



UNIVERSIDADE FEDERAL DO CEARÁ
CENTRO DE CIÊNCIAS DA SAÚDE
FACULDADE DE MEDICINA
DEPARTAMENTO DE FISIOLOGIA E FARMACOLOGIA
PÓS-GRADUAÇÃO EM FARMACOLOGIA

ARINICE DE MENEZES COSTA

ESTUDO DO MECANISMO DE AÇÃO CITOTÓXICA DE
NAFTOQUINONAS SINTÉTICAS ANÁLOGAS DO LAPACHOL

FORTALEZA

2012

ARINICE DE MENEZES COSTA

**ESTUDO DO MECANISMO DE AÇÃO CITOTÓXICA DE NAFTOQUINONAS
SINTÉTICAS ANÁLOGAS DO LAPACHOL**

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 Gardenia Carmen Gadelha Militão

FORTALEZA

2012

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

C87e Costa, Arinice de Menezes.
Estudo do mecanismo de ação citotóxica de naftoquinonas sintéticas análogas do lapachol/ Arinice de Menezes Costa. – 2012.
76 f. : il.

Dissertação (Mestrado) - Universidade Federal do Ceará. Faculdade de Medicina.
Programa de Pós-Graduação em Farmacologia, Fortaleza, 2012.
Orientação: Prof^a. Dr^a. Leticia Veras Costa Lotufo.

1. Naftoquinonas. 2. Espécies de Oxigênio Reativas. I. Título.

CDD 615.1

ARINICE DE MENEZES COSTA

**ESTUDO DO MECANISMO DE AÇÃO CITOTÓXICA DE NAFTOQUINONAS
SINTÉTICAS ANÁLOGAS DO LAPACHOL**

Dissertação submetida à coordenação do programa de Pós-graduação em Farmacologia como parte dos requisitos necessários para a obtenção do título de mestre em Farmacologia outorgado pela Universidade Federal do Ceará.

BANCA EXAMINADORA

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

Prof. Dr. Pedro Jorge Caldas Magalhães
Universidade Federal do Ceará

Dr^a. Paula Christine Jimenez
Universidade Federal do Ceará

Dedico à Deus e aos meus pais

AGRADECIMENTOS

Agradeço, principalmente, ao Senhor Jesus, por sua fidelidade em todos os momentos da minha vida, especialmente nos momentos difíceis e pelas bênçãos sem medida;

*À Profa. Dra. **Letícia Veras Costa Lotufo**, pela orientação neste trabalho, incentivo, paciência, oportunidades, confiança e por todos os ensinamentos que contribuíram muito para a minha formação;*

*Em especial, agradeço à Profa. Dra. **Gardenia Carmen Gadelha Militão**, que sem sombra de dúvidas é uma das pessoas que mais contribuiu para minha formação acadêmica, com sua paciência, ensinamentos, co-orientação nesse trabalho, pelo exemplo de simplicidade, determinação e pela valiosa amizade.*

*Aos Profs. Drs. **Cláudia Pessoa** e **Manoel Odorico de Moraes**, pelo apoio, incentivo, amizade e ., pela contribuição à pesquisa no Laboratório de Oncologia Experimental;*

*Aos Profs. Drs. **Paulo Costa** e **Alcides J. M. da Silva**, por disponibilizarem os compostos para realização desse trabalho;*

*Aos **meus pais**, por me apoiarem em todos os momentos, pelo exemplo de vida, dedicação e pelas orações;*

*Agradeço à **Evelyne Alves**, pelo companheirismo e amizade nesses sete anos de convivência e pela ajuda no LOE;*

À Ana Jérсия e Delano pelas discussões que contribuíram enormemente para o desenvolvimento desse trabalho e pelos três jalecos que comprei por causa do Delano;

Ao amigos Stefâneo e Bruno Soares pela a grande ajuda nos experimentos no momento que mais precisei. Eu não teria conseguido sem vocês. Muito, muito, muito obrigada;

Aos amigos do Laboratório de Oncologia Experimental: André, Aline Sbardelotto, Assuero, Cecília Carvalho, Daisy, Daniel Pascoalino, Danilo, Felipe, Gabriela, Igor, Marcos, Patrícia Marçal, Paula Abreu, Paula Jimenez, Sarah, Treissy Washington Bastos que estiveram sempre dispostos a ajudar e de forma direta ou indireta contribuíram muito para esse trabalho.

*Agradeço à **Adelânia Marinho** e **Sheyla**, pela amizade e apoio*

*Agradeço especialmente , **Silvana França, Erivanda França** e a **Rogéria Montenegro** pela constante ajuda dentro do laboratório e pelas conversas agradáveis;*

*Lutar pelo bom, pelo justo
e pelo melhor do mundo.*

Olga Benário

RESUMO

O lapachol, uma naftoquinona natural, e seus derivados sintéticos têm demonstrado, nos últimos anos, importantes ações citotóxicas contra várias linhagens de células tumorais, assim como significativa atividade antitumoral contra alguns tumores. Assim, o objetivo desse trabalho foi avaliar os mecanismos de ação citotóxica em células HL-60 de duas naftoquinonas sintéticas análogas do lapachol (compostos **1** e **2**). Inicialmente foi investigado a atividade antiproliferativa dessas naftoquinonas após um período de incubação de 72h em células leucêmicas (HL-60) e células mononucleadas do sangue periférico (CMSP) onde foi observado que essas naftoquinonas mostraram-se ativas para estas linhagens com CI_{50} de 12 μ M, 2,3 μ M e 4,3 μ M para o lapachol, composto **1** e composto **2**, respectivamente em células HL-60 e 13,7 μ M e 34,0 μ M para o composto **1** e **2** em células CMSP, respectivamente. A atividade antiproliferativa em células HL-60 após 24 horas de incubação foi avaliada com e sem co-tratamento com o antioxidante n-acetilcisteína (NAC). Assim, a CI_{50} sem NAC após 24 horas de exposição ao lapachol, composto **1** e composto **2** foi de 42,9 μ M, 2,7 μ M e 4,3 μ M, respectivamente. Já CI_{50} com NAC (5 μ M) após 24 horas de exposição ao lapachol, composto **1** e composto **2** foi de 180,0 μ M, 46,0 μ M e 18,0 μ M, respectivamente. Estudos feitos em células HL-60 indicaram que o lapachol e seus dois análogos induzem morte celular por apoptose e necrose, como mostrado pelas mudanças morfológicas avaliadas através do uso de coloração May-Grünwald-Giemsa. Nos ensaios realizados por citometria de fluxo foi revelado que estes compostos promovem a geração de espécies reativas de oxigênio (EROs) 18,86%, 13,31% e 39,11% respectivamente para o lapachol (82 μ M) e compostos **1** e **2** (3,5 μ M) e 40,94% e 60,49% para os compostos **1** e **2** (7,0 μ M), respectivamente. O lapachol (82 μ M) e os compostos **1** e **2** (3,5 μ M) diminuíram o número de células com membrana íntegra 26,51%, 34,78% e 29,58% respectivamente e os compostos **1** e **2** (7,0 μ M) diminuíram 75,3% e 71,1%, respectivamente. A fragmentação do DNA promovida por esses compostos foi observada a partir de 3 horas de exposição sendo mais intensa após 24 horas de exposição aos compostos testados. O lapachol e os compostos **1** e **2** também promoveram a ativação de caspases relacionadas com a via intrínseca de morte celular. Além disso, mostraram induzir a quebra de fitas de DNA. Todos os efeitos citotóxicos foram abolidos quando os compostos **1** e **2** foram co-incubados com o NAC, mostrando, dessa forma, a participação de EROs na citotóxicidade destas naftoquinonas.

Palavras-chave: Naftoquinonas. Espécies de Oxigênio Reativas.

ABSTRACT

The lapachol, one naphthoquinone natural, and its derivatives synthetic have demonstrated, in recent years, important actions cytotoxic against several lineages of tumor cells, well as significant antitumoral activity against some tumors. Thus, the objective of this work was to evaluate the mechanisms of action cytotoxic in cells HL-60 of two naphthoquinones synthetic analogous of lapachol (compounds **1** and **2**). Initially was investigated the antiproliferative activity of these naphthoquinones after a incubation period of 72 hours in leukemic cells (HL-60) and peripheral blood mononucleated cells (PBMC) where was observed that these naphthoquinones were active for these lines with IC_{50} of 12 μM , 2.3 μM and 4.3 μM for the lapachol, compound **1** and compound **2**, respectively in cells HL-60 and 13.7 μM and 34.0 μM for compound **1** and **2** in cells PBMC, respectively. The antiproliferative activity in cells HL-60 after 24 hours incubation was evaluated with and without co-treatment with the antioxidant n-acetylcysteine (NAC). Thus, IC_{50} without NAC after 24 hours of exposure to lapachol, compound **1** and compound **2** was 42.9 μM , 2.7 μM and 4.3 μM , respectively. Have IC_{50} with NAC (5 μM) after 24 hours of exposure to lapachol, compound **1** and compound **2** was 180.0 μM , 46.0 μM and 18.0 μM , respectively. Studies done in HL-60 cells indicated that the lapachol and its two analogues induce cell death by apoptosis and necrosis, as shown by morphological changes evaluated through the use of staining May-Grünwald-Giemsa. In trials realized by flow cytometry was revealed that these compounds promote the generation of reactive oxygen species (ROS) 18.86%, 13.31% and 39.11% respectively for the lapachol (82 μM) and compounds **1** and **2** (3.5 μM) and 40.94% and 60.49% for the compounds **1** and **2** (7.0 μM), respectively. The lapachol (82 μM) and the compounds **1** and **2** (3.5 μM) decreased the number of cells with intact membrane 26.51%, 34.78% and 29.58% respectively and the compounds **1** and **2** (7.0 μM) decreased 75.3% and 71.1%, respectively. The DNA fragmentation promoted by such compounds was observed starting from 3 hours of exposure being more intense after 24 hours of exposure to tested compounds. The lapachol and the compounds **1** and **2** also promoted the activation of caspases related to intrinsic pathway of cell death. Furthermore, showed induce the synthesis of DNA strands. All cytotoxic effects were abolished when the compounds **1** and **2** were co-incubated with the NAC, showing thus the participation ROS in cytotoxicity of these naphthoquinones.

Keywords: Naphthoquinones. Reactive Oxygen Species.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Capacidades biológicas adquiridas por células cancerosas durante o processo de tumorigênese.....	14
Figura 2. Ilustração esquemática da homeostase redox celular.....	15
Figura 3. Desencadeamento do mecanismo de morte de células cancerosas mediado por EROs.....	16
Figura 4. Apoptose relacionada a ativação da via intrínseca.....	19
Figura 5. Classificação de quinonas.....	23
Figura 6. Ciclo redox das quinonas.....	25
Figura 7. Lapachol.....	26
FIGURA 8. Estrutura química do Lapachol e seus análogos sintéticos.....	30
Figura 9. Padrão de danos ao DNA para o ensaio cometa.....	39
Figura 10. Geração de EROs em células HL-60.....	42
Figura 11. Fotomicrografias de células HL-60 tratadas com Lapachol (82µM), composto 1 e 2 (3,5 e 7,0 µM) ou diluente (controle) por 1 e 3h e coradas com May-Grünwald-Giemsa... 43	43
Figura 12. Fotomicrografias de células HL-60 tratadas com Lapachol (82µM), composto 1 e 2 (3,5 e 7,0 µM) ou diluente (controle) com e sem o NAC por 24h e coradas com May-Grünwald-Giemsa. Os números indicam as seguintes alterações observadas: 1. Fragmentação nuclear; 2. Blebbing; 3.necrose; 4. Redução do citoplasma.....	44
Figura 13: Efeito do Lapachol e dos seus análogos sintéticos (compostos 1 e 2) sobre a integridade de membrana de células HL-60.....	46
Figura 14. Histograma dos efeitos do lapachol e dos compostos 1 e 2 sobre a integridade da membrana de HL-60 determinado por citometria de fluxo.....	47
Figura 15. Efeito do lapachol e seus análogos sintéticos (compostos 1 e 2) sobre a concentração de células HL-60.....	48
Figura 16. Efeito do Lapachol e seus análogos sintéticos (compostos 1 e 2) sobre a fragmentação de DNA de células leucêmicas de HL-60.....	49
Figura 17. Histograma dos efeitos do lapachol e dos compostos 1e 2 sobre a fragmentação do DNA de células HL-60 determinado por citometria de fluxo.....	50
Figura 18. Efeito do lapachol e dos compostos 1e 2 sobre a ativação de caspases 3 e 7 de células HL-60 determinado por citometria de fluxo.....	51
Figura 19. Efeito do lapachol e dos compostos 1 e 2 sobre a ativação de caspase 9 de células HL-60 determinado por citometria de fluxo.....	52

LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Exemplos de funções e alvos intracelulares de EROs.	17
Tabela 2. Principais agentes antineoplásicos moduladores de EROs.....	22
Tabela 3. Nomeclatura IUPAC e peso molecular dos compostos estudados.....	31
Tabela 4. Atividade citotóxica in vitro do lapachol e seus análogos em células leucêmicas humana (HL-60) e células mononucleares do sangue periférico humano (CMSP).....	41
Tabela 5. Avaliação do potencial genotóxico do lapachol e seus análogos sintéticos (composto 1 e composto 2) em células HL-60 pelo ensaio do cometa, após 1h de incubação	53

LISTA DE ABREVIATURAS

®	Marca registrada
AIF	Fatores de indução de apoptose
APAF-1	Fator apoptótico ativado por protease
ANOVA	Análise de variância
ATO	Trióxido de arsênio
7AAD	7 amino-actinomicina
CMSP	Células Mononucleares de Sangue Periférico
DCF	Diclorofluoresceína
DMSO	Dimetilsulfóxido
E.P.M.	Erro Padrão da Média
EROs	Espécies reativas de Oxigênio
H ₂ -DCF-DA	Diacetato de 2',7'-diclorodihidrofluoresceína
IAP	Inibidores de apoptose
ICAD	Inibidor de DNase ativada por caspase
LMC	Leucemia mielóide crônica
MTT	3-(4,5-dimetil-2-tiazol)-2,5-difenil-brometo de tetrazolium
NAC	N-acetil-L-cisteína
PBS	Phosphate Buffer Solution (Tampão Fosfato)
PI	Iodeto de propídeo
PMA	Forbol-12-miristato-13-acetato
RPMI	Roswell Parrk Memorial Institute Medium
TNF	Fator de necrose tumoral
TNFR	Receptores do fator de necrose tumoral
U	Unidade
UV	Ultra-Violeta

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	13
1.1 CÂNCER	13
1.2 CÂNCER E ESPÉCIES REATIVAS DE OXIGÊNIO (EROS)	14
1.3 TERAPIAS PRO-OXIDANTES NO TRATAMENTO DO CÂNCER	20
1.4 QUINONAS	23
1.5 LAPACHOL E SEUS ANÁLOGOS SINTÉTICOS	25
2 OBJETIVOS	29
2.1 OBJETIVO GERAL	29
2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS	29
3 MATERIAIS E MÉTODOS	30
3.1 MATERIAIS UTILIZADOS	30
3.1.1 Equipamentos, reagentes e soluções	30
3.1.2 Naftoquinonas	30
3.2 METODOLOGIA EXPERIMENTAL	31
3.2.1 Estudo da atividade citotóxica	31
3.2.1.1 Avaliação da atividade antiproliferativa em linhagens de células tumorais in vitro - Teste do MTT	32
3.2.2.2 Determinação da atividade hemolítica em eritrócitos de camundongos.	33
3.2.3 Estudo do Mecanismo de Ação em células HL-60.	33
3.2.3.1 Determinação da geração de espécies reativas de oxigênio intracelulares	34
3.2.3.2 Análise morfológica - Coloração por May-Grünwald-Giemsa	34
3.2.3.3 Determinação da integridade da membrana celular - viabilidade celular	35
3.2.3.4 Análise da fragmentação do DNA por citometria de fluxo.....	35
3.2.3.5 Determinação da ativação de caspases	36
3.2.4 Avaliação do efeito do lapachol e seus análogos sobre a quebra de fitas do DNA – ensaio do cometa	36
3.3 ANÁLISE DOS DADOS	37
4 RESULTADOS	40
4.1 CITOTOXICIDADE INDUZIDA PELO LAPACHOL E SEUS ANÁLOGOS SINTÉTICOS	40
4.2. ESTUDO DOS MECANISMOS ENVOLVIDOS NO EFEITO DO LAPACHOL E SEUS ANÁLOGOS EM CÉLULAS HL-60.	41
5 DISCUSSÃO	54
6 CONCLUSÃO	61
REFERÊNCIAS	62
ANEXO A – MATERIAIS UTILIZADOS	73

1 INTRODUÇÃO

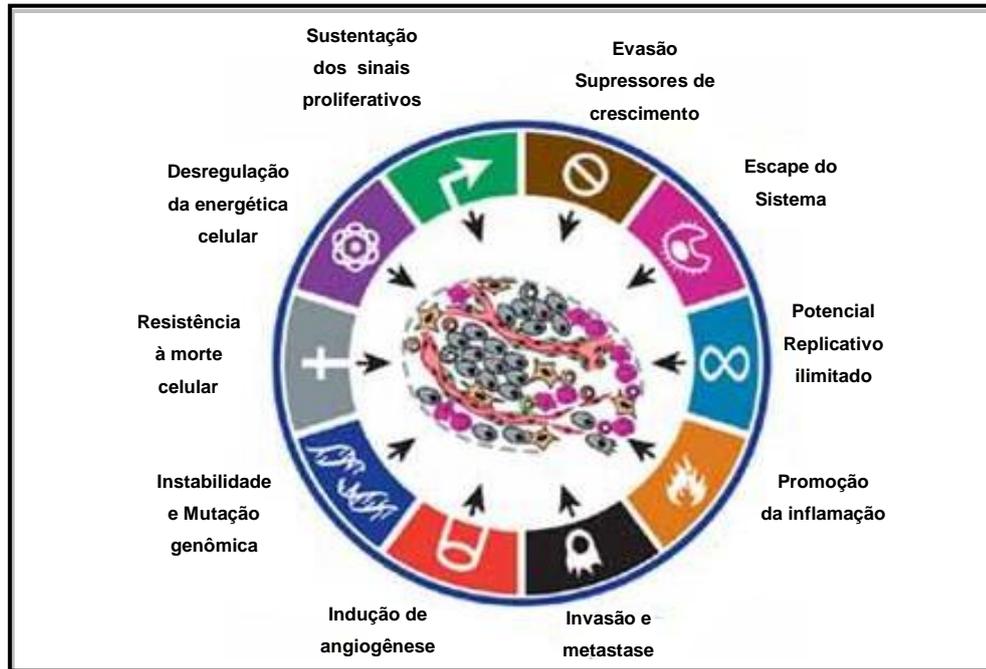
1.1 Câncer

O câncer é uma das doenças mais importantes na atualidade, sendo a segunda maior causa de mortes por doença em países desenvolvidos, ficando atrás apenas das doenças cardiovasculares (CÉSAR; BERALDO, 2005). No Brasil, as estimativas para o ano de 2012 serão válidas também para o ano de 2013 e apontam para a ocorrência de aproximadamente 518.510 casos novos de câncer, incluindo os casos de pele não melanoma, reforçando a magnitude do problema do câncer no país (INCA, 2012). No Ceará a taxa estimada para o ano de 2012 é de 196,96 novos casos para cada 100 mil homens e 200,62 novos casos para cada 100 mil mulheres (INCA, 2012).

O câncer é considerado uma doença genética, resultante 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 sem controle (BERGMAN, 1997).

Várias evidências indicam que a tumorigênese em humanos é um processo com várias etapas. Estas etapas refletem alterações genéticas que dirigem o processo de transformação de células humanas normais em células malignas (HANAHAN; WEINBERG, 2000). Durante esse processo as células normais vão adquirindo capacidades biológicas que caracterizam o estado neoplásico. Essas capacidades biológicas manifestam-se através de alterações na fisiologia das células transformadas, as quais podemos citar: sustentação da proliferação celular, evasão de supressores de crescimento, resistência a morte celular, potencial replicativo ilimitado, indução da angiogênese, invasão tecidual e metástase, evasão do sistema imune e desregulação do metabolismo energético da célula (HANAHAN; WEINBERG, 2011) (Figura 1).

Figura 1. Capacidades biológicas adquiridas por células cancerosas durante o processo de tumorigênese



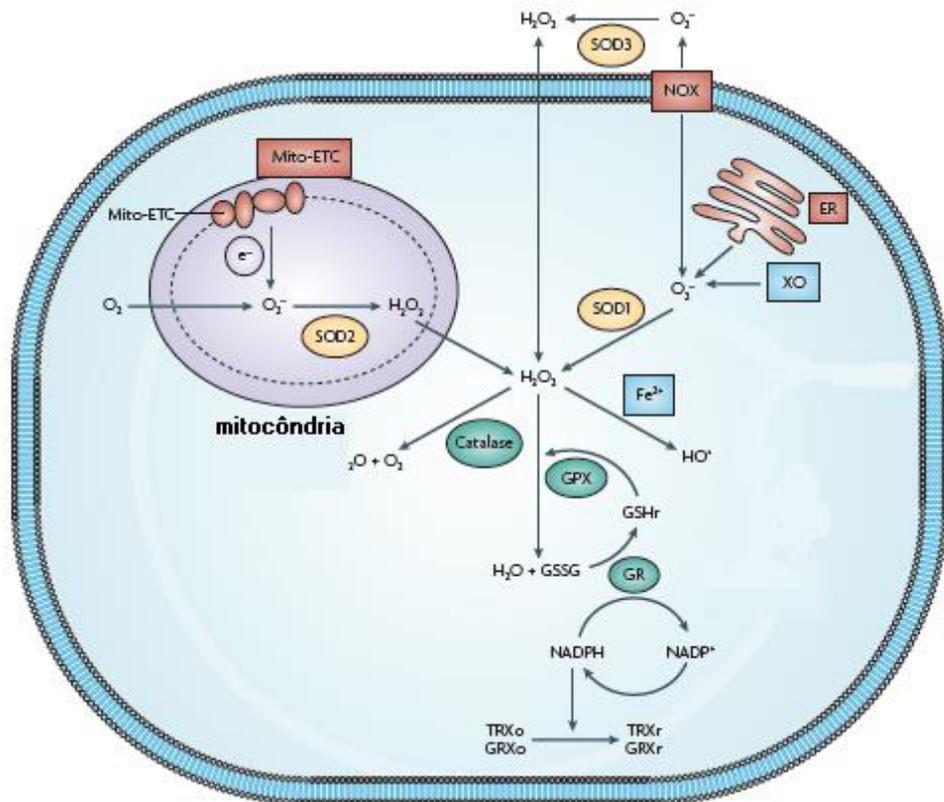
Fonte: HANAHAN; WEINBERG, 2011.

1.2 Câncer e Espécies reativas de oxigênio (EROs).

Nas células normais existe um balanço entre a geração e eliminação de radicais livres, mantendo assim, a homeostase do estado redox da célula (DEVI *et al.*, 2000). Entende-se por radicais livres aquelas espécies reativas de oxigênio (ERO) com elétrons desemparelhados, como o ânions superóxido (O_2^-), oxigênio singlete ($1O_2$) e radical hidroxila (HO^\cdot), além das espécies não-radicalais como o peróxido de hidrogênio (H_2O_2). EROs de natureza radicalar são altamente reativos e sua meia-vida, geralmente, dura alguns segundos ou minutos. Espécies não radicalares, no entanto, podem existir por um longo período de tempo, mas podem ser convertidas em espécies radicais (GUPTE; MUMPER, 2008).

O balanço do estado redox da célula é mantido por um poderoso sistema antioxidante que neutraliza as EROs (Figura 2). Esse sistema é composto por enzimas como a superóxido dismutase (SOD), catalase, sistema glutaciona (glutaciona, glutaciona redutase, peroxidase e transferase), sistema tioredoxina (tioredoxina, tioredoxina peroxidase e peroxiredoxina), além da vitamina E e vitamina C (MANDA; NECHIFOR; NEAGU, 2009).

Figura 2. Ilustração esquemática da homeostase redox celular.



Principais locais de geração celular de espécies reativas de oxigênio (EROs) incluem a cadeia mitocondrial de transporte de elétrons (Mito-ETC), o retículo endoplasmático (ER) e do sistema NADPH oxidase (NOX). As principais enzimas envolvidas na geração de EROs são: GPX, glutatona peroxidase; GR, glutatona redutase; GRXo, glutarredoxina (oxidada); GRXr, glutarredoxina (reduzida); GSHr, glutatona (reduzida); GSSG, a glutatona (oxidada); TRXo, tioredoxina (oxidada); TRXr, tioredoxina (reduzida); oxidase, xantina XO. Fonte: TRACHOOTHAM; ALEXANDRE; HUANG, 2009)

O estresse oxidativo ocasionado por um desbalanço no estado redox da célula está relacionado com várias desordens patológicas como câncer, *Diabetes mellitus*, aterosclerose, doenças neurodegenerativas e desordens auto-imunes como artrite, além de estar envolvido no processo de envelhecimento (VALKO *et al.*, 2007). Está bem documentado que as células cancerosas estão sob um aumentado e persistente estresse oxidativo devido a um aumento intracelular dos níveis de EROS (GUPTE; MUMPER, 2008).

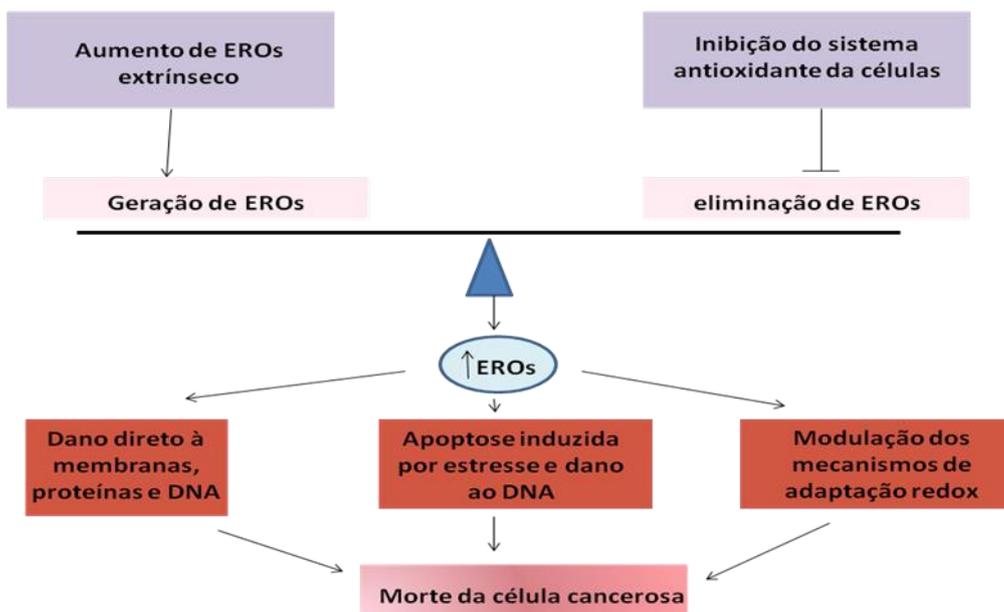
Têm-se especulado que o aumento de EROs em células cancerosas seja devido a fatores como estimulação oncogênica, aumento da atividade metabólica e mau funcionamento mitocondrial (PELICIANO *et al.*, 2004). De fato, EROs atuam em

múltiplas cascatas de sinalização relacionadas com o comportamento de células cancerosas, tais como sobrevivência (CLERKIN *et al.*, 2008), proliferação e angiogênese (FUKAI-USHIO; NAKAMURA, 2008). Além disso, são consideradas responsáveis pelo desenvolvimento, progressão, invasão e metástase dos cânceres (GILES, 2006).

Embora o tratamento dos tumores com uma terapia antioxidante seja uma estratégia razoável, ironicamente, o mecanismo latente que muitos agentes quimioterápicos e radiação ionizante exercem sobre as células tumorais para matá-las não está associada com o aumento de antioxidantes, mas sim com a produção de mais EROs levando a um estresse oxidativo irreversível (KONG; LILLEHEI, 1998).

Em baixas concentrações EROs favorecem a sobrevivência e proliferação das células, porém, em altas concentrações, elas exaurem a capacidade antioxidante das células provocando injúrias celulares irreversíveis desencadeando um programa de sinalização que leva à senescência, apoptose ou necrose (HALLIWELL, 2007). Os mecanismos envolvidos na morte celular dependente de EROs estão resumidos na figura 3.

Figura 3. Desencadeamento do mecanismo de morte de células cancerosas mediado por EROs.



Adaptado: TRACHOOTHAM; ALEXANDRE; HUANG, 2009.

Provavelmente, o mais significativo efeito de EROs em vias de sinalização tem sido observado nas vias da proteína quinase ativada por mitógeno (MAPK). Essas vias envolvem a ativação de fatores de transcrição (NF- κ B, AP-1 e P53) que controlam a expressão de genes que reparam danos no DNA, fazem o bloqueio da proliferação de células defeituosas, ativam o sistema imune e induzem a apoptose (VALKO *et al.*, 2005). A tabela 1 lista algumas funções e alvos moleculares de EROS.

Tabela 1. Exemplos de funções e alvos intracelulares de EROs.

Alvo	Nome	Função	Efeito das EROs ou oxidação
Caspase 8		Proteases envolvidas na iniciação e execução da apoptose.	Ativado por EROs
NF-κB	Fator nuclear de gene de cadeia leve kappa ligantes em células B	Regulação da resposta imune	Ativado por EROs como inibidor IκB e degradado por oxidação.
P53		Proteína supressora de tumor	Danos na molécula
VEGF	Fator de crescimento endotelial vascular	Aumenta a permeabilidade de capilares vasos sanguíneos	
SOD	Superóxido dismutase	Cataliza a conversão de ânion superóxido a peróxido de hidrogênio	Acumulação de EROs pode causar danos a lipídios, proteínas e DNA.
JNK	Quinase N-terminal c-Jun	Membro da família MAPK, promove fosforilação e ativação de AP-1 levando a apoptose ou necrose.	EROs leva a ativação seguida de dissociação de Trx (tiroxina)
IL6	Interleucina 6 ou interleucina beta	Proteína multifuncional que tem papel importante na defesa do hospedeiro	EROs diminui a atividade
ASK1	Quinase 1 reguladora de sinal de apoptose	Ativa de proteínas relacionadas a apoptose	Causa dissociação do complexo Trx-ASK1 levando a ativação de JNK e p38
EGFR	Receptor de fator de crescimento epidermal	Ativa Raf e MAPKK levando a ativação e ERK	Ativado por EROs

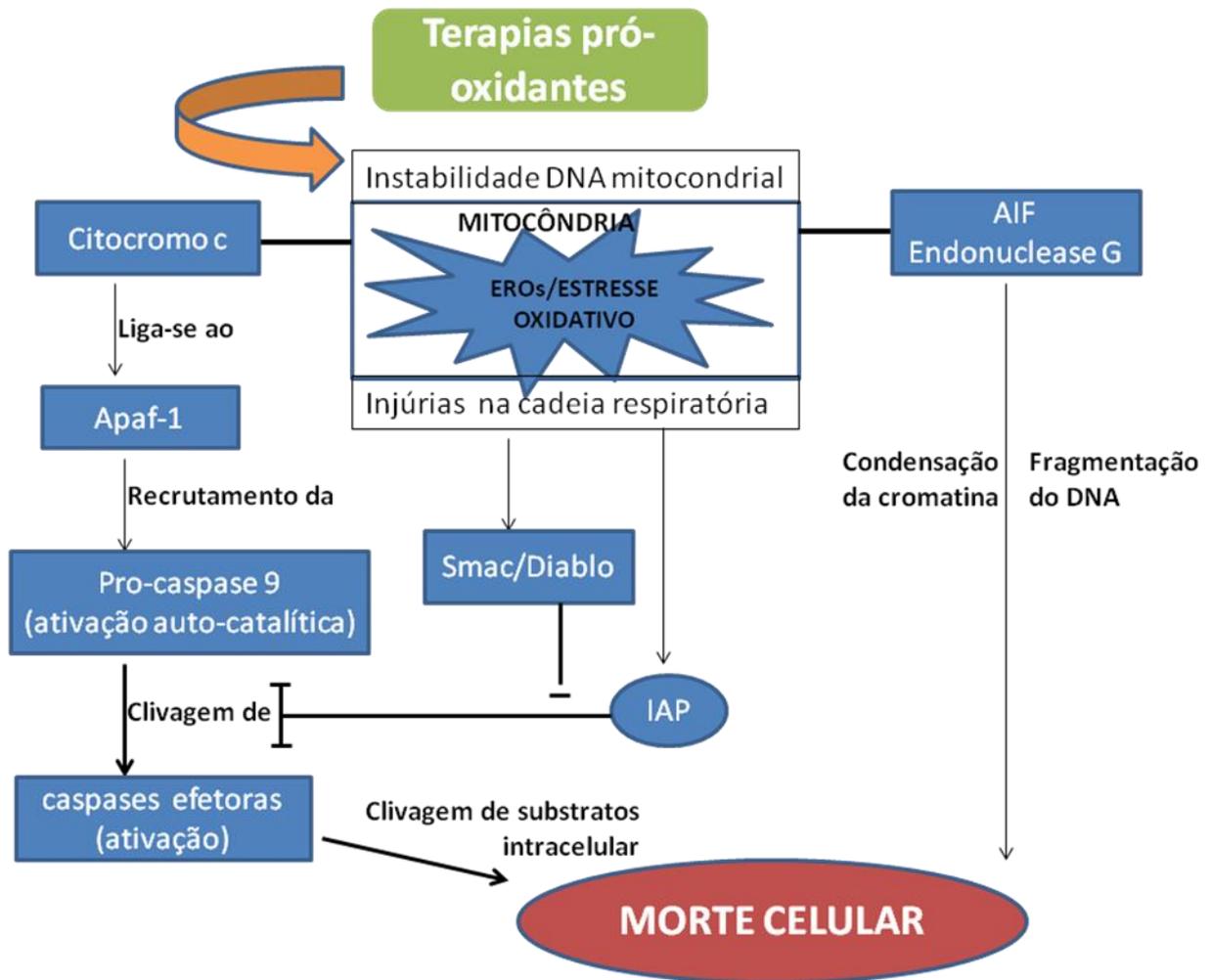
Adaptada SEIFRIED *et al.* (2007)

Apoptose, ou morte celular programada, é um processo essencial para a manutenção do desenvolvimento dos seres vivos, sendo importante para eliminar células indesejadas ou defeituosas. Durante a apoptose, a célula sofre alterações morfológicas características desse tipo de morte celular. Tais alterações incluem a retração da célula, perda de aderência com a matriz extracelular e células vizinhas, condensação da cromatina, fragmentação internucleossômica do DNA e formação dos corpos apoptóticos (GRIVICICH; REGNER; ROCHA, 2007). A apoptose pode ser induzida por EROs tanto por via extrínseca via Fas (membro da família de receptores de morte) (WIANG *et al.*, 2008) como por via da mitocôndria (ORRENIUS, 2004).

A apoptose por via intrínseca começa com a oligomerização de proteína pro-apoptóticas Bax e Bak na membrana externa da mitocôndria. Tal evento, leva a permeabilização da membrana mitocôndrial e consequente liberação de proteínas apoptogênicas (citocromo c e AIF) e de fatores regulatórios (Smac/DIABLO e IAP). IAP pode inibir a ativação da caspase 3 e Smac/Diablo pode se ligar a IAP e impedir seu efeito anti-apoptótico (SCORRANO *et al.*, 2003 e DU; FANG; LI, 2000).

Uma vez liberado citocromo c liga-se ao Apaf-1, que recruta a pro-caspase 9 e promove sua ativação autocatalítica. A caspase 9, quando ativada, promove a ativação de caspases efetoras (caspase 3 e 7) que rapidamente clivam substratos intracelular e executam a apoptose (MANDA; NECHIFOR; NEAGU, 2009) (Figura 4).

Figura 4. Apoptose relacionada a ativação da via intrínseca



Adaptado: MANDA; NECHIFOR; NEAGU, 2009.

Existem evidências de que EROs matem as células cancerosas principalmente por apoptose, porém em condições de estresse oxidativo severo, EROs também pode induzir necrose (GARDNER *et al.* 1997).

Recentemente, tem se tornado evidente que a clássica dicotomia de apoptose versus necrose é uma simplificação de processos altamente sofisticados, os quais protegem o organismo contra processos prejudiciais ou indesejados (RICCI; ZONG, 2006). A necrose é um evento regulado que pode estar envolvido no desenvolvimento de múltiplos cenários fisiológicos e patológicos (SIMON; HAJ-YEHIA; LEVI-SCHAFFER, 2000). As características fundamentais de necrose

incluem esgotamento energético celular, danos aos lipídios de membrana e perda de função das bombas de íons homeostáticos / canais (RICCI; ZONG, 2006).

De fato, uma abordagem terapêutica utilizando agentes pró-oxidantes para o tratamento do câncer pode ser muito promissora. Desde a década de 50, muitas estratégias tem sido exploradas baseadas nessa ideia. Pode-se explorar o potencial de EROs para matar as células cancerosas de duas maneiras, a saber:

- (1) Induzindo a geração de EROs diretamente nas células tumorais;
- (2) Inibindo o sistema de defesa antioxidativo (enzimático) das células tumorais.

1.3 Terapias pro-oxidantes no tratamento do câncer

Muitos agentes quimioterápicos utilizados na atualidade para o tratamento do câncer tem mostrado causar um aumento de EROs intracelular. Esses agentes terapêuticos incluem: trióxido de arsênio (ATO), antraciclina (doxorubicina, daunorubicina), alcalóides da vinca (vinblastina e vincristina), mitomicina c e camptotecina. Além de outros mecanismos de ação citotóxica, esses agentes têm demonstrado exibir atividade anticâncer através da geração de H_2O_2 na célula ou ativação de vias apoptóticas que dependem de H_2O_2 (SIMIZU; UMEZAWA; IMOTO, 1998). Alexandre e colaboradores relataram que a acumulação de H_2O_2 é um inicial e crucial passo para morte em células cancerosas induzida por paclitaxel tanto *in vitro* como *in vivo* (ALEXANDRE *et al.*, 2006).

Rituximab, um anticorpo monoclonal anti-CD20 induz apoptose através da geração de EROs e foi aprovado para o tratamento de linfomas não-Hodgkin (RENSCHLER, 2004)

Procarbazina e butionina sulfoximina são alguns dos agentes anti-câncer cuja atividade depende da produção de EROs ou de sua interação com enzimas que inibem a ação de EROs (GUPTA; MUMPER, 2008). Uma lista resumida de agentes moduladores de EROs usados no tratamento do câncer encontra-se na tabela 2.

Emodina é uma antraquinona natural que mostrou aumentar a citotoxicidade e seletividade do ATO em células tumorais através da geração de EROs (YI *et al.*, 2004).

As antraciclina, como a daunorrubicina, reagem com citocromo P450 redutase na presença de NADPH para formar radical semiquinona, o qual pode reagir com oxigênio e gerar superóxido (SERRANO *et al*, 1999). A doxorrubicina, outro membro da família das antraciclina, é conhecido por também gerar superóxido e peróxido de hidrogênio intracelular, o quais podem causar dano mitocondrial e conseqüentemente apoptose de maneira independente de p53 (TSANG *et al*, 2003).

Tabela 2. Principais agentes antineoplásicos moduladores de EROs

Agentes moduladores de EROs	Mecanismo de ação	Status atual
Agentes geradores de EROs exógeno		
Motexafina gadolinium	<ul style="list-style-type: none"> Catalisador pró-oxidante que a induz a formação intracelular de superóxido e inibe TrxR, acumula-se preferencialmente em células tumorais. 	<ul style="list-style-type: none"> Estudos clínicos de fase III. Usado em combinação com outros agentes no tratamento de malignidades hematológicas e metástase cerebral.
B-lapachona	<ul style="list-style-type: none"> Sofre ciclo redox catalisado por NQO1 	<ul style="list-style-type: none"> Estudos clínicos de fase I/II em tumores que superexpressão NQO1
Inibidores do sistema antioxidante		
Butionina sulfóximina	<ul style="list-style-type: none"> Inibe a síntese de GSH Melhora a atividade de As_2O_3 	<ul style="list-style-type: none"> Estudos clínicos de fase I/II em combinação com As_2O_3 ou Melfalan
Imexon	<ul style="list-style-type: none"> Depleta GSH através de ligações a tiois 	<ul style="list-style-type: none"> Estudos clínicos de fase I/II em combinação com docetaxel e gencitabina
Feniletil isotiocianato	<ul style="list-style-type: none"> Conjuga e exporta GSH para fora da célula 	<ul style="list-style-type: none"> Estudos pré-clínicos em malignidades hematológicas
Mangafodopir	<ul style="list-style-type: none"> Inibe GPx NF-κB Mimetiza SOD, catalase e GSH redutase – aumenta os níveis de H_2O_2 em células cancerosas 	<ul style="list-style-type: none"> Estudos clínicos de fase II em combinação com quimioterapia no tratamento de câncer de fígado
2-metoxiestradiol	<ul style="list-style-type: none"> Inibe SOD levando ao acúmulo de superóxido Inibe a polimerização da tubulina 	<ul style="list-style-type: none"> Estudos clínicos de fase II em tumores de próstata, ovário, cérebro e renal.
Tetratiomolibdato	<ul style="list-style-type: none"> Inibe SOD₁ citosólico 	<ul style="list-style-type: none"> Estudos clínicos de fase II em melanoma, mieloma, carcinoma de próstata e mama.
Múltiplos mecanismos de ação		
As_2O_3	<ul style="list-style-type: none"> Inibe GPx e TrxR Inibe cadeia respiratória mitocondrial 	<ul style="list-style-type: none"> Aprovado para o tratamento de leucemia promielocítica
Mecanismo de ação desconhecido		
Elesclomol	<ul style="list-style-type: none"> Induz rápida acumulação de EROs em células cancerosas levando a apoptose Melhora a atividade do paclitaxel 	<ul style="list-style-type: none"> Estudos clínicos de fase III suspensos

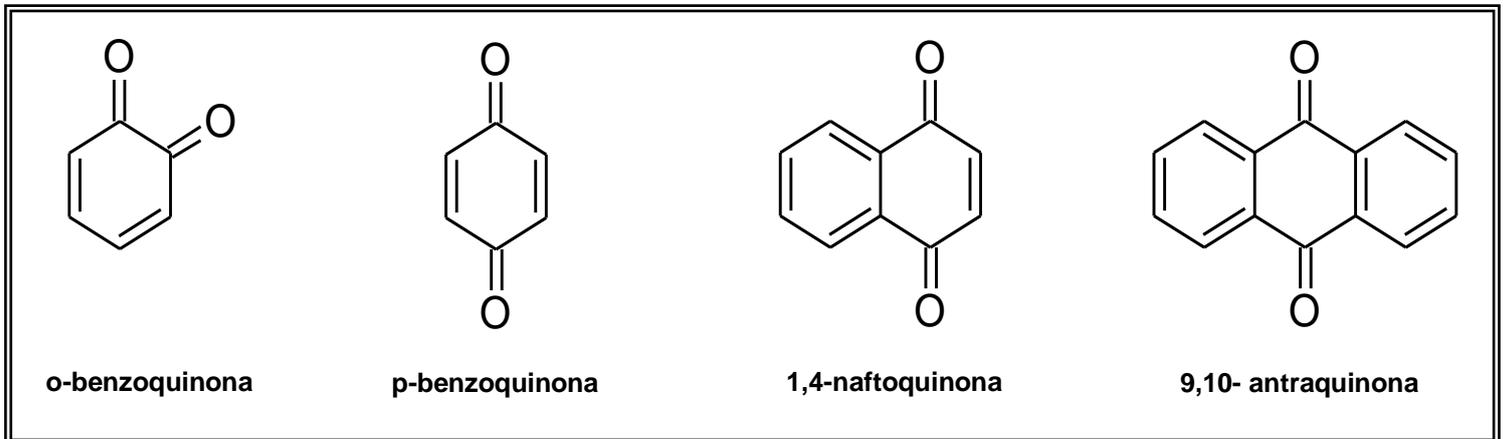
Adaptado Trachootham, Alexandre e Huang, 2009

1.4 Quinonas

Quinonas correspondem a compostos de uma grande família de ocorrência natural, geralmente encontrada em plantas, fungos e bactérias (KUMAGAI *et al.*, 1997; SILVA, 2003). As quinonas naturais ou sintéticas possuem um vasto espectro de atividades biológicas (ASCHE, 2005; THOMSON, 1987), dentre elas a atividade antitumoral, estando entre os mais eficientes agentes quimioteráuticos utilizados na clínica no tratamento de numerosos tipos de cânceres. (DALEN *et al.*, 2008).

Quinonas são compostos dicetônicos com estrutura $O=C-(C=C)_n-C=O$ derivados de compostos aromáticos cujos grupos carbonila são encontrados separados ou conjugados com dupla ligação (BRUNMARK; CADENAS, 1988). Em função do ciclo no qual o sistema de duplas e cetonas conjugadas está inserido, têm-se os três grupos principais de quinonas: benzoquinonas – um anel benzênico; naftoquinonas – um anel naftalênico; antraquinonas – um anel antracênico linear ou angular (Figura 5) (SIMÕES *et al.*, 2002).

Figura 5. Classificação de quinonas



Fonte: Silva *et al.* 2003

Sabe-se que as quinonas são metabólitos envolvidos em diversos processos bioquímicos vitais, principalmente naqueles relativos aos níveis de cadeia respiratória e fotossíntese, como por exemplo, as ubiquinonas e plastoquinonas, respectivamente (GOODWIN; MERCER, 1972).

Nos últimos anos, têm-se observado um crescimento de estudos sobre a atividade farmacológica das quinonas. Tais estudos tem mostrado que estes compostos tem grande biodinamicidade, destacando-se as propriedades

microbicidas, tripanossomicidas, viruscidas, antitumorais e inibidoras de sistemas celulares reparadores, tais como atividade de enzimas importantes como as topoisomerasas (ESTEVEZ-SOUZA *et al.*, 2007; MONKS, 1992; SILVA, 2003).

Estudos sobre o mecanismo de ação biológica das quinonas destacam a importância do grupo quinonoídico como grupo farmacofórico imprescindível para geração de espécies reativas de oxigênio que induzem a apoptose (SILVA, 2003).

Há vários modos de ação pelos quais as quinonas exercem atividade citotóxica, no entanto, não está claro qual dessas ações é mais importante para induzir danos celulares. Porém o principal alvo de ação citotóxica é o DNA (SAIFY, 1999).

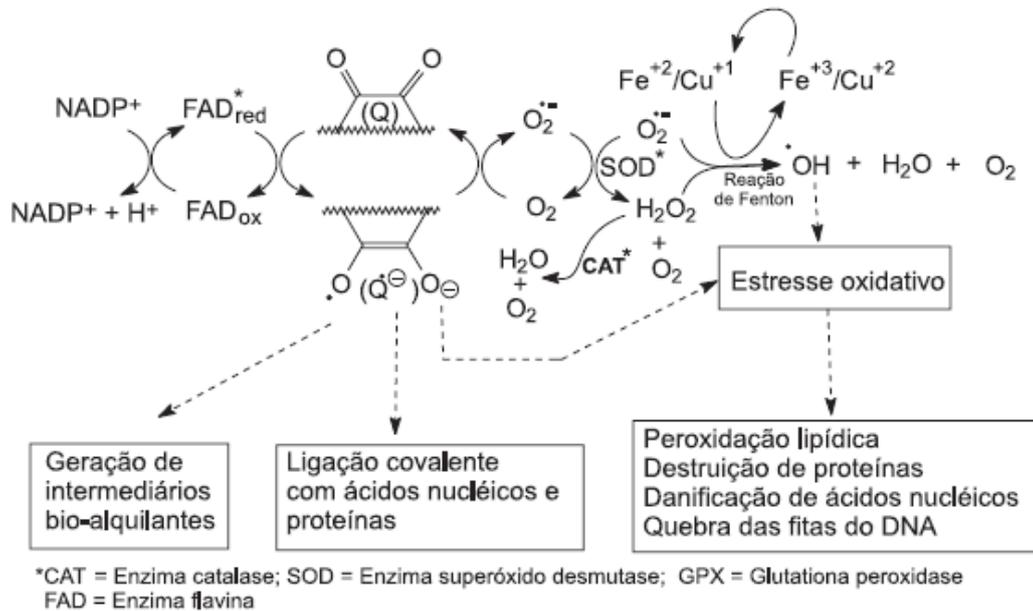
Algumas quinonas também atuam como agentes intercalantes na molécula de DNA ou como inibidores de enzimas essenciais para duplicação do DNA e biossíntese de nucleotídeos (SALUSTIANO *et al.*, 2009). Também podem ser ativados *in situ* formando conjugados intermediários, os quais são poderosos agentes alquilantes (SALUSTIANO *et al.*, 2009).

É notável a importância da utilização das quinonas e seus análogos como agentes anticâncer. Por exemplo, compostos como dactinomicina, antibióticos do grupo das antraciclina (daunorrubicina, doxorrubicina e mitoxantrona), bleomicina e mitomicina C tem sido usados na clínica para quimioterapia do câncer (GALM, 2005; WOLKENBERG *et al.* 2005).

A doxorrubicina (Adriamicina ®) e o seu congênere, daunorrubicina (daunomicina), têm sido usadas durante mais de 30 anos para o tratamento de uma variedade de doenças malignas. Doxorrubicina é utilizada para o tratamento de tumores sólidos, como tumores de: mama, ductos biliares, tecido endometrial, esôfago e fígado, osteossarcomas, sarcomas dos tecidos moles, e linfoma não-Hodgkin (MURPHY; LAWRENCE; LENHARD, 1995). Enquanto daunorrubicina tem utilidade principalmente em leucemia mielóide aguda (WIERNIK; DUTCHER, 1992), a mitomicina C é usada no tratamento de tumores sólidos (TOMASZ; PALOM, 1991).

A citotoxicidade das quinonas está relacionada com a capacidade de serem biorreduzidas por flavoenzimas gerando radicais semi-quinonas que por sua vez doam elétrons ao oxigênio molecular gerando espécies reativas de oxigênio (SALMON-CHEMIN *et al.*, 2001) (Figura 6).

Figura 6. Ciclo redox das quinonas

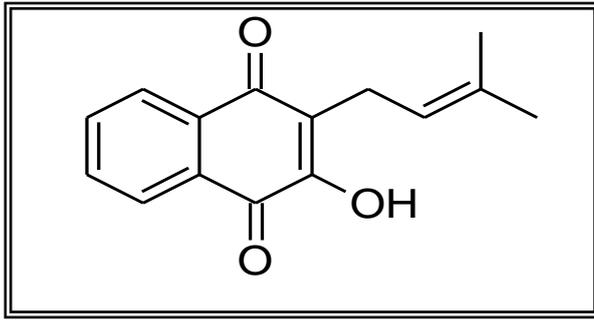


Fonte: SILVA; FERREIRA; SOUZA, 2003.

1.5 Lapachol e seus análogos sintéticos

O lapachol (2-hidroxi-3-(3-metil-2-butenil)-1,4-naftalenodiona (Figura 7), é uma naftoquinona que foi primeiramente isolada por E. Parteno da *Tabebuia avellanedae* em 1882, sendo posteriormente encontrado em outras famílias como Leguminosae, Verbenaceae, Proteaceae, Sapotaceae, Scrophulariaceae e Malvaceae. *Tabebuia avellanedae* é uma árvore da família Biognoniaceae, comumente conhecida como “pau-d’arco” ou “ipê roxo” no Brasil (PATERNO, 1882; HUSSEIN, 2007).

Os estudos farmacológicos das naftoquinonas obtidas das tabebuias foi pioneiro no Brasil, tendo-se iniciado na década de 60. Desde então, outros pesquisadores desenvolvem pesquisas com este grupo de naftoquinonas e seus derivados sintéticos (SILVA, 2003).

Figura 7. Lapachol

Fonte: HUSSAIN *et al.*, 2007.

Estudos iniciais realizados na Universidade Federal de Pernambuco demonstraram que o lapachol possui forte atividade contra bactérias Gram-positivas (GONÇALVES DE LIMA; WEIGERT, 1972). O lapachol também tem atividade contra *Helicobacter pylori*, *Staphylococcus*, *Streptococcus*, *Bacillus*, *Enterococcus*, e espécies de *Clostridium*. Além disso, foi relatado que lapachol tem um efeito significativo contra *Candida albicans*, *Candida tropicalis*, e *Cryptococcus neoformans*, que era semelhante a anfotericina B. Acredita-se que a atividade antifúngica do lapachol é devido à sua interação com a membrana celular (GONÇALVES DE LIMA *et al.*, 1956; PORTILLO *et al.*, 2001).

Além das atividades microbicidas, o lapachol e alguns análogos inibem o crescimento de queratinócitos humanos, sendo considerado um composto com potencial atividade antipsoriática (MÜLLER; SELLMER; WIEGREBE, 1999). O lapachol também possui atividade analgésica (SESTER, 1996), antiulcerogênica (GOEL *et al.*, 1987), antiviral (LI, 1993) e antiinflamatória (ALMEIDA *et al.*, 1990).

Outrora, o lapachol fora comercializado para utilização como adjuvante no tratamento de certos tipos de câncer, sendo o medicamento fabricado pelo Laboratório Farmacêutico do Estado de Pernambuco (LAFEPE), não mais disponível no mercado (FONSECA *et al.*, 2003). O lapachol é ativo em Linfossarcoma de Murphy Sturm, e é inativo em algumas neoplasias murinas como adenossarcoma 755, carcinoma pulmonar de Lewis, leucemia linfocítica P388 e leucemia L-1210 (LINARDI; OLIVEIRA; SAMPAIO, 1975).

O lapachol tem mostrado vários efeitos benéficos para o tratamento do câncer, entretanto não é uma droga ideal. Os ensaios clínicos o desaprovam em

decorrência de efeitos colaterais que em muito agravam o quadro clínico de pacientes com câncer (BLOCK *et al.*, 1974).

Devido a sua atividade antitumoral, o lapachol é um candidato para modificação sistemática de sua molécula a fim de compreender as suas relações estrutura-atividade e assim desenvolver análogos com atividade e perfil toxicológico melhorados (HUSSEIN, 2007).

Os produtos naturais tem sido de grande importância na descoberta de novas moléculas biologicamente ativas. No entanto, devido a sua escassez ou até mesmo para o melhoramento de sua ação farmacológica, a síntese química tem se mostrado vital no desenvolvimento de novas drogas mais eficazes e seletivas.

Nos últimos anos, tem-se relatado as atividades moluscicida (CAMARA *et al.*, 2008; SILVA *et al.*, 2002), antimalarial (ANDRADE-NETO *et al.*, 2004); tripanocida (GOULARD *et al.*, 1997), antiviral (SILVA *et al.*, 2002), leshimanicida (SILVA *et al.*, 2009), e antitumoral (EYONG, 2008; RAO *et al.*, 1968; SILVA *et al.*, 2009) de naftoquinonas derivadas do lapachol. Nesse contexto, naftoquinonas análogas do lapachol tem sido sintetizadas com a finalidade de descobrir novas drogas anticancer.

Os efeitos citotóxicos destas naftoquinonas são principalmente devido a dois seguintes fatores: (i) inibição da DNA topoisomerase II e (ii) formação de radical semiquinona que pode transferir um elétron ao oxigênio para produzir superóxido. Ambos, semiquinona e superóxido, podem gerar o radical hidroxila, que é a causa de quebras de cadeia de DNA. 1,4-naftoquinona contém dois grupos de quinona que têm a capacidade de aceitar um ou dois elétrons para formar o radical ânion correspondente. Provavelmente, as ações de relevância biológicas das naftoquinonas são dependentes do ciclo redox das quinonas que gera EROs (VERMA, 2006).

Em estudo para avaliar a atividade citotóxica do lapachol e alguns derivados sintéticos em várias linhagens tumorais (K562 – câncer de colón, Lucena 1 – leucemia, Daudi – leucemia e MCF-7 – câncer de mama) e células mononucleadas do sangue periférico (CMSP), Salustiano e colaboradores (2009) observaram que estas naftoquinonas foram citotóxicas inclusive em linhagens resistentes ao estresse oxidativo como é o caso da MCF-7. Além disso, esses compostos mostraram certa seletividade para células tumorais.

Sete novas 1,4-naftoquinonas relacionadas ao lapachol sintetizadas por Silva e colaboradores mostraram importantes atividades biológicas, incluindo efeito contra proliferação de MCF-7, infecções com o vírus Herpes simplex tipo 2 e contra miotoxicidade induzida por veneno de cobra (SILVA *et al.*, 2002).

Eyong e colaboradores (2008) obtiveram várias naftoquinonas a partir da ozonólise do lapachol e dentre estas duas inibiram 100% o crescimento de células DU-145 (carcinoma de próstata humano).

Esses achados apontam para o potencial do lapachol como modelo para a produção de novos compostos com propriedades anticâncer.

2 OBJETIVOS

2.1 Objetivo geral

O presente trabalho tem como objetivo geral estudar as propriedades citotóxicas de duas naftoquinonas sintéticas análogas ao lapachol.

2.2 Objetivos específicos

- Avaliar a seletividade das naftoquinonas quanto à atividade citotóxica frente a células tumorais versus células mononucleares de sangue periférico (CMSP).
- Avaliar o decurso temporal do efeito citotóxico das naftoquinonas em células leucêmicas humanas (HL-60);
- Avaliar os possíveis mecanismos envolvidos na citotoxicidade induzida por estas naftoquinonas em células HL-60.
- Avaliar a participação de EROs na atividade citotóxica das naftoquinonas sobre as células HL-60.

3 MATERIAIS E MÉTODOS

3.1 Materiais utilizados

3.1.1 Equipamentos, reagentes e soluções

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

3.1.2 Naftoquinonas

Os análogos do Lapachol foram sintetizados e cedidos pelos Profs. Drs. Paulo Ribeiro Costa e Alcides José Monteiro da Silva da Universidade Federal do Rio de Janeiro. As amostras foram mantidas a - 20°C em soluções estoque de DMSO a 1mg/mL.

FIGURA 8. Estrutura química do Lapachol e seus análogos sintéticos

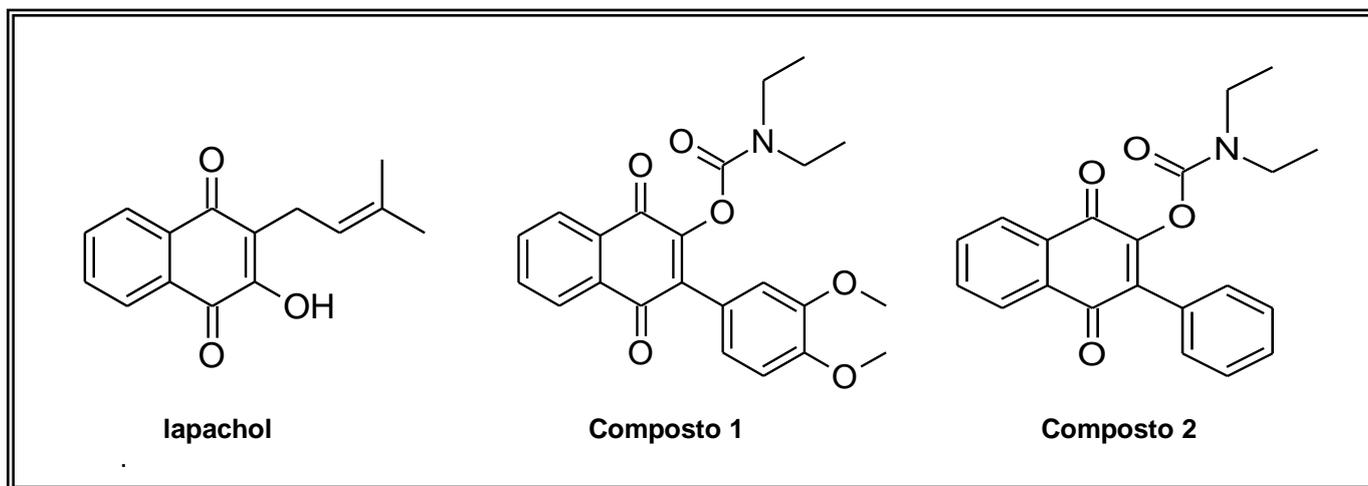


Tabela 3. Nomeclatura IUPAC e peso molecular dos compostos estudados.

AMOSTRA	NOME QUÍMICO (IUPAC)	PESO MOLECULAR
LAPACHOL	4-Hidroxi-3-(3-metilbut-2-enil)naftaleno-1,2-diona	242,27
COMPOSTO 1	1,4-dioxo-3-fenil-1,4-dihidronaftalen-2-yl dietilcarbamate	349,37
COMPOSTO 2	3-(3,4-dimetoxifenil)-1,4-dioxo-1,4-dihidronaftalen-2-yl dietilcarbamate	409,43

3.2 Metodologia Experimental

3.2.1 Estudo da atividade citotóxica

Cultivo da Linhagem tumoral

Células HL-60 (ATCC: CCL-240TM) foram cultivadas em frascos plásticos para cultura (Corning, 75 cm², volume de 250 mL para células em suspensão); utilizando o meio de cultura RPMI 1640 suplementado com 10% de soro fetal bovino e 1% de antibióticos (penicilina/estreptomicina). As células foram incubadas em estufa a 37°C com atmosfera de 5% de CO₂, seguido da observação do crescimento celular com ajuda de microscópio de inversão a cada 24 horas (BUTLER; DAWSON, 1992).

Obtenção das células mononucleares do sangue periférico

As células mononucleares do sangue periférico (CMSP) foram obtidas a partir de sangue periférico de voluntários clinicamente saudáveis. A coleta de sangue foi realizada em frascos heparinizados (vacuntainer) por profissionais capacitados da Unidade de Farmacologia Clínica (UNIFAC) da Universidade Federal do Ceará. As células foram isoladas através de um gradiente de densidade por meio da utilização do HistopaqueTM-1077. Uma amostra de 3mL de sangue periférico foi diluída em 5mL de PBS. Essa solução foi adicionada a um tubo Falcon contendo 2mL de

Histopaque™-1077 e, posteriormente, centrifugada por 30 minutos a 1500 rpm. Após a centrifugação, a solução foi separada, em virtude da densidade do Histopaque™-1077, em três camadas visíveis. Uma superior (soro), uma intermediária (células e Histopaque™-1077) e uma inferior (hemácias). Em seguida, a região intermediária foi cuidadosamente removida e adicionada a um terceiro tubo contendo PBS, o qual foi centrifugado por 20 minutos a 1000 rpm. O sobrenadante foi descartado e o precipitado de células foi ressuscitado em 2mL de PBS. As células foram utilizadas imediatamente após o processo de isolamento, sendo cultivadas em meio de cultura RPMI-1640 suplementado com 20% de soro fetal bovino, 1% de antibióticos e fitohemaglutinina (2 a 4%). (COMEPE – Protocolo nº281/09).

3.2.1.1 Avaliação da atividade antiproliferativa em linhagens de células tumorais *in vitro* - Teste do MTT

O ensaio consiste em uma análise colorimétrica baseada na conversão do sal 3-(4,5-dimetil-2-tiazol)-2,5-difenil-2-H-brometo de tetrazólio (MTT) para formazan, pela atividade da enzima succinil-desidrogenase presente na mitocôndria da célula viável (MOSMANN, 1983), permitindo, dessa maneira, quantificar a porcentagem de células vivas.

Procedimento Experimental

As células HL-60 foram distribuídas em multiplacas de 96 cavidades numa densidade de 3×10^5 células/mL. As substâncias testes (0,009 – 5 µg/mL) foram incubadas durante 21 ou 69 horas juntamente com a suspensão de células. Após o período de incubação, as placas foram centrifugadas (1500 rpm/15 min), e o sobrenadante foi descartado. Cada cavidade recebeu 150 µL da solução de MTT (10% em meio RPMI 1640) e foi reincubada durante 3 horas, em estufa a 37°C e a 5% CO₂, totalizando 24 e 72 horas de experimento, respectivamente. Após esse período, as placas foram novamente centrifugadas (3000 rpm/10 min), o sobrenadante foi desprezado, e o precipitado foi ressuscitado em 150µL de DMSO para a quantificação do sal reduzido nas células vivas. As absorbâncias foram lidas com o auxílio do espectrofotômetro de placa, no comprimento de onda de 595 nm.

3.2.2.2 Determinação da atividade hemolítica em eritrócitos de camundongos.

Segundo Costa-Lotuf *et al* (2002), este ensaio permite avaliar o potencial dos compostos testes em causar danos à membrana plasmática celular, seja pela formação de poros ou pela ruptura total da mesma.

Procedimento experimental

O sangue foi coletado de camundongos Swiss (*Mus musculus*) por via plexo orbital e diluído em 30 volumes de solução salina (NaCl 0,85% + CaCl₂ 10mM). Os eritrócitos foram lavados 2 vezes em solução salina por centrifugação (1500 rpm / 5 min) para redução da contaminação plasmática e ressuspensos em solução salina para se obter uma suspensão de eritrócitos (SE) a 2%. Esses experimentos foram realizados em multiplacas com 96 poços, com a concentração dos compostos testes em 250 e 500 µg/mL. Cada poço da 1ª fileira recebeu 100µL da solução salina. Na 2ª, os poços receberam 80µL da solução salina e 20µL do veículo de diluição da substância teste, neste caso, DMSO 1%. Aos poços da 3ª fileira, foram adicionados 180µL de solução salina e 20µL da substância teste em solução (5mg/mL). Da 4ª fileira em diante os poços receberam 100 µL da solução salina, excetuando-se os da última fileira, que receberam 80µL de solução salina e 20µL de Triton X-100 1% (controle positivo). Em seguida, 100µL da suspensão de eritrócitos 2% foram plaqueados em todos os poços. Após incubação de 1 h sob agitação constante à temperatura ambiente (26°C), as amostras foram centrifugadas (5000 rpm/ 3min) e o sobrenadante foi analisado em espectrofotômetro de placa a 540 nm. (COMEPE – Protocolo n°281/09).

3.2.3 Estudo do Mecanismo de Ação em células HL-60.

Células da linhagem HL-60, na concentração de 3×10^5 células/mL, foram incubadas por 1, 3 e 24 horas e examinadas ao microscópio óptico de inversão. As concentrações utilizadas para os compostos **1** e **2** estão dentro do intervalo de confiança das CI₅₀ de 24h para esses dois compostos de forma que fosse possível relacionar suas atividades citotóxicas com suas estruturas químicas. Assim as concentrações utilizadas foram 3,5 e 7µM para estes compostos. A concentração utilizada para estudo do lapachol foi de 82 µM. Os grupos do controle negativo receberam a mesma quantidade de DMSO.

3.2.3.1 Determinação da geração de espécies reativas de oxigênio intracelulares

As espécies reativas de oxigênio intracelulares foram monitoradas utilizando o diacetato de 2'7'-diclorohidrofluoresceína (H₂-DCF-DA), que é convertido em um produto altamente fluorescente denominado de diclorofluoresceína (DCF) na presença de espécies reativas de oxigênio intracelulares (LEBEL *et al.*, 1992).

Procedimento Experimental

No final do tratamento de 1 horas com as amostras teste, as células foram incubadas a 20 µM de H₂-DCF-DA e mantidas a 37°C por 30 minutos no escuro. Após terminar o período total de incubação as células foram centrifugadas por duas vezes, lavadas e ressuspensas em tampão PBS e analisadas imediatamente utilizando citometria de fluxo com comprimento de onda de excitação e emissão de 490 e 530 nm, respectivamente. PMA (Forbol-12-miristato-13-acetato) foi utilizado como controle positivo.

3.2.3.2 Análise morfológica - Coloração por May-Grünwald-Giemsa

A coloração utilizada nesse experimento se baseia em interações eletrostáticas entre os corantes e moléculas-alvo. Essa coloração possui azul de metileno (corante básico), eosina (corante ácido), entre outros componentes básicos que permite distinguir o citoplasma e o núcleo, sendo possível analisar a célula quanto a sua integridade nuclear, bem como alterações no citoplasma. Essa técnica é bastante indicada para estudo do padrão de morte celular (apoptose/necrose).

Procedimento Experimental

Células da linhagem HL-60, plaqueadas na concentração de 3 x 10⁵ células/mL foram incubadas por 1, 3 e 24 horas com as drogas e examinadas ao microscópio de inversão. Para observar a morfologia, 50µL da suspensão de células foram adicionadas à centrífuga de lâmina (cytospin). Após a adesão das células na lâmina, a fixação foi feita com metanol por 1 minuto e a coloração por May-Grunwald, por 10 segundos, seguida pelo Giemsa por mais 10 segundos.

3.2.3.3 Determinação da integridade da membrana celular - viabilidade celular

O teste baseia-se na capacidade do iodeto de propídeo penetrar nas células cuja membrana esteja rompida e após a ligação ao DNA emitir alta fluorescência quando é excitado pelo laser. As células com membrana íntegra emitem baixa fluorescência (SHAPIRO, 1995).

Procedimento Experimental

Uma alíquota de 100µL de suspensão de células tratadas e não tratadas foi incubada com 100µL de uma solução de PI a 50µg/mL (diluído em tampão fosfato). Após 5 minutos as amostras foram analisadas por citometria de fluxo. Foram obtidas informações sobre morfologia celular (espalhamento frontal e lateral da luz, o que corresponde ao tamanho e granulosidade relativa entre as células, respectivamente) e integridade de membrana utilizando-se o filtro para o espectro do vermelho (DARZYNKIEWICZ *et al.*, 1992).

3.2.3.4 Análise da fragmentação do DNA por citometria de fluxo

Esse teste baseia-se na capacidade do iodeto de propídeo ligar-se ao DNA. Inicialmente a membrana plasmática das células foram lisadas por um detergente, permitindo que o iodeto de propídeo (PI) ligue-se ao DNA de todas as células. Células com o DNA íntegro emitirão alta fluorescência, já núcleos com condensação da cromatina e DNA fragmentado incorporam menos PI e por isso emitem menor fluorescência, sugestivo de apoptose. Além disso, o PI consegue intercalar proporcionalmente a quantidade de DNA da célula, podendo então mensurar as fases do ciclo celular, através da quantidade de DNA presente em cada fase do ciclo celular.

Procedimento Experimental

Uma alíquota de 100µL de suspensão de células tratadas e não tratadas foi incubada com 100µL de uma solução de lise (0,1% de citrato de sódio, 0,1 % de Triton X-100 e 2 µg/mL iodeto de propídeo em PBS). Após um período de 30 minutos, onde os tubos permaneceram no escuro, as amostras foram analisadas no citômetro de fluxo (NICOLETTI *et al.*, 1991).

3.2.3.5 Determinação da ativação de caspases

As caspases pertencem a família de proteases cisteínas. A caspase 9 é uma caspase iniciadora envolvida no processo de apoptose por via intrínseca. Quando a célula recebe estímulos apoptóticos, a mitocôndria libera citocromo c que irá formar um complexo com APAF-1 e d-ATP que irão ativar a caspase 9 que por sua vez irá ativar as caspases efetoras 3 e 7.

A ativação das caspases 3 e 7 possuem papel fundamental no mecanismo de apoptose, sendo responsável pela clivagem de vários componentes celulares relacionados ao reparo e ao controle do DNA. Assim, a quantificação dos níveis de caspase efetoras como 3 e 7 permite avaliar os mecanismos de indução apoptótica (MEHMET, 2002).

Procedimento Experimental

A detecção das caspases foi analisada por citometria de fluxo utilizando o Kit FAM de caspases 3/7 ou 9 após 24 horas de incubação com os compostos **1**, **2** nas concentrações de 3,5 e 7,0 μM e o lapachol na concentração de 82 μM foram comparadas ao controle negativo (grupo não-tratado). As células ($0,3 \times 10^5$) foram incubadas com marcador fluorescente, o inibidor de caspase 6 (FLICA) e mantida 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.

3.2.4 Avaliação do efeito do lapachol e seus análogos sobre a quebra de fitas do DNA – ensaio do cometa

Desenvolvido por Ostling e Johanson (1984) e modificado por Singh *et al.* (1988) e, posteriormente, por Olive (1989), o ensaio do cometa permite detectar quebra de fitas simples e duplas na molécula de DNA induzidas por substâncias com potencial genotóxico, tais como agentes alquilantes, intercalantes e oxidantes. Algumas variações foram introduzidas no ensaio, como a utilização de

enzimas digestivas específicas que permitem que mutações, incorporações erradas de uracila no DNA, danos nas bases (pirimidinas e purinas oxidadas), sítios de reparo, ligações cruzadas (DNA-DNA ou DNA-proteína) sejam transformados em quebras e possam, então, ser analisados pelo teste (PFUHLER; WOLF, 1996; COLLINS *et al.*, 1997; DUTHIE; MCMILLAN, 1997).

O teste do cometa não é utilizado para detectar mutações gênicas, mas, sim, lesões genômicas que, após serem processadas, podem resultar em mutação. Diferente das mutações, as lesões detectadas pelo ensaio podem ser reparadas ou não. Assim sendo, o teste do cometa pode ser empregado em estudos de cinética de reparo de lesões no DNA (COLLINS, 2004).

Procedimento experimental

Inicialmente, células da linhagem HL-60 ($0,3 \times 10^6$ células/mL) foram distribuídas em placas de 24 poços e incubadas com os com o lapachol e os compostos **1** e **2** por 1h. Em seguida, 20 μ L da suspensão de células ($\sim 10^6$ células/mL) foram dissolvidos em 0,75 % de agarose de baixo ponto de fusão e imediatamente espalhada sobre uma lâmina pré-tratada com 1,5 % de agarose e ponto de fusão normal. As células foram, então, colocadas em solução de lise por pelo menos 1 h a 4°C. Em seguida, as lâminas foram dispostas horizontalmente na cuba de eletroforese e preenchida com tampão de corrida em pH > 13 (HARTMANN; SPEIT, 1997.). A eletroforese foi conduzida em baixa luminosidade por 20 minutos, usando 25 V e uma corrente de 300 mA. Após a eletroforese, as lâminas foram retiradas e mergulhadas na solução de neutralização por 5 minutos. As células foram contadas em microscópio de fluorescência após coloração com brometo de etídeo. Com objetivo de correlacionar o dano causado ao DNA com a geração intracelular de EROs induzida pelo lapachol e os compostos **1** e **2**, as células foram pré-tratadas por 1h com NAC e em seguida co-incubadas com os compostos e seguido o teste do cometa como descrito acima.

3.3 Análise dos dados

Para determinação do potencial antiproliferativo do lapachol e dos compostos **1** e **2**, os experimentos realizados foram analisados segundo suas médias e respectivos erros-padrão. O gráfico absorbância x concentração foi registrado e

determinado a sua concentração inibitória média capaz de provocar 50% do efeito máximo (CI_{50}) e seus respectivos intervalos de confiança de 95% (IC 95%) realizado a partir de regressão não-linear no programa GraphPad Prism Software versão 5.0.

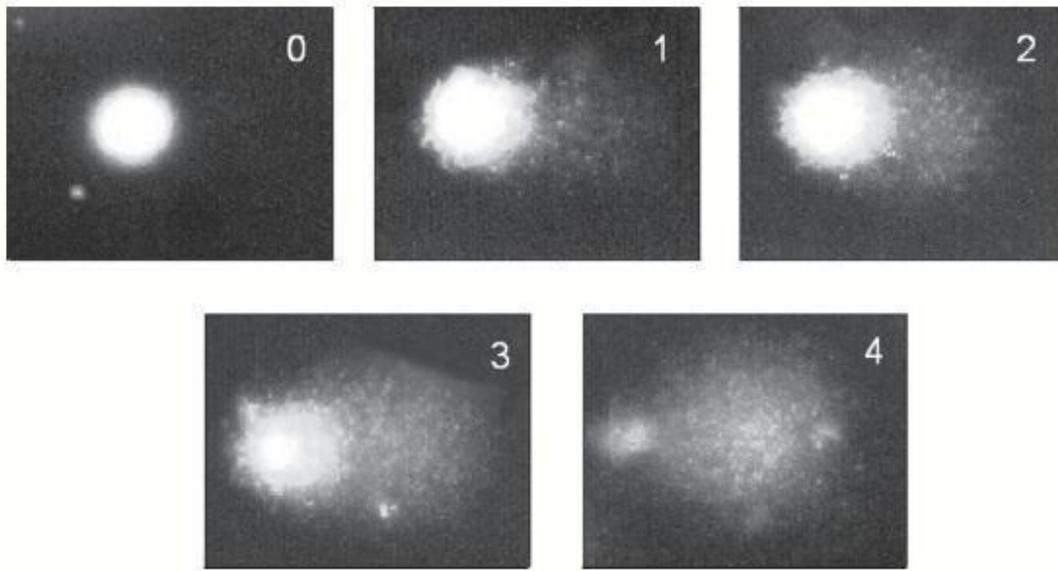
A atividade hemolítica da substância foi determinada de maneira relativa ao valor dos controles positivo e negativo. Foi registrada a porcentagem do efeito x log da concentração e determinadas suas CE_{50} (concentração média capaz de provocar 50% do efeito máximo) e seus respectivos intervalos de confiança (IC 95%) a partir de regressão não-linear, utilizando o programa Prisma versão 5.0 (GraphPad Software).

Para análise das possíveis alterações morfológicas na célula após tratamento com o lapachol e compostos **1** e **2**, as lâminas contendo as células coradas foram levadas ao microscópio para avaliação das suas características morfológicas e comparadas ao controle (não-tratadas). O registro das alterações celulares foi feito por fotografia em microscopia óptica.

Nos estudos realizados por 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 Dunnett, com nível de significância de 5% ($p < 0,05$).

A análise do teste do cometa foi realizada de acordo com o padrão de escores previamente determinados pelo tamanho e intensidade da cauda do cometa (BURLINSON *et al.*, 2007; HARTMANN; SPEIT, 1997; TICE *et al.*, 2000). Foram contados 100 cometas/lâmina e classificados, de acordo com a porcentagem de DNA na cauda do cometa, indicando o grau de quebra do DNA, de acordo com a Figura 9. Onde, 0 = sem danos (<5%), 1 = baixo nível de danos (5-20%), 2 = médio nível de danos (20-40%), 3 = alto nível de danos (40-95%) e 4 = dano total (>95%).

Figura 9. Padrão de danos ao DNA para o ensaio cometa.



Fonte: Collins (2004).

4 RESULTADOS

4.1 Citotoxicidade induzida pelo lapachol e seus análogos sintéticos

O potencial antiproliferativo dos compostos foi analisado pelo método colorimétrico do MTT. Após 72h de exposição (Tabela 4), o lapachol e os compostos **1** e **2** apresentaram atividade citotóxica em células HL-60 com CI_{50} de 12 μ M, 2,3 μ M e 4,3 μ M respectivamente. Para células normais do sangue periférico humano (CMSP) os valores de CI_{50} para os compostos **1** e **2** foram de 13,7 μ M e 34,0 μ M, respectivamente (Tabela 4). Os resultados mostram que as células HL-60 são mais sensíveis aos efeitos citotóxicos dos compostos **1** e **2** cujos efeitos foram 6 vezes mais intensos nesta linhagem celular que na CMSP para o composto **1** e 8 vezes mais intensos nesta linhagem celular que na CMSP para o composto **2**. Nos experimentos de 24h de exposição com o lapachol e os compostos **1** e **2**, os valores de CI_{50} encontrados foram 42,9 μ M, 7,9 μ M e 5,6 μ M respectivamente (Tabela 4). Indicando a forte dependência do tempo de incubação no caso do lapachol, enquanto que para os compostos **1** e **2**, os efeitos foram similares após 24 e 72 horas.

A fim de avaliar a participação de espécies reativas de oxigênio (EROs) no efeito citotóxico do lapachol e dos compostos **1** e **2**, as células HL-60 foram pré-tratadas com um inibidor de espécies reativas de oxigênio, N-acetil-cisteína (NAC). Após o pré-tratamento com NAC os valores de CI_{50} encontrados para o lapachol e os compostos **1** e **2** foram 180 μ M, 46 μ M e 18 μ M respectivamente (Tabela 4). Os resultados sugerem que há participação de EROs no efeitos citotóxicos destes compostos.

Além disso, os resultados dos ensaios hemolíticos (dados não mostrados) revelam que a atividade citotóxica dos compostos estudados seja por mecanismos mais específicos, uma vez que nem o lapachol nem seus análogos foram capazes de romper a membrana eritrocitária (hemólise), mesmo em altas concentrações ($CE_{50} > 500 \mu$ M).

Tabela 4. Atividade citotóxica in vitro do lapachol e seus análogos em células leucêmicas humana (HL-60) e células mononucleares do sangue periférico humano (CMSP).

Tempo de exposição	24h	24h com NAC	72h	
	CI ₅₀ µM (CI)	CI ₅₀ µM (CI)	CI ₅₀ µM (CI)	
composto	HL-60			CMSP
Lapachol	42,9 (22,8-145)	180 (121-282)	12 (7,8-15)	Nt*
Composto 1	7,9 (5,5-11)	46 (37,5-69,8)	2,3 (1,4-4,5)	13,7
Composto 2	5,6 (3,7-8,3)	18 (8,5-36)	4,3	34

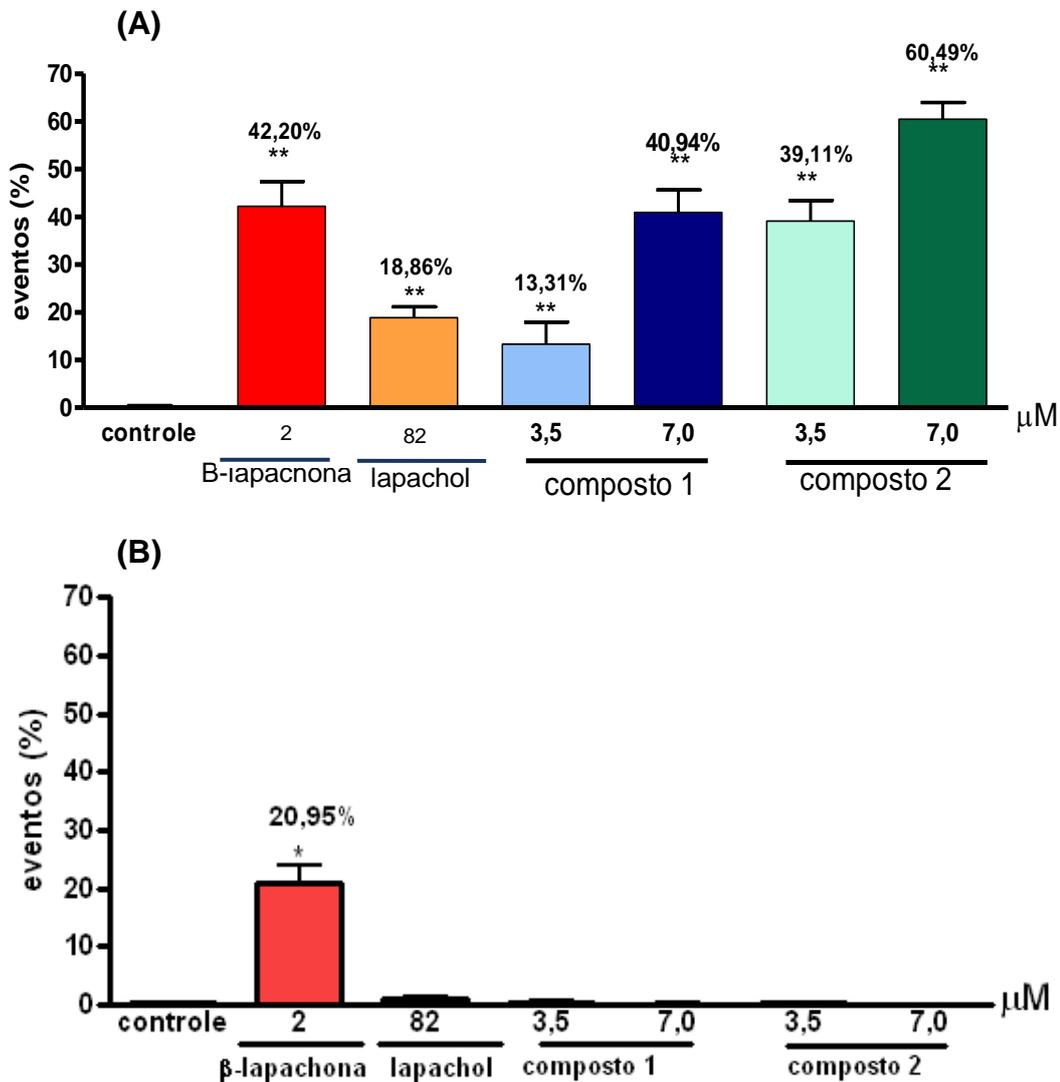
* não testado.

A fim de fazer um estudo comparativo (estrutura química – atividade citotóxica) entre os análogos do lapachol determinou-se uma concentração intermediária entre os dois compostos, baseados na CI₅₀ de 24h. Dessa forma, as concentrações testadas para os análogos do lapachol foram 3,5 e 7,0 µM e para o lapachol usou-se uma concentração próxima do dobro de CI₅₀ de 24h. Os estudos de mecanismo de ação foram feitos em células HL-60 como modelo de estudo em diferentes intervalos de tempo (1, 3 e 24h).

4.2. Estudo dos mecanismos envolvidos no efeito do lapachol e seus análogos em células HL-60.

Observamos que, após pré-tratamento com NAC, houve um aumento da CI₅₀ do lapachol e seus análogos. Por isso avaliamos a geração de espécies reativas de oxigênio induzida por esses compostos em células HL-60 após 1h de tratamento. Observamos que houve aumento significativo de EROs nas células tratadas com o lapachol e os compostos **1** e **2** (Figura 10 A). Após pré-tratamento com NAC a geração de EROs foi abolida nos compostos **1** e **2** e diminuída cerca de 50% no controle positivo utilizado neste experimento, a β-lapachona (Figura 10 B).

Figura 10. Geração de EROs em células HL-60.



Geração de EROs em células HL-60. (A) As células foram tratadas com o lapachol (82 μM) e com os compostos 1 e 2 (3,5 e 7,0 μM) por 1h. (B) NAC (5mM) foi adicionado 1h antes do tratamento de 1h com o lapachol e seus análogos. A β -lapachona (2 μM) foi usada como controle positivo (MARINHO, 2009). As células foram coradas com H2-DCF-DA e cinco mil eventos foram adquiridos. O controle negativo foi tratado com veículo utilizado para diluir os compostos testados. Três experimentos independentes foram feitos em triplicata. * $p < 0,05$ e ** $p < 0,01$, comparado ao controle por ANOVA seguido de teste de Dunnett.

Em seguida, os efeitos do lapachol e de seus análogos foram avaliados em células HL-60 em diferentes intervalos de tempo (1, 3 e 24h). Além disso, também exploramos a participação de EROs nesses efeitos. Para isso, pré-tratamos as células por 1h com o antioxidante NAC, em seguida as células foram reincubadas com o lapachol e seus análogos.

A morfologia das células HL-60 após o tratamentos com o lapachol e os compostos **1** e **2** foi avaliada pelo método de coloração May-Grünwald-Giemsa após períodos de incubação de 1, 3 e 24h. Após 1 e 3h de tratamento com o lapachol e os compostos **1** e **2** não foram observadas alterações significativas na morfologia das células tratadas quando comparadas ao controle (células não tratadas) (Figura 11).

Quando tratadas por 24h com o lapachol e os compostos **1** e **2**, as células HL-60 apresentaram alterações morfológicas características de morte celular por apoptose (fragmentação da cromatina, blebbing e diminuição do volume celular) e necrose (dano na membrana celular). Tais efeitos não foram observados quando as células HL-60 foram pré-tratadas por 1h com NAC (Figura 12).

Figura 11. Fotomicrografias de células HL-60 tratadas com Lapachol (82 μ M), composto 1 e 2 (3,5 e 7,0 μ M) ou diluente (controle) por 1 e 3h e coradas com May-Grünwald-Giemsa.

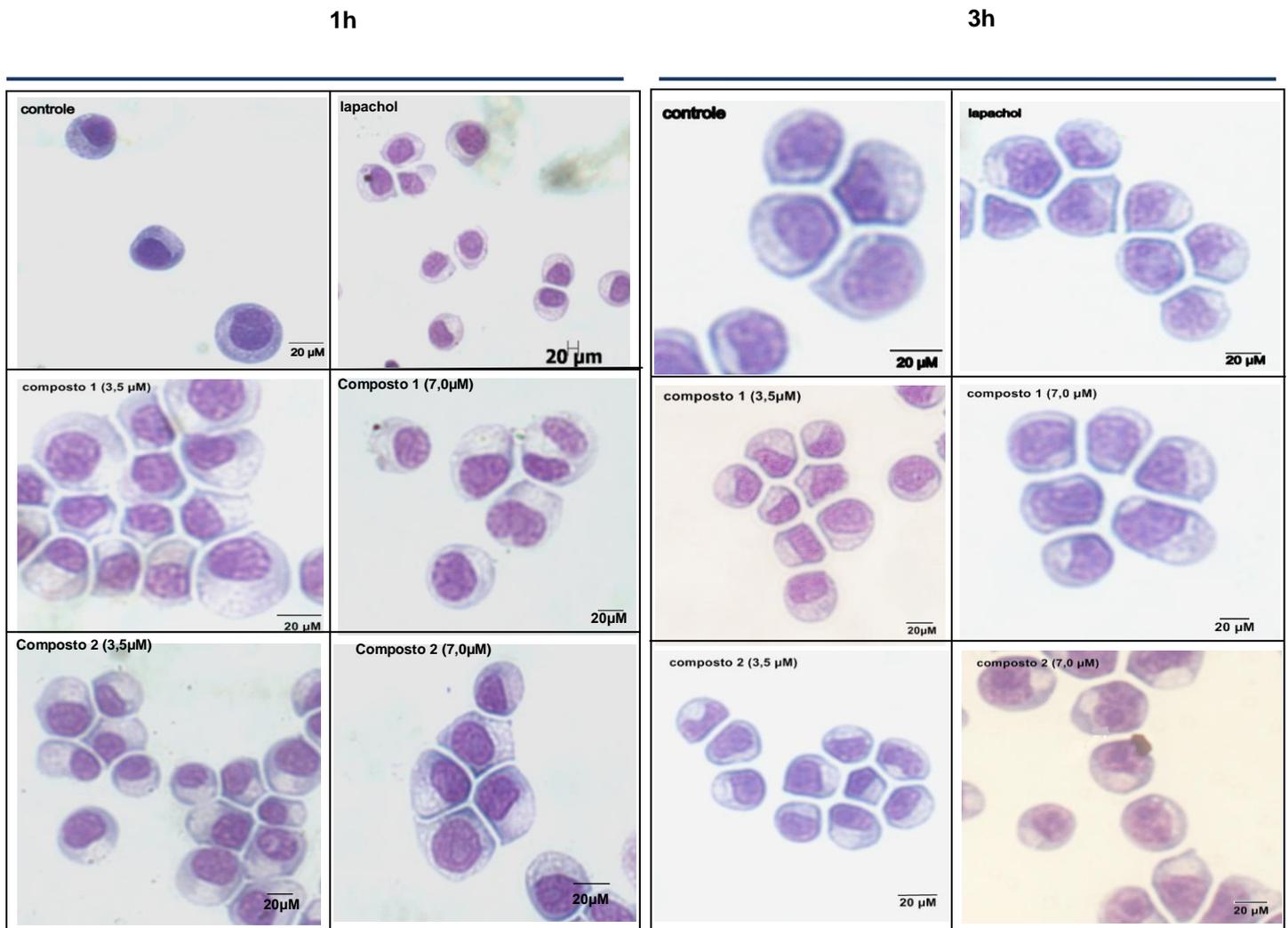
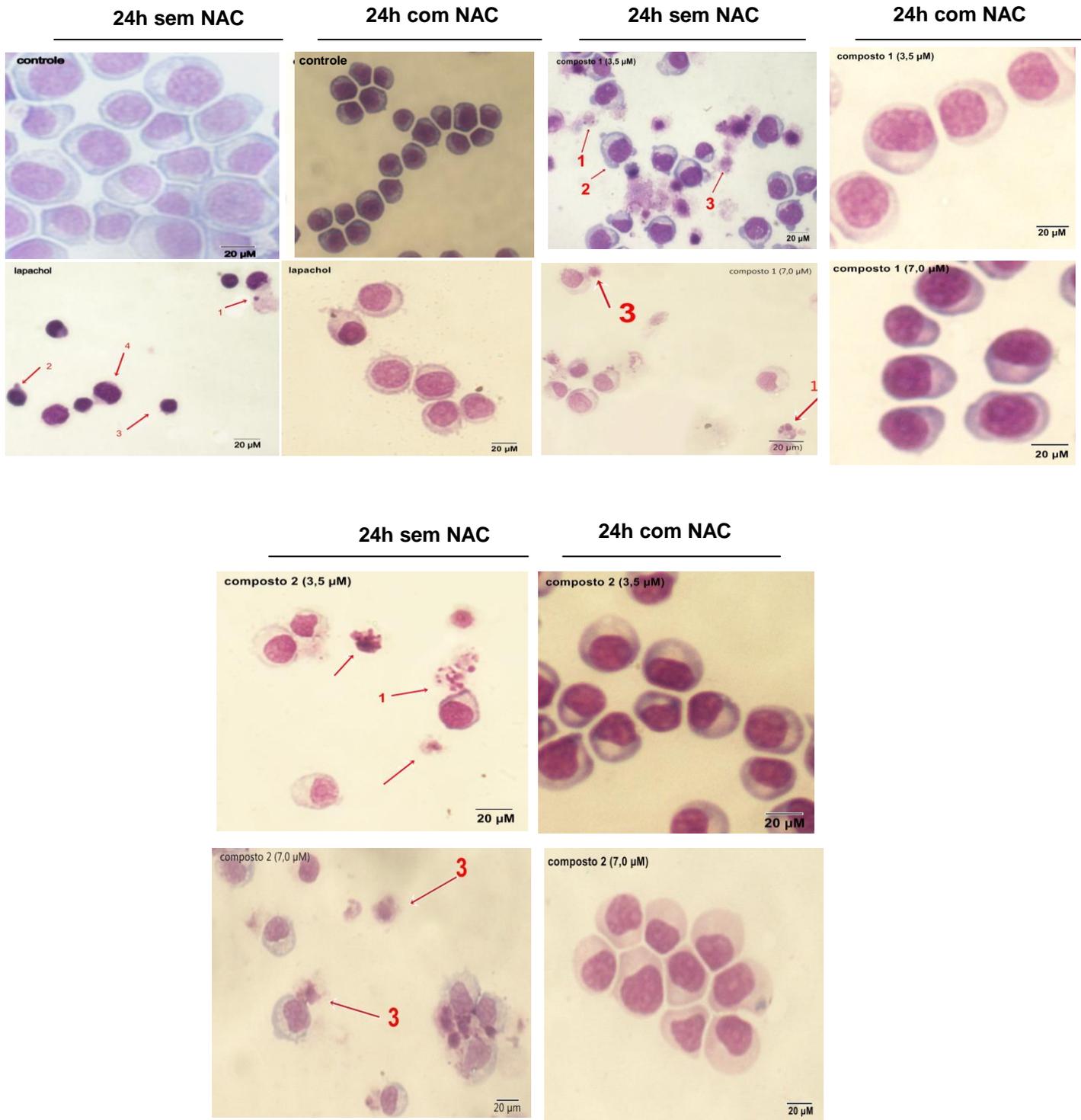


Figura 12. Fotomicrografias de células HL-60 tratadas com Lapachol (82 μ M), composto 1 e 2 (3,5 e 7,0 μ M) ou diluente (controle) com e sem o NAC por 24h e coradas com May-Grünwald-Giemsa. Os números indicam as seguintes alterações observadas: 1. Fragmentação nuclear; 2. Blebbing; 3. necrose; 4. Redução do citoplasma.

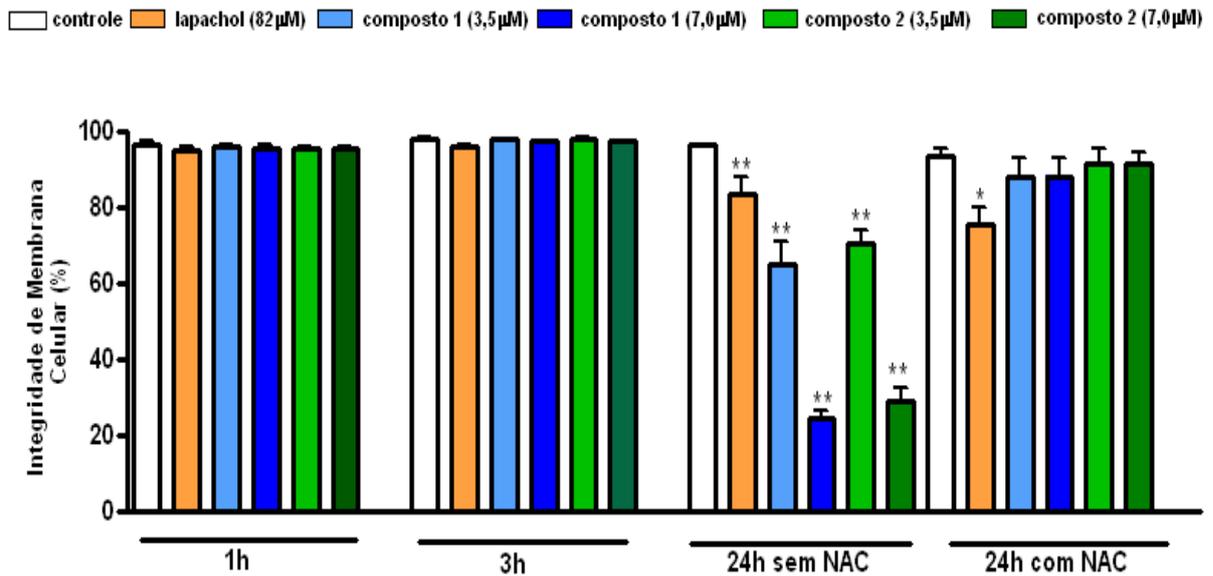


A integridade da membrana celular e a concentração de células foram, em seguida, determinadas por citometria de fluxo após 1, 3 e 24 horas de incubação com o lapachol e os compostos **1** e **2**.

Nenhum composto causou diminuição na integridade de membrana das células após 1 e 3h de tratamento. Por outro lado, após 24h de tratamento com esses compostos, houve significativa diminuição da porcentagem de células com membrana celular íntegra quando comparada ao controle negativo (não-tratada) (Figura 13). Assim, na concentração de 3,5 μM os compostos **1** e **2** diminuíram, respectivamente, cerca de 34,78% e 29,58% o número de células com membrana íntegra e na concentração de 7,0 μM diminuíram, respectivamente, 75,3,% e 71,1% o número de células com membrana íntegra (Figura 14). O lapachol, por sua vez, diminuiu 26,51% o número de células com membrana íntegra (Figura 14). Os efeitos sobre a viabilidade celular encontrados nas células tratadas com os compostos **1** e **2** foram totalmente revertidos quando estas células foram pré-tratadas por 1h com NAC e depois reincubadas com os compostos **1** e **2** por 24h não sendo encontradas diferenças significativas entre tratados e controle negativo (não-tratado). No entanto, os efeitos sobre a integridade de membrana nas células tratadas com o lapachol não foram revertidos quando estas foram pré-tratadas com NAC(Figura 14).

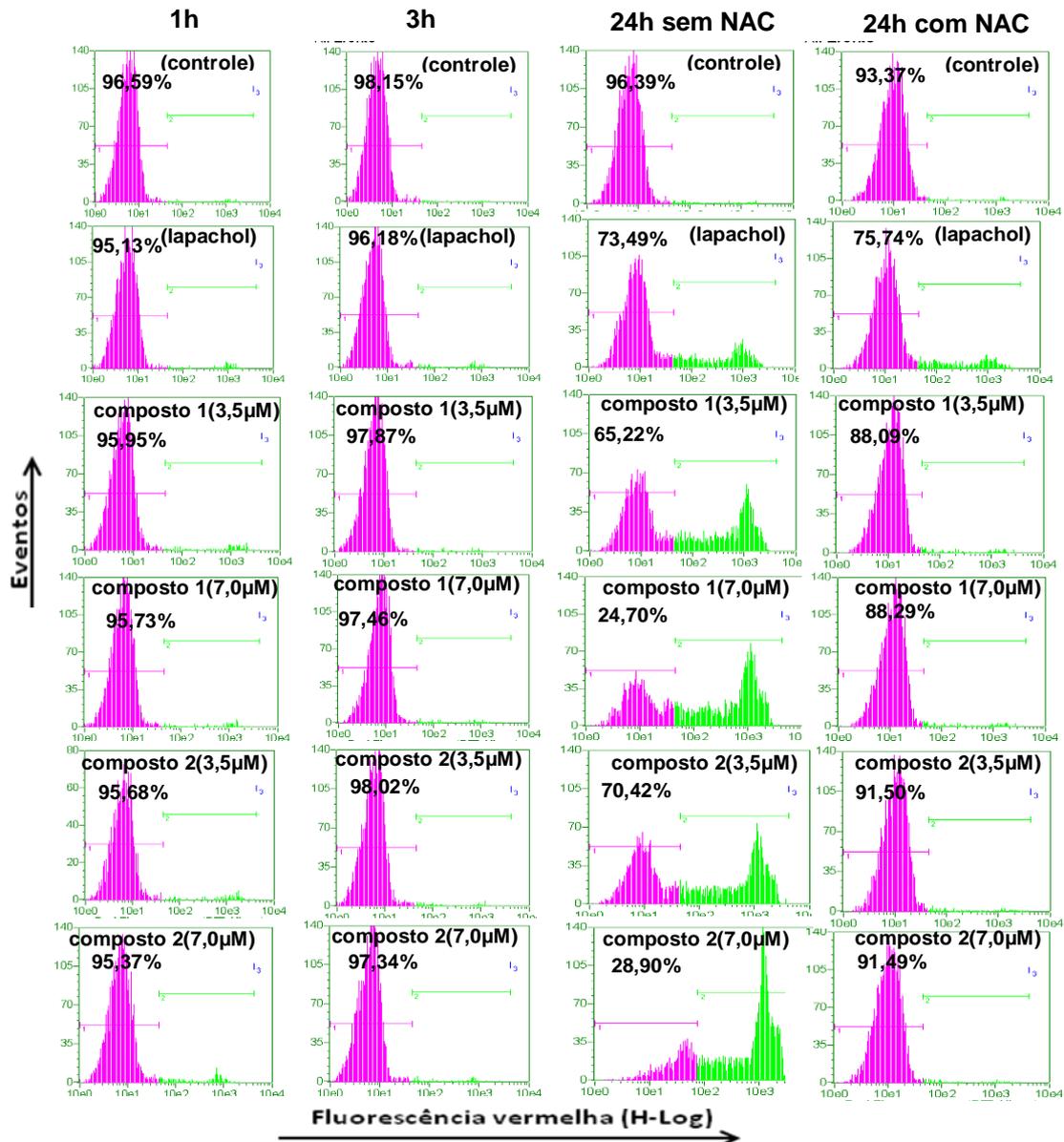
Observou-se que o lapachol e os compostos 1 e 2 diminuíram o número de células quando comparadas ao controle negativo (não-tratada) apenas após 24h de tratamento (Figura 15).

Figura 13: Efeito do Lapachol e dos seus análogos sintéticos (compostos 1 e 2) sobre a integridade de membrana de células HL-60.



Efeito do Lapachol e dos seus análogos sintéticos (compostos 1 e 2) sobre a integridade de membrana de células leucêmicas HL-60, analisado por citometria de fluxo utilizando iodeto de propídeo, após 1 e 3 horas sem NAC e 24 horas de incubação sem NAC ou pré-tratadas com NAC por 1hD). O controle negativo (Controle) foi tratado com o veículo utilizado para diluir as substâncias testadas. Os dados correspondem à média \pm E.P.M. de três experimentos independentes. Cinco mil eventos foram contados em cada experimento. *, $p < 0,05$ e **, $p < 0,01$ comparado com o controle negativo por ANOVA seguido pelo teste de Dunnett.

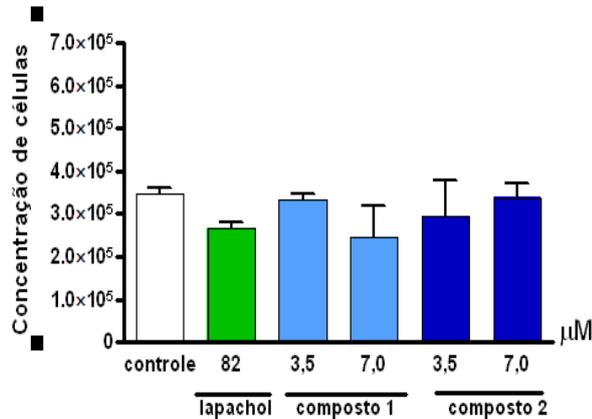
Figura 14. Histograma dos efeitos do lapachol e dos compostos 1 e 2 sobre a integridade da membrana de HL-60 determinado por citometria de fluxo .



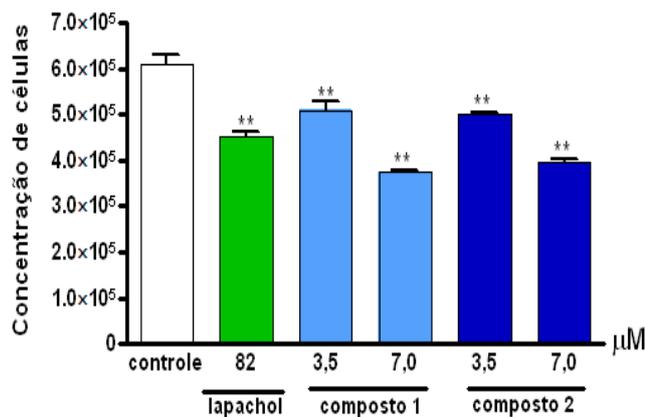
Efeito do lapachol e dos seus análogos sintéticos (compostos 1 e 2) sobre a integridade de membrana de células leucêmicas HL-60, analisado por citometria de fluxo utilizando iodeto de propídeo, após 1 e 3 horas sem NAC e 24 horas de incubação sem NAC ou pré-tratadas com NAC por 1h. O controle negativo (Controle) foi tratado com o veículo utilizado para diluir as substâncias testadas. Os dados correspondem à média de três experimentos independentes. Cinco mil eventos foram contados em cada experimento e comparados com o controle negativo por ANOVA seguido pelo teste de Dunnett.

Figura 15. Efeito do lapachol e seus análogos sintéticos (compostos 1 e 2) sobre a concentração de células HL-60

(1h)



(24h)



Efeito do lapachol e dos seus análogos sintéticos (compostos 1 e 2) sobre a concentração de células HL-60, analisado por citometria de fluxo utilizando iodeto de propídeo, após 1 e 24h. Os dados correspondem à média \pm E.P.M. de três experimentos independentes. Cinco mil eventos foram contados em cada experimento. **, $p < 0,01$ comparado com o controle negativo por ANOVA seguido pelo teste de Dunnett

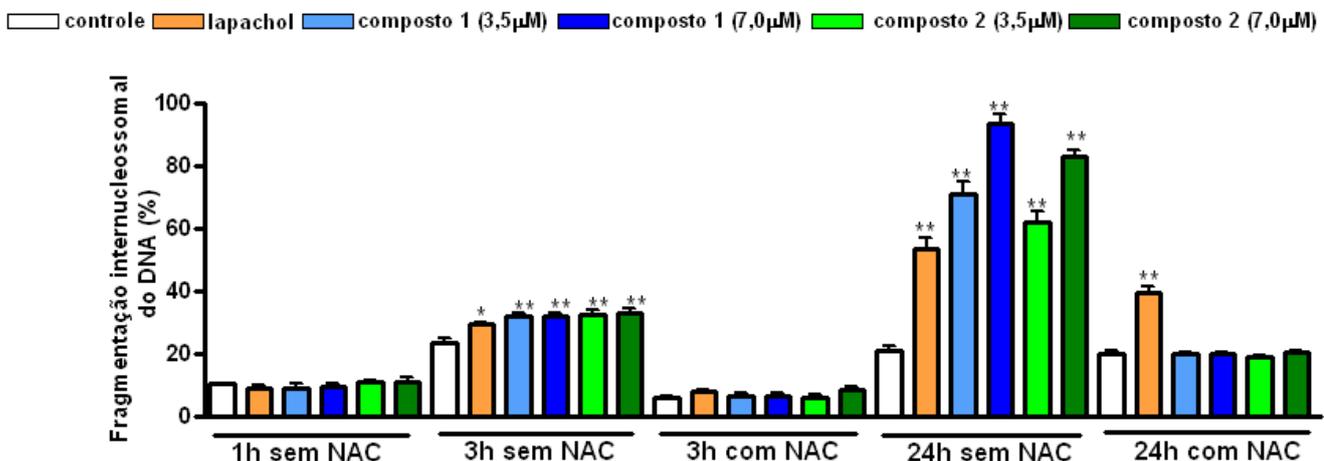
A análise da fragmentação do DNA das células HL-60 tratadas com o lapachol e os compostos 1 e 2 foi realizada por citometria de fluxo nos intervalos de 1, 3 e 24h de incubação e analisada através do programa ModFit LT 3.1. Os resultados mostraram que os efeitos sobre a fragmentação do DNA só foram observados a partir de 3h de incubação com os compostos testados, dados mostrados na Figura 16. Tanto o lapachol quanto os seus dois análogos, em todas as concentrações testadas, causaram aumento significativo na fragmentação de

DNA após 3 horas de exposição. As células não tratadas apresentaram 23,77% de fragmentação, enquanto as células tratadas com o lapachol 29,61%. As células tratadas com os compostos **1** e **2** apresentaram, respectivamente, 32,31% e 32,52% de fragmentação quando tratadas com esses compostos na concentração de 3,5 μM e 32,35% e 33,25% quando tratadas na concentração de 7,0 μM (Figura 17).

Após 24h de exposição, a fragmentação do DNA foi bem mais intensa nas células tratadas com os compostos estudados. As células não tratadas apresentaram 21,11% de fragmentação, enquanto as tratadas com lapachol 53,57%. As células tratadas com os compostos **1** e **2** na concentração de 3,5 μM apresentaram fragmentação do DNA de 71,23% e 62,34%, e 93,96% e 83,24%, na concentração de 7,0 μM , respectivamente (Figura 17).

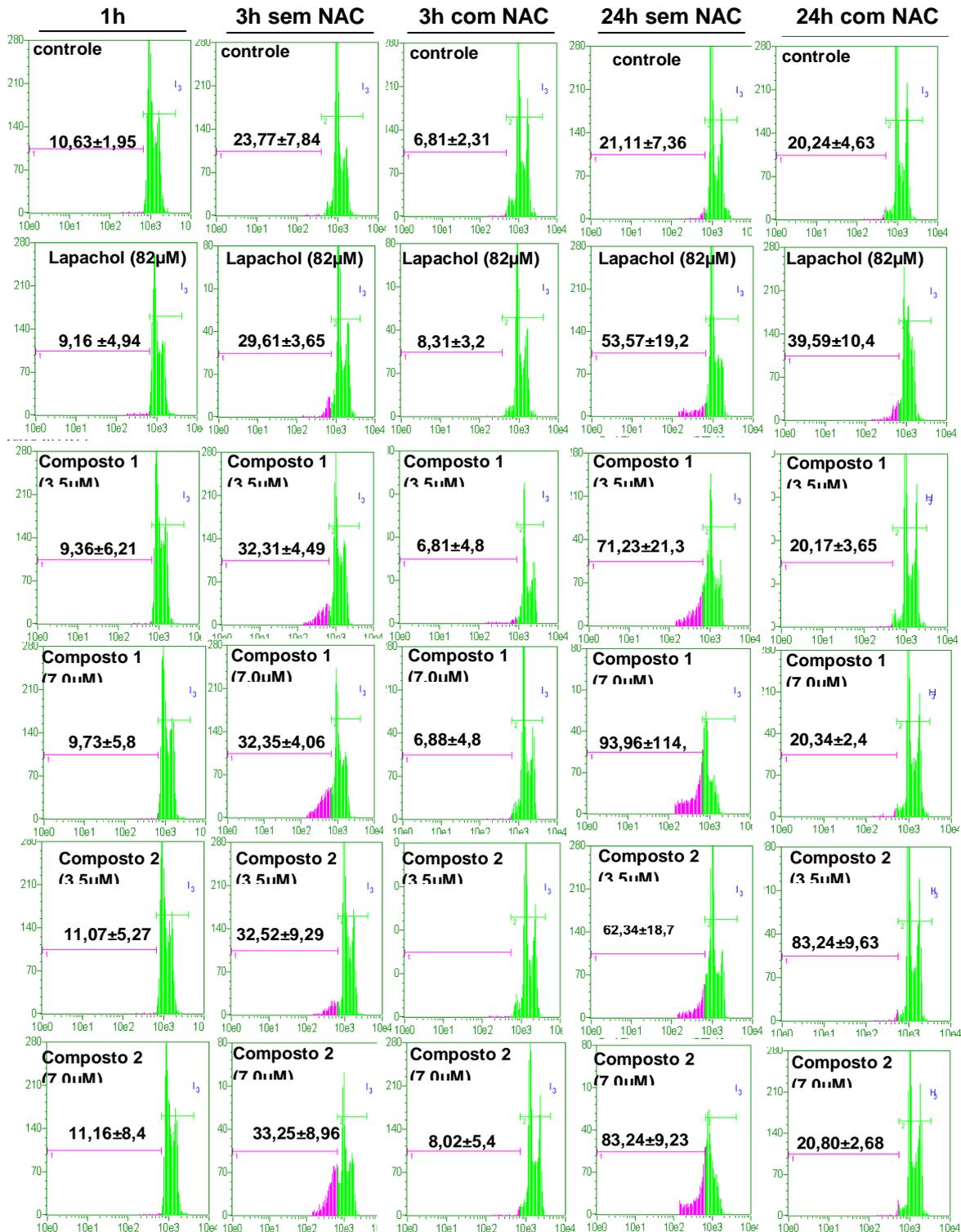
Esses efeitos foram abolidos quando as células foram pré-incubadas com NAC, exceto para o lapachol (Figura 17) cuja fragmentação foi de 44,54%.

Figura 16. Efeito do Lapachol e seus análogos sintéticos (compostos **1** e **2**) sobre a fragmentação de DNA de células leucêmicas de HL-60.



Efeito do Lapachol e seus análogos sintéticos (compostos **1** e **2**) sobre a fragmentação de DNA de células leucêmicas de HL-60, analisado por citometria de fluxo utilizando iodeto de propídeo, após 1, 3 e 24 horas de incubação. O controle negativo (Controle) foi tratado com o veículo utilizado para diluir as substâncias testadas. Os dados correspondem à média \pm E.P.M. de três experimentos independentes. Cinco mil eventos foram contados em cada experimento. *, p < 0,05 e **, p < 0,01 comparado com o controle negativo por ANOVA seguido pelo teste de Dunnett.

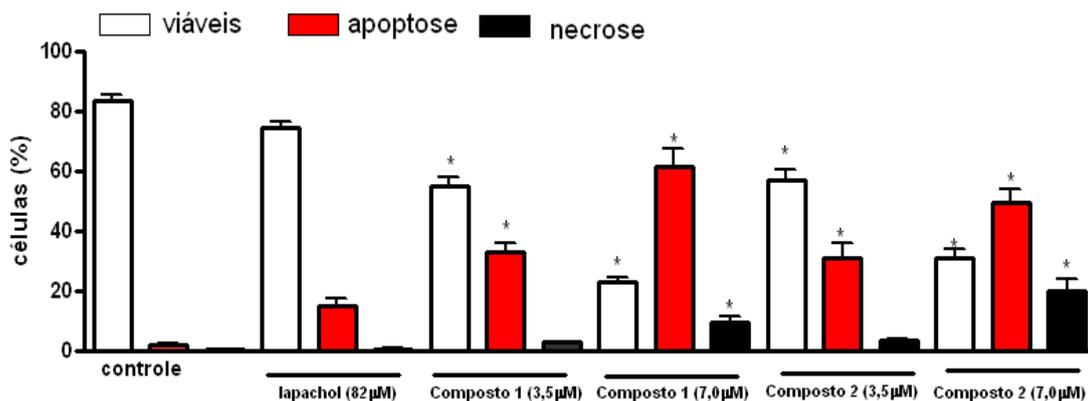
Figura 17. Histograma dos efeitos do lapachol e dos compostos 1 e 2 sobre a fragmentação do DNA de células HL-60 determinado por citometria de fluxo.



Efeito do Lapachol e dos seus análogos sintéticos (compostos 1 e 2) sobre a fragmentação do DNA de células HL-60, analisado por citometria de fluxo utilizando iodeto de propídeo, após 1.3 e 24 horas sem NAC ou pré-tratadas com NAC por 1h. Os dados correspondem à média de três experimentos independentes. Cinco mil eventos foram contados em cada experimento e comparados com o controle negativo por ANOVA seguido pelo teste de Dunnett.

A ativação das caspases 3/7 na apoptose induzida pelos compostos estudados foi avaliada e os resultados obtidos mostram que os composto **1** e **2** promoveram ativação destas caspases quando comparadas ao controle negativo (células não-tratadas). O lapachol não ativou as caspases 3 e 7 de maneira significativa na concentração e no de intervalo de tempo testados (Figura 18). Após tratamento de 24 horas, a porcentagem de células em apoptose observada foi de respectivamente, 15,03%, 33,17% e 31,02 % para o lapachol (82 μ M) e os compostos **1** e **2** (3,5 μ M) e 61,83 % e 49,60% para os compostos **1** e **2** (7,0 μ M). Já o percentual de células em necrose observado após o tratamento de 24 horas com os compostos estudados foi de respectivamente, 0,70%, 3,00% e 3,50% para o lapachol (82 μ M) e os compostos **1** e **2** (3,5 μ M) e 9,34% e 20,29% para os compostos **1** e **2** (7,0 μ M).

Figura 18. Efeito do lapachol e dos compostos 1e 2 sobre a ativação de caspases 3 e 7 de células HL-60 determinado por citometria de fluxo

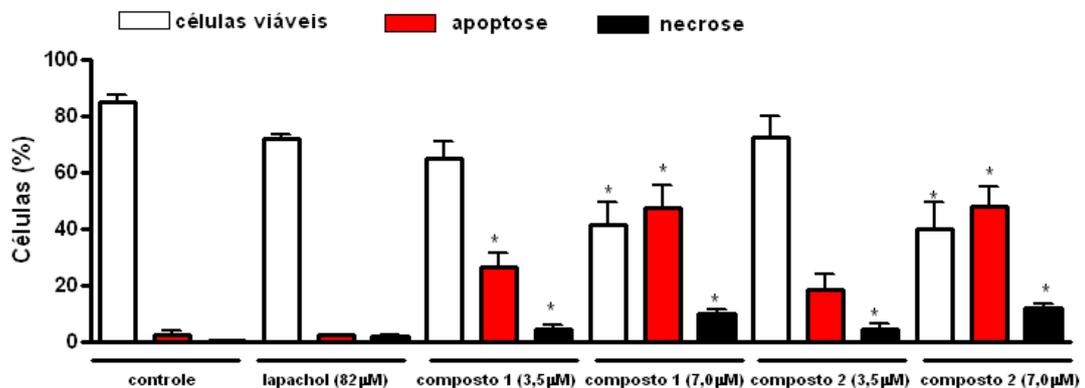


Efeito do Lapachol (82 μ M) e seus análogos sintéticos (3,5 e 7 μ M) sobre a ativação das caspases 3 e 7 em células HL-60 determinada por citometria de fluxo utilizando iodeto de propídio e FLICA, após tratamento de 24h. Os dados obtidos de dois experimentos independentes feitos em triplicata. *, $p < 0,05$, comparado com o controle por ANOVA seguido de teste Dunnett. Cinco mil eventos foram adquiridos.

A fim de saber se a apoptose induzida pelo tratamento com o lapachol e seus análogos era por via intrínseca, ou seja, com envolvimento da mitocôndria a ativação da caspase 9 foi avaliada. Os dados mostram que houve ativação da caspase 9 nas células tratadas com os compostos **1** e **2** após exposição de 24h (Figura 19). O lapachol, no entanto, não ativou a caspase 9 na concentração e intervalo de tempo testado. Após tratamento de 24h, a porcentagem de células em apoptose observada foi de respectivamente, 2,38%, 26,54% e 18,54% para o lapachol (82 μ M) e os compostos **1** e **2** (3,5 μ M) e 47,48% e 47,84% para os

compostos **1** e **2** (7,0 μ M). Já para células em necrose o percentual observado após o tratamento de 24h com os compostos estudados aqui foi de respectivamente, 3,8%, 8,87% e 13,50% % para o lapachol (82 μ M) e os compostos **1** e **2** (3,5 μ M) e 14,39% e 14,46% para os compostos **1** e **2** (7,0 μ M).

Figura 19. Efeito do lapachol e dos compostos 1 e 2 sobre a ativação de caspase 9 de células HL-60 determinado por citometria de fluxo



Efeito do Lapachol (82 μ M) e seus análogos sintéticos (3,5 e 7 μ M) sobre a ativação das caspase 9 em células HL-60 determinada por citometria de fluxo utilizando iodeto de propídio e FLICA, após tratamento de 24h. Os dados obtidos de dois experimentos independentes feitos em triplicata. *, $p < 0,05$, comparado com o controle por ANOVA seguido de teste Dunnett. Cinco mil eventos foram adquiridos.

O lapachol (82 μ M) e os compostos **1** e **2** (3,5 e 7,0 μ M) induziram a quebra de fitas de DNA de células HL-60, dados mostrados na tabela 5.

A pré-incubação da cultura de HL-60 com NAC por 1h, protegeu o material genético dessas células das agressões destes compostos quando comparado aos experimentos conduzidos na ausência de NAC (Tabela 5).

Tabela 5. Avaliação do potencial genotóxico do lapachol e seus análogos sintéticos (composto 1 e composto 2) em células HL-60 pelo ensaio do cometa, após 1h de incubação.

substâncias	Concentração (μM)	Índice de Dano (ID)	Índice de Dano (ID)
		1h sem NAC	1h com NAC
Controle	-	5,500	7,667
Lapachol	82	87,00*	12,50
Composto 1	3,5	109,0**	12,83
Composto 1	7,0	219,0***	10,50
Composto 2	3,5	117,3**	10,67
Composto 2	7,0	227,0***	9,000

A tabela apresenta os valores correspondentes à média de dois experimentos independentes realizados em duplicata, obtidos a partir da contagem de 100 células por experimento. *, $p < 0,05$, **, $p < 0,01$, *** $p < 0,001$ comparado com o controle negativo por ANOVA seguido pelo teste de comparações múltiplas de Dunnet.

5 DISCUSSÃO

Quinonas são amplamente utilizadas como anticancerígenos (FOYE, 1995). A citotoxicidade desses compostos está relacionada com seu ciclo redox (O'BRIEN, 1995). As quinonas estão sujeitas a redução de 1 elétron, por exemplo pela NADPH dependente de citocromo P450 redutase formando radical semi-quinona, ou redução de 2 elétrons formando hidroquinonas (BRUNMARK; CADENAS, 1989).

Em condições aeróbicas, os radicais semi-quinonas são rapidamente oxidados pelo oxigênio molecular formando espécies reativas de oxigênio que podem ser exploradas em terapias antineoplásicas (MANDA; NECHIFOR; NEAGU, 2009). Vários estudos têm demonstrado que os efeitos de drogas anticâncer pertencentes ao grupo das quinonas deve-se, em parte, a geração de EROs intracelular (PELICANO; HUANG, 2004).

O lapachol (2-hidroxi-3(3-metilbutenil)-1-4-naftoquinona) é uma naftoquinona que demonstrou possuir atividade anticâncer, porém seus efeitos tóxicos impediu sua utilização em humanos (SANTANA, SILVA, 1981). Vários análogos do lapachol tem sido desenvolvidos e a citotoxicidade desses compostos interfere diretamente na proliferação celular, mostrando que possuem potencial anticâncer (KLAUS *et al*, 2009).

A síntese de análogos mais promissores de compostos anticancer tem sido comumente utilizada para descobrir os grupamentos essenciais à atividade biológica, e isso pode ser feito através da relação entre estrutura química e atividade biológica servindo de base para otimização molecular (GARRETT; WORKMAN, 1999; WILSON; DANISHEFSKY, 2007).

Neste trabalho, buscou-se investigar as propriedades citotóxicas e o mecanismo da ação citotóxica do naftoquinonas sintéticas (compostos **1** e **2**) análogas do lapachol, além de analisar a participação de EROs na atividade citotóxica dessas naftoquinonas.

Inicialmente, o potencial antiproliferativo dos compostos em estudo foi determinado através do ensaio do MTT após 72h de incubação em cultura de células leucêmicas (HL-60) e células mononucleares do sangue periférico de voluntários sadios (CMSP). Foi observado que a CI_{50} dos compostos estudados foi

maior nas células normais (CMSP) mostrando que as células HL-60 são mais sensíveis aos efeitos citotóxicos dos compostos **1** e **2**.

Em estudo comparativo da citotoxicidade do lapachol e naftoquinonas derivadas sobre três linhagens leucêmicas e CMSP, Salustiano e colaboradores observaram que tanto o lapachol como seus derivados apresentaram menor CI_{50} nas linhagens leucêmicas quando comparadas as células normais (CMSP) (SALUSTIANO *et al.*, 2009)

Análise de células de cultura primária de leucemia isoladas de pacientes com vários tipos de leucemia mostraram que há uma aumento significativo de EROs em células leucêmicas comparadas com linfócitos normais (DEVI *et al.* 2000; HILEMAN *et al.*, 2003; ZHOU *et al.*, 2003). O aumento da expressão de oncogenes como c-myc e ras, da taxa metabólica e do mau funcionamento da cadeia respiratória em células tumorais está relacionado com o aumento da indução de EROs intracelular quando comparado à células normais (VAFA *et al.*, 2002).

De fato, as células cancerosas estão sob um aumento intrínseco de EROs intracelular o que pode providenciar uma oportunidade de matar estas células baseados na sua vulnerabilidade a insultos provocados pelo incremento de EROs (PELICANO; CARNEY; HUANG, 2004). Quando células normais e cancerosas são expostas a quantidades equivalentes de EROs exógenos ou a agentes estimulantes de EROs intracelular, as células tumorais atingem mais facilmente um limiar de dano, levando ao acúmulo produtos oxidativos de DNA, proteínas e lipídios que desencadeiam a morte celular (OZBEN, 2007).

Isso explica os achados relativos a maior sensibilidade de células tumorais à abordagens terapêuticas pró-oxidantes que tem sido observado em muitos estudos, incluindo o nosso (JING *et al.*, 2002, YI *et al.*, 2004).

Como já foi dito, a ação citotóxica das quinonas deve-se em parte a geração de EROs por esse grupo químico. O antioxidante n-acetil-cisteína (NAC) tem sido capaz de interferir no programa pro-apoptótico induzido por EROs através da reposição intracelular do conteúdo de glutathiona reduzida (COSSARIZZA *et al.*, 1995). Esses argumentos tornam consistentes os achados de CI_{50} após 24h de

exposição com as drogas teste com e sem presença de NAC, quando foi observado o aumento da Cl_{50} do lapachol e seus análogos na presença de NAC.

Após observar a participação de EROs no efeito citotóxico do lapachol e dos compostos **1** e **2**, a geração de EROs induzida por esses compostos após 1h de tratamento foi mensurada em células HL-60. Constatou-se que a geração de EROs induzida pelos análogos do lapachol foi mais intensa que pelo seu protótipo. Sabe-se que o lapachol possui a capacidade de induzir estresse oxidativo através da formação intracelular de EROs, como peróxido de hidrogênio (H_2O_2), o ânion-radical superóxido (O_2^-) e o radical hidroxila ($HO\cdot$) (SILVA; FERREIRA ; SOUZA, 2003). Interessantemente, em estudo realizado por Klaus e colaboradores para avaliar o dano oxidativo em células HaCaT (queratinócitos humanos) induzido por várias 1,4-naftoquinonas observou-se que o lapachol (100 μ M) não foi capaz de gerar ânion superóxido e nem de aumentar a formação de glutathiona oxidada (GSSG), enquanto outras naftoquinonas como juglona e plumbagina apresentaram potente indução de EROs nessa linhagem celular (KLAUS *et al.*, 2010).

A apoptose é a principal via de morte celular utilizada para remover células defeituosas ou não desejadas do organismo de uma maneira “limpa” durante o desenvolvimento embrionário, homeostase tecidual e regulação imune (ELLIS; YUAN; HORVITZ, 1991). Muitas terapias anticâncer são baseadas na ativação das vias pró-apoptóticas (LAMKANFI *et al.*, 2002). Duas vias distintas iniciam a apoptose: A via extrínseca que conta com a ativação de receptores de morte (BEYAERT *et al.*, 2002), e a via intrínseca que começa com a liberação de fatores pro-apoptóticos mitocondriais em resposta a vários tipos de estímulos danosos à célula, como por exemplo o aumento intracelular de EROs (FESTJENS, *et al.*, 2004).

A morte celular programada sob algumas condições perde as características típicas de apoptose assumindo características típicas de necrose (KALAI *et al.* 2002). As características da necrose são: aumento do volume citoplasmático, dano irreversível da membrana celular e colapso das organelas (FIERS *et al.* 1999).

A análise morfológica pelo método de coloração May-Grünwald-Giemsa é uma excelente metodologia que nos permite sugerir o tipo de morte celular induzida pelo tratamento com o lapachol e os compostos **1** e **2**. Dessa forma, na análise morfológica de células HL-60 foram observadas alterações características tanto de

apoptose como de necrose após exposição de 24 horas ao lapachol e seus análogos.

A excessiva produção de EROs pode induzir dano a vários componentes celulares (HENSLEY et al., 2000). O dano ao DNA será discutido mais adiante. O dano a proteínas pode ocorrer por modificações oxidativas diretas em cadeias laterais e por clivagem de peptídeos mediada por EROs (STADTMAN, 1990). As membranas lipídicas também são vulneráveis ao ataque de EROs. Uma vez iniciada, a peroxidação lipídica produz radicais orgânicos que propagam a reação de peroxidação resultando em um dano substancial à célula (HALLIWELL; GUTTERIDGE, 1993). Tal evento diminui a fluidez das membranas biológicas e aumentam a sua permeabilidade com conseqüente indução de morte celular programada (MOREL *et al.*, 1990).

Assim, EROs e o dano oxidativo tem sido implicado na indução de apoptose (TAMARIT; CABISCOL, 1998). Entretanto, oxidação celular maciça pode levar a morte celular por necrose em vez de apoptose (BROWN; BORUTAITE, 2002, HIGUCHI, 2003) e ainda uma combinação de apoptose e necrose pode ocorrer (KROEMER *et al.*, 1998). Sob estresse oxidativo, SAPK (proteína quinase ativada por estresse) membro da família MAPK (proteína quinase ativada por mitógeno) é ativada e sua ativação é particularmente importante na apoptose dependente de mitocôndria (TOURNIER *et al.*, 2000). ASK-1, um regulador de SAPK, é considerado a ligação entre EROs e SAPK. Em células que não estão sob estresse oxidativo, ASK1 é inativada através de sua ligação com TRX que quando oxidada se dissocia de ASK1 que por sua vez ativa SAPK, desencadeando a fosforilação de fatores pró-apoptóticos, incluindo P53 que pode aumentar a permeabilização da membrana externa da mitocôndria por ligação direta com membros da família Bcl-2 (Bax e Bak) (TOURNIER *et al.*, 2000; RICCI; ZONG, 2006).

A morte celular necrótica induzida por TNF- α tem a participação de EROs (KIM *et al.*, 2007; JACOB *et al.*, 2005). Fiers e colaboradores especulam que a mitocôndria seja a principal fonte de EROs mediadora de necrose (FIERS *et al.*, 1999).

A citometria de fluxo possibilita a diferenciação dos tipos de morte celular por métodos como análise da integridade de membrana celular e fragmentação do DNA. Estes ensaios baseiam-se na capacidade do corante iodeto de propídio (PI), em

penetrar nas células cujas membranas encontram-se danificada, característica de morte celular por necrose (MARINHO *et al.* 2009; VERMES, HAANEN, REUTELINGSPERGER, 2000).

Na análise da integridade de membrana celular por citometria de fluxo observou-se que somente a partir de 24 horas de exposição aos compostos testados foi possível observar uma diminuição significativa da integridade da membrana celular. Estes efeitos foram abolidos quando o lapachol e os compostos **1** e **2** foram co-administrados com NAC. Entretanto, o NAC não interferiu na citotoxicidade exercida pelo lapachol em células HL-60, sugerindo a participação de outros mecanismos independentes da geração de EROs. Outras naftoquininas (β -lapachona, por exemplo) também demonstraram que a geração de EROs não é o único mecanismo responsável pelos seus efeitos citotóxicos (REINICKE *et al.*, 2005). Esses resultados corroboram com os achados na análise morfológica. Além disso, o lapachol e os compostos **1** e **2** causaram diminuição da densidade celular após tratamento de 24 horas.

Em muitos casos, a terapia anti-câncer resulta na ativação de caspases, uma família de proteases, que atuam como moléculas efetoras em vários tipos de morte celular (DEGTEREV, *et al.*, 2003). As caspases são sintetizadas em sua forma inativa (pró-caspase) que quando clivadas em seus resíduos de cisteínas tornam-se ativas e vão fosforilar outros substratos intracelulares formando uma cascata que culmina na morte celular (DEGTEREV, *et al.*, 2003).

Nós avaliamos a ativação da caspase 9, relacionando assim a apoptose induzida pelas naftoquinonas estudadas com a via intrínseca, bem como a ativação de caspases efetoras 3 e 7 e observamos que estas caspases estão ativadas na presença dos compostos que estudamos, exceto o lapachol que parece não ativar essas caspases na concentração e intervalo de tempo estudados (24 horas). Vários estudos mostram que a ação citotóxica de outras naftoquinonas também envolve a ativação de caspase 9, 3 e 7 (YONG-SAM *et al.*, 2010; MARINHO *et al.*, 2010).

A geração de EROs durante a apoptose pode ser associada a um mau funcionamento da cadeia respiratória e permeabilidade da membrana mitocondrial que é caracterizada pela abertura do complexo de poros de transição de permeabilidade (PT) o qual resulta na liberação de citocromo c e formação de

apoptossomo que conta com a participação da caspase 9. Esta por sua vez, ativa as caspases efetoras 3 e 7 responsáveis pelos eventos finais da apoptose (ZAMZAMI, *et al.*, 1995; BOYA *et al.*, 2003) .

A apoptose é morfológicamente caracterizada por algumas alterações celulares como: condensação da cromatina, formação de corpos apoptóticos e fragmentação do DNA (GALLUZZI *et al.*, 2011). A fragmentação do DNA ocorre pela ativação da DNase dependente de caspase (CAD) (ENARI *et al.*, 1998) . Métodos de detecção de fragmentação do DNA tem sido usados vastamente para mensurar apoptose (KROEMER: MARTINS, 2005).

A fragmentação do DNA é um evento presente tanto na necrose com na apoptose. A análise da fragmentação do DNA em células tratadas com o lapachol e seus análogos foi observada somente a partir de 3h de exposição às substâncias testadas . Tal efeito foi muito mais intenso após 24h de incubação e abolido quando o lapachol e os compostos **1** e **2** foram co-administrados com NAC, mostrando que a participação de EROs é um fator determinante na indução dos efeitos sobre o DNA das células tratadas. Outras naftoquinonas, como por exemplo a β -lapachona, induz a fragmentação do DNA (CHIANG *et al.*, 1999).

O dano causado por EROs é considerado o tipo de lesão mais comum do DNA (DIPILLE,1995). Devido a sua reatividade química natural, EROs são capazes de atacar vários componentes do DNA, levando a geração de uma variedade de produtos modificados mediados por EROs, incluindo bases oxidadas (por exemplo: 8-oxo-dG), quebra de fitas de DNA, crosslinks DNA-proteína (RANDERATH *et al.*, 1996; LLOYD *et al.*,1997). A geração de radical superóxido (O_2^-) na mitocôndria pode causar danos tanto ao DNA mitocondrial como também ao DNA nuclear por sua conversão em peróxido de hidrogênio (H_2O_2), o qual é mais estável e capaz de atravessar a membrana nuclear. Na presença de íons Fe^{++} o H_2O_2 é convertido em radical hidroxila OH^\cdot que causa severos danos ao DNA (KUCHINO, *et al.*, 1987 SHIBUTANI *et al.*, 1991).

A mais extensivamente estudada das oxidações do DNA é a 8-oxo-deoxiguanosina, principalmente por que é a mais facilmente detectada. Esse tipo de lesão pode causar mutações que envolvem transversões CG \rightarrow TA (LUNEC *et al.*, 2002).

Kumagai e colaboradores demonstraram que o metabolismo do lapachol na presença de P450 redutase e NADPH causa dano ao DNA devido a bioativação desse composto e consequente geração de anião superóxido e radical hidroxila (KUMAGAI *et al.*, 1997). Outras naftoquinonas também demonstraram causar dano as moléculas de DNA, em estudo realizado por Cavalcanti foi observado que a β -lapachona e a nor- β -lapachona causaram a indução de quebra de fitas de DNA (CAVALCANTI, 2010). Entretanto, alguns estudos mostram que estas naftoquinonas não interagem diretamente com o DNA, ao contrário, elas induzem à danos secundários, por exemplo, via EROs (OLIVEIRA-BRETT *et al.*, 2002).

Esses resultados condizem com nossos achados, onde podemos observar que tanto o lapachol como os seus análogos (compostos **1** e **2**) aumentaram o padrão de migração do DNA após a eletroforese (ensaio do cometa) indicando a ocorrência de lesões à molécula de DNA.

Os resultados encontrados neste estudo indicam que a geração de EROs é essencial para a citotoxicidade dos compostos **1** e **2**, sendo o evento inicial para causar os danos na célula que resultam em apoptose ou necrose. Tais resultados encorajam a continuação de estudos com moléculas derivadas do lapachol visto que esses compostos demonstram ser potencialmente anticancerígenos.

6 CONCLUSÃO

Os análogos do lapachol mostraram-se mais ativos em células leucêmicas (HL-60) que em células normais (CMSP), causando morte celular tanto por necrose como por apoptose. A morte celular induzida por estes compostos está relacionada com a ativação de caspases envolvidas com a via intrínseca e à lesões causadas à molécula de DNA. Tais efeitos estão relacionados com a geração de espécies reativas de oxigênio intracelular.

REFERÊNCIAS

- ALEXANDRE J. *et al.* Accumulation of hydrogen peroxide is an early and crucial step for paclitaxel-induced cancer cell death both in vitro and in vivo. **Cancer Cell Biol.**, v.119, p. 41-48, 2006.
- ALMEIDA, E. R. *et al.* Antiinflammatory action of Lapachol. **J. Ethnopharmacol.**, v. 29, p. 239-241, 1990.
- AMSTAD P.; MORET R.; CERRUTTI P., Glutathione peroxidase compensates for the hypersensitivity of Cu, Zn-superoxide dismutase overproducers to oxidative stress, **J. Biol. Chem.**, v.269, p 1606-1609, 1994.
- 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. **Bioorg. Med. Chem. Lett.**, v.14, p. 1145–1149, 2004.
- ASCHE, C. Antitumour quinones. **Mini Rev. Med. Chem.**, v. 5, p. 449-467, 2005
- BEHREND L.; HENDERSON G.; ZWACKA R.M. Reactive oxygen species in oncogenic transformation. **Biochem. Soc. Trans.**, v.31, p. 1441-1444, 2003
- BERGMAN, P. J.; HARRIS, D. Radioresistance, chemoresistance and apoptosis resistance. The past, present and future. **Vet. Clin. N. Am.**, v. 27, p. 47-57, jan. 1997.
- BEYAERT, R. *et al.*, Signaling to gene activation and cell death by tumor necrosis factor receptors and Fas. **Int. Rev. Cytol.**, v. 214, p. 225–272, 2002.
- BLOCK, J.B. *et al.* Early clinical studies with lapachol. **Cancer Chemother. Rep.** 2, v.4, p. 27-28,1974.
- BOYA, P. *et al.* The chemopreventive agent N-(4-hydroxyphenyl)retinamide induces apoptosis through a mitochondrial pathway regulated by proteins from the Bcl-2 family. **Oncogene**, v. 22, p. 6220–6230, 2003.
- BRECKENRIDGE, D. G. *et al.* Regulation of apoptosis by endoplasmic reticulum pathways. **Oncogene**, v.22, p. 8608-8618, 2003.
- BROWN, G.C.; BORUTAITE, V. Nitric oxide inhibition of mitochondrial respiration and its role in cell death. **Free Radic. Biol. Med.**, v.33, p. 1440-1450, 2002.
- BRUNMARK, A.; CADENAS, E. Redox and addition chemistry of quinoid compounds and its biological implications. **Free Rad. Biol. Med.**, v.7, p. 435-437, 1989.
- BURLINSON, B. *et al.* Fourth international workgroup on genotoxicity testing: results of the in vivo comet assay workgroup. **Mutat. Res.**, v. 627, p. 31-35, 2007.
- BUTLER, M.; DAWSON, M. (Ed.). **Cell culture**. Oxford: Blackwell, 1992.

CAMARA, C.A. *et al.* Molluscicidal activity of 2-hydroxy-[1,4]naphthoquinone and derivatives. **An. Acad. Bras. Ciênc.**, v. 80, n. 2, p. 329-334, 2008.

CAVALCANTI, B. C. **Avaliação *in vitro* do potencial citotóxico de derivados arilaminados nor- β -lapachônicos**: Estudos de mecanismos de ação. 170 f. Tese (doutorado em farmacologia) - Faculdade de Medicina, Universidade Federal do Ceará, Fortaleza, 2010.

CLEMENT, M.V.; PERVAIZ, S. Reactive oxygen intermediates regulate cellular response to apoptotic stimuli: the hypothesis. **Free Rad. Res.**, v.30, p.247-252, 1999.

CLERKIN, J.S. *et al.* Mechanisms of ROS modulated cell survival during carcinogenesis. **Cancer Lett.**, v.266, p. 30-36, 2008.

COLLINS, A. R. *et al.* The comet assay: what can it really tell us? **Mutag. Res.**, v. 375, p. 183-193, 1997.

COLLINS, A. R. The comet assay for DNA damage and repair. **Mol. Biotechnol.**, v. 26, p. 249-261, 2004.

COSSAIZZA, A. *et al.* Protective effect of N-acetylcysteine in tumor necrosis factor- α -induced apoptosis in U937 cells. The role of mitochondria. **Exp. Cell Res.**, v. 220, p. 232-240, 1995.

COSTA-LOTUFO, L. V. *et al.*, N. The cytotoxic and embryotoxic effects of kaurenoic acid, a diterpene isolated from *Copaifera langsdorffii* oleo-resin. **Toxicol.**, v. 40, n. 8, p. 1231-1234, 2002

CROSS A.R.; JONES O.T.; Enzymic mechanisms of superoxide production. **Biochem. Biophys. Acta**, v. 1057, p.281-298, 1991.

DALEM, V.E.C. *et al.* Cardioprotective interventions for patients receiving anthracyclines. **The Cochrane Library**, 2008.

DARZYNKIEWICZ, Z. *et al.* Features of apoptotic cells measured by flow cytometry. **Cytometry**, v. 13, p. 795-808, 1992.

DAVYDOV, D.R. Microsomal monooxygenase in apoptosis, another target for cytochrome c signaling? **Trends Biochem. Sci.**, v. 26, p. 155-160, 2001.

DEVI, G. S. *et al.* Free radicals antioxidant enzymes and lipid peroxidation in different types of leukemia. **Clin. Chim. Acta**, v.293, p. 53-62, 2000.

DIPPLE, A. DNA adducts of chemical carcinogens. **Carcinogenesis**, v. 16, p. 437-441, 1995.

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, 2000.

DUTHIE, S. J.; MCMILLAN, P. Uracil misincorporation in human DNA detected using single cell gel electrophoresis. **Carcinogenesis**, v. 18, p. 1709-1714, 1997.

ELLIS, R.E.; YUAN, J.Y.; HORVITZ, H.R. Mechanisms and functions of cell death. **Annu. Rev. Cell Biol.**, v. 7, p. 663–698.

ESTEVEZ-SOUZA, A. *et al.* Cytotoxic and DNA-topoisomerase effects of lapachol amine derivatives and interactions with DNA. **Braz. J. Med. Biol. Res.**, v. 40, p. 1399-1402, 2007.

EYONG, K.O. *et al.*, Semisynthesis and antitumoral activity of 2-acetylfuranonaphthoquinone and other naphthoquinone derivatives from lapachol. **Bioorg. Med. Chem. Lett.**, v.18, p. 5387–5390, 2008.

FESTJENS, N. *et al.* Bcl-2 family members as sentinels of cellular integrity and role of mitochondrial intermembrane space proteins in apoptotic cell death. **Acta Haematol.**, v. 111, p. 7–27, 2004.

FIERS, W. *et al.* More than one way to die: Apoptosis, necrosis and reactive oxygen damage. **Oncogene**, v.30, p. 7719-7730, 1999.

FLEURY, C.; MIGNOTTE, B.; VAYSSIÈRE J. Mitochondrial reactive oxygen species in cell death signaling. **Biochimie**, v.84, p. 131-141, 2002.

FONSECA, S.G.; BRAGA, R.M.C.; SANTANA, D.P. Lapachol-química, farmacologia e métodos de dosagem. **Rev. Bras. Farm.**, v.84, p. 9-16, 2003.

FONTES, A.P.; CÉSAR, E.T.; BERALDO, H. A química inorgânica na terapia do câncer. **Cadernos Temáticos da Química Nova na Escola**, v.6, p.13-18, 2005.

FOYE, W. O. (Ed.). **Cancer chemotherapeutic agents**. Washington D.C: American Chemical Society, 1995.

GALLUZZI, L. *et al.* Molecular definitions of cell death subroutines: recommendations of nomenclature Committee on cell death 2012. **Cell Death Differ.**, p.1-14, 2011.

GALM, U. *et al.*, Antitumor antibiotics: bleomycin, enediyne and mitomycin. **Chem. Rev.**, v.105, p. 739-758, 2005.

GARDNER, A. M. *et al.* Apoptotic vs nonapoptotic cytotoxicity induced by hydrogen peroxide. **Free Radic. Biol. Med.**, v.22, p. 73-83, 1997.

GARRETT, M. D.; WORKMAN, P. Discovering Novel Chemotherapeutic Drugs for the Third Millennium. **Eur. J. Cancer**, v. 35, p. 2010-2030, 1999.

GEWIRTZ, D. A. A critical evaluation of the mechanisms of action proposed for the antitumor effects of the anthracycline antibiotics adriamycin and daunorubicin. **Biochem. Pharmacol.**, v.57, p. 727-741, 1999.

GILES, G. I. The redox regulation of thiol dependent signaling pathways in cancer. **Curr. Pharm.**, v.12, p.4427-4443, 2007.

GOEL, R. K. *et al.*, Effect of Lapachol, a naphthoquinone isolated from *Tectona grandis*, on experimental peptic ulcer and gastric secretion. **J. Pharm. Pharmacol.**, v.39, p. 138-140, 1987.

GONÇALVES DE LIMA, O. *et al.* Primeiras observações sobre a ação antimicrobiana do Lapachol. **Rev. Inst. Antibiót.**, v. 4, n. 1/2, p. 12, 1956.

GONÇALVES DE LIMA, O.; WEIGERT, E. Atividade antimicrobiana e antineoplásica de Juglona, Lapachol e Plumbagina. **Rev. Inst. Antibiót.**, v.12, n. 1/2, p. 3-12, 1972.

GOODWIN, T. W.; MERCER, E. I. **Introduction to plant biochemistry**. New York: Pergamon Press, 1972.

GOULART, M.O.F. *et al.* Trypanomicidal activity and redox potential of heterocycliacand 2-hidroxy-naphthoquinones. **Bioorg. Med. Chem. Lett.**, v. 7, n. 15, p. 2043-2048, 1997.

GRIVICICH, I.; REGNER, A.; ROCHA, A. B. Morte celular por apoptose. **Rev. Bras. Cancerol.**, v. 53, n. 3, p. 335-343, 2007.

GUPTA A.; MUMPER R. Elevated copper and oxidative stress in cancer cells as a target for cancer treatment. **Cancer Treat. Rev.**, v.35, p. 32-46, 2009.

HALLIWELL, B. Oxidative stress and cancer: Have we moved forward? **Biochem. J.** v.401, p. 1-11, 2007.

HALLIWELL, B.; CLEMENT, M V.; LONG, L.H. Hydrogen peroxide in the human body. **Free Radic. Lett.**, v.486, p. 10-13, 2000.

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

HANAHAN, D.; WEINBERG, R.A. The hallmarks of cancer: The next generation. **Cell**, v.144, p. 646-674, 2011.

HARTMANN, A.; SPEIT, G. The contribution of cytotoxicity to DNA-effects in the single cell gel test (Comet assay). **Toxicol. Lett.**, v. 90, p. 183-188, 1997.

HAWLEY, S.T. **Introduction to flow cytometry**: a learning guide. San Jose, CA: BD Bioscience, 2000. Disponível em <http://www.stemcell.umn.edu/prod/groups/med/@pub/@med/documents/asset/med_80691.pdf>. Acesso em: 2 Mar. 2012.

HENSLEY, K. *et al.* Reactive oxygen species, cell signaling and cell injury. **Free Radic. Biol. Med.**, v.28, p. 1456-1462, 2000.

HIGUCHI, Y. Chromosomal DNA fragmentation in apoptosis and necrosis induced by oxidative stress. **Biochem. Pharmacol.**, v. 66, p. 1527-1535, 2003.

HILEMAN, E.O. *et al.* Intrinsic oxidative stress in cancer cells: a biochemical basis for therapeutic selectivity. **Cancer Chemother. Pharmacol.**, 2003.

HLAVATA, L. *et al.* The oncogenic RAS2 (val19) mutation locks respiration, independently of PKA, in a mode prone to generate ROS. **EMBO J.**, v. 22, p. 3337-3345, 2003.

HUSSAIN, S.P.; HOFSETH, L.J.; HARRIS, C.C. Radical causes of cancer. **Nat. Rev. Cancer**, v. 3, p. 276-285, 2003.

INSTITUTO NACIONAL DO CÂNCER (Brasil). **Estimativa 2012**: Incidência de câncer no Brasil. Rio de Janeiro, 2012. Disponível em: <<http://www.inca.gov.br/estimativa/2012/index.asp?ID=2>>. Acesso em: 2 mar. 2012.

JACOB, C. *et al.* c-Cbl mediates ubiquitination, degradation and downregulation of human protease-activated receptor 2. **J. Biol. Chem.**, v. 280, p.16076-16087, 2005.

JING, X. *et al.* Induction of apoptosis in hepatocellular carcinoma cell lines by emodin. **Jpn. J. Cancer Res.**, v.93, p. 874-882, 2002.

KALAI, M. *et al.* Tipping the balance between necrosis and apoptosis in human and murine cells treated with interferon and dsRNA. **Cell Death Differ.**, v. 9, p. 981–994, 2002.

KIM, Y.S. *et al.* TNF-induced activation of Nox 1 NADPH oxidase and role in the induction of necrotic cell death. **Mol. Cell.**, v. 26, p. 675-687, 2007.

KINGSTON, D. G. I. Natural products as pharmaceuticals and sources for lead structures. In: WERMUTH, C.G. (Ed.). **The Practice of Medicinal Chemistry**. London: Academic Press, 1996. p. 102-114.

KLAUS, V. *et al.* 1,4-Naphthoquinones as inducers of oxidative damage and stress signaling in HaCat human keratinocytes. **Arch. Biochem. Biophys.**, v. 496, p. 93-100, 2010.

KONG, Q.; LILLEHEI, K. O. Antioxidant inhibitors for cancer therapy. **Med. Hypoth.**, v. 51, p. 405–409, 1998.

KROEMER, G. *et al.* Classification of cell death: Recommendations of the Nomenclature Committee on cell death. **Cell Death Differ.**, v.10, p. 76-100, 2005.

KROEMER, G.; DALLAPORTA, B.; RESCHE-RIGON, M. The mitochondrial death/life regulator in apoptosis and necrosis. **Annu. Rev. Physiol.**, v. 60, p. 619-642, 1998.

KUCHINO, Y. *et al.* Misreading of DNA templates in containing 8-hydroxydeoxyguanosine at the modified base and at the adjacent residues. **Nature**, v. 327, p. 77–79, 1987.

KUMAGAI, Y. *et al.* Bioactivation of Lapachol responsible for DNA scission by NADPH-cytochrome P450 reductase. **Environ. Toxicol. Pharmacol.**, v.3, p. 245-250, 1997.

LAMKANFI, M. *et al.*, Alice in caspase land, A phylogenetic analysis of caspases from worm to man. **Cell Death Differ.**, v. 9, p. 358–361, 2002.

LEBEL, C.P.; ISCHIROPOULOS, H.; BONDY, S. C. Evaluation of the probe 2',7' dichlorofluorescein as an indicator of reactive oxygen species formation and oxidative stress. **Chem. Res. Toxicol.**, v. 5, p. 227-231, 1992.

LEE Y.; SHACTER E. Oxidative stress inhibits apoptosis in human lymphoma cells. **J. Biol. Chem.**, v. 274, p. 19792-19798, 1999.

LI, Y. *et al.* **Medical Sci.**, v. 90, p. 1839, 1993.

LINARD, M. C. F.; OLIVEIRA, M. M.; SAMPAIO, M.R.P., Lapachol derivative active against mouse lymphocytic leukemia P-388. **J. Med. Chem.**, v. 18, n. 11, p. 1159–1161, 1975.

LIU, H. *et al.*, Activation of apoptosis signal-regulating kinase 1 (ASK 1) by tumor necrosis factor receptor-associated factor 2 requires prior dissociation of the ASK 1 inhibitor thioredoxin. **Mol. Cell. Biol.**, v. 20, p. 2198-2208, 2000.

LLOYD, D. R.; PHILLIPS, D.H.; CARMICHAEL, P.L. Generation of putative intrastrand cross-links and strand breaks in DNA by transition metal ion-mediated oxygen radical attack. **Chem. Res. Toxicol.**, v. 10, p. 393–400, 1997.

LOTEM, J. *et al.* Cellular oxidative stress and the control of apoptosis by wild type P53, cytotoxic compounds and cytokines. **Proc. Natl. Acad. Sci. USA**, v.93, p. 9166-9171, 1996.

LUNDBERG, A.S. *et al.* Genes involved in senescence and immortalization. **Cell Biol.**, v.12, p. 705-709, 2000.

LUNEC, J. *et al.* Urinary 8-oxo-2'-deoxyguanosine: redox regulation of DNA repair in vivo? **Free Rad. Biol. Med.**, v.33, p. 875-885, 2002.

MANDA, G.; NECHIFOR, M.T.; NEAGU, T. Reactive oxygen species, cancer and anti-cancer therapies. **Curr. Chem. Biol.**, v.3, p. 342-366, 2009.

MARINHO, *et al.*, Oxidative stress induction by (+)-cordiaquinone J triggers both mitochondria-dependent apoptosis and necrosis in leukemia cells. **Chem. Biol. Interact.**, v.183, p. 369-379, 2010.

MATES, J.M.; SÁNCHEZ-JIMÉNEZ, F.M. Role of reactive oxygen species in apoptosis implications for cancer therapy. **Int. J. Biochem. Cell Biol.**, v. 32, n.2, p. 157-170, 2000.

MAYER, M.; NOBLE, M. N-acetyl-L-cysteine is pluripotent protector against cell death and enhancer of trophic factor-mediated cell survival *in vitro*. **Proc. Natl. Acad. Sci. USA**, v.91, p. 7496-7500, 1994.

MEHMET, H. Apoptosis: caspase finds a new place to hide. **Nature**, v. 403, p. 29 – 30, 2002.

MOLDEUS, P.; COTGREAVE, I.A.; BERGGREN, M. Lung protection by a thiol-containing antioxidant: N-acetylcysteine. **Respiration, Suppl.** 1, p. 31-42, 1986.

MONKS, T. J. *et al.* Quinone chemistry and toxicity. **Toxicol. Appl. Pharmacol.**, v. 112, p. 2-16, 1992.

MOREL, I. *et al.* Kinetic evaluation of free malondialdehyde and enzyme leakage as indices of iron damage in rat hepatocyte cultures. Involvement of free radicals. **Biochem. Pharmacol.**, v.39, p. 1647-1655, 1990.

MOSMANN, T. Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: application to proliferation and cytotoxicity assays. **J. Immunol. Methods**, v. 65, p. 55-63, 1983.

MÜLLER, K.; SELLMER, A.; WIEGREBE, W. Potential Antipsoriatic Agents: Lapacho Compounds as Potent Inhibitors of HaCaT Cell Growth. **J. Nat. Prod.**, v. 62, p. 1134-1136, 1999.

MURPHY, G.P.; LAWRENCE Jr, W.; LENHARD, R.E. **Textbook of Clinical Oncology**. 2nd ed. [S.I.]: American Cancer Society, 1995.

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

O'BRIEN, P.J. Molecular mechanisms of quinine cytotoxicity. **Chem. Biol. Interact.**, v.80, p. 1-41, 1991.

OBERLEY, T.D. Oxidative damage and cancer. **Am. J. Pathol**, v. 160, n. 2, 2002.

OKI, T. *et al.* **J. Antibiot.**, v. 28, p. 830, 1975.

OLIVE, P. L. Cell proliferation as a requirement for development of the contact effect in Chinese hamster V79 spheroids. **Radiat. Res.**, v. 117, p. 79-92, 1989.

OLIVEIRA-BRETT, A. M.; GOULART, M.O.F.; ABREU, F.C. Reduction of lapachones and their reactions with L-cysteine and mercaptoethanol on glassy carbon electrodes. **Bioelectrochemistry**, v. 19, p. 53-55, 2002.

ORRENIUS, S. Mitochondrial regulation of apoptotic cell death. **Toxicol. Lett.**, v. 149, p. 19, 2004.

ORTHOLAND, J. Y.; GANESAN, A. Natural products and combinatorial chemistry: back to the future. **Curr. Opin. Chem. Biol.** B, v. 8, n. 3, p. 271-280, 2004.

OSTLING, O.; JOHANSON, K.J. Microelectrophoretic study of radiation-induced DNA damages in individual mammalian cells. **Biochem. Biophys. Res. Commun.**, v. 123, p. 291-298, 1984

OZBEN, T. Oxidative stress and apoptosis: Impact on cancer therapy. **J. Pharm. Sci.**, v.96, p. 2181-2196, 2007.

PATERNO, E. **Gazz. Chim. Ital.**, v.12, p 337, 1882.

PELICANO, H.; CARNEY, D.;HUANG, P. ROS stress in cancer by therapeutic implications. **Drug Resist. Updat.**, v. 7, p. 97 -110, 2004.

PERVAIZ, S. *et al.* Superoxide anion inhibits drug-induced tumor cell death. **Febs Lett.**, v. 459, p. 343-348, 1999.

PFUHLER, S.; WOLF, H.U. Detection of DNA- crosslinking agents with the alkaline comet assay. **Environ. Mol. Mutagen.**, v. 27, p. 196-201, 1996.

PICARDO, M.; PASSI, S. Free radicals. In: BOS, J. D. (Ed.). **Skin immune system.** New York: [s.n.], 1997. p. 207-226.

PINKUS R.; WEINER L.M.; DANIEL V. Role of oxidants and antioxidants in the induction of AP-1, NF-KB, and glutathione S-transferase gene expression. **J. Biol. Chem.**, v.271, p. 13422-13429, 1996.

PORTILLO, A. *et al.* Antifungal activity of Paraguayan plants used in traditional medicine. **J. Ethnopharmacol.**, v. 76, p. 93-98, 2001.

PREMEREUR, N.; VANDEN, B.C.; ROELS, F. Cytochrome P-450-dependent H₂O₂ production demonstrated in vivo influence of Phenobarbital and allylisopropylacetamide. **FEBS Lett.**, v. 199, p. 19-22, 1986.

RANDERATH, K. *et al.* Structural origins of bulky oxidative DNA adducts (type III-compounds) as deduced by oxidation of oligonucleotides of known sequence. **Chem. Res. Toxicol.**, v. 91, p. 247-254, 1996.

RAO, K.V.; MCBRIDE, T.J.; OLESON, J.J.; Recognition and Evaluation of Lapachol as an Antitumor Agent. **Cancer Res.**, v.28, p.1952-1954, 1968.

REDDY, L.; ODHAV, B.; BHOOLA, K. D. Natural products for cancer prevention: a global perspective. **Pharmacol. Ther.**, v. 99, p. 1-13, 2003.

REINICKE, K. E. *et al.* Development of β -lapachone prodrugs for therapy against human cancer cells with elevated NAD(P)H: quinone oxidoreductase 1 levels. **Clin. Cancer Res.**, v. 11, p. 3055-3064, 2005.

RENSCHLER, M. F. The emerging role of reactive oxygen species in cancer therapy. **Eur. J. Cancer**, v. 40, p. 1934-1940, 2004.

RICCI, M. S.; ZONG, W. X. Chemotherapeutic approaches for targeting cell death pathways. **Oncologist**, v. 11, p. 342-357, 2006.

SAIFY, Z. S. *et al.* Role of quinines moiety as antitumour agents: a review. **Pak. J. Pharm. Sci.**, v. 12, n. 2, p. 21-23, 1999.

SALMOM-CHEMIN, L. *et al.* 2- and 3-Substituted 1,4-Naphthoquinone Derivatives as Subversive Substrates of Trypanothione Reductase and Lipoamide Dehydrogenase from *Trypanosoma cruzi*: Synthesis and Correlation between Redox Cycling Activities and in Vitro Cytotoxicity. **J. Med. Chem.**, v. 44, p. 548, 2001.

SALUSTIANO, E. J. S. *et al.* Comparison of the cytotoxic effect of lapachol, α -lapachone and pentacyclic 1,4-naphthoquinones on human leukemic cells. **Invest. New Drugs**, v. 28, p. 139–144, 2009.

SANTANA, C. F.; SILVA, A. A. F. Primeiras observações com o emprego de lapachol em pacientes humanos portadores de neoplasias malignas. **Rev. Inst. Antibiót.**, v. 8, p. 257-264, 1996.

SCORRANO, L. *et al.* BAX and BAK Regulation of Endoplasmic Reticulum Ca²⁺: A Control Point for Apoptosis. **Science**, v. 300, p.135-139, 2003.

SEIFRIED, H. E. *et al.* A review of the interaction among dietary antioxidants and reactive oxygen species. **J. Nutr. Biochem.**, v.18, p. 567-579, 2007.

SERRANO, J. *et al.* Cardiosselective and cumulative oxidation of mitochondrial DNA following suchronic doxorubicin administration. **Biochim. Biophys.**, v. 1411, p. 201-205, 1999.

SESTER, E. A. **Avaliação biofarmacêutica do lapachol tópico**: ensaios *in vitro* e *in vivo*. Dissertação (Mestrado em ciências farmacêuticas) - Centro de Ciências da Saúde, Universidade Federal de Pernambuco, Recife, 1996.

SHAPIRO, H. M. **Practical flow cytometry**. 3rd ed. New York: Wiley-Liss, 1995.
SHIBUTANI S.; TAKESHITA M.; GROLLMAN A.P. Insertion of specific bases during DNA synthesis past the oxidation-damaged base 8-oxodG. **Nature**, v. 349, p. 431–434, 1991.

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

- SIMIZU S.; UMEZAWA K.; IMOTO M. Requirement of caspase 3(-like) protease-mediated hydrogen peroxide production for apoptosis induced by various anticancer drugs. **J Biol. Chem.**, v.273, p. 26900-26907, 1998.
- SIMÕES, M. O.; SCKENKEL, E. P.; GOSMANN, G. **Farmacognosia: da planta ao medicamento**. 4. ed. Porto Alegre: Ed. Universidade/UFRGS; Florianópolis: Ed. da UFSC, 2002.
- SIMON, H.U.; HAJ-YEHIA, A.; LEVI-SCHAFFER, F. Role of reactive oxygen species (ROS) in apoptosis induction. **Apoptosis**, v.5, p. 415-418, 2000.
- SINGH, N. P. *et al.* A simple technique for quantification of low levels of DNA damage in individual cell. **Exp. Cell Res.**, v. 175, p. 184-191, 1988.
- STADTMAN, E. R. Metal ion-catalyzed oxidation proteins: biochemical mechanism and biological consequences. **Free Radic. Biol.**, v. 9, p. 315-325, 1990.
- STAHL, W. *et al.* Carotenoid mixtures protect multilamellar liposomes against oxidative damage: synergistic effects of lycopene and lutein. **Febs Lett.**, v. 427, p. 305-308, 1998.
- TAMARIT, J.; CABISCOL, J. ROS, identification of the cells oxidatively damaged proteins in *Escherichia coli* cells exposed to oxidative stress. **J. Biol. Chem.**, v.273, p. 3027-3032, 1998.
- THOMSON, R. H. **Naturally occurring quinones**. London: Chapman and Hall, 1987.
- TICE, R. R. *et al.* Single cell gel/Comet assay: guidelines for in vitro and in vivo genetic toxicology testing. **Environ. Mol. Mutagen.**, v. 35, p. 206–221, 2000.
- TOMASZ, M.; PALOM, Y. **Pharmacol. Ther.**, v. 76, p. 71, 1991.
- TOURNIER, C. *et al.* Requirement of JNK for stress induced activation of cytochrome c-mediated cell death pathway. **Science**, v.288, p.870-874 2000.
- TRACHOOTHAM, D.; ALEXANDRE, J.; HUANG, P. Targeting cancer cells by ROS-mediated mechanisms: A radical therapeutic approach? **Drug Discov.**, v.8, p. 579-591, 2009.
- TSANG, W. P. *et al.* Reactive oxygen species mediate doxorubicin induced p53-independent apoptosis. **Life Sci.**, v.73, p. 2047-2048, 2003.
- USHIO-FUKAI, M.; NAKAMURA, Y. Reactive oxygen species and angiogenesis: NADPH oxidase as target for cancer therapy. **Cancer Lett.**, v.266, p. 37-52, 2008.
- VAFI, O. *et al.* C-Myc can induce DNA damage, increase reactive oxygen species, and mitigate p53 function: a mechanism for oncogene-induced genetic instability. **Mol. Cell**, v. 9, p. 1031-1044, 2002.

VALKO, M. *et al.*, Free radicals, metals and antioxidants in oxidative stress-induced cancer. **Chem. Biol. Interact.**, v. 160 p. 1-40, 2006.

VERCAMMEN, D. *et al.* Dual signaling of the Fas receptor: initiation of both apoptotic and necrotic cell death pathways. **J. Exp. Med.**, v.188, p. 919–930, 1998.

VERMA, R. P. Anti-Cancer Activities of 1,4-Naphthoquinones: A QSAR Study. **Anti Canc. Agents Med. Chem.**, v. 6, p. 489-499, 2006.

VERMES, I *et al.*, Novel assay for apoptosis. Flow cytometric detection of phosphatidylserine expression on early apoptotic cells using fluorescein labeled Annexin v. **J. Immunol. Methods**, v. 184, p. 39- 51. 1995.

WANG, J.; YI, J. Cancer cell killing via ROS: to increase or decrease, that is the question. **Cancer Biol. Ther.**, v. 7, n. 12, p. 1875-1884, 2008.

WARBURG, O. On the origin of cancer cells. **Science**, v.123, p. 309-314, 1956.

WILSON, R. M.; DANISHEFSKY, S. J. Applications of total synthesis toward the discovery of clinically useful anticancer agents. **Chem. Soc. Rev.**, v. 36, p. 1207-1226, 2007.

WOLKENBERG, S.E.; BOGER, D.L. Mechanisms of in situ activation for DNA-targeting antitumor agents. **Chem. Rev.**, v. 102, p. 2477-2495, 2005.

YI, J. *et al.* Emodin enhances arsenic trioxide –induced apoptosis via generation of reactive oxygen species and inhibition of survival signaling. **Cancer Res.**, v. 64, p. 108-116, 2004.

ZAMZAMI, J. M. *et al.* Sequential reduction of mitochondrial transmembrane potential and generation of reactive oxygen species in early programmed cell death. **J. Exp. Med.**, v. 182, p. 367–377, 1995.

ZHOU, Y. *et al.*, Free radical sensitivity to ROS-generating anticancer agents. **Blood**, v.1001, p. 4098-4104, 2003.

ANEXO A – MATERIAIS UTILIZADOS

Equipamentos

Agitador de placa Shaker PSU – 2T plus

Agitador de placa, MLW Modelo Thys 2

Agitador de tubo, Donner AD 8850

Banho-maria, DELLTA Modelo 105Di

Centrífuga Centimicro FANEN Modelo 212

Centrífuga de placas, Eppendorf Modelo Centrifuge 5403

Centrífuga Excelsa Baby I FANEN Modelo 206

Citômetro de fluxo Guava EasyCyte Mine

Espectrofotômetro de placa, DTX 880 Multimode Detector, Beckman Coulter, Inc. Fullerton, California, USA

Estufa de secagem e esterilização FANEM Modelo 315 SE

Fluxo laminar VECO

High Throughput Screening (HTS)/Laboratory Automation Workstation, Biomek 3000, Beckman Coulter

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

Microscópio de fluorescência, Olympus Modelo BX41

Microscópio óptico de inversão, Nikon Diaphot

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

pHmetro, Micronal B474

Pipetas automáticas, Gilson

Soluções e Reagentes

NOMES	CONCENTRAÇÕES	MARCA
Álcool Etílico	70%	Vetec
Iodeto de propídeo 1mg/mL	1mg de iodeto de propídeo	Boehringer
	PBS q.s.p.	-
Meio de cultura de células RPMI 1640	Diluído em água deionizada e esterelizada, filtrado em filtro millipore – 0,22 mm – e complementado com 10% SBF, 1% de glutamina, 1% de antibióticos, 1% de bicarbonato de sódio (0,75%) e 25 mM de HEPES	Cultilab
MTT	20 mg de MTT	Sigma
	PBS q.s.p. 100 mL de solução	-
Penicilina - estreptomicina	Penicilina 10.000 U.I./mL	Cultilab
	Estreptomicina 10 mg/mL	Cultilab
Soro fetal bovino	-	Cultilab
DMSO		Vetec
SSC 10X	Cloreto de sódio 1,5 M	-
	Citrato de sódio 0,15 M	
	H ₂ O	
Tampão fosfato (PBS)	8,766 g de Cloreto de sódio	Labsynth®
	2,14 g de NaHPO ₄ .7H ₂ O	Labsynth®
	0,276 g de NaHPO ₄ .H ₂ O	Labsynth®

	H ₂ O q.s.p. 1 L de solução (pH = 7,2)	-
Tampão Tris (TBS) 10X	Cloreto de sódio 1,5 M	Labsynth®
	Tris 0,5 M (pH= 7,6)	Proquímios®
	H ₂ O	-
Triton X -100	-	Isofar