Células tratadas com α -lapachona na concentração de 10 μ M. (D): Células tratadas com o derivado THP na concentração de 2,5 μ M. (E): Células tratadas com o derivado THP na concentração de 5 μ M. (F): Células tratadas com o derivado THP na concentração de 10 μ M. Setas pretas: fragmentação nuclear, setas azuis: redução do volume celular, setas vermelhas: eosinofilia e perda da integridade da membrana plasmática.

Figura 14. Morfologia das células de melanoma (MDA-MB-435) tratadas com α -lapachona e derivado THP após 24 horas de incubação visualizadas por microscopia óptica.



Aumento 100x. (A): Controle negativo tratado com veículo utilizado na diluição das substâncias (DMSO). (B): Células tratadas com doxorubicina (3 μ M) (C): Células tratadas com α -lapachona na concentração de 10 μ M. (D): Células tratadas com o derivado THP na concentração de 2,5 μ M. (E): Células tratadas com o derivado THP na concentração de 5 μ M. (F): Células tratadas com o derivado THP na concentração de 10 μ M. Setas pretas: fragmentação nuclear, setas azuis: redução do volume celular, setas vermelhas: eosinofilia e perda da integridade da membrana plasmática.

4.5 Citometria de fluxo

4.5.1 Integridade de membrana celular e concentração de células determinada por citometria de fluxo

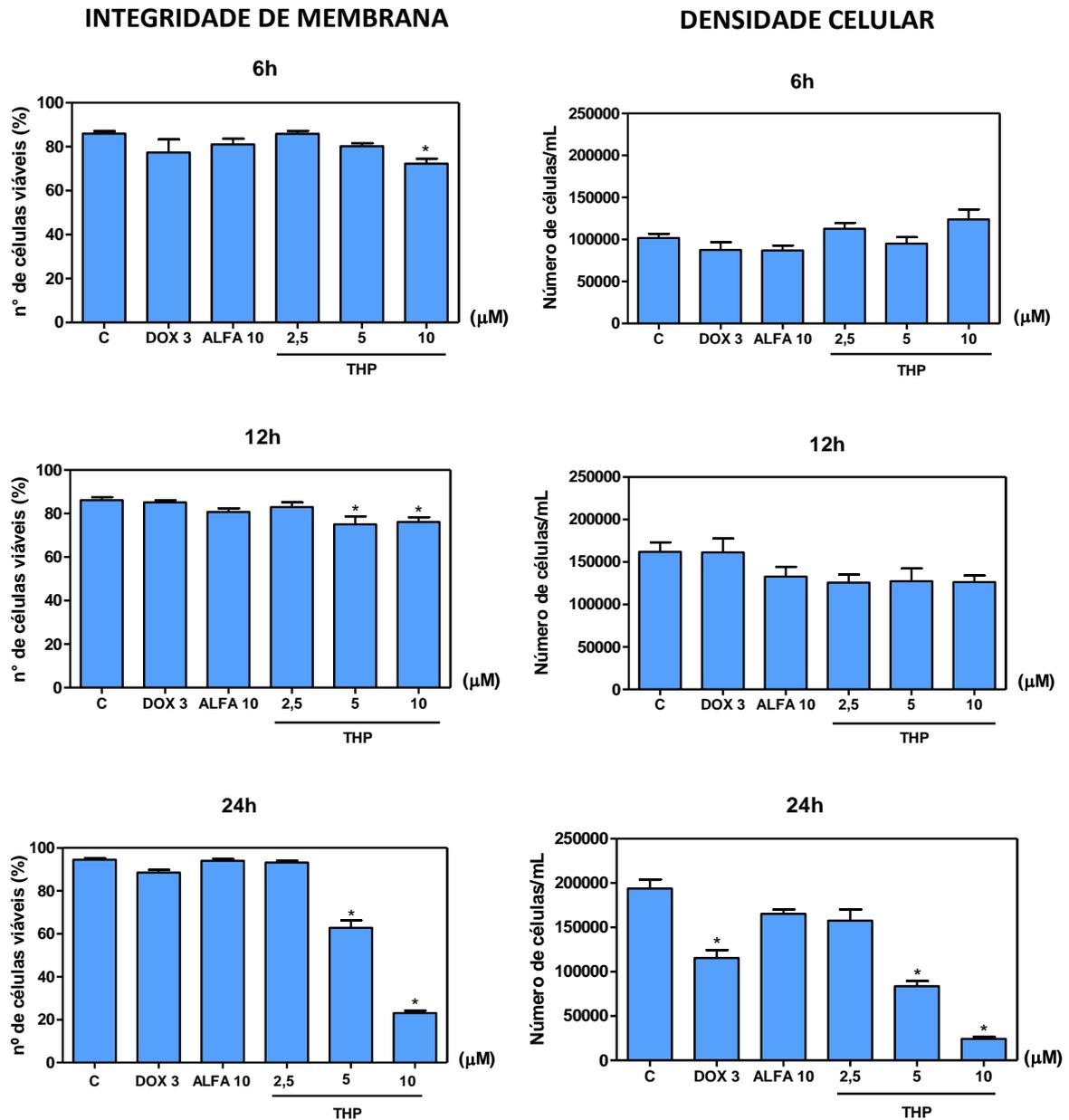
A integridade da membrana celular e a concentração de células foram determinadas por citometria de fluxo após 6, 12 e 24 horas de incubação com as amostras-teste. O corante hidrofílico iodeto de propídio foi utilizado para corar o núcleo de células com dano na membrana celular.

A avaliação da integridade de membrana mostrou que a maior concentração do derivado THP (10 μ M) apresentou pequena perda na integridade da membrana celular após 6 e 12 horas de incubação (72,29% e 76,13% de células com membrana íntegra, respectivamente) comparados ao controle negativo (85,99% e 86,12%). A concentração de 5 μ M também apresentou pequena diminuição na integridade da membrana celular após 12 horas de incubação (75,02%).

Após 24 horas de incubação, o derivado THP reduziu a integridade de membrana de modo concentração-dependente, apresentando 62,80% e 23,11% de células viáveis nas concentrações de 5 e 10 μ M respectivamente, comparados com o controle negativo (94,45%).

Como observado no gráfico, o derivado THP causou diminuição na densidade celular de maneira concentração-dependente somente após 24 horas de exposição. As células tratadas com α -lapachona não apresentou diferença estatística quando comparada ao controle negativo. A doxorrubicina apresentou diminuição da densidade celular após 24 horas de incubação.

Gráfico 2. Avaliação dos efeitos da α -lapachona (ALFA) na concentração de 10 μM e seu análogo THP (2,5, 5 e 10 μM) na integridade da membrana plasmática e densidade em células de melanoma (MDA-MB-435) após 6, 12 e 24 horas de exposição, analisadas por citometria citometria de fluxo utilizando o corante iodeto de propídio.



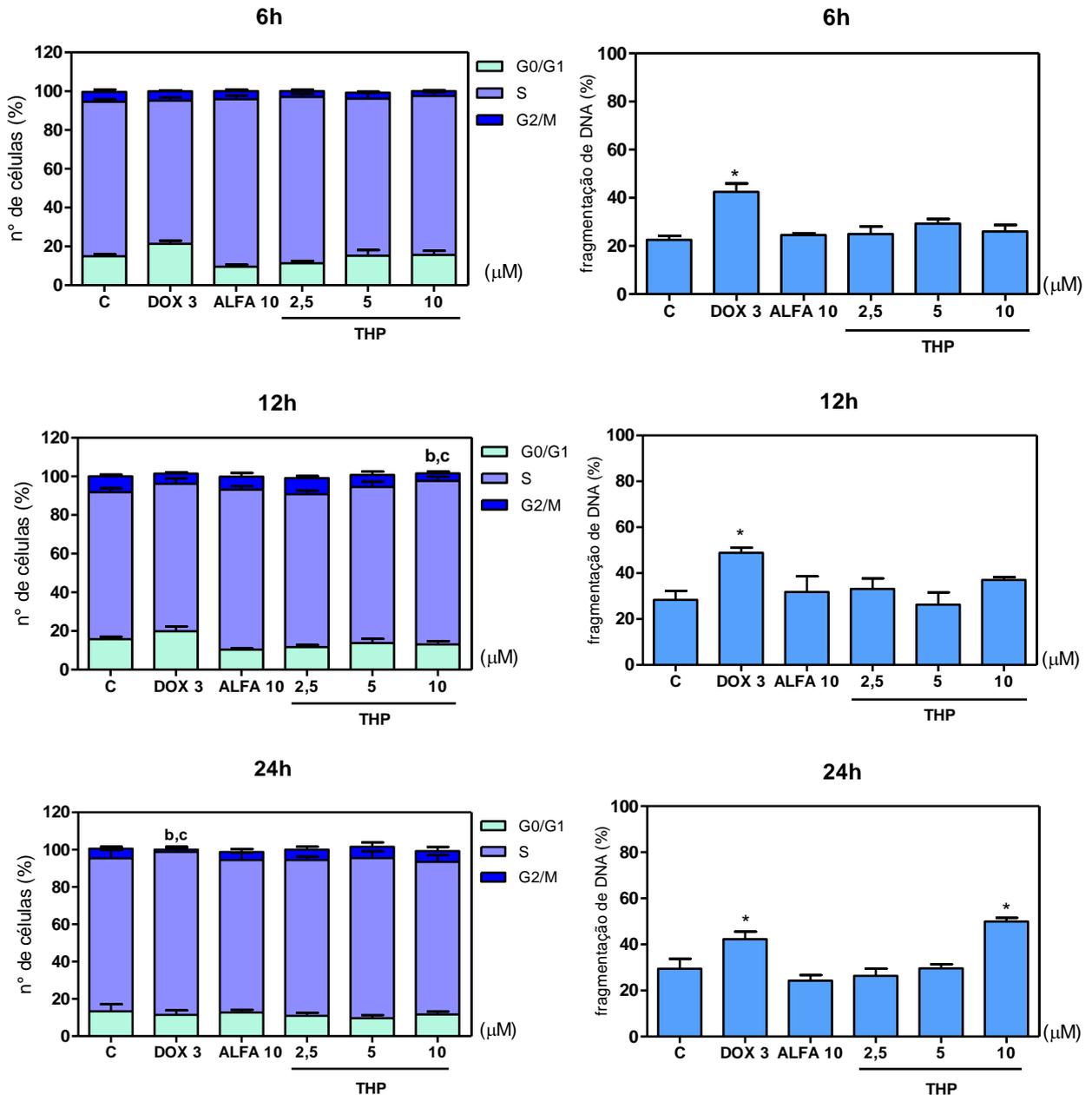
O controle negativo (C) foi tratado com o veículo utilizado na diluição das substâncias (DMSO). Os dados correspondem a média \pm E.P.M de três experimentos independentes ($n=3$). Cinco mil eventos foram contados. ** $p < 0.05$ comparado ao controle, seguida do teste de Dunnett.

4.5.2 Análise do ciclo celular e da fragmentação de DNA determinada por citometria de fluxo

A progressão do ciclo celular e a fragmentação de DNA em células MDA-MB-435 tratadas com os compostos foram realizadas por citometria de fluxo e analisadas através do programa ModFit LT 3.1. Os resultados demonstraram que o derivado THP na maior concentração (10 μ M) causou aumento significativo da fragmentação de DNA somente após 24 horas de incubação, com valores de 42,32% e 49,96% respectivamente. As células não tratadas apresentaram 29,43% de fragmentação e a alfa-lapachona não causou aumento significativo de fragmentação em nenhum tempo de incubação. Doxorrubicina demonstrou aumento da fragmentação celular em todos os tempos de incubação.

Quanto ao ciclo celular, os compostos testados não interferiram nas fases do ciclo celular em nenhum tempo de exposição testado. A doxorrubicina, utilizada como controle positivo, causou redução nas células em G2/M e pequeno aumento de células em S após 24 horas de exposição.

Gráfico 3. Avaliação dos efeitos da α -lapachona (ALFA) na concentração de 10 μM e seu análogo THP (2,5, 5 e 10 μM) na progressão do ciclo celular e fragmentação de DNA em células de melanoma (MDA-MB-435) após 6, 12 e 24 horas de exposição, analisadas por citometria de fluxo utilizando solução de lise composta por iodeto de propídeo, Triton X-100 (0,1%) e citrato de sódio (0,1%).

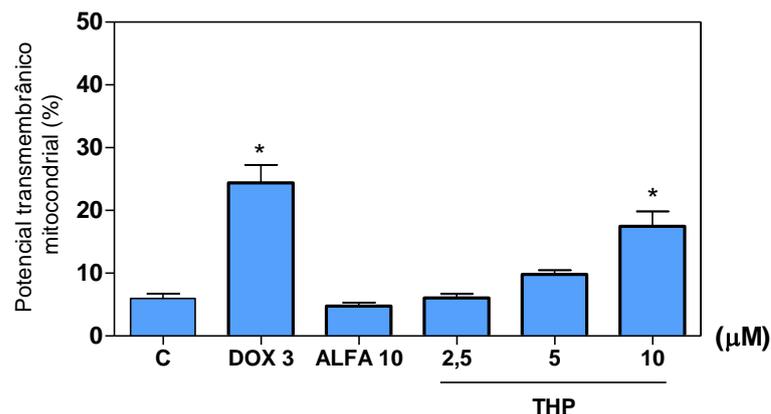


O controle negativo (C) foi tratado com o veículo utilizado na diluição das substâncias (DMSO). Os dados correspondem a média \pm E.P.M de três experimentos independentes ($n=3$). Cinco mil eventos foram contados. b: $p < 0,05$ em S comparado com o controle negativo por ANOVA seguido pelo teste de Dunnett; c: $p < 0,05$ em G2/M comparado com o controle negativo por ANOVA seguido pelo teste de Dunnett. * $p < 0,05$ comparado ao controle, por ANOVA seguido pelo teste de Dunnett.

4.5.3 Determinação do Potencial Transmembrânico de Mitocôndria

Foram observadas alterações no potencial transmembrânico mitocondrial em células de melanoma MDA-MB-435 tratadas com a maior concentração do derivado THP (10 μ M), apresentando 19,8% de despolarização mitocondrial. A α -lapachona não apresentou efeito significativo quando comparado ao controle negativo. A doxorrubicina, utilizada como controle positivo, causou 24,42% de despolarização mitocondrial.

Gráfico 4. Avaliação dos efeitos da α -lapachona (ALFA) na concentração de 10 μ M e seu análogo THP (2,5, 5 e 10 μ M) na potencial transmembrânico mitocondrial em células de melanoma (MDA-MB-435) determinado por citometria de fluxo utilizando rodamina 123, após 24 horas de incubação.



O controle negativo (C) foi tratado com o veículo utilizado na diluição das substâncias (DMSO). Os dados correspondem à média \pm E.P.M. de três experimentos independentes. Cinco mil eventos foram contados em cada experimento. *, $p < 0,05$ comparado com o controle negativo por ANOVA seguido pelo teste de Dunnett.

4.5.4. Determinação da ativação da caspases 3/7

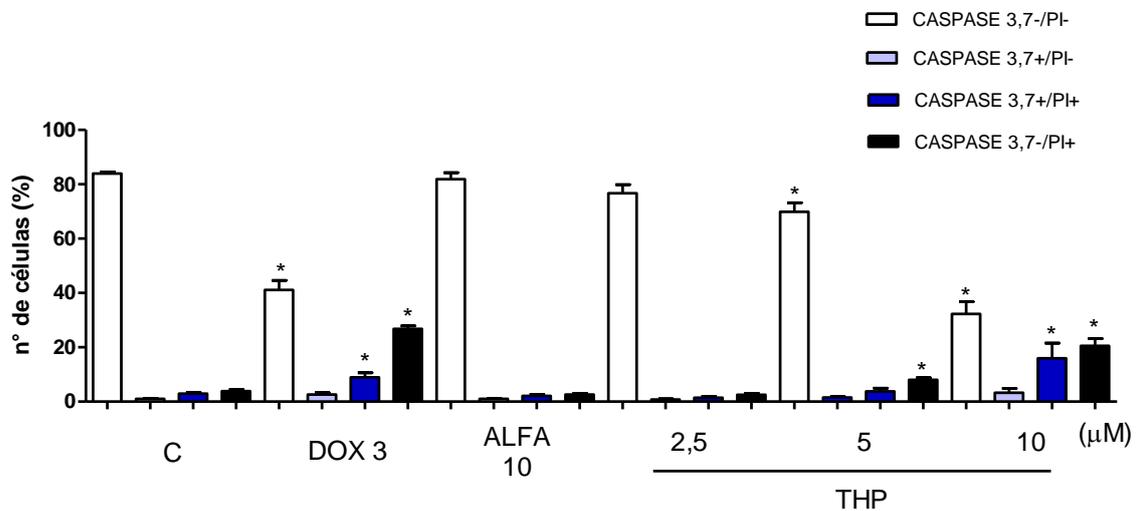
As caspases 3 e 7, denominadas executoras da apoptose, clivam substratos específicos que são vitais à célula e são ativadas tanto pela via extrínseca quanto intrínseca. Neste ensaio, foi observada que o derivado THP, nas concentrações de 5 e 10 μ M causou diminuição de células viáveis, sem marcação de iodeto de propídio e caspases (69,88% e 31,14% de células viáveis, respectivamente), comparados ao controle negativo (83,94%).

Nas mesmas concentrações, o derivado THP também causou aumento do número de células com marcação de iodeto de propídio, relacionadas com o processo necrótico, com valores de 8,02% e 24,16% (5 e 10 μ M, respectivamente), comparados ao controle negativo (3,84%).

Adicionalmente, a concentração de 10 μ M causou pequeno aumento do número de células com marcação de iodeto de propídio e caspases 3 e 7 ativas (7,67%), relacionado ao processo de apoptose tardia. O controle negativo apresentou valor de 2,94%.

A α -lapachona não induziu ativação de caspases executoras 3 e 7 na concentração testada (10 μ M) e o controle positivo, doxorrubicina, causou diminuição de células viáveis (41,08%), aumento de células em apoptose tardia, com marcação de iodeto de propídio e caspases 3 e 7 ativas, aumento de células necróticas, com marcação de iodeto de propídio (26,77%), após 24 horas de incubação.

Gráfico 5. Avaliação dos efeitos da α -lapachona (ALFA) na concentração de 10 μ M e seu análogo THP (2,5, 5 e 10 μ M) na ativação de caspases 3/7 em células de melanoma (MDA-MB-435) determinado por citometria de fluxo, após 24 horas de incubação.



O controle negativo (C) foi tratado com o veículo utilizado na diluição das substâncias (DMSO). Dados correspondem à média \pm E.P.M. de três experimentos independentes. Cinco mil eventos foram contados em cada experimento. *, $p < 0,05$ comparado com o controle negativo por ANOVA seguido pelo teste de Dunnett.

4.5.5. Avaliação da presença de espécies reativas de oxigênio (EROs)

A fim de investigar uma possível contribuição do estresse oxidativo no efeito antiproliferativo das naftoquinonas estudadas sobre as células MDA-MB-435, foi realizado o ensaio do MTT em células pré-incubadas com N-acetil-cisteína (NAC), um inibidor de espécies reativas de oxigênio. Os dados obtidos mostram que, quando pré-incubadas com NAC, a CI_{50} da alfa-lapachona aumentou 2 vezes, enquanto o valor de CI_{50} do derivado THP não alterou significativamente. Os resultados encontrados são mostrados na tabela 3.

Tabela 3. Atividade citotóxica da α -lapachona e seu derivado THP em células de melanoma MDA-MB-435 após 24 horas de incubação, pré-tratadas com N-acetil-cisteína (5mM). Valores de CI_{50} representados em $\mu\text{g/mL}$ (μM) e seus respectivos intervalos de confiança.

Amostras	MDA-MB-435 CI_{50} (μM)
α -lapachona	10,03 (41,40) 8,44 – 11,93
THP	1,96 (7,25) 1,65 – 2,33

5 DISCUSSÃO

Os avanços da Química, Farmacologia e Biologia Molecular a partir de meados do século XX, aliados à introdução de novos ensaios bioquímicos, conduziram ao desenvolvimento da Química Medicinal, com o planejamento racional de fármacos baseado na abordagem fisiológica. Assim, observa-se o ressurgimento no interesse por produtos naturais que podem ser utilizados como matrizes no desenvolvimento de novas substâncias bioativas, a fim de otimizar a molécula e conseqüentemente o perfil terapêutico, em termos de eficácia e seletividade para atingir propriedades farmacocinéticas e farmacodinâmicas ideais (MONTANARI; BOLZANI, 2001; GANESAN, 2008; WILSON; DANISSHEFSKY, 2007).

As quinonas, por sua vez, são identificadas como importante elemento farmacofórico para atividade citotóxica, incluindo atividade antitumoral (LIU; LI; SAKYA, 2004). Vários métodos sintéticos têm sido relatados na literatura, demonstrando claramente que as naftoquinonas tem importância para o desenvolvimento de novas substâncias com promissoras atividades biológicas (FERREIRA *et al.*, 2010).

A 1,4-naftoquinona, α -lapachona, mostra-se como excelente protótipo para o desenvolvimento de novos análogos, sendo importante para a pesquisa de compostos com maior potência farmacológica e menor toxicidade (KRISHNAN, 2000, 2001). Alguns análogos relacionados a α -lapachona e outras piranonaftoquinonas têm sido descritos com atividade citotóxica contra diferentes linhagens tumorais (SILVA *et al.*, 2002; BRASTIANOS *et al.*, 2006; LIMA *et al.*, 2005; ROCHA; LOPES; SCHWARSTMANN, 2011).

A morte celular desregulada é uma característica comum em muitas doenças, incluindo o câncer, e a modulação desta resposta celular tem sido mostrada como uma efetiva estratégia terapêutica. Assim, testes que mensuram fenômenos relacionados à morte celular são amplamente utilizados para o desenvolvimento de fármacos (KEPP *et al.*, 2011).

Em trabalho anterior do nosso grupo (SANTOS, 2010), relatou-se o potencial citotóxico de análogos da α -lapachona em linhagens tumorais de leucemia (HL-60), melanoma humano (MDA-MB-435), glioblastoma (SF-295) e cólon (HCT-8),

onde o derivado THP apresentou citotoxicidade significativa na linhagem de melanoma MDA-MB-435, com valor de CI_{50} igual a $1,37\mu M$, após 72 horas de incubação, demonstrando seletividade à esta linhagem, já que os valores de CI_{50} para as outras linhagens testadas foram acima de $11\mu M$.

Assim, para avaliar a citotoxicidade e seletividade deste composto, ampliou-se o painel de células tumorais, principalmente com linhagens de mama e melanoma, devido à controversa origem da linhagem MDA-MB-435.

A linhagem celular tumoral MDA-MB-435, utilizada primeiramente como modelo de câncer de mama metastático (PRICE *et al.*, 1990; CLARCK *et al.*, 1995; 2000) passou a ser reportada com características gênicas relacionadas à células de melanoma e então, diversos estudos foram desenvolvidos com o intuito de identificar a verdadeira origem tecidual desta linhagem tumoral (ELISSON *et al.*, 2002; JESSANI *et al.*, 2002; LEE *et al.*, 2003; MYERS, *et al.* 1997; ROSS *et al.*, 2000; SELLAPPAN *et al.*, 2004).

A controversa origem das células MDA-MB-435 têm persistido devido aos trabalhos conflitantes, no entanto, trabalhos reportaram que a linhagem tumoral MDA-MB-435 parece ter a mesma origem que a linhagem de melanoma M14 (RAE *et al.*, 2006; GARRAWAY *et al.*, 2005) dados que, posteriormente foram publicados no site do programa de screening do NCI (<http://dtp.nci.nih.gov>) confirmando a origem melanocítica das células MDA-MB-435. No entanto, diversos pesquisadores ainda a relatam como modelo de câncer de mama. (PHOENIX; VUMBACA; CLAFFEY, 2009; HOLLESTELLE, *et al.*, 2009; ZHANG *et al.*, 2010; JIANG *et al.*, 2012).

Diante do exposto acima, analisamos o potencial citotóxico em linhagens de mama (MDA-MB-231, Hs578T) e melanoma (MDA-MB-435, B-16, B-16-F-10, M14, MALME-3M), pelo ensaio do MTT.

Os resultados demonstrados em valores de CI_{50} após 72 horas de incubação indicaram que a introdução do grupamento THP no anel pirânico da molécula alfa-lapachona, aumentou a citotoxicidade contra seis das linhagens tumorais testadas, apresentando maior seletividade às linhagens de melanoma, como descrito anteriormente.

A inserção do grupamento THP aumentou a citotoxicidade da alfa-lapachona em aproximadamente 6 vezes contra a linhagem tumoral MDA-MB-435, com valores de CI_{50} de $1,37\mu M$ e $8,18\mu M$ para derivado THP e seu protótipo,

respectivamente. Nas demais linhagens, esta modificação estrutural causou aumento de cerca de 2 vezes no potencial citotóxico da molécula.

Interessantemente, o derivado THP apresentou-se 7 vezes menos citotóxico ($CI_{50}=10,36 \mu\text{M}$) contra a linhagem M14, considerada com a mesma origem de MDA-MB-435, com 97% de semelhança (GARRAWAY *et al.*, 2005), enquanto a alfa-lapachona apresentou a metade da citotoxicidade ($CI_{50}=19,69 \mu\text{M}$) quando comparadas à MDA-MB-435.

Estes achados corroboram com a literatura, que relata que modificação no anel que se liga ao grupo quinona, incluindo anéis furano e pirano, levam a mudanças significantes na sua bioatividade, influenciando na atividade antitumoral de naftoquinonas (PÉREZ-SACAU *et al.*, 2003, 2007). Daí, a síntese de piranonaftoquinonas com padrões de substituição diferentes têm atraído o interesse de pesquisadores.

Segundo Moura *et al.* (2001), o aumento da lipofilicidade também pode induzir o aumento do potencial citotóxico, como demonstrado através inserção do grupamento cíclico THP na molécula de alfa-lapachona.

Diante dos resultados anteriores, avaliou-se a citotoxicidade contra linhagens tumorais de melanoma (MDA-MB-345, B-16-F-10, MALME-3M, M14) após 24 horas de incubação, pois apresentaram melhor perfil citotóxico frente às substâncias-teste no ensaio anterior. Os resultados foram semelhantes aos demonstrados anteriormente, com a linhagem MDA-MB-435 apresentando maior sensibilidade aos efeitos citotóxicos das substâncias-teste com valores de CI_{50} de 20,04 μM e 5,18 μM para alfa-lapachona e seu derivado THP, respectivamente.

Um dos maiores problemas relacionados com o tratamento do câncer são os efeitos colaterais, já que a maioria dos agentes quimioterápicos atua de forma não-específica, lesando tanto células malignas quanto normais (MURAD; SALMOMN, 1998), particularmente as células de rápido crescimento, como as gastrointestinais, capilares e as do sistema imunológico. Assim, a busca por novos quimioterápicos tem como objetivo principal aumentar a seletividade e a efetividade dessas substâncias, destruindo células tumorais e preservando as células normais (ALMEIDA *et al.*, 2005).

Assim, avaliou-se a citotoxicidade em células mononucleares do sangue periférico humano (CMSP), para avaliar a seletividade dos compostos estudados para células tumorais. Observou-se que os dois compostos demonstraram certa seletividade para células tumorais, sendo que a introdução do anel tetrahidropirano induziu maior seletividade para células tumorais que o seu protótipo, apresentando valores de CI_{50} 2,6 vezes maior que observada em células MDA-MB-435 no mesmo tempo de incubação.

Como o derivado THP apresentou maior citotoxicidade contra a linhagem MDA-MB-435, esta foi escolhida para o desenvolvimento dos experimentos posteriores.

Na avaliação da cinética de crescimento na linhagem tumoral MDA-MB-435, sob os efeitos da alfa-lapachona e seu derivado THP após 3, 6, 12 e 24 horas de incubação, observou-se o efeito citotóxico do derivado THP a partir de 12 horas de incubação (10 μ M), com aumento de células não-viáveis. Após 24 horas de incubação, o efeito é mais acentuado, onde se observou diminuição de células viáveis e aumento de células não-viáveis nas concentrações de 5 e 10 μ M, de maneira concentração-dependente.

Estes resultados corroboram com o ensaio do MTT, onde o derivado THP demonstrou maior atividade citotóxica que seu protótipo, no entanto, este efeito parece estar relacionado, principalmente, com a perda da integridade de membrana, já que o ensaio de exclusão por azul de tripan é baseado no princípio de que as células com membrana íntegra conseguem expulsar o corante, contrariamente às células não-viáveis (com membrana rompida). A perda de integridade de membrana plasmática, por sua vez, está intimamente relacionada à morte celular por necrose.

Estes resultados, também corroboraram com a citometria de fluxo, em que foram realizados experimentos em MDA-MB-435 avaliando os parâmetros: número de células, integridade de membrana, despolarização mitocondrial, ciclo celular, fragmentação de DNA e ativação de caspases. Nesses experimentos, também foi evidenciada a diminuição significativa do número de células nas concentrações de 5 e 10 μ M após 24 horas de incubação com o derivado THP, além de diminuição de células com membrana plasmática íntegra, corroborando com os resultados da curva de crescimento.

Outro parâmetro relacionado com a morte celular é a fragmentação de DNA (KROEMER *et al.*, 2009). Desse modo, o número de células com o DNA fragmentado aumentou significativamente somente na maior concentração testada (10 μ M) após 24 horas de incubação, o que sugere a indução de necrose pela exposição ao derivado THP, já que a fragmentação de DNA em células com membrana íntegra seria uma alteração típica de um processo apoptótico.

Vários agentes anticâncer exercem sua ação sobre as células que se encontram no ciclo celular, mas também há fármacos que tem a capacidade de destruir as células tumorais independentemente de estarem atravessando o ciclo ou de estarem em repouso (MURAD; SALMONN, 1998; CHABNER, 1996). Do mesmo modo, os compostos estudados demonstraram que seus efeitos citotóxicos não estão relacionados com o ciclo celular.

Muitos processos bioquímicos que caracterizam a apoptose podem ocorrer também durante a necrose, como a dissipação do potencial transmembrânico mitocondrial, já que o processo necrótico é acompanhado pelo desmantelamento de organelas citoplasmáticas, em particular, a mitocôndria (KROEMER *et al.*, 2009). Os resultados mostraram que a alteração mitocondrial demonstrada após o tratamento do derivado THP (10 μ M) após 24 horas de incubação, sugere um processo necrótico, tendo em vista, a intensa perda de células com membrana íntegra demonstrada nesta mesma concentração e tempo de exposição.

A atividade de caspases foi considerada como marcador universal da apoptose antes da descoberta de outros tipos de morte celular independente de caspases com morfologia apoptótica (XIANG; CHAO; KORSMEYER, 1996). No entanto, a avaliação da atividade de caspases continua sendo uma parte importante na detecção da apoptose (KEPP *et al.*, 2011). Então, avaliou-se a atividade de caspases efetoras 3 e 7 no processo de morte celular induzido por alfa-lapachona e seu derivado THP, onde não se observou ativação significativa destas enzimas em nenhuma concentração testada. Estes resultados corroboram, mais uma vez, com a morte celular por necrose, já que neste processo não há participação destas proteases.

Os resultados demonstrados pelas alterações morfológicas corroboram, em grande parte, com a citometria de fluxo, principalmente na observação do acentuado número de células com perda da integridade de membrana após 24 horas de exposição do derivado THP na concentração de 10 μ M. Pode-se observar, também, a ocorrência de células com cromatina condensada (picnose), a partir de 6 horas de incubação encontrada em processos apoptóticos e necróticos (GALUZZI, *et al.*, 2011).

A maioria dos fármacos quimioterápicos induzem apoptose, no entanto, a literatura recente mostra que a utilização de compostos que induzem especificamente necrose em células tumorais pode ser uma estratégia terapêutica promissora no tratamento de tumores resistentes a apoptose (KEPP *et al.*, 2011).

Recentes relatos demonstram que algumas drogas candidatas a antitumorais causam necrose (LI *et al.*, 2007; LU *et al.*, 2010; SHAHABUDDIN *et al.*, 2010), assim como outras naftoquinonas com atividade anticâncer estabelecida, como β -lapachona e shikonina, também podem exercer sua atividade citotóxica via necrose, como mecanismo predominante (HAN *et al.*, 2007; SUN *et al.* 2006).

A recente descoberta de que a necrose não é somente um processo puramente acidental, e que pode ser regulado por processos bioquímicos, denominado necroptose, tem incitado bastante interesse no desenvolvimento de moduladores deste tipo de morte celular (LASTER; WOOD; GOODING, 1988; DEGTEREV *et al.*, 2005). Esta forma de morte programada é independente de mediadores centrais apoptóticos, como p53, Bax / Bak, ou caspases.

Além disso, esta forma de necrose programada induz uma resposta inflamatória que fornece proteção adicional contra o acúmulo de células danificadas ou aberrantes, e repara o tecido danificado (ZONG *et al.*, 2004).

Exemplos de agentes que induzem morte celular por necrose programada incluem agentes alquilantes de DNA, que podem provocar necrose em células tumorais via hiperativação de PARP1 (ZONG *et al.*, 2004), inibidores da família de proteínas de inibidores celulares de apoptose (IAP), como os que mimetizam a ação de SMAC, promovem necroptose *in vitro*, facilitando a ubiquitinação de RIP1

(DINEEN *et al.*, 2010; VANDENABEELE *et al.*, 2010; VANLANGENAKKER *et al.*, 2011).

O mecanismo citotóxico de muitas 1,4 naftoquinonas, como a juglona, plumbagina e menadiona tem sido associado à excessiva geração de EROs, como radicais superóxido, oxigênio *singlet* e peróxido de hidrogênio (INBARAJ; CHIGNELL, 2004; CHUNG *et al.*, 1999).

Por sua vez, a excessiva geração EROs tem sido associada a vários casos de apoptose e também durante a necrose programada (BONFOCO *et al.*, 1995; KROEMER; GALLUZZI; BRENNER, 2007; MELINO *et al.*, 1997; NICOTERA; BERNASSOLA; MELINO, 1999; VANDENABEELE *et al.*, 2010).

Em nossa avaliação indireta da produção de EROs através da pré-incubação com N-acetil-cisteína (NAC) em células MDA-MB-435 tratadas com as amostras-teste, verificou-se que a citotoxicidade do derivado THP não parece estar relacionada com a geração de EROs, visto que a diferença entre valores de CI_{50} das células tratadas com e sem NAC, não foi significativa, considerando o intervalo de confiança. A citotoxicidade da alfa-lapachona, por sua vez, parece estar associada, pelo menos em parte, à formação de EROs, visto que o valor de CI_{50} das células pré-tratadas com NAC é cerca de 2 vezes maior que sem o pré-tratamento.

Assim, observou-se que a introdução do grupamento THP na molécula de alfa-lapachona reduziu o seu potencial redox, já que, é conhecido que capacidade das naftoquinonas formarem EROs é influenciada pela natureza e posição dos substituintes na molécula (BOLTON *et al.*, 2000; MUNDAY; SMITH; MUNDAY, 1995; ÖLLINGER; BRUNMARK, 1991).

Como a presença do centro redox nas quinonas é descrito como uma característica importante responsável pela sua ação citotóxica parece que outro mecanismo de ação está presente neste caso, assim como, relatado por Bourguignon *et al.* (2009) para a atividade tripanocida do derivado oxirano da alfa-lapachona.

Diante do exposto acima, os dados obtidos neste trabalho reforçam a importância da alfa-lapachona como protótipo promissor, onde os resultados demonstraram maior potencial anticâncer do derivado tetrahidropirano. Entretanto,

torna-se necessário a realização de estudos mais detalhados para elucidar o verdadeiro mecanismo de ação deste composto.

6 CONCLUSÃO

O derivado THP possui potente atividade citotóxica, principalmente em linhagens de melanoma, quando comparado ao seu protótipo alfa-lapachona. A introdução do grupo tetrahidropirano na estrutura molecular do protótipo parece ser a responsável por essa maior atividade.

A sua ação citotóxica induz, principalmente, a diminuição da integridade da membrana plasmática, sendo independente do ciclo celular, caspases efetoras e produção de EROs, sugerindo, por sua vez, um processo necrótico. Esses achados reforçam o potencial de naftoquinonas sintéticas como protótipos para a produção de novos compostos com propriedades anticâncer.

REFERÊNCIAS

- ADAM-KLAGES, S. *et al.* Death receptors and caspases: role in lymphocyte proliferation, cell death, and autoimmunity. **Immunologic Research**, v. 33, p. 149-166, 2005.
- ALBERTS, B. *et al.* **Biologia Molecular da Célula**. 5. ed. Porto Alegre: Artmed, 2009.
- ALMEIDA, E. R. *et al.* Antiinflammatory action of lapachol. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 29, p. 239-241, May 1990.
- ALMEIDA, V. L. *et al.* Câncer e agentes antineoplásicos ciclo-celular específicos e ciclo-celular não específicos que interagem com o DNA: Uma introdução. **Química Nova**, v. 28, p. 118-129, fev. 2005.
- ANDRADE-NETO, V. F. *et al.* Antimalarial activity of phenazines from lapachol, β lapachone and its derivatives against *Plasmodium falciparum* in vitro and *Plasmodium berghei* in vivo. **Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters**, v. 14, p. 1145-1149, Mar. 2004.
- ASCHE, C. Antitumour quinones. **Mini-Reviews in Medicinal Chemistry**, v. 5, p. 449-467, May 2005.
- AUSTIN, F. G. Schistosoma Mansoni Chemoprophylaxis with Dietary Lapachol. **America Journal of Tropical Medicine and Hygiene**, v. 23, p. 412-419, May 1974.
- BAI, X. *et al.* Honokiol, a small molecular weight natural product, inhibits angiogenesis in vitro and tumor growth in vivo. **Journal of Biological Chemistry**, v. 278, p. 35501-35507, June 2003.
- BAKER, D. D. *et al.* The value of natural products to future pharmaceutical discovery. **Natural Products Reports**, v. 24, p. 1225-1244, May 2007.
- BALASSABIANO, I. I. *et al.* Demonstration of the lapachol as a potential drug for reducing cancer metastasis. **Oncology Reports**, v. 13, p. 329-334, Feb. 2005.
- BALUNAS, M. J.; KINGHON, A. D. Drug discovery from medicinal plants. **Life Sciences**, v. 78, p. 431-441, Dec. 2005.
- BARBOSA, T. P. *et al.* New 1,2,3,4-tetrahydro-1-aza-anthraquinones and 2-aminoalkyl compounds from nor-lapachol with molluscicidal activity. **Bioorganic & Medicinal Chemistry**, v. 13, p. 6464-6469, Dec. 2005.
- BARREIRO, E. J.; FRAGA, C. A. F. **Química medicinal: as bases moleculares da ação dos fármacos**. 2. ed. Porto Alegre: Artmed, 2001.

BELINSKY, M.; JAISWAL, A. K. NAD(P)H:Quinone oxidoreductase₁ (DT-diaphorase) expression in normal and tumor tissues. **Cancer Metastasis Reviews**, v. 12, p. 103-117, June 1993.

BERGMAN, P. J.; HARRIS, D. Radioresistance, chemoresistance and apoptosis resistance. The past, present and future. **Veterinary Clinics of North America**, v. 27, p. 47-57, Jan. 1997.

BERLINCK, R.G.S. *et al.* Chemical and pharmacological characterization of halitoxin from *Amphimedon viridis* (PORIFERA) from the southeastern brazilian coast. **Comparative Biochemistry and Physiology**, v. 115, p. 155-163, 1996.

BEY, E. A. *et al.* An NQO1- and PARP-1-mediated cell death pathway induced in non-small-cell lung cancer cells by β -lapachone. **Proceedings of National Academy of Sciences**, v. 104, p.11832-11837, July 2007.

BINASCHI, M. *et al.* *In vivo* site specificity and human isoenzyme selectivity of two topoisomerase II poisoning anthracyclines. **Cancer Research**, v. 60, p. 3770-3776, July 2000.

BLOCK, J. B. *et al.* Early clinical studies with lapachol (NSC-11905). **Cancer Chemotherapie Reports 2**, v. 4, p. 27-28, Dec. 1974.

BOLTON, J. L. *et al.* Role of quinones in toxicology. **Chemical Research Toxicology**, v. 13, p. 135-160, Feb. 2000.

BONFIL, R. D. *et al.* Higher antitumor activity of vinflunine than vinorelbine against an orthotopic murine model of transitional cell carcinoma of the bladder. **Urologic Oncology**, v. 7. n. 4. p. 159-166, July 2002.

BONFOCO, E. *et al.* Apoptosis and necrosis: two distinct events induced, respectively, by mild and intense insults with N-methyl-D-aspartate or nitric oxide/superoxide in cortical cell cultures. **Proceedings of National Academy of Sciences**, v. 92, p. 7162–7166, Aug. 1995.

BONIFAZI, E. L. *et al.* Antiproliferative activity of synthetic naphthoquinones related to lapachol. First synthesis of 5-hydroxylapachol. **Bioorganic e Medicinal Chemistry**, v. 19. p. 828-830, Apr. 2010.

BOOTHMAN, D. A.; GREER, S.; PARDEE, A. B. Potentiation of halogenated pyrimidine radiosensitizers in human carcinoma cells by beta-lapachone (3,4-dihydro-2,2-dimethyl-2H-naphtho[1,2-b]pyran- 5,6-dione), a novel DNA repair inhibitor. **Cancer Research**, v. 47, p. 5361 - 5366, Oct. 1987.

BOOTHMAN, D. A.; PARDEE, A. B. Inhibition of radiation-induced neoplastic transformation by beta-lapachone. **Proceedings of National Academy of Sciences**, v. 86, p. 4963-4967, Mar. 1989.

BOURGUIGNON, S.C. *et al.* Trypanosoma cruzi: in vitro activity of Epoxy-a-Lap, a derivative of α -lapachone, on trypomastigote and amastigote forms. **Experimental Parasitology**, v.122, p. 91–96, Mar. 2009.

BOURGUIGNON, S.C. *et al.* Trypanosoma cruzi: Insights into naphthoquinone effects on growth and proteinase activity. **Experimental Parasitology**. v. 127, p.160–166, July 2011.

BOYA, P. *et al.* Inhibition of Macroautophagy Triggers Apoptosis. **Molecular and Cellular Biology**, v. 25, p. 1025–1040, Feb. 2005.

BRASTIANOS, H. C. *et al.* Exiguamine A, an indoleamine-2,3-dioxygenase (IDO) inhibitor isolated from the marine sponge *Neopetrosia exigua*. **Journal of the American Chemical Society**, v. 128, p. 16046-16047, Dec. 2006.

BROOKS, S.A. *et al.* Molecular interactions in cancer cell metastasis. **Acta Histochemica**, v. 112, p. 3-25, Jan. 2010.

BRUIN, E. C.; MEDEMA, J. P. Apoptosis and non-apoptotic deaths in cancer development and treatment response. **Cancer Treatment Reviews**, v. 34, p. 737-749, Dec. 2008.

BUDAVARI, S. **The Merck Index**. 12th ed. White House Station: Merck. 1996.

BUNZ, F. Cell death and cancer therapy. **Current Opinion in Pharmacology**, v. 1, p. 337-341, July 2001.

BURSCHE, W. *et al.* Cell death and autophagy: cytokines, drugs, and nutritional factors. **Toxicology**, v. 254, p. 147–157, June 2008

BUTLER, M. S. The role of natural product chemistry in drug discovery. **Journal of Natural Products**, v. 67, n. 12, p. 2141-2153, Nov. 2004.

BUTLER, M. S. Natural products to drugs: natural product-derived compounds in clinical trials. **Natural Products Reports**, v. 25, p. 475–516, Mar. 2008.

BUTLER, M. S.; NEWMAN, D. J. Mother Nature's gifts to diseases of man: the impact of natural products on anti-infective, anticholesteremics and anticancer drug discovery. **In Progress in Drug Research**, v. 65, p. 3-44, 2008.

CAILLEAU, R.; OLIVE, M.; CRUCIGER, Q. V. Long-term human breast carcinoma cell lines of metastatic origin: Preliminary characterization. **In Vitro**, v. 14, p. 911–915, 1978.

CARVALHO, L. H. *et al.* In vitro activity of natural and synthetic naphthoquinones against erythrocytic stages of Plasmodium falciparum. **Brazilian Journal of Medical and Biological Research**, v. 21, p. 485-487, 1988.

CASTEDO, M. *et al.* Cell death by mitotic catastrophe: a molecular definition. **Oncogene**, v. 23, p. 2825-2837, Apr. 2004.

CHABNER, B. A.; LONGO, D. L. **Cancer chemotherapy and biotherapy: principles and practice**. 2nd ed. Philadelphia: Lippincott-Raven, 2006.

CHABNER, B. A.; CALABRESI, P. **As Bases Farmacológicas da Terapêutica**, p. 903-949. 9 ed. Mc Graw Hill: Rio de Janeiro, 1996.

CHAU, Y. *et al.* Involvement of hydrogen peroxide in topoisomerase inhibitor β -lapachone- induced apoptosis and differentiation in human leukemia cells. **Free Radical Biology & Medicine**, v. 24, p. 660-670, Mar. 1998.

CHIN, Y. *et al.* Drug Discovery From Natural Sources. **The AAPS Journal**, v. 8, p. 239 - 253, Apr. 2006.

CHIPUK, J. E.; GREEN, D. R. How do BCL-2 proteins induce mitochondrial outer membrane permeabilization?. **Trends in Cell Biology**, v. 18, p. 157-164, Apr. 2008.

CHOI, E. K. *et al.* Upregulation of NAD(P)H:Quinone Oxidoreductase By Radiation Potentiates the Effect of Bioreductive β -Lapachone on Cancer Cells. **Cancer Research Treatment**, v. 37, p. 183-190, June 2005.

CHUNG, S. H. *et al.* The biological significance of non-enzymatic reaction of menadione with plasma thiols: enhancement of menadione-induced cytotoxicity to platelets by the presence of blood plasma. **FEBS Letters**, v. 23, p. 235-240, Apr. 1999.

CLARCKE, R. *et al.* *In vitro* models of human breast cancer. In HARRIS, J. R.; LIPPMAN, M. E.; MORROW, M.; HELLMAN, S. (Ed). **Diseases of the breast**. Philadelphia: Lippincott Williams & Wilkins, 1995.

CLARCKE, R.; JOHNSON, M. Animal models. In: HARRIS, J. R. (Ed). **Diseases of the breast**. 2nd ed. Philadelphia: Lippincott Williams & Wilkins, 2000. p. 319–334.

COELHO, K. C. G. *et al.* Activity of b-lapachone derivatives against rifampicin-susceptible and –resistant strains of Mycobacterium tuberculosis. **Tuberculosis**, v. 90, p. 203-297, June 2009.

COLOTTA, F. *et al.* Cancer-related inflammation, the seventh hallmark of cancer: links to genetic instability. **Carcinogenesis**, v. 30, p.1073-1081, May 2009.

COTRAN, R. S.; KUMAR, V.; COLLINS, T. **Patologia estrutural e funcional**. 6th ed. México: McGraw-Hill, 2000.

CRAGG, G. M.; GROTHAUS, P. G.; NEWMAN, D. J. Impact of Natural Products on Developing New Anti-Cancer Agents. **Chemical Reviews**, v. 109, p. 3012–3043, May 2009.

CRAGG, G. M.; NEWMAN, D. J. Plants as a source of anti-cancer agents. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 100, p. 72-79, 2005.

CRAGG, G. M.; NEWMAN, D. J.; WEISS, R. B. Coral reefs, forests, and thermal vents: the worldwide exploration of nature for novel antitumor agents. **Seminars in Oncology**, v. 24, p. 156-163, Apr. 1997.

CUEVAS, C.; FRANCHESCH, A. Development of Yondelis[®] (trabectedin, ET 743). A semisynthetic process solves the supply problem. **Natural Products Reports**, v. 26, p. 322-337, Mar. 2009.

CURY-BOAVENTURA, M. F.; POMPEIA, C.; CURI, R. Comparative toxicity of oleic acid and linoleic acid on Jurkat cells. **Clinical Nutrition**, v. 23, p. 721-732, 2004.

DEGTEREV, A. *et al.* Chemical inhibitor of nonapoptotic cell death with therapeutic potential for ischemic brain injury. **Nature Chemical Biology**, v. 1, p. 112–119, May 2005.

DINEEN, S. P. *et al.* Smac mimetic increases chemotherapy response and improves survival in mice with pancreatic cancer. **Cancer Research**, v. 70, p. 2852-2861, Mar. 2010.

DU, C. *et al.* Smac, a mitochondrial protein that promotes cytochrome *c*-dependent caspase activation by eliminating IAP inhibition. **Cell**, v. 102, p. 33-42, July 2000

EDINGER, A. L.; THOMPSON, C. B. Death by design: apoptosis, necrosis and autophagy. **Current Opinion Cell Biology**, v. 16, p. 663–669, Oct. 2004.

ELLISON, G. *et al.* Further evidence to support the melanocytic origin of MDA-MB-435. **Molecular Pathology**, v. 55, p. 294–299, Oct. 2002.

FERREIRA, S. B. *et al.* β -Lapachona: Sua importância em química medicinal e modificações estruturais. **Revista Virtual de Química**, v. 2, p. 140-160, out. 2010.

FERREIRA, V. F. *et al.* Tripanocidal agents with cytotoxicity to mammalian cell line: A comparison of the theoretical and biological features of lapachone derivatives. **Bioorganic and Medicinal Chemistry**, v. 14, p. 5456-5466, May 2006.

FERREIRA, V. F. *et al.* The Diels-Alder Reaction with O-2,3-Dimethylene-1,4-Naphthoquinone: A Useful Intermediate for the Synthesis of the B Ring of Anthracyclines. **Journal of Brazilian Chemistry Society**, v. 7, p. 169-172, July 1996.

FESTJENS, N.; VANDEN BERGHE, T.; VANDENABEELE, P. Necrosis, a well-orchestrated form of cell demise: signalling cascades, important mediators and concomitant immune response. **Biochimica et Biophysica Acta**, v. 1757, p. 1371-1387, Oct. 2006.

- FINK, S. L.; COOKSON, B. T. Apoptosis, Pyroptosis, and Necrosis: Mechanistic Description of Dead and Dying Eukaryotic Cells. **Infection and Immunity**, v. 73, p. 1907-1916, Apr. 2005.
- FOSTER, I. Cancer: a cell cycle defect. **Radiography**, v. 14, p. 144-149, Jan. 2008.
- FOYE, William. O. **Cancer Chemotherapeutic Agents**. 1st ed. Washington D.C.: American Chemical Society, 1995.
- FRIDOVISC, I. Oxygen toxicity; A radical explanation. **The Journal of Experimental Biology**, v. 201, p. 1203-1209, Mar. 1998.
- GALLUZZI, L. et al. Guidelines for the use and interpretation of assays for monitoring cell death in higher eukaryotes. **Cell Death and Differentiation**, v. 16, p. 1093–1107, Mar. 2009.
- GALLUZZI, L. et al. Cell death signaling and anticancer therapy. **Frontiers in Oncology**, v. 1, p. 1-18, Mar. 2011.
- GANESAN, A. The Impact of natural products upon modern drug discovery. **Current opinion in chemical biology**, v. 12. p. 306-317, June 2008.
- GARKAVTSEVA, I. et al. Dehydro- α -lapachone, a plant product with antivasular activity. **Proceedings of National Academy of Sciences**, v. 108, p. 11596-11601, July 2011.
- GARNIER, S. et al. Antifungal and antibacterial naphthoquinones from *Newbouldia laevis* roots. **Phytochemistry**, v. 42, p. 1315-1320, July 1996.
- GARRAWAY, L. A. et al. Integrative genomic analyses identify MITF as a lineage survival oncogene amplified in malignant melanoma. **Nature**, v. 436, p. 117-122, July 2005.
- GOEL, R. K. et al. Effect of lapachol, a naphthaquinone isolated from *Tectona grandis*, on experimental peptic ulcer and gastric secretion. **Journal of Pharmacy and Pharmacology**, v. 39, p. 138-140, Feb. 1987.
- GOIJMAN, S. G.; STOPPANI, A. O. M. Effects of β -lapachone, a peroxide-generating quinone, on macromolecule synthesis and degradation in *Trypanosoma cruzi*. **Archives of Biochemistry and Biophysics**, v. 240, p. 273-280, July 1985.
- GOLSTEIN, P.; KROMER, G. Cell death by necrosis: towards a molecular definition. **TRENDS in Biochemical Sciences**, v. 32, p. 37-43, Dec. 2006.
- GOULART, M. O. F. et al. Trypanocidal activity and redox potential of heterocyclic- and 2-hydroxy-naphthoquinones. **Bioorganic Medicinal Chemistry Letters**, v. 7, p. 2043-2048, July 1997.

GRELLIER, P. *et al.* Antiplasmodial activity of quinones: Roles of aziridinyl substituents and the inhibition of *Plasmodium falciparum* glutathione reductase. **Archives of Biochemistry and Biophysics**, v.494, p.32-39, Feb. 2010.

GUIRAUD, P. *et al.* Comparison of antibacterial and antifungal activities of lapachol and beta-lapachone. **Planta Medica**, v. 60, p. 373-374, Aug. 1994.

GUTIERREZ, P. L. The role of NAD(P)H oxireductase (DT-diaphorase) in the bioactivation of quinine – containing antitumor agents: A review. **Free Radical Biology & Medicine**, v. 29, p. 263-275, Aug. 2000

HAN, W. *et al.* Shikonin circumvents cancer drug resistance by induction of a necroptotic death. **Molecular Cancer Therapy**, v .6, p. 1641-1649, May 2007.

HANAHAHAN, D.; WEINBERG, R. A. The hallmarks of cancer. **Cell**, v. 100, p. 57-70, Jan. 2000.

HANAHAHAN, D.; WEINBERG, R. A. Hallmarks of Cancer: The Next Generation. **Cell**, v. 144, p. 646-674, Mar. 2011.

HANAYAMA, R. *et al.* Autoimmune disease and impaired uptake of apoptotic cells in MFG-E8-deficient mice. **Science**, v. 304, p. 1147-1150, May 2004.

HARVEY, A. L. Natural products in drug discovery. **Drug Discovery Today**, v. 13, p. 894-901, Aug. 2008.

HENGARTNER, M. O. The Biochemistry of apoptosis. **Nature**, v. 407, p. 770-776, Oct. 2000.

HERR, H.W.; MORALES, A. History of bacillus Calmette-Guerin and bladder cancer: an immunotherapy success story. **Journal of Urology**, v. 179, p. 53-56, Nov. 2008.

HOLLESTELLE, A. *et al.* Distinct gene mutation profiles among luminal-type and basal-type breast cancer cell lines. **Breast Cancer Research and Treatment**, v. 121, p. 53-64, 2010.

HOOKER, S. C. The Constitution of Lapachic Acid (Lapachol) and Derivatives. **Journal of Chemical Society**, v. 6, p. 611-650, 1892.

HOTCHKISS, R. S. *et al.* Mechanisms of Disease Cell Death. **New England Journal of Medicine**, v. 361, p. 1570-1583, Oct. 2009.

HOUGHTON, J. A. Apoptosis and drug response. **Current Opinion in Oncology**, v. 11, 475-481, Nov. 1999.

HUSSAIN, H. *et al.* Lapachol: a overview. **Arkivoc**, p. 145-171, Aug. 2007

IBIS, C. *et al.* Synthesis and biological evaluation of novel nitrogen- and sulfur-containing hetero-1,4-naphthoquinones as potent antifungal and antibacterial agents. **European Journal of Medicinal Chemistry**, v. 46, p. 5861-5867, Dec. 2011.

IGNEY, F. H.; KRAMMER, P. H. Death and anti-death: tumour resistance to apoptosis. **Nature Reviews Cancer**, v. 2, p. 277-288, Apr. 2002.

INBARAJ, J. J.; CHIGNELL, C. F. Cytotoxic action of juglone and plumbagin: a mechanistic study using HaCaT keratinocytes. **Chemical Research in Toxicology**, v. 17, p. 55 - 62, Jan. 2004.

INSTITUTO NACIONAL DO CANCER (Brasil). **Estimativas de incidência e mortalidade por câncer no Brasil**. 2012. Disponível em: <<http://www.inca.gov.br>>. Acesso em: 30 abr. 2012.

ITOH, N.; NAGATA, S. A novel protein domain required for apoptosis. Mutational analysis of human Fas antigen. **The Journal of Biological Chemistry**, v. 268, p. 10932-10937, May 1993.

JESSANI, N. *et al.* Enzyme activity profiles of the secreted and membrane proteome that depict cancer cell invasiveness. **Proceedings of National Academy of Sciences**, v. 99, p. 10335-10340, Aug. 2002.

JORQUEIRA, A. *et al.* Oxyrane derivative of alpha-lapachone is potent growth inhibitor of Trypanosoma cruzi epimastigote forms. **Parasitology Research**, v. 99, p. 429-433, Apr. 2006.

JARABAK, R.; JARABAK, J. Effect of ascorbate on the DT-Diaphorase-mediated redox cycling of 2-Methyl-1,4-naphthoquinone. **Archives of Biochemistry and Biophysics**, v. 318, p. 418-423, Apr. 1995.

JIANG, K. *et al.* Cyclosporine A inhibits breast cancer cell growth by downregulating the expression of pyruvate kinase subtype M2. **International Journal of Molecular Medicine**, v. 30, p. 302-308, Aug. 2012.

JOSEPH, P. *et al.* NAD(P)H:quinine-oxidoreductase1 (DT-diaphorase): expression, regulation, and role in cancer. **Oncology Research**, v. 6, p. 525-532, Mar. 1994.

JUNG, A.; BRABLETZ, T.; KIRCHNER, T. The migrating cancer stem cells model - a conceptual explanation of malignant tumour progression. **Ernst Schering Foundation Symposium Proceedings**, v. 5, p. 109-124, 2006.

KATZUNG, Bertram G. **Farmacologia básica e clínica**. 9. ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2006.

KAWECKI, D. R. *et al.* A phase II study of ARQ 501 in patients with advanced squamous cell carcinoma of the head and neck. **Journal of Clinical Oncology**. 2007 **ASCO Annual Meeting Proceedings (Post-Meeting Edition)**, v. 25, p. 16509, June 2007.

KAYSER, O. et al. In vitro leishmanicidal activity of monomeric and dimeric naphthoquinones. **Acta Tropica**, v. 77, p. 307-314, May 2000.

KERR, J. F. R.; WYLLIE, A. H.; CURRIE, A. R. Apoptosis: A basic biological phenomenon with wide-ranging implications in tissue kinetics. **British Journal of Cancer**, v. 26, p. 239-257, 1972.

KEPP, O. et al. Cell death assays for drug discovery. **Nature reviews**, v. 10, p. 221-237, Mar. 2011.

KHONG, H. Y. *et al.* A phase 2 study of ARQ 501 in combination with gemcitabine in adult patients with treatment naïve, unresectable pancreatic adenocarcinoma. **Journal of Clinical Oncology**, v. 25, p. 15017, June 2007.

KIM, E. J. *et al.* Synergistic Effect of Ionizing Radiation and β -lapachone against RKO Human Colon Adenocarcinoma Cells. **Cancer Research Treatment**, v. 37, p. 183-190, June 2005.

KIM, S. O., *et al.* Induction of Egr-1 is associated with anti-metastatic and anti-invasive ability of beta-lapachone in human hepatocarcinoma cells. **Bioscience, Biotechnology and Biochemistry**, v. 71, p. 2169–2176, 2007.

KINGSTON, D. G. I. Modern Natural Products Drug Discovery and Its Relevance to Biodiversity Conservation. **Journal of Natural Products**, v. 74, p. 496-511, Dec. 2011.

KINGSTON, D. G. I.; NEWMAN, D. J. The search for novel drug leads for predominately antitumor therapies by utilizing mother nature's pharmacoforic libraries. **Current Opinion Drug Discovery & Development**, v. 8, p. 207-227, Mar. 2005.

KLIONSKY, D. J. Autophagy: from phenomenology to molecular understanding in less than a decade. **Nature Reviews Molecular Cell Biology**, v. 8, p. 931-937, Nov. 2007.

KLIONSKY, D. J.; EMR, S. D. Autophagy as a regulated pathway of cellular degradation. **Science**, v. 290, p. 1717-1721, Dec. 2000.

KRISHNSAN, P.; BASTOW, K. F. Novel Mechanisms of DNA Topoisomerase II Inhibition by Pyranonaphthoquinone Derivatives - Eleutherin, α -Lapachone, and β -Lapachone. **Biochemical Pharmacology**, v. 60, p. 1367-1379, Nov. 2000.

KRISHNSAN, P.; BASTOW, K. F. Novel Mechanisms of DNA Topoisomerase II Inhibition by the pyranonaphthoquinone derivatives α -Lapachone and β -Lapachone. **Cancer Chemotherapy and Pharmacology**, v. 47, p. 187-198, Mar. 2001.

KROEMER, G. *et al.* Classification of cell death: recommendations of the Nomenclature Committee in Cell Death 2009. **Cell Death and Differentiation**, v. 16, p. 3-11, 2009.

KROEMER, G.; GALLUZZI, L.; BRENNER, C. Mitochondrial membrane permeabilization in cell death. **Physiological Reviews**, v. 87, p. 99–163, Jan. 2007.

KROEMER, G.; JAATTELA, M. Lysosomes and autophagy in cell death control. **Nature Reviews Cancer**, v. 5, p. 886-897, Nov. 2005.

KROEMER, G.; REED, J. C. Mitochondrial control of cell death. **Nature Medicine**, v. 6, p. 513-519, May 2000.

KUMAGAI, Y. *et al.* The Chemical Biology of Naphthoquinones and Its Environmental Implications. **Annual Review of Pharmacology and Toxicology**, v. 52, p. 221-247, Sept. 2011.

KUMMAR, V.; ABBAS, A.; FAUSTO, N. **Robbins & Cotran: pathology basis of diseases**. 4. ed. Pequim: WB Saunders, 2007.

KUSUZAKI, K. *et al.* Review. Acridine orange could be an innovative anticancer agent under photon energy. **In Vivo**, v. 21, p. 205-214, Mar. 2007.

LASTER, S. M.; WOOD, J. G.; GOODING, L. R. Tumor necrosis factor can induce both apoptic and necrotic forms of cell lysis. **Journal of Immunology**, v. 141, p. 2629-2634, Oct. 1988.

LAUBE, T., *et al.* Synthesis and pharmacological activities of some sesquiterpene quinines and hydroquinones. **Bioorganic & Medicinal Chemistry**, v. 17, p. 1422–1427, Jan. 2009.

LEE, H. *et al.* Gene expression profiling of tumor xenografts: in vivo analysis of organspecific metastasis. **International Journal of Cancer**, v. 107, p. 528-534, Nov. 2003.

LEE, K.; XIAO, Z. In: CRAGG, G. M.; KINGSTON, D. G. I.; NEWMAN, D. J. (Ed.). **Anticancer agents from natural products**. Boca Raton: CRC Press LLC, 2005. p. 71.

LEVINE, B.; DERETIC, V. Unveiling the roles of autophagy in innate and adaptive immunity. **Nature Reviews Immunology**, v. 7, p. 767-777, Oct. 2007.

LI, C. J. *et al.* Potent inhibition of tumor survival *in vivo* by β -lapachone plus taxol: Combining drugs imposes different artificial checkpoints. **Proceedings of National Academy of Sciences**, v. 96, 13369-13374, Nov. 1999.

LI, C. J.; AVERBOUKH, L.; PARDEE, A. B. β -Lapachone, a Novel DNA Topoisomerase I Inhibitor with a Mode of action Different from Camptothecin. **The Journal of Biological Chemistry**, v. 268, p. 22463-22468, Oct. 1993.

LI, L. *et al.* Honokiol Induces a Necrotic Cell Death through the Mitochondrial Permeability Transition Pore. **Cancer Research**, v. 67, p. 4894-4903, May 2007.

LIMA, C. S. *et al.* Cytotoxic pyranonaphthoquinones from *Melloa quadrivalis* (Bignoniaceae). **Nature Product Research**, v. 19, p. 217-222, Apr. 2005.

LIU, X. *et al.* Induction of apoptotic program in cell-free extract: requirement for dATP and cytochrome c. **Cell**, v. 86, p. 147-157, July 1996.

LIU, K. C.; LI, J.; SAKYA, S. Synthetic approaches to the 2003 new drugs. **Mini-Reviews in Medicinal Chemistry**, v. 4, p. 1105-1125, Dec. 2004.

LIU, S. *et al.* Inhibition of inducible nitric oxide synthase by β -lapachone in rat alveolar macrophages and aorta (pages 746–750). **British Journal of Pharmacology**, v. 126, p. 746-750, 1999.

LOCKSLEY, R. M.; KILLEEN, N.; LENARDO, M. J. The TNF and TNF receptor superfamilies: integrating mammalian biology. **Cell**, v. 104, p. 487-501, Feb. 2001.

LOPES, J. N. *et al.* In vitro and in vivo evaluation of the toxicity of 1,4-naphthoquinone and 1,2-naphthoquinone derivatives against *Trypanosoma cruzi*. **Annals of Tropical Medicine and Parasitology**, v. 72, p. 523-531, Dec. 1978.

LOURO, I. D. *et al.* **Genética molecular do câncer**. 1. ed. São Paulo: MSG Produção Editorial, 2002.

LU, C. *et al.* Chrysophanol induces necrosis through the production of ROS and alteration of ATP levels in J5 human liver cancer cells. **Molecular Nutrition & Food Research**, v. 54, p. 967-976, Aug. 2010.

MAJNO, G.; JORIS, I. Apoptosis, oncosis, and necrosis: an overview of cell death. **American Journal of Pathology**, v. 146, p. 3-15, Jan. 1995

MALKINSON, A. M. *et al.* Elevated DT-diaphorase Activity and Messenger RNA Content in Human Non-Small Cell Lung Carcinoma: Relationship to the Response of Lung Tumor Xenografts to Mitomycin C. **Cancer Research**, v. 52, p. 4752-4757, Sept. 1992.

MANNA, S. K. *et al.* Suppression of Tumor Necrosis Factor-Activated Nuclear Transcription Factor-kappa B, Activator Protein-1, c-Jun N-terminal Kinase, and Apoptosis by Beta-Lapachone. **Biochemical Pharmacology**. v. 57, p. 763-774, Nov. 1999.

MARIN, A. *et al.* DT-diaphorase and cytochrome B₅ reductase in human lung and breast tumours. **British Journal of Cancer**, v. 76, p. 923–929, Oct. 1997.

MELINO, G. S-nitrosylation regulates apoptosis. **Nature**, v. 388, p. 432-433, July 1997.

MELINO, G. The Sirens' song. **Nature**, v. 412, p. 23, July 2001.

MENDELSON, J.; HOWLEY, P. M. **The molecular basis of cancer**. 3rd ed. Philadelphia: WB Saunders, 2008.

MONTANARI, C. A.; BOLZANI, V. S. Planejamento racional de fármacos baseado em produtos naturais. **Química Nova**, v. 24, p.105-111, fev. 2001.

MOON, D.O. *et al.* Anti-inflammatory effects of beta-lapachone in lipopolysaccharide-stimulated bv2 microglia. **International Immunopharmacology**, v. 7, p. 506–514, 2007.

MOSMMAN, T. Rapid colorimetric assay for the cellular growth and survival: application to proliferation and cytotoxicity assays. **Journal of Immunological Methods**, v. 65. p. 55-63, Dec. 1983.

MOURA, K. C. G. *et al.* Trypanocidal Activity of Isolated Naphthoquinones from *Tabebuia* and Some Heterocyclic Derivatives: A Review from an Interdisciplinary Study. **Journal of Brazilian Chemical Society**, v. 12, p. 325-338, May 2001.

MUNDAY, R.; SMITH, B. L.; MUNDAY, C. M. Toxicity of 2,3-dialkyl-1,4-naphthoquinones in rats: Comparison with cytotoxicity in vitro. **Free Radical Biology and Medicine**, v. 19, p. 759-765, Dec. 1995.

MURAD, A. M.; KATZ, A. **Oncologia**: bases clínicas do tratamento. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 1996.

MYERS, T. G. *et al.* A protein expression database for the molecular pharmacology of cancer. **Electrophoresis**. v. 18, p. 647– 653, Mar. 1997.

NAGATA, K. *et al.* Antimicrobial Activity of Novel Furanonaphthoquinone Analog. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**. v. 42, p. 700 - 702, Mar. 1998.

NASTRUCCI, C.; CESARIO, A.; RUSSO, P. Anticancer Drug Discovery from the Marine Environment. **Recent Patents on Anticancer Drug Discovery**. v. 7, p. 218 - 232, 2012.

NATIONAL CANCER INSTITUTE. Disponível em: <<http://www.cancer.gov/>>. Acesso em: 25 Apr. 2012.

NETTO, C. D. *et al.* New pterocarpanquinones: Synthesis, antineoplastic activity on cultured human malignant cell lines and TNF- α modulation in human PBMC cells. **Bioorganic & Medicinal Chemistry**, v. 18, p. 1610–1616, Feb. 2010.

NETTO-FERREIRA, J. C. *et al.* Characterization, reactivity and photosensitizing properties of the triplet excited state of α -lapachone. **Physical Chemistry Chemical Physics**, v. 10, p. 6645 – 6652, Sept. 2008.

NEWMAN, D. J.; CRAGG, G. M.; SNADER, K. M. The influence of natural products upon drug discovery. **Natural Products Reports**. v. 17. p. 215 – 234, May 2000.

NEWMAN, D. J.; CRAGG, G. M.; SNADER, K. M. Natural Products as sources of new drugs over the period 1981 – 2002. **Journal of Natural Products**, v. 66, p. 1022-1037, July 2003.

NEWMAN, D. J.; CRAGG, G. M. Natural Products as Sources of New Drugs over the 30 Years from 1981 to 2010. **Journal of Natural Products**, v. 75, p. 311-335, Mar. 2012.

NICOLETTI, I. *et al.* A rapid and simple method for measuring thymocyte apoptosis by propidium iodide staining and flow cytometry. **Journal of Immunology Methods**, v. 139, p. 271-279, 1991.

NICOTERA, P.; BERNASSOLA, F.; MELINO, G. Nitric oxide (NO), a signaling molecule with a killer soul. **Cell Death & Differentiation**, v. 6, p. 931-933, Oct. 1999.

NOBLE, R. L. The discovery of the vinca alkaloids – chemotherapeutic agents against cancer. **Biochemistry and Cell Biology**, v. 68, p. 1344-1351, Dec. 1990.

O'BRIEN, J. *et al.* Investigation of the Alamar Blue (resazurin) fluorescent dye for the assessment of mammalian cell cytotoxicity. **FEBS Journal**, v. 267, p. 5421-5426, Sept. 2000.

OLIVEIRA, A. B. *et al.* Estrutura química e atividade biológica de naftoquinonas de Bignoniáceas brasileiras. **Química Nova**, v. 13, p. 302-307, 1990.

ÖLLINGER, K.; BRUNMARK, A. Effect of hydroxy substituent position on 1,4-naphtho-quinone toxicity to rat hepatocytes. **The Journal of Biological Chemistry**, v. 266, p. 21496-21503, Nov. 1991.

OLSSON, M.; ZHIVOTOVSKY, B. Caspases and cancer. **Cell Death and Differentiation**, v. 18, p. 1441-1449, Apr. 2011.

OKADA, H.; MAK, T. W. Pathways of apoptotic and non-apoptotic death in tumor cells. **Nature Reviews Cancer**, v. 4, p. 592-603, Aug. 2004.

ORRENIUS, S.; ZHIVOTOVSKY, B. The future of toxicology—does it matter how cells die?. **Chemical Research in Toxicology**, v. 19, p. 729-733, June 2006.

ORRENIUS, S.; ZHIVOTOVSKY, B.; NICOTERA, P. Regulation of cell death: the calcium-apoptosis link. **Nature Reviews Molecular Cell Biology**, v. 4, p. 552-565, July 2003.

ORRENIUS, S.; NICOTERA, P.; ZHIVOTOVSKY, B. Cell Death Mechanisms and Their Implications in Toxicology. **Toxicological Sciences**, v. 119, p. 3-19, Sept. 2011.

PARK, E. J.; CHOI, K. S.; KWON, T. K. β -Lapachone-induced reactive oxygen species (ROS) generation mediates autophagic cell death in glioma U87 MG cells. **Chemico-Biological Interactions**, v. 189, p. 37-44, Jan. 2011.

PERES, C. M.; CURI, R. **Como cultivar células**. 1. ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2005.

PEREZ-SACAU, E. Inhibitory effects of lapachol derivatives on Epstein-Barr virus activation. **Bioorganic and Medicinal Chemistry**, v. 11, p. 483-488, Feb. 2003.

PEREZ-SACAU, E. et al. Antiplasmodial activity of naphthoquinones related to lapachol and beta-lapachone. **Chemistry & Biodiversity**, v. 2, p. 264–274, 2005.

PEREZ-SACAU, E. et al. Synthesis and Pharmacophore Modeling of Naphthoquinone Derivatives with Cytotoxic Activity in Human Promyelocytic Leukemia HL-60 Cell Line. **Journal of Medicinal Chemistry**, v. 50, p. 696-706, Jan. 2007.

PHOENIX, K. N.; VUMBACA, F.; CLAFFEY, K. P. Therapeutic metformin/AMPK activation promotes the angiogenic phenotype in the ER α negative MDA-MB-435 breast cancer model. **Breast Cancer Research Treatment**, v. 113, p. 101-111, Feb. 2009.

PINK, J. J. et al. Activation of a cysteine protease in MCF-7 and T47D breast cancer cells during beta-lapachone mediated apoptosis. **Experimental Cell Research**, v. 255, p. 144-155, Mar. 2000a.

PINK, J. J. et al. NAD(P)H: quinone oxidoreductase activity is the principal determinant of β -lapachone cytotoxicity. **Journal Bioorganic Chemistry**, v. 275, p. 5416-5424, Feb. 2000b.

PINTO, A. V. et al. Schistosomiasis mansoni: blockage of cercarial skin penetration by chemical agents: I. naphthoquinones and derivatives. **Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene**, v. 71, p. 133-135, Oct. 1977.

PINTO, C. N. et al. Chemical reactivity studies with naphthoquinones from Tabebuia with anti trypanosomal efficacy. **Arzneimittel Forschung**, v. 12, p. 1120-1128, Dec. 2000.

PIO CORRÊA, M.; PENNA, L. A. **Dicionário de plantas úteis do Brasil e das exóticas cultivadas**. 1. ed. Rio de Janeiro: IBDF, 1969.

PLANCHON, S. M. et al. β -Lapachone mediated apoptosis in human promyelocytic leukemia (HL-60) and human prostate cancer cells: a p53-independent response. **Cancer Research**, v. 55, p. 3706-3711, Sept. 1995.

PLANCHON, S. M. et al. β -Lapachone-induced apoptosis in human prostate cancer cells: involvement of NQO1/xip3. **Experimental Cell Research**, v. 267, p. 95-106, July 2001.

PRICE, J. E. et al. Tumorigenicity and metastasis of human breast carcinoma cell lines in nude mice. **Cancer Research**, v. 50, p. 717-721, Feb. 1990.

PROSKURYAKOV, S. Y.; KONOPLYANNIKOV, A. G.; GABAI, V. L. Necrosis: a specific form of programmed cell death?. **Experimental Cell Research**, v. 283, p. 1-16, Feb. 2003.

- RAE, J. M. *et al.* Common origins of MDA-MB-435 cells from various sources with those shown to have melanoma properties. **Clinical & Experimental Metastasis**, v. 21, p. 543-552, Sept. 2004.
- RANG, H. P. *et al.* **Rang & Dale: farmacologia**. 5. ed. Rio de Janeiro: Guabanara Koogan. 2003.
- RAO, K. V.; McBRIDE, T. J.; OLESON, J. J. Recognition and Evaluation of Lapachol as an Antitumor Agent. **Cancer Research**, v. 28, p. 1952-1954, Oct. 1968.
- RIBEIRO, K. A. L. *et al.* Activities of naphthoquinones against *Aedes aegypti* (Linnaeus, 1762) (Diptera: Culicidae), vector of dengue and *Biomphalaria glabrata* (Say, 1818), intermediate host of *Schistosoma mansoni*. **Acta Tropica**, v.111, p. 44–50, 2009.
- RICCI, M. S.; ZONG, W. X. Chemotherapeutic approaches for targeting cell death pathways. **Oncologist**, v. 11, p. 342-357, Apr. 2006.
- RÍOS-LUCI, C. *et al.* β -Lapachone analogs with enhanced antiproliferative activity. **European Journal of Medicinal Chemistry**, v. 53, p. 264-274, July 2012.
- RICH, T.; WATSON, C. J.; WYLLIE, A. Apoptosis: the germs of death. **Nature Cell Biology**, v. 1, p. 69–71, July 1999.
- ROCHA, A. B.; LOPES, R. M.; SCHWARSTMANN, G. Natural products in anticancer therapy. **Current Opinion in Pharmacology**, v. 1, p. 364–369, Aug. 2001.
- ROSS, D. T. *et al.* Systematic variation in gene expression patterns in human cancer cell lines. **Nature Genetics**, v. 24, p. 227-235, Mar. 2000.
- ROVER JÚNIOR, L. *et al.* Sistema antioxidante envolvendo o ciclo metabólito da glutationa associado a métodos eletroanalíticos na avaliação do estresse oxidativo. **Química Nova**, v. 24, p. 112-119, Jan. 2001.
- RUDDON, Raymond. W. **Cancer biology**. 4th ed. New York: Oxford University Press, 2007.
- SALAS, C. *et al.* Trypanosoma cruzi: Activities of lapachol and α - and β -lapachone derivatives against epimastigote and trypomastigote forms. **Bioorganic & Medicinal Chemistry**, v. 16, p. 668-674, Jan. 2008.
- SALMONM, S.E. **Farmacologia Básica & Clínica**, p. 629-655. 6. ed. Rio de Janeiro: Guabanara Koogan. 1998.
- SALUSTIANO, E. J. S. *et al.* Comparison of the cytotoxic effect of lapachol, α -lapachone and pentacyclic 1,4-naphthoquinones on human leukemic cells. **Investigational New Drugs**, v. 28, p. 139-144, Apr. 2010.

SANTANA, C. F.; SILVA, A. A. F. Primeiras observações com o emprego de lapachol em pacientes humanos portadores de neoplasias malignas. **Revista do Instituto de Antibióticos**, v. 8, p. 89-94, 1981.

SANTOS, A. F. et al. Molluscicidal activity of 2-hydroxy-3-alkyl-1,4-naphthoquinones and derivatives. **International Journal for Parasitology**, v. 30, p. 1199-1202, Oct. 2000.

SANTOS, A. F. et al. Molluscicidal and Trypanocidal Activities of Lapachol Derivatives. **Planta Medica**, v. 67, p. 92-93, Feb. 2001.

SANTOS, E. A. **Avaliação da atividade citotóxica da α -lapachona e seus derivados sintéticos em linhagens tumorais humanos *in vitro***. 2010. 77 f. Monografia (Graduação em Farmácia) – Faculdade de Farmácia, Odontologia e Enfermagem, Universidade Federal do Ceará, Fortaleza, 2010.

SELLAPAN, S. et al. Lineage infidelity of MDA-MB-435 cells: Expression of melanocyte proteins in a breast cancer cell line. **Cancer Research**, v. 64, p. 3479-3485, May 2004.

SCHOTTENFELD, D.; BEEBE-DIMMER, J.L. Advances in cancer epidemiology: understanding causal mechanisms and the evidence for implementing interventions. **Annual Review Public Health**, v.26, p. 37-60, Apr. 2005.

SCHUERCH, A. R.; WEHRLI, W. β -Lapachone, an Inhibitor of Oncornavirus Reverse Transcriptase and eukaryotic DNA Polymerase-alpha. Inhibitory effect, Thiol Dependence and Specificity. **European Journal of Biochemistry**, v. 84, p. 197-205, Mar. 1978.

SHAHABUDDIN, M. S. et al. A novel structural derivative of natural alkaloid ellipticine, MDPSQ, induces necrosis in leukemic cells. **Invest New Drugs**, v. 29, p. 523-533, Aug. 2009.

SILVA, A. J. M. et al. Synthesis and preliminary pharmacological evaluation of new (\pm) 1,4-naphthoquinones structurally related to lapachol. **Bioorganic and Medicinal Chemistry**, v. 10, p. 2731-2738, Feb. 2002.

SILVA JÚNIOR, et al. Synthesis and anti-Trypanosoma cruzi activity of derivatives from nor-lapachones and lapachones. **Bioorganic & Medicinal Chemistry**, v.16, p. 5030-5038, May 2008.

SILVA JÚNIOR, et al. On the search for potential anti-Trypanosoma cruzi drugs: Synthesis and biological evaluation of 2-hydroxy-3-methylamino and 1,2,3-triazolic naphthoquinoidal compounds obtained by click chemistry reactions. **European Journal of Medicinal Chemistry**, v. 52, p. 304-312, June 2012.

SILVA, M. N. et al. Synthesis of new aldehyde derivatives from β -lapachone and nor- β -lapachone. **Arkivoc**, p.156-168, Aug. 2003.

SILVA, M. N.; FERREIRA, V. F.; SOUZA, M. C. B. V. Um panorama atual da química e farmacologia de naftoquinonas com ênfase na β -lapachona e derivados. **Química Nova**, v. 26, p. 407-416, June 2003.

SIMÕES, M. O. et al. **Farmacognosia: da planta ao medicamento**. 4. ed. Porto Alegre: Ed. da UFSC, 2002. p. 555-580.

SINGAL, P. K.; ILISKOVIC, N. Doxorubicin-Induced Cardiomyopathy. **New England Journal Medicine**, v. 300, p. 900-905, Sept. 1998.

SPANDIDOS, D.A. Oncogenes and tumor suppressor genes as paradigms in oncogenesis. **Journal of Buon**, v.12, Suppl. 1, p.S9-12, Sept. 2007.

SPENCE, R. A. J.; JONHSTON, P. G. **Oncology**. Oxford: Oxford University Press, 2001.

STAGLIANO, K. W. *et al.* Regiocontrolled synthesis and HIV inhibitory activity of unsymmetrical binaphthoquinone and trimeric naphthoquinone derivatives of conocurvone. **Bioorganic & Medicinal Chemistry**, v. 14, p. 5651-5665, Aug. 2006.

SUN, X. et al. Selective Induction of Necrotic Cell Death in Cancer Cells by β -Lapachone through Activation of DNA Damage Response Pathway. **Cell Cycle**, v. 5, p. 2029-2035, Sept. 2006.

SUSIN, S. A. *et al.* Two distinct pathways leading to nuclear apoptosis. **Journal of Experimental Medicine**, v. 192, p. 571-580, Aug. 2000.

SUZUKI, M. *et al.* Synergistic Effects of Radiation and β -Lapachone in DU-145 Human Prostate Cancer Cells *In Vitro*. **Radiation Research**, v. 165, p. 525-531, May 2006.

TAGLIARINO, C. *et al.* Calcium is a key signaling molecule in beta-lapachone-mediated cell death. **Journal of Biological Chemistry**, v. 276, p. 19150-19159, Mar. 2001.

TANDON, V. K. et al. 'On water' assisted synthesis and biological evaluation of nitrogen and sulfur containing hetero-1,4-naphthoquinones as potent antifungal and antibacterial agents. **European Journal of Medicinal Chemistry**, v.45, p. 2418-2426, June 2010.

TEIXEIRA, M. J. *et al.* *In vitro* and *in vivo* Leishmanicidal activity of 2-hydroxy-3-(3-methyl-2-butenyl)-1,4-naphthoquinone (lapachol). **Phytotherapy Research**, v. 15, p. 44-48, Jan. 2001.

THOMSON, R. H. **Naturally occurring quinones III**. 2nd ed. Califórnia: Chapman and Hall, 1987.

THOMSON, R. H. Distribution of naturally occurring quinones. **Pharmaceutisch weekblad. Scientific**. v.13, p. 70 – 73, Apr. 1991.

U.S. Food and Drug Administration (FDA). Disponível em: <<http://www.fda.gov/>>. Acesso em: 17 May 2012.

VANDENABEELE, P. *et al.* Molecular mechanisms of necroptosis: an ordered cellular explosion. **Nature Reviews Molecular Cell Biology**, v.11, p. 700-714, Oct. 2010.

VAN DER HEIJDEN, R. *et al.* The Catharanthus alkaloids: pharmacognosy and biotechnology. **Current Medicinal Chemistry**, v. 11, p. 607-628, Mar. 2004.

VANLANGENAKKER, N. *et al.* cIAP1 and TAK1 protect cells from TNF-induced necrosis by preventing RIP1/RIP3-dependent reactive oxygen species production. **Cell Death & Differentiation**, v. 18, p. 656-665, Apr. 2011.

VERMEULEN, K.; VAN BOCKSTAELE, D. R.; BERNEMAN, Z. N. The cell cycle: a review of regulation, deregulation and therapeutic targets in cancer. **Cell Proliferation**, v. 36, p. 131-149, June 2003.

WEI, P. *et al.* New potential inhibitors of DNA topoisomerases, part II: Design and synthesis of α -Lapachone derivatives under microwave irradiation. **Bioorganic e Medicinal Chemistry**, v. 19, p. 828-830, Feb. 2009.

WEINBERG, R. A. p53 e apoptose: guardião e executor. In: WEINBERG, R. A. (Ed.). **A biologia do câncer**. Porto Alegre: Artmed, 2008.

WHO. **World cancer report 2008**. Disponível em: <<http://www.who.int/cancer/publications/en/>>. Acesso em: 25 June 2012.

WILSON, R. M.; DANISSHEFSKY, S. J. Applications of total synthesis toward the discovery of clinically useful anticancer agents. **Chemical Society Reviews**, v. 36, p. 1207-1226, June 2007.

XIANG, J.; CHAO, D. T.; KORSMEYER, S. J. BAX-induced cell death may not require interleukin 1 β -converting enzyme-like proteases. **Proceedings of National Academy of Sciences**, v. 93, p. 14559-14563, Dec. 1996.

YUAN, J.; LIPINSKI, M.; DEGTEREV, A. Diversity in the mechanisms of neuronal cell death. **Neuron**, v. 40, p. 401-413, Oct. 2003.

ZAKHAROVA, O. D. *et al.* Cytotoxicity of new polyfluorinated 1,4-naphthoquinones with diverse substituents in the quinone moiety. **Bioorganic & Medicinal Chemistry**, v.19, p. 256-260, Jan. 2011.

ZANI, C. L. *et al.* Anti-plasmodial and anti-trypanosomal activity of synthetic naphtho[2,3-b]thiophen-4,9-quinones. **Bioorganic & Medicinal Chemistry**, v. 5, p. 2185-2192, Dec. 1997.

ZHANG, Q. *et al.* Human Breast Cancer Cell Lines Co-Express Neuronal, Epithelial, and Melanocytic Differentiation Markers *In Vitro* and *In Vivo*. **Plos one**, v. 5, p. 1-6, Mar. 2010

ZHI-JUN Y. *et al.* A dye-based lymphocyte proliferation assay that permits multiple immunological analyses: mRNA, cytogenetic, apoptosis, an immunophenotyping studies. **Journal of Immunological Methods**, v. 210, p. 25-39, Dec. 1997.

ZHOU, Z. *et al.* Kinetic and Docking Studies of the Interaction of Quinones with the Quinone Reductase Active Site. **Biochemistry**, v. 42, p. 1985-1994, Jan. 2003.

ZIEGLER, U.; GROSCURTH, P. Morphological features of cell death. **News in Physiological Sciences**, v. 19, p. 124-128, June 2004

ZITVOGEL, L. *et al.* The immune response against dying tumor cells. **Advances in Immunology**, v. 84, 131-179, July 2009.

ZONG, W. X. *et al.* Alkylating DNA damage stimulates a regulated form of necrotic cell death. **Genes & Development**, v. 18, p. 1272-1282, June 2004.

ANEXO A – MATERIAIS UTILIZADOS

Equipamentos

Agitador de placa, MLW® Modelo Thys

Agitador de placa Shaker PSU® – 2T plus

Agitador de tubo, Donner AD 8850®

Banho-maria DELLTA® Modelo 105Di

Centrífuga Centimicro FANEN® Modelo 212

Centrífuga de placas Eppendorf® Modelo Centrifuge 5403

Citômetro de Fluxo Guava EasyCyte Mine®

Espectrofotômetro de placas DTX 880 Multimode Detector®

Estufa de secagem e esterilização FANEM® Modelo 315 SE

HTS - high-throughput screening - biomek 3000®

Incubadora de células (CO₂ Water-Jacket Incubator) NUAIRE TS Autoflow®

Microscópio óptico OPTON TNB-04T-PL/PZO-Labimex® Modelo Studar lab

Microscópio óptico de inversão Nikon Diaphot®

Phmetro, Micronal B 474®

Soluções e Reagentes

Soluções/reagentes	Concentrações
Alamar Blue	0,312 mg/mL
Azul de Tripán	10 mg de Azul de tripan
	PBS q.s.p. 100 mL de solução
Brometo de Etídio (100 µg/mL)	1 mg de brometo de etídio
	PBS q.s.p. 10 mL
Dimetilsufóxido (DMSO)	-
Ficoll- Hypaque	-
Fitohemaglutinina	-
Iodeto de propídeo	1 mg de iodeto de propídeo
	PBS q.s.p. 100 mL de solução
Kit Instant Prov Corante rápido de hematologia	-
Meio de cultura de células RPMI 1640	Dissolvido em água deionizada e esterilizada por filtração em membrana de 0,22 µm, complementado com Bicarbonato de sódio (0,75%)
MTT- (3-(4,5-dimetiltiazol-2yl)-2,5 difeniltetrazolium bromide)	20 mg de MTT
	PBS q.s.p. 100 mL de solução
N-Acetil-L-cisteína (1M)	-
Penicilina-Estreptomicina	Penicilina 10.000 UI/MI
	Estreptomicina 10 mg/mL

Solução salina para hemólise	8,5 g de cloreto de sódio
	1,11 g de cloreto de cálcio
	H ₂ O q.s.p. 1L
Tampão PBS	8,776 g de Cloreto de sódio
	2,14 de Fosfato de sódio heptahidratado
	2,276 g de fosfato de sódio
	H ₂ O q.s.p. 1L (pH=7,2)
Triton X-100	-
Tripsina-EDTA	-

Fármaco

Cloridrato de Doxorrubicina – Sigma-Aldrich