



UNIVERSIDADE FEDERAL DO CEARÁ
FACULDADE DE MEDICINA
DEPARTAMENTO DE FISIOLOGIA E FARMACOLOGIA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM FARMACOLOGIA

BRUNO COELHO CAVALCANTI

**AVALIAÇÃO *IN VITRO* DO POTENCIAL CITOTÓXICO DE
DERIVADOS ARILAMINADOS *NOR*- β -LAPACHÔNICOS: ESTUDOS
DE MECANISMO DE AÇÃO**

FORTALEZA

2010

BRUNO COELHO CAVALCANTI

**AVALIAÇÃO *IN VITRO* DO POTENCIAL CITOTÓXICO DE DERIVADOS
ARILAMINADOS *NOR*- β -LAPACHÔNICOS: ESTUDOS DE MECANISMO DE
AÇÃO**

Tese submetida à Coordenação do Programa de Pós-Graduação em Farmacologia do Departamento de Fisiologia e Farmacologia da Universidade Federal do Ceará como requisito parcial para a obtenção do título de Doutor em Farmacologia.

Orientadora: Prof^a. Dr^a. Cláudia do Ó Pessoa

FORTALEZA

2010

C365a Cavalcanti, Bruno Coêlho

**Avaliação *in vitro* do potencial citotóxico de derivados arilaminados *nor*- β -lapachônicos: estudos de mecanismo de ação / Bruno Coêlho Cavalcanti. – Fortaleza, 2010.
170 f. : il.**

**Orientadora: Prof^ª. Dra. Cláudia do Ó Pessoa
Tese (Doutorado) – Universidade Federal do Ceará.
Faculdade de Medicina. Programa de Pós-Graduação em Farmacologia.**

1. Ensaio de Seleção de Medicamentos Antitumorais 2. Espécies de Oxigênio Reativas 3. Teste de Mutagenicidade I. Pessoa, Cláudia do Ó (Orient.) II. Título.

CDD: 615.321

BRUNO COELHO CAVALCANTI

**AVALIAÇÃO *IN VITRO* DO POTENCIAL CITOTÓXICO DE DERIVADOS
ARILAMINADOS *NOR-β-LAPACHÔNICOS*: ESTUDOS DE MECANISMO DE
AÇÃO**

Tese submetida à Coordenação do Programa de Pós-Graduação em Farmacologia como parte dos requisitos necessários para obtenção do título de Doutor em Farmacologia, outorgado pela Universidade Federal do Ceará.

A transcrição de qualquer trecho deste trabalho é permitida, desde que seja feita de conformidade com as normas da ética científica.

BANCA EXAMINADORA

Prof^a. Dr^a. Cláudia do Ó Pessoa (Orientadora)
Universidade Federal do Ceará

Prof. Dr. João Antônio Pêgas Henriques
Universidade Federal do Rio Grande do Sul

Prof. Dr^a. Marília Oliveira Fonseca Goulart
Universidade Federal de Alagoas

Prof. Dr. Vietla Satyanarayana Rao
Universidade Federal do Ceará

Prof. Dr. Manoel Odorico de Moraes
Universidade Federal do Ceará

Aos meus pais

AGRADECIMENTOS

À **Dr^a. Cláudia do Ó Pessoa**, pela orientação deste trabalho, pela ajuda, incentivo, amizade, paciência demonstrada em todos os momentos de trabalho em comum e por sua contribuição à pesquisa no Laboratório de Oncologia Experimental;

À **Dr^a. Letícia Veras Costa-Lotuf** pelo incentivo na realização desse trabalho, por todas as dúvidas esclarecidas e pela amizade;

Ao **Dr. Manoel Odorico de Moraes** pelo reconhecimento do meu esforço na tentativa de desenvolver um bom trabalho, por sua contribuição à pesquisa no Laboratório de Oncologia Experimental e pela amizade;

Ao **Dr. Antônio Ventura Pinto** (Universidade Federal do Rio de Janeiro) e ao **Dr. Carlos Kleber de Andrade** e **Dr. Eufrânio N. da Silva Júnior**, da Universidade de Brasília, pela síntese e fornecimento das moléculas estudadas e por todas as dúvidas esclarecidas no decorrer dos estudos;

Aos **Dr. João Antônio Pêgas Henriques**, **Dr^a. Jenifer Saffi** e a doutoranda **Dinara Jaqueline Moura**, da Universidade Federal do Rio Grande do Sul, pela doação da linhagem celular V79 e pela realização de experimentos (leveduras) importantes para o desenvolvimento dessa tese;

À **Dr^a. Marília Oliveira Fonseca Goulart**, da Universidade Federal de Alagoas, pela paciência e boa vontade no esclarecimento de várias dúvidas surgidas durante todas as fases do desenvolvimento dessa tese;

Ao **Dr. Vietla Satyanarayana Rao**, por todas as dúvidas esclarecidas no desenvolver da pesquisa, pelo incentivo e amizade;

Aos amigos e colegas que queimam as pestanas no Laboratório de Oncologia Experimental, pelas brincadeiras e momentos de descontração e pelo apoio que tornaram mais fáceis e prazerosos meu dia-a-dia no laboratório;

Em especial ao mestrando **Felipe Rocha** pela ajuda nos experimentos de citometria de fluxo, ao doutorando **José Roberto** e ao **Dr. Hemerson Iury** pela assistência nos ensaios de citotoxicidade e genotoxicidade, e ao estudante de Ciências Biológicas **Igor Cabral** pelo grande interesse e boa vontade em querer participar e ajudar nos mais diversos experimentos desse e de outros trabalhos e pela formatação dessa tese;

Às técnicas **Silvana, Erivanda e Rogéria** pela imensurável ajuda cedida para a realização dessa teses e a todos os outros trabalhos realizados no laboratório;

À **Aura Yda**, funcionária do Departamento de Fisiologia e Farmacologia, que sempre esteve disposta a ajudar;

Aos funcionários do Departamento de Fisiologia e Farmacologia da UFC: Íris, Fernando e Chiquinho;

Aos professores dos Departamentos de Biologia, Bioquímica e Biologia Molecular e Fisiologia e Farmacologia da Universidade Federal do Ceará, pela contribuição na minha formação acadêmica e profissional;

Ao **Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq)** pelo apoio financeiro, sem o qual seria impossível a realização desse trabalho;

A **Financiadora de Estudos e Projetos (FINEP)**, a **Fundação Cearense de Apoio ao Desenvolvimento Científico e Tecnológico (FUNCAP)** e ao **Banco do Nordeste (BNB)** pelo suporte financeiro indispensável à realização desse trabalho;

Aos meus pais, **Majela e Regina**, pela vida, pela educação e formação moral e pela dedicação em dar oportunidade aos filhos, e juntamente com meus irmãos, **Igor, Lívio e Diego**, que sempre me apoiaram e torceram por mim, formam a minha família;

À **Priscylla**, minha Neguinha, pelo apoio, compreensão, companheirismo, amor e carinho nos momentos mais difíceis;

Aos demais familiares pelo exemplo de união e solidariedade;

À todos que direta ou indiretamente contribuíram para a realização desse trabalho.

RESUMO

Avaliação in vitro do potencial citotóxico de derivados arilamino nor- β -lapachônicos: estudos de mecanismo de ação. Tese de Doutorado apresentada ao programa de Pós-Graduação em Farmacologia. Autor: Bruno Coêlho Cavalcanti. Orientadora: Prof^a. Dr^a. Cláudia do Ó Pessoa. Departamento de Fisiologia e Farmacologia, Universidade Federal do Ceará.

A busca por novos derivados citotóxicos da *nor*- β -lapachona é parte de uma crescente e contínua busca por novos compostos ativos. O presente estudo teve como objetivo avaliar o potencial citotóxico de quatro derivados arilaminos (**1-4**) da *nor*- β -lapachona e os prováveis mecanismos envolvidos na citotoxicidade da *nor*- β -lapachona e de seus derivados. Três derivados (**1**, **3** e **4**) e seu precursor apresentaram elevado potencial citotóxico sobre todas as linhagens celulares tumorais humanas utilizadas. Em estudos com células não tumorais (CMSP), a *nor*- β -lapachona não induziu citotoxicidade, porém seus derivados apresentaram efeitos antiproliferativos, cuja intensidade variou de moderado a fraco com valores de CI_{50} iguais a 5,02 μ M (**1**), 12,02 μ M (**3**) e 10,65 μ M (**4**). Além disso, os compostos não apresentaram efeitos hemolíticos ($EC_{50} > 219,29 \mu$ M). Tanto a *nor*- β -lapachona quanto seus derivados (**1**, **3** e **4**) induziram apoptose (via mitocondrial) em células HL-60, como observado através dos ensaios de análises morfológicas e de citometria de fluxo, e distúrbios sobre a progressão do ciclo celular de células HL-60, apenas na maior concentração (4 μ M). O tratamento com os compostos induziu a formação de EROS, assim como quebras das fitas da molécula de DNA em células HL-60 (NQO1⁻) e DU-145 (NQO1⁺). A co-administração de GSH reduziu a sensibilidade celular aos efeitos tóxicos dos compostos estudados, e o pré-tratamento com agentes antioxidantes (NAC e IK) reduziu drasticamente a produção de radicais livres, o mesmo não ocorrendo com culturas pré-tratadas com BH (agente depletor de GSH). Porém, o dicumarol (inibidor de NQO1) preveniu a formação de EROS e os efeitos genotóxicos apenas na linhagem DU-145, indicando que esses compostos possam ser metabolizados por outras redutases que não a NQO1. As lesões ao DNA de células DU-145 promovidas pela *nor*- β -lapachona e seus derivados (**1**, **3** e **4**) foram, parcialmente, reparadas após um período de tempo de 24 horas, o que corrobora com a síntese não programada de DNA detectada após a exposição a esses compostos. Além disso, todos os compostos ativos interferiram sobre os processos de reparo dos danos ao DNA induzidos pelo MMS, o que indica que a interferência sobre esses processos contribui para seus efeitos citotóxicos. A *nor*- β -lapachona e seus derivados arilaminos (**1**, **3** e **4**) inibiram a taxa de proliferação de cepas de *S. cerevisiae* defectivas na expressão de topoisomerases (*Top1 Δ* , *Top3 Δ* e *Top1 Δ Top3 Δ*) de maneira mais pronunciada do que observado na cepa selvagem (BY4741), indicando que a interferência sobre a atividade das topoisomerases influencia, de algum modo, a citotoxicidade desses compostos. Nos estudos de genotoxicidade e mutagenicidade com fibroblastos de pulmão de hamster chinês (linhagem V79), todos os compostos citotóxicos promoveram quebras nas fitas de DNA, oxidação de bases nitrogenadas e indução de micronúcleos, em concentração (10 μ M) muito superior do que as necessárias para induzir os mesmos eventos em células tumorais. Reforçando a participação de EROS sobre os eventos mutagênicos, o pré-tratamento com NAC preveniu a formação de células micronucleadas e reduziu a sensibilidade celular aos efeitos tóxicos dos compostos estudados. Esses resultados ressaltam as propriedades antitumorais da *nor*- β -lapachona e seus derivados arilaminos e que eles podem ser considerados como protótipos para o desenvolvimento de novos agentes anticâncer.

Palavras-chave: *nor*- β -lapachona. Citotoxicidade. Espécies Reativas de Oxigênio. Topoisomerases. Genotoxicidade e Mutagenicidade.

ABSTRACT

In vitro evaluation of cytotoxic potential of arylamino-*nor*- β -lapachone derivatives: studies of mechanisms of action. PhD Thesis presented to Post-Program of Pharmacology of Physiology and Pharmacology Department of Ceará Federal University. Author: Bruno Coêlho Cavalcanti. Advisor: Prof^a. Dr^a. Cláudia do Ó Pessoa.

The search for new cytotoxic derivatives of *nor*- β -lapachone is part of a growing and continuous search for new active compounds. The present study aimed to evaluate the cytotoxic potential of four arylamino-*nor*- β -lapachone derivatives (**1-4**) and the probable mechanism involved in the cytotoxicity of these compounds. Among the tested derivatives, only three of them (**1**, **3** and **4**) and the precursor molecule elicited a significant antiproliferative effects in all human tumor cell lines used in the study. In experiments with peripheral blood mononuclear cells (PBMC), *nor*- β -lapachone did not induce cytotoxicity, however its derivatives showed antiproliferative effects whose intensity ranged from moderate to weak, with IC₅₀ values equal to 5.02 μ M (**1**), 12.02 μ M (**3**) and 10.65 μ M (**4**). Moreover, all the compounds showed no hemolytic effects (EC₅₀> 219.29 μ M). *Nor*- β -lapachone and its derivatives (**1**, **3** and **4**) induced apoptosis (mitochondrial pathway) in HL-60 cells, based upon morphological and flow cytometric analysis, and interference on HL-60 cell cycle progression, only at the highest concentration (4 μ M). Compounds exposure induced intracellular ROS generation, as well as DNA strand breaks in HL-60 (NQO1⁻) and DU-145 (NQO1⁺) cell lines. The co-administration of GSH reduced the cellular sensibility to the toxic effects of the studied compounds. Unlike cells pre-treated with BH (glutathione depletor agent), cells pre-exposed to antioxidants agents (NAC or KI) showed low production of free radicals. On the other hand, dicoumarol (NQO1 inhibitor) prevented the ROS formation and DNA strand breaks only in DU-145 cells, indicating that these compounds can be metabolized by other reductases than NQO1. The DNA damage induced by *nor*- β -lapachone and its derivatives (**1**, **3** and **4**) in DU-145 cells were partially repaired after 24 h, which agrees with the data of unscheduled DNA synthesis. In addition, all active compounds interfere with DNA repair processes of DNA damage induced by MMS, indicating that this action contributes to compounds cytotoxic effects. All active compounds inhibited the proliferation rate of *S. cerevisiae* strains defective in the expression of DNA topoisomerases (*Top1 Δ* , *Top3 Δ* and *Top1 Δ Top3 Δ*) more pronounced than that observed in wild type strain (BY4741), suggesting that the interference on topoisomerases activities may contributes to the cytotoxicity of active compounds. Genotoxicity and mutagenicity studies with Chinese hamster lung fibroblast cell line (V79), showed that all cytotoxic compounds promoted DNA strand breaks, DNA bases oxidation and micronucleus formation in a concentration (10 μ M) far higher than needed to induce the same events in tumor cells. Strengthening the ROS contribution on the mutagenic events, the pre-treatment with NAC prevented the formation of micronucleated cells and reduced the V79 cell sensibility to the cytotoxic effects of the studied compounds. These findings underscore the antitumor properties of *nor*- β -lapachone and its arylamino derivatives and they can be considered as prototypes for the development of new anticancer agents.

Keywords: *nor*- β -lapachone. Cytotoxicity. Reactive Oxygen Species. Topoisomerases. Genotoxicity and Mutagenicity.

LISTA DE TABELAS

1 –	Atividade enzimática de NQO1, citocromo <i>b5</i> redutase e citocromo P450 redutase em linhagens de carcinoma de próstata humano.....	30
2 –	Células utilizadas nos ensaios de citotoxicidade, genotoxicidade e mutagenicidade.....	46
3 –	Cepas de <i>S. cerevisiae</i> utilizadas no presente estudo.....	48
4 –	Atividade citotóxica <i>in vitro</i> da β -lapachona, <i>nor</i> - β -lapachona e derivados arilaminos <i>nor</i> - β -lapachônicos frente a linhagens tumorais humanas pelo ensaios do MTT e células mononucleadas do sangue periférico humano (CMSP) pelo ensaio do Alamar Blue após 72 horas de exposição.....	75
5 –	Atividade citotóxica <i>in vitro</i> da <i>nor</i> - β -lapachona e derivados arilaminos <i>nor</i> - β -lapachônicos (1-4) frente às linhagens tumorais humanas HL-60 e DU-145 na presença ou ausência de glutathiona (GSH, 15 mM) pelo ensaio do MTT e células mononucleadas do sangue periférico humano (CMSP) pelo ensaio do Alamar Blue após 24 horas de exposição.....	76
6 –	Efeito da <i>nor</i> - β -lapachona e seus derivados (1, 3 e 4) sobre a progressão do ciclo celular após 4 horas de exposição.....	84
7 –	Efeito da <i>nor</i> - β -lapachona e seus derivados (1, 3 e 4) sobre a progressão do ciclo celular após 24 horas de exposição.....	85
8 –	Efeito da β -lapachona, <i>nor</i> - β -lapachona e seus derivados (1, 3 e 4) sobre a geração de EROS em culturas de HL-60 e DU-145 após 4 horas de exposição.....	92
9 –	Indução de quebras totais de DNA após 4 horas de exposição a β -lapachona, <i>nor</i> - β -lapachona e seus derivados (1, 3 e 4) em culturas de HL-60 e DU-145, analisadas pela versão alcalina do teste do cometa.....	97

10 –	Indução de quebras duplas de DNA após 4 horas de exposição a β -lapachona, <i>nor</i> - β -lapachona e seus derivados (1 , 3 e 4) em culturas de HL-60 e DU-145, analisadas pela versão neutra do teste do cometa.....	98
11 –	Percentual de lesões reparadas após a exposição de 4 horas aos compostos β -lapachona, <i>nor</i> - β -lapachona e derivados <i>nor</i> - β -lapachônicos (1 , 3 e 4) em culturas de DU-145 após 4 horas de exposição, analisadas pela versão alcalina do teste do cometa.....	102
12 –	Percentual de lesões ao DNA induzidas pelo MMS reparadas após co-tratamento com β -lapachona, <i>nor</i> - β -lapachona e derivados <i>nor</i> - β -lapachônicos (1 , 3 e 4) em culturas de DU-145, analisadas pela versão alcalina do teste do cometa.....	103
13 –	Atividade citotóxica <i>in vitro</i> da <i>nor</i> - β -lapachona e derivados arilaminos <i>nor</i> - β -lapachônicos frente à linhagem V79 pelo ensaio do MTT após 24 horas de exposição.....	106
14 –	Indução de quebras de fitas do DNA após 4 horas de exposição a <i>nor</i> - β -lapachona e seus derivados (1 , 3 e 4) em culturas de V79, analisadas pelas versões alcalina e neutra do teste do cometa.....	107
15 –	Efeito da <i>nor</i> - β -lapachona e seus derivados (1 , 3 e 4) sobre a frequência de células V79 binucleadas (CBN) após 4 horas de exposição.....	110

LISTA DE FIGURAS

1 –	Drogas antitumorais naturais. Taxol (A), camptotecina (B), podofilotoxina (C) e etoposídeo (D).....	21
2 –	Classificação de quinonas de acordo com seus sistemas aromáticos.....	22
3 –	Redução de quinonas (Q) via 1 e 2 elétrons, gerando semiquinonas (Q [•]), e hidroquinonas (QH ₂), respectivamente.....	24
4 –	Ciclo redox induzido por quinonas.....	24
5 –	Estruturas químicas do lapachol (E) e da β-lapachona (F).....	26
6 –	Estrutura química da nor-β-lapachona.....	27
7 –	Esquema de metabolização de quinona (1,4-benzoquinona).....	28
8 –	Expressão de NQO1 em três linhagens de carcinoma de próstata humano analisados por <i>Western blot</i>	30
9 –	Atividade enzimática de NQO1 em células de carcinoma humano epitelial (HeLa) e células leucêmicas HL-60 (A), expressão de NQO1 nas linhagens HeLa e HL-60 analisados por <i>Western blot</i> (B).....	31
10 –	Via extrínseca de ativação da apoptose.....	33
11 –	Via intrínseca de ativação da apoptose.....	35
12 –	Ativação biorredutiva da mitomicina C e sua ligação ao DNA.....	37
13 –	1,4-naftoquinonas com potencial genotóxico e mutagêncio.....	38
14 –	Obtenção das células mononucleadas do sangue periférico (CMSP) por meio de gradiente de densidade estabelecido pelo Histopaque TM -1077.....	47
15 –	Rota de síntese dos derivados arilaminos substituídos da nor-β-lapachona. (1) 2,2-dimetil-3-(4-nitro-arilamino)-2,3-diidro-nafto[1,2-b]furan-4,5-diona; (2) 2,2-dimetil-3-(2-metil-5-nitro-arilamino)-2,3-diidro-nafto[1,2-b]furan-4,5-diona; (3) 2,2-dimetil-3-(2-nitro-arilamino)-2,3-diidro-nafto[1,2-b]furan-4,5-diona; (4) 2,2-dimetil-3-(2-metil-4-nitro-arilamino)-2,3-diidro-nafto[1,2-b]furan-4,5-diona.....	49
16 –	Tipos de cometa. Classificação por categoria de dano: (0) sem dano (< 5%); (1) Baixo nível de dano (5 - 20%); (2) médio nível de dano (20 - 40%); (3) alto nível de dano (40 - 95%); (4) dano máximo (> 95%).....	66

17 -	Efeito da <i>nor</i> - β -lapachona e seus derivados (1-4) sobre a incorporação do BrdU por células HL-60 após 24 horas de exposição.....	77
18 -	Efeitos da <i>nor</i> - β -lapachona e seus derivados (1, 3 e 4) sobre a viabilidade celular, indução de apoptose e necrose após 4 horas (A) e 24 horas (B) de exposição analisados morfológicamente através da coloração diferenciada por brometo de etídio e laranja de acridina.....	79
19 -	Efeito da <i>nor</i> - β -lapachona e seus derivados (1, 3 e 4) sobre a integridade da membrana plasmática de células HL-60 após 4 horas (A) e 24 horas (B) de exposição através do método de exclusão por iodeto de propídio por citometria de fluxo.....	80
20 -	Efeito da <i>nor</i> - β -lapachona e seus derivados (1, 3 e 4) sobre o $\Delta\psi_m$ de células HL-60 após 4 horas (A) e 24 horas (B) de exposição aos compostos. E efeito da ciclosporina A (CsA) sobre o $\Delta\psi_m$ de células HL-60 tratadas com os compostos por 4 horas (C).....	82
21 -	Efeito da <i>nor</i> - β -lapachona e seus derivados (1, 3 e 4) sobre a fragmentação internucleossomal de DNA em células HL-60 após 4 horas (A) e 24 horas (B) de exposição. E efeito da ciclosporina A (CsA) sobre a fragmentação internucleossômica de DNA de células HL-60 tratadas com os compostos por 4 horas (C).....	86
22 -	Efeito da <i>nor</i> - β -lapachona e seus derivados (1, 3 e 4) sobre a externalização da fosfatidilserina em células HL-60 após 4 horas.....	87
23 -	Efeito da <i>nor</i> - β -lapachona (<i>nor</i> - β -lap) e seus derivados (1, 3 e 4) sobre a ativação das caspases efetoras-3 e -7 em células HL-60 após 4 horas.....	89
24 -	Efeito da ciclosporina A (CsA) sobre a ativação de caspases 3 e 7 induzidas pela <i>nor</i> - β -lapachona e seus derivados (1, 3 e 4) após 4 horas de incubação em células HL-60.....	90
25	Efeito do dicumarol sobre a produção de EROS induzida pela <i>nor</i> - β -lapachona e seus derivados (1, 3 e 4) após 4 horas de incubação em células HL-60 (A) e DU-145 (B).....	93
26 -	Efeito do iodeto de potássio (IK), N-acetil-L-cisteína (NAC) e 1-bromoheptano (BH) sobre a geração de EROS induzida pela <i>nor</i> - β -lapachona (<i>nor</i> - β -lap) e seus derivados (1, 3 e 4) em culturas de HL-60 (A) e DU-145 (B) após 4 horas de exposição a concentração de 4 μ M.....	95

27 -	Efeito do dicumarol sobre a indução de quebras de DNA promovidas pela β -lapachona, <i>nor</i> - β -lapachona e seus derivados (1 , 3 e 4) em culturas de HL-60 (A) e DU-145 (B) após 4 horas de exposição, analisadas pela versão alcalina do teste do cometa.....	99
28 -	Efeito do iodeto de potássio (IK), N-acetil-L-cisteína (NAC) e 1-bromoheptano (BH) sobre a indução de quebras de DNA induzida pela β -lapachona (β -lap), <i>nor</i> - β -lapachona (<i>nor</i> - β -lap) e seus derivados (1 , 3 e 4) em culturas de HL-60 (A) e DU-145 (B) após 4 horas de exposição a concentração de 4 μ M, analisadas pela versão alcalina do teste do cometa.....	100
29 -	Reparo parcial das lesões induzidas no DNA pela β -lapachona, <i>nor</i> - β -lapachona e derivados <i>nor</i> - β -lapachônicos (1 , 3 e 4) em culturas de DU-145 após 4 horas de exposição a concentração de 4 μ M, analisadas pela versão alcalina do teste do cometa.....	101
30 -	Influência dos compostos sobre a persistência das lesões ao DNA induzidas pelo metil-metano-sulfonado (MMS) em culturas de DU-145, analisadas pela versão alcalina do teste do cometa.....	103
31 -	Efeito dos compostos sobre a síntese de DNA não programada na presença ou ausência de MMS em células DU-145.....	104
32 -	Efeito da β -lapachona (A), <i>nor</i> - β -lapachona (B), derivados 1 (C), 3 (D) e 4 (E) sobre a inibição de crescimento da levedura <i>S. cerevisiae</i> (BY4741) e sobre cepas de <i>S. cerevisiae</i> defectivas na expressão de topoisomerasas (<i>top1Δ</i> , <i>top3Δ</i> e <i>top1Δtop3Δ</i>).....	105
33 -	Danos oxidativos induzidos pela <i>nor</i> - β -lapachona (<i>nor</i> - β -lap) (A), derivados 1 (B), 3 (C) e 4 (D), após 4 horas de incubação, através da versão alcalina do teste do cometa.....	108
34 -	Efeito da <i>nor</i> - β -lapachona e seus derivados (1 , 3 e 4) sobre a frequência de micronúcleos (MN), na presença ou na ausência de NAC, em células V79 binucleadas (CBN) após 4 horas de exposição.....	109

LISTA DE SÍMBOLOS E ABREVIATURAS

$\Delta\psi_m$	Potencial transmembrânico mitocondrial
ANOVA	Análise de variância
APAF-1	Fator ativador de proteases pró-apoptóticas 1
AP	Apurínico
BE/LA	Brometo de etídio/laranja de acridina
BH	1-Bromoheptano
CI₅₀	Concentração Inibitória Média
CMSP	Células mononucleadas do sangue periférico
CsA	Ciclosporina A
CBN	Células binucleadas
DIC	Dicumarol
DMSO	Dimetilsulfóxido
Endo III	Endonuclease III
E.P.M.	Erro Padrão da Média
EROS	Espécies reativas de oxigênio
Fpg	Formamidopirimidina DNA glicosilase
GSH	Glutathiona reduzida
GSSG	Glutathiona oxidada
GPx	Glutathiona peroxidase
IC95%	Intervalo de confiança de 95%
IK	Iodeto de potássio
MN	Micronúcleos
MTT	3-(4,5-dimetil-2-tiazol)-2,5-difenil-brometo de tetrazolium
NAC	N-acetil-L-cisteína
NQOs	NAD(P)H/dihidronicotinamida ribosídeo (NRH):quinona oxidoreductase
NQO1	NAD(P)H:quinona oxidoreductase 1
PBS	Phosphate Buffer Solution (Tampão Fosfato)
PPM	Permeabilização da membrana mitocondrial
RPMI	Roswell Parrk Memorial Institute Medium
TPM	Transição da permeabilidade mitocondrial

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	19
1.1 Produtos naturais com atividade anticâncer	20
1.1.1 Quinonas: potencial antitumoral.....	22
1.1.1.1 Naftoquinonas.....	24
1.1.1.2 Biorredução de quinonas.....	28
1.2 Morte celular: apoptose e necrose	31
1.2.1 Apoptose.....	31
1.2.2 Necrose.....	35
1.3 Genotoxicidade e mutagenicidade de quinonas	36
2 OBJETIVOS	39
2.1 Geral	40
2.2 Específicos	40
3 MATERIAIS E MÉTODOS	41
3.1 Materiais utilizados	42
3.1.1 Equipamentos.....	42
3.1.2 Soluções e reagentes.....	43
3.2 Modelos biológicos	46
3.2.1 Linhagens celulares.....	46
3.2.1.1 Obtenção e cultivo das células tumorais.....	46
3.2.2 Obtenção das células mononucleares do sangue periférico.....	47
3.2.3 Obtenção das leveduras <i>Saccharomyces cerevisiae</i>	48
3.2.3.1 Preparo das culturas de <i>S. cerevisiae</i>	48
3.3 Procedimentos experimentais	49
3.3.1 Obtenção da <i>nor</i> - β -lapachona e de seus derivados arilamino substituído.....	49
3.3.2 Estudo da atividade antiproliferativa em células tumorais.....	50
3.3.2.1 Procedimento experimental.....	50
3.3.2.2 Análise dos dados.....	50
3.3.3 Estudo da atividade antiproliferativa em células não tumorais.....	51
3.3.3.1 Procedimento experimental.....	51
3.3.3.2 Análise dos dados.....	51
3.3.4 Avaliação da atividade hemolítica em eritrócitos de camundongos.....	52
3.3.4.1 Procedimento experimental.....	52

3.3.5 Estudo dos mecanismos de ação citotóxico.....	53
3.3.5.1 Avaliação da inibição da síntese de DNA replicativa através da técnica da incorporação da 5-bromo-2-deoxiuridina em células HL-60.....	53
3.3.5.1.1 Procedimento experimental.....	54
3.3.5.1.2 Análise dos dados.....	54
3.3.5.2 Análise morfológica de células HL-60 através da coloração diferencial por brometo de etídio/laranja de acridina.....	54
3.3.5.2.1 Procedimento experimental.....	55
3.3.5.2.2 Análise dos dados.....	55
3.3.5.3 Avaliação dos efeitos dos compostos sobre a integridade da membrana celular de HL-60.....	56
3.3.5.3.1 Procedimento experimental.....	56
3.3.5.3.2 Análise dos dados.....	56
3.3.5.4 Estudo dos efeitos dos compostos sobre o potencial transmembrânico mitocondrial ($\Delta\psi_m$) de células HL-60.....	57
3.3.5.4.1 Procedimento experimental.....	57
3.3.5.4.2 Análise dos dados.....	58
3.3.5.5 Estudo dos efeitos dos compostos sobre a progressão do ciclo celular de células HL-60.....	58
3.3.5.5.1 Procedimento experimental.....	58
3.3.5.5.2 Análise dos dados.....	59
3.3.5.6 Estudo dos efeitos dos compostos sobre a externalização da fosfatidilserina em células HL-60.....	59
3.3.5.6.1 Procedimento experimental.....	60
3.3.5.6.2 Análise dos dados.....	60
3.3.5.7 Avaliação dos efeitos dos compostos sobre a ativação de caspases (3 e 7) em células HL-60.....	60
3.3.5.7.1 Procedimento experimental.....	61
3.3.5.7.2 Análise dos dados.....	61
3.3.5.8 Avaliação dos efeitos dos compostos sobre a produção de espécies reativas de oxigênio intracelular em células HL-60 e DU-145.....	61
3.3.5.8.1 Procedimento experimental.....	62
3.3.5.8.2 Análise dos dados.....	63

3.3.5.9 Ensaio do cometa.....	63
3.3.5.9.1 Procedimento experimental.....	63
3.3.5.9.2 Análise dos dados.....	67
3.3.5.10 Análise da síntese de DNA não-programada em células DU-145.....	67
3.3.5.10.1 Procedimento experimental.....	67
3.3.5.10.2 Análise dos dados.....	68
3.3.5.11 Estudo dos efeitos dos compostos sobre o crescimento de cepas de <i>S. cerevisiae</i> deficientes em topoisomerasas.....	68
3.3.5.11.1 Procedimento experimental.....	68
3.3.5.11.2 Análise dos dados.....	69
3.3.6 Estudo da atividade genotóxica e mutagênica.....	69
3.3.6.1 Cultivo e manutenção da linhagem celular V79.....	69
3.3.6.2 Estudo da atividade antiproliferativa em células V79.....	70
3.3.6.3 Avaliação da indução de danos ao DNA pelo ensaio do cometa.....	70
3.3.6.3.1 Análise dos dados.....	70
3.3.6.4 Teste do micronúcleo.....	71
3.3.6.4.1 Procedimento experimental.....	71
3.3.6.4.2 Análise dos dados.....	72
4 RESULTADOS.....	73
4.1 Citotoxicidade induzida pela <i>nor</i>-β-lapachona e seus derivados arilaminos.....	74
4.2 Inibição da síntese replicativa de DNA através da incorporação de BrdU.....	76
4.3 Análise morfológica – coloração diferencial por brometo de etídio/laranja de acridina (BE/LA).....	77
4.4 Efeitos da <i>nor</i>-β-lapachona e seus derivados sobre a integridade da membrana celular de HL-60.....	80
4.5 Efeitos da <i>nor</i>-β-lapachona e seus derivados sobre o potencial transmembrânico mitocondrial ($\Delta\psi_m$) de células HL-60.....	81
4.6 Efeitos da <i>nor</i>-β-lapachona e seus derivados sobre a progressão do ciclo celular de células HL-60.....	83
4.7 Detecção da fosfatidilserina (PS) externalizada após a exposição de células HL-60 à <i>nor</i>-β-lapachona e seus derivados.....	87
4.8 Efeitos da <i>nor</i>-β-lapachona e seus derivados sobre a ativação das caspases efetoras 3 e 7 em células HL-60.....	88

4.9 Efeitos da <i>nor</i>-β-lapachona e seus derivados sobre a produção intracelular de espécies reativas de oxigênio (EROS) por oxidação do DCFH.....	91
4.10 Efeitos da <i>nor</i>-β-lapachona e seus derivados sobre a indução de quebras de fitas da molécula de DNA.....	96
4.11 Estudo da cinética de reparo das lesões ao DNA induzidas por <i>nor</i>-β-lapachona e seus derivados em células DU-145.....	101
4.12 Efeitos da <i>nor</i>-β-lapachona e seus derivados sobre o crescimento de <i>S. cerevisiae</i> deficientes em enzimas topoisomerases.....	104
4.13 Efeito antiproliferativo da <i>nor</i>-β-lapachona e seus derivados sobre células V79.....	106
4.14 Avaliação do potencial genotóxico e mutagênico da <i>nor</i>-β-lapachona e seus derivados em células V79.....	106
5 DISCUSSÃO.....	111
6 CONCLUSÃO.....	136
REFERÊNCIAS.....	138

Introdução

1 INTRODUÇÃO

1.1 Produtos naturais com atividade anticâncer

Desde aproximadamente 1500 a.C., as plantas e seus extratos têm sido reconhecidos como possuidoras de potencial anticâncer (LYONS, 1987; VIEGAS JÚNIOR *et al.*, 2006). Entretanto, o estudo racional e organizado de plantas como fontes de agentes anti-neoplásicos começou apenas em 1947 com os estudos pioneiros de Hartwell e colaboradores, no qual constituintes puros originados de plantas foram caracterizados e associados à atividade antitumoral do extrato bruto, tendo sido adicionadas posteriormente ao arsenal terapêutico (PETER, 1997; ALLEY *et al.*, 1998).

Atualmente, a natureza tem se destacado como fonte de novos agentes ativos para uma grande diversidade de doenças. Os produtos naturais continuam a desempenhar um papel relevante como fonte de novas drogas ou protótipos para o desenvolvimento de fármacos, apesar dos recentes progressos na área da química combinatória (MARTIN; CRITCHLOW, 1999; DA ROCHA *et al.*, 2001; REDDY *et al.*, 2003; PATERSON; ANDERSON, 2005). Nos últimos 25 anos, dentre os novos fármacos aprovados, cerca de 30% são produtos naturais ou derivados destes. Entretanto, em se tratando dos fármacos antitumorais, este número sobe para 42%, por exemplo, segundo Newman e Cragg (2007).

Segundo Dewick (1996), através da bioprospecção de produtos naturais de mais de 114 mil extratos vegetais oriundos de aproximadamente 35 mil espécies de vegetais, o Instituto Nacional do Câncer dos Estados Unidos da América (NCI-EUA) descobriu importantes drogas antitumorais naturais como o taxol (**A**) da planta *Taxus brevifolia* Nutt., camptotecina (**B**) da planta *Camptotheca acuminata* Decne, e semi-sintéticas como a podofilotoxina (**C**) e o etoposídeo (**D**) a partir de precursores isolados da planta *Podophyllum peltatum* L. (PEZZUTO, 1997; BALUNAS; KINGHORN, 2005), já usadas na prática clínica (WALL; WANI, 1996; ZAROGOULIDIS *et al.*, 2009). Devido à grande importância que as drogas antitumorais (naturais) representam na prática clínica, inúmeros análogos foram sintetizados na tentativa de se obter fármacos mais potentes (KINGSTON, 2000).

Muitas dessas substâncias serviram como protótipos para o desenvolvimento de drogas antitumorais mais modernas, como, por exemplo, os análogos dos alcalóides da vinca vindesina (Eldisine[®]) e vinorelbina (Navelbine[®]), o análogo do taxol docetaxel (Taxotere[®]), e os análogos da camptotecina, o topotecano (Hycamtin[®]) e irinotecano (Camptosar[®]). Desse

modo, esses medicamentos movimentam cerca de 50 bilhões de dólares anualmente (Cragg; Newman, 2000; Pinto *et al.*, 2002; Cragg; Newman, 2005).

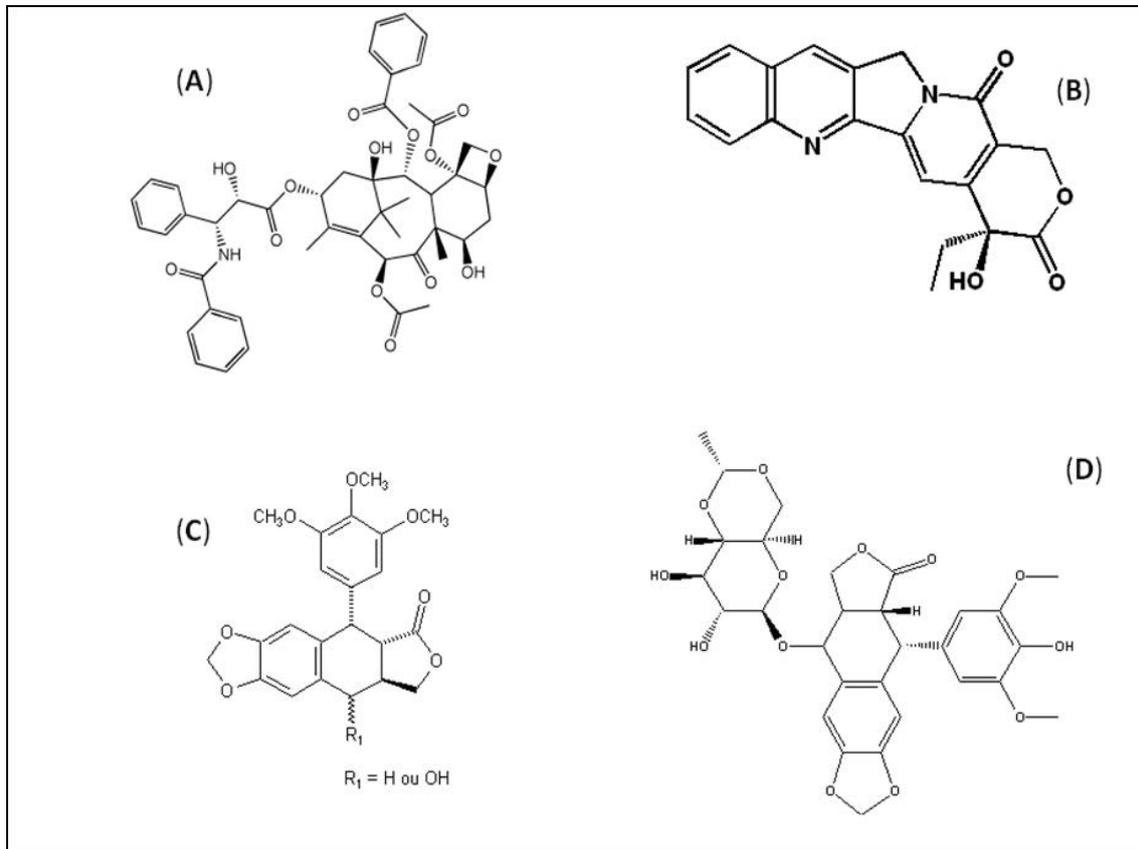


Figura 1 - Drogas antitumorais naturais. Taxol (A), camptotecina (B), podofilotoxina (C) e etoposídeo (D).

De maneira geral, as drogas antitumorais têm por base a capacidade de agir sobre células em divisão, sem, contudo, fazer distinção entre células cancerosas e não cancerosas. Além disso, frequentemente, não se chega a cura e, por produzirem muitas reações tóxicas, a relação risco/benefício é desfavorável ao paciente. Esses são alguns dos aspectos que fazem com que um foco do desenvolvimento de novas terapias para o câncer esteja na redução da toxicidade com decorrente aumento do benefício clínico, que é expresso no aumento do tempo e melhora na qualidade de vida do paciente (HANSEN; MILLER, 1997).

O grupo de drogas que tem tido maior impacto sobre a sobrevivência e qualidade de vida, são os agentes antineoplásicos. Contudo, há necessidade do desenvolvimento de novas drogas que reduzam os efeitos adversos do tratamento. Nesse sentido, é importante salientar a importância do trabalho da química farmacêutica que tem produzido compostos que, se não aumentam o índice de cura ou sobrevivência, tem reduzido de maneira importante os efeitos

tóxicos desses agentes e produzido melhoras nos sintomas associados ao câncer (MARKMAN, 1998).

1.1.1 Quinonas: potencial antitumoral

As quinonas são compostos orgânicos cuja principal característica é a presença de dois grupos carbonílicos que formam um sistema conjugado com pelo menos duas ligações duplas C-C. Com base na sua estrutura molecular, as quinonas são classificadas de acordo com o sistema aromático presente em suas estruturas químicas. Por exemplo, as benzoquinonas, naftoquinonas e antraquinonas, estão relacionadas aos sistemas aromáticos benzeno, naftaleno e antraceno, respectivamente (figura 2).

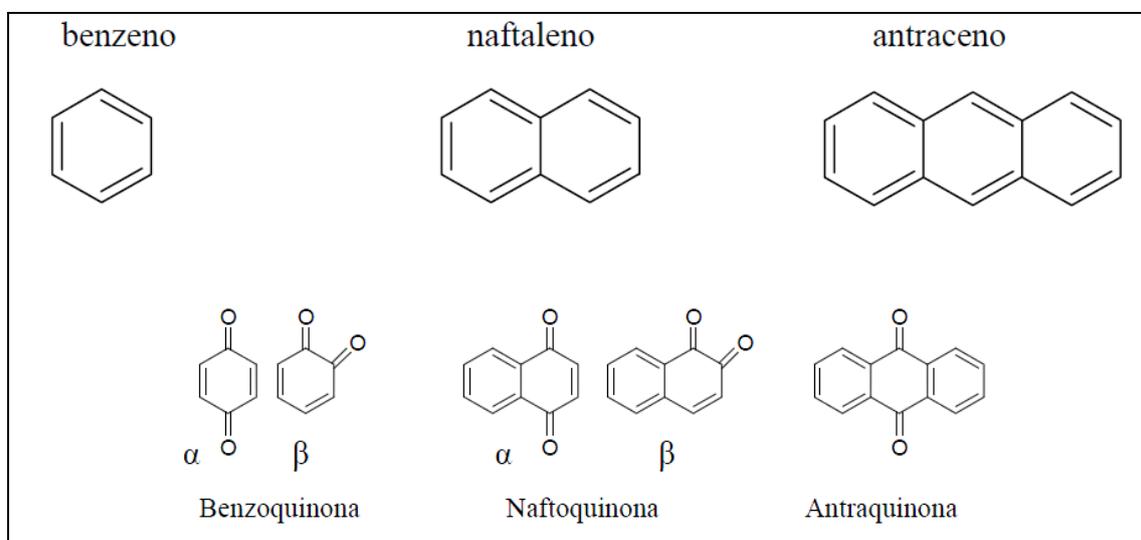


Figura 2 - Classificação de quinonas de acordo com seus sistemas aromáticos

Fonte: Adaptado de Da Silva (2007a).

As quinonas são amplamente distribuídas na natureza e participam de diversos processos biológicos (MONKS *et al.*, 1992; ASCHE, 2005). Nos vegetais, por exemplo, as quinonas encontram-se distribuídas em plantas superiores, principalmente nas famílias Bignoniaceae, Verbenaceae, Polygoniaceae, Leguminosae e Lythraceae (THOMSON, 1997).

O potencial antitumoral das quinonas é conhecido há mais de três décadas com a publicação de um trabalho realizado pelo NCI-EUA em 1974, onde foi avaliada a atividade antitumoral de quinonas naturais e sintéticas (DRISCOLL *et al.*, 1974a,b). Muitas drogas antitumorais de uso clínico que contém um núcleo quinônico em suas estruturas, como por

exemplo, as antraciclina, mitoxantrona e mitomicina C, apresentam excelente atividade antitumoral (GEWIRTZ, 1999; BEALL; WINSKI, 2000; CHUNG *et al.*, 2004; ZHANG *et al.*, 2006).

Sendo as quinonas substâncias capazes de catalisar processos biológicos de transferência de elétrons, suas funções bioquímicas estão relacionadas, em grande parte, com sua capacidade em realizar conversões redox reversíveis (PETROVA *et al.*, 1990). Quando reduzidas, ocorre a formação de um radical semiquinona ou a produção de hidroquinona (relativamente mais estável), que pode ser oxidado quando ocorre a transferência de elétrons a uma molécula ou radical aceptor (figura 3). O radical semiquinona é extremamente reativo, podendo reagir com o oxigênio molecular levando a formação de radicais superóxido ($O_2^{\bullet-}$), radicais hidroxil (OH^{\bullet}), oxigênio singlete (1O_2) e peróxido de hidrogênio, os quais são muito tóxicos para a célula devido a capacidade desses radicais ou moléculas em induzir ou facilitar a peroxidação lipídica, inativação enzimática e modificações na molécula de DNA (figura 4) (HALLIWELL; CROSS, 1994; RADJENDIRANE *et al.*, 1997). Dependendo da estabilidade das hidroquinonas geradas, estas podem passar por um novo ciclo redox (auto-oxidação) ao reagir com o oxigênio molecular formando novas semiquinonas e induzindo a formação deletéria endógena de espécies bioativas de oxigênio (CADENAS, 1995; FOURIE *et al.*, 2002).

Logo, boa parte dos mecanismos citotóxicos das drogas antitumorais que possuem um núcleo quinônico, pode ser atribuída pela formação de intermediários reativos que podem se ligar ao DNA (CUMMINGS, 2000; BEALL; WINSKI, 2000) ou por induzirem estresse oxidativo quando o grupo quinônico for reduzido por enzimas redutoras presentes na célula (POWIS, 1989; O'BRIEN, 1991; JOSEPH *et al.*, 2000).

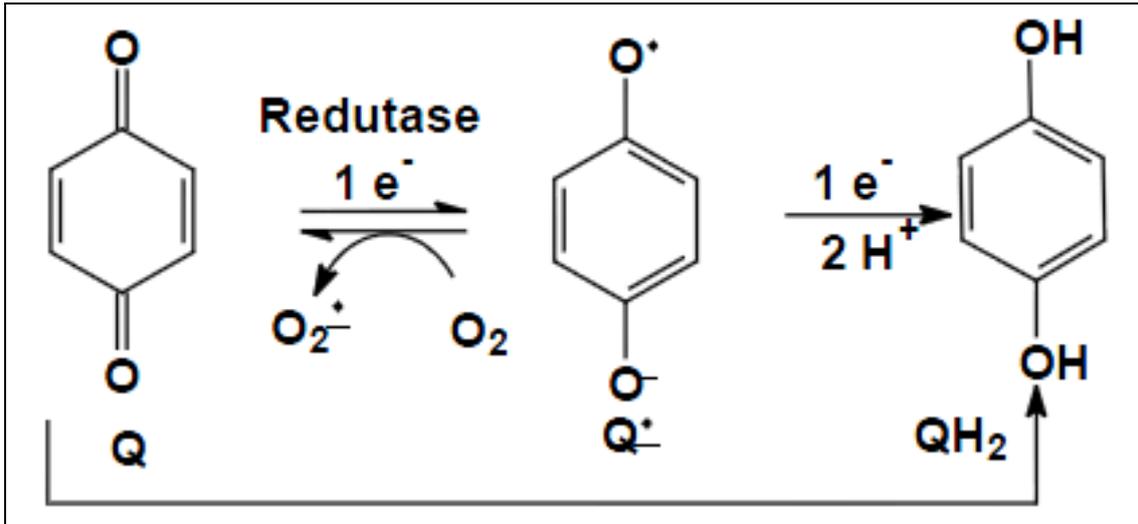


Figura 3 - Redução de quinonas (Q) via 1 e 2 elétrons, gerando semiquinonas (Q•), e hidroquinonas (QH₂), respectivamente.

Fonte: Adaptado De Moura (2008).

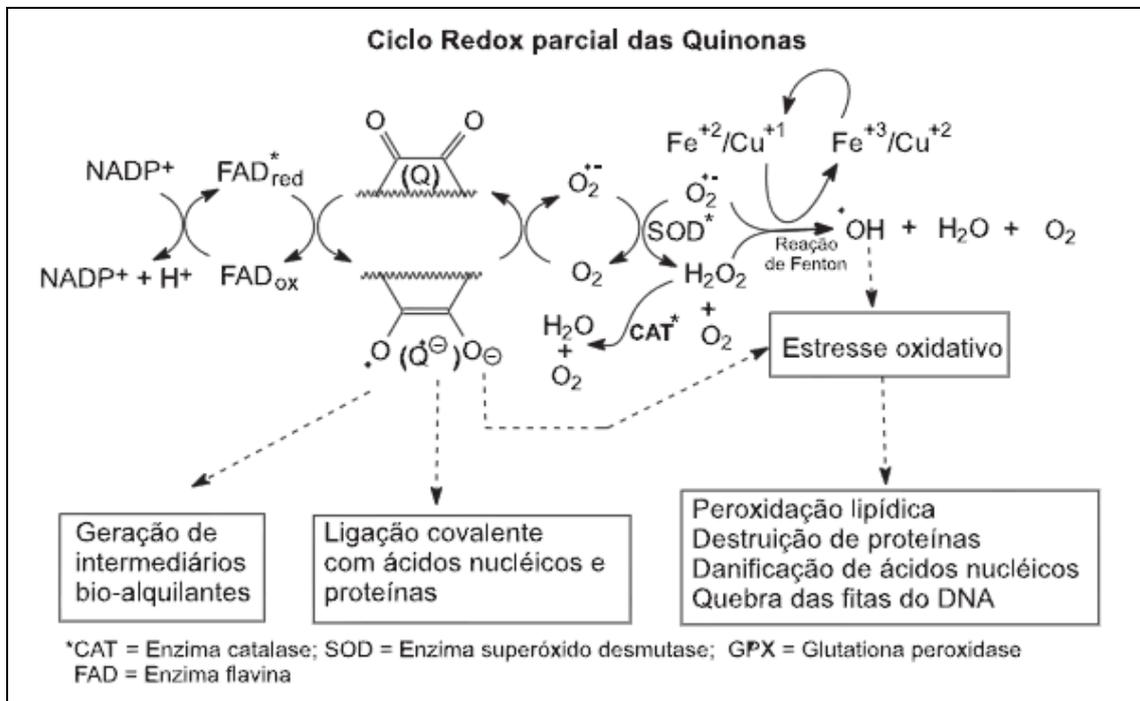


Figura 4 - Ciclo redox induzido por quinonas.

Fonte: Da Silva *et al.* (2003).

1.1.1.1 Naftoquinonas

Dentre as naftoquinonas naturais destaca-se o lapachol (**E**), isolado principalmente do cerne de árvores do gênero *Tabebuia* (Bignoniaceae) conhecidas como ipês. A atividade

antitumoral do lapachol foi descrita em 1962 em estudos realizados com carcinoma de Walker-256 (RAO *et al.*, 1968). Outrora, o lapachol já foi comercializado para utilização como coadjuvante no tratamento de certos tipos de câncer (ARAÚJO *et al.*, 2002).

Em 1964, os estudos antitumorais de fase clínica I com o lapachol, realizado pelo NCI-EUA, não obteve êxito devido aos efeitos colaterais induzidos pela molécula (BLOCK *et al.*, 1974). Porém, em outro estudo clínico conduzido em 1980, o lapachol foi capaz de inibir o crescimento tumoral em pacientes com vários tipos de tumores (mama, próstata, rins, fígado) e reduzir a sensação de dor provocada pelas neoplasias (HUSSAIN *et al.*, 2007). Alguns estudos reportaram a atividade citotóxica *in vitro* do lapachol contra linhagens tumorais (RAO, 1974; SKOV *et al.*, 1993; SALUSTIANO *et al.*, 2010) e seus efeitos anti-metastáticos em modelos *in vivo* foram descritos (SIEBER *et al.*, 1976; DE OLIVEIRA *et al.*, 1978; BALASSIANO *et al.*, 2005; MAEDA *et al.*, 2008). Além do mais, um número expressivo de derivados sintéticos relacionados ao lapachol tem mostrado excelente atividade citotóxica *in vitro* (DIAS; MEDINA, 1996; MI *et al.*, 2002; RAVELO *et al.*, 2004; ESTEVES-SOUZA *et al.*, 2007).

A β -lapachona (**F**) é um análogo do lapachol, muito estudado farmacologicamente devido a seus efeitos antiproliferativos contra diversas linhagens de células tumorais (DOCAMPO *et al.*, 1979; LI *et al.*, 1993a; CHAU *et al.*, 1998; CHOI *et al.*, 2003; OUGH *et al.*, 2005; LEE *et al.*, 2006), apresentando poucos efeitos ciotóxicos contra células não tumorais (SUN *et al.*, 2006; DA SILVA JÚNIOR *et al.*, 2010) e devido ao seu potencial antitumoral em modelos *in vivo* (SCHAFFNER-SABBA *et al.*, 1984; LI *et al.*, 1999; QUEIROZ *et al.*, 2008; DONG *et al.*, 2009), com baixos efeitos colaterais (LI *et al.*, 1999). Kung *et al.* (2007) reportou os efeitos anti-angiogênicos *in vitro* da β -lapachona sobre células endoteliais vasculares humanas.

A β -lapachona apresenta baixa solubilidade em água, o que limita sua administração sistêmica em aplicações clínicas (NASONGKLA *et al.*, 2003; DE ABREU *et al.*, 2007). Contudo, uma nova composição farmacêutica de β -lapachona complexada com ciclodextrina codificada com ARQ 501, com maior solubilidade aquosa, tem demonstrado sinais promissores em estudos clínicos antitumorais de fase clínica I e II (LI, 2006a, b; YANG *et al.*, 2008).

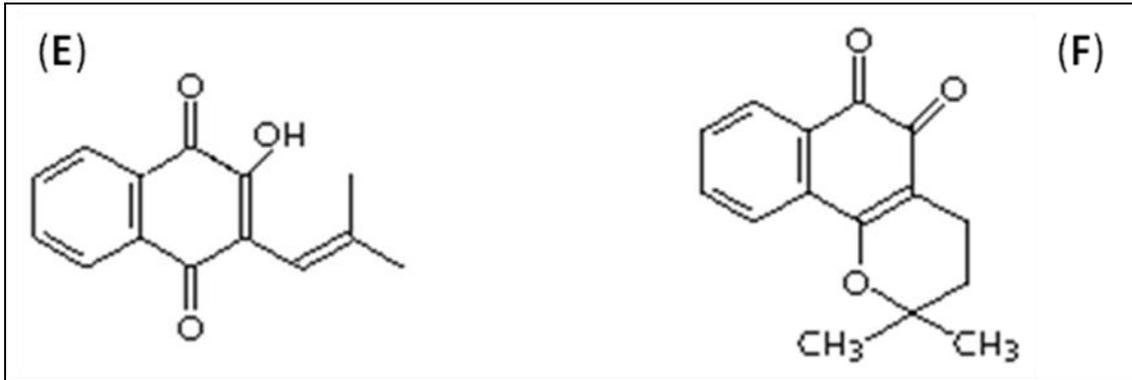


Figura 5 - Estruturas químicas do lapachol (E) e da β -lapachona (F).

Apesar de haver vários estudos no sentido de elucidar os mecanismos de ação responsáveis pela citotoxicidade da β -lapachona, seus mecanismos de indução de morte celular, por exemplo, permanecem não totalmente compreendidos (HUANG; PARDEE, 1999; LI *et al.*, 2003). Foi relatado que dependendo do sistema celular, a β -lapachona pode ativar vias distintas dos mecanismos que levarão a morte celular (LIU *et al.*, 2002; SUN *et al.*, 2006) independentemente do status dos genes *TP53* e *Bax/Bak* (codificam proteínas pré-apoptóticas) ou de caspases em células cancerosas (LI *et al.*, 1993b; PLANCHON *et al.*, 1995; WUERZBERGER *et al.*, 1998). Tem sido sugerido que os efeitos antiproliferativos atribuídos a β -lapachona contra as células tumorais estão relacionados à inibição das enzimas topoisomerases I e II (LI *et al.*, 1993a; DEGRASSI *et al.*, 1993; FRYDMAN *et al.*, 1997; HUEBER *et al.*, 1998; KRISHNAN; BASTOW, 2000), porém, a concentração de β -lapachona requerida para inibir a topoisomerase I, por exemplo, é superior a concentração necessária para induzir apoptose (LI *et al.*, 2003).

Consistente com a inibição de topoisomerases, a β -lapachona, também, inibe as enzimas envolvidas no reparo das lesões no DNA (BOORSTEIN; PARDEE, 1984; BOOTHMAN *et al.*, 1987; BOOTHMAN, 1989a) favorecendo a ocorrência de quebras das fitas de DNA, aberrações cromossômicas e trocas de cromátides irmãs (DEGRASSI *et al.*, 1993; VANNI *et al.*, 1998) e potencializando os efeitos induzidos por radiações ionizantes ou agentes alquilantes sobre o DNA (SCHAFFNER-SABBA *et al.*, 1984; BOOTHMAN *et al.*, 1987, 1989; CHOI *et al.*, 2007). Adicionalmente, a β -lapachona também é capaz de inibir enzimas envolvidas na síntese do DNA durante sua replicação, como por exemplo, a DNA polimerase- α (SCHUERCH; WEHRLI, 1978), e de reduzir a atividade enzimática da telomerase através da diminuição da expressão do gene humano da transcriptase reversa da telomerase (hTERT) (LEE *et al.*, 2005).

A β -lapachona, assim como outras naftoquinonas, após sofrerem redução enzimática, podem produzir espécies bioativas de oxigênio ($O_2^{\cdot-}$, HO^{\cdot} e 1O_2) e H_2O_2 (PORTELA; STOPPANI, 1996; CHAU *et al.*, 1998; PINK *et al.*, 2000a; DE ABREU *et al.*, 2005, 2007; COJOCEL *et al.*, 2006) favorecendo o aumento de peroxidação lipídica, da inativação enzimática e modificações na molécula de DNA (figura 4) (HALLIWELL; CROSS, 1994; RADJENDIRANE *et al.*, 1997; BENTLE *et al.*, 2006).

No Brasil, em se tratando de quinonas obtidas de espécies vegetais do gênero *Tabebuia*, destaca-se o pioneirismo dos estudos farmacológicos realizados por O. G. de Lima (Universidade Federal de Pernambuco, UFPE) na década de 60 e o do prof. Dr. B. Gilbert (Universidade Federal do Rio de Janeiro, UFRJ), a partir da década de 70. Desde então, vários outros pesquisadores, como o prof. Dr. Antônio Ventura Pinto (UFRJ), desenvolvem pesquisas com este grupo de naftoquinonas e seus derivados semi-sintéticos, em estudos farmacológicos e químicos de diversos tipos. Mais recentemente, o grupo da prof^a. Dr^a. M. O. F. Goulart (Universidade Federal de Alagoas, UFAL) dedica-se ao estudo eletroquímico destas quinonas (DA SILVA *et al.*, 2003).

Recentemente, o grupo de pesquisa coordenado pelos professores Dr. Antônio Ventura Pinto (UFRJ) e Dr. Carlos Kleber de Andrade (Universidade de Brasília, UnB) sintetizou uma série de análogos da *nor*- β -lapachona (figura 6), que em colaboração com o grupo de pesquisa do Laboratório de Oncologia Experimental (LOE) determinaram a relevante atividade citotóxica desses compostos contra linhagens de células tumorais humanas (DA SILVA JÚNIOR *et al.*, 2007b; DA SILVA JÚNIOR *et al.*, 2010).

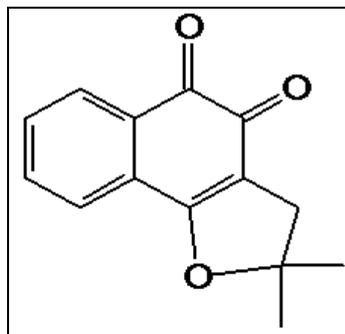


Figura 6 - Estrutura química da *nor*- β -lapachona.

1.1.1.2 Bioedução de quinonas

A maioria dos efeitos biológicos atribuídos as quinonas, assim como para a β -lapachona, são dependentes de sua bioativação (GUTIERREZ, 2000; PINK *et al.*, 2000a; BAILEY *et al.*, 2001; OLIVEIRA-BRETT *et al.*, 2002; NEMEIKAITÉ-CENIENE *et al.*, 2003; PHILLIPS *et al.*, 2004; DE ABREU *et al.*, 2005).

As quinonas podem ser metabolizadas via redução de um ou de dois elétrons. A redução de um elétron é catalisada por redutases como a NADPH-citocromo P450 redutase, citocromo *b5* redutase, xantina oxidoreductase e ubiquinona oxidoreductase. Como descrito anteriormente, esse processo leva a formação de radicais semiquinonas reativos, que na presença de oxigênio molecular induzem a geração de espécies reativas de oxigênio (EROS). Em contraste, a redução via dois elétrons catalisada pela NAD(P)H/dihidronicotinamida ribosídeo (NRH):quinona oxidoreductase (NQOs), produz hidroquinonas, relativamente mais estáveis, prevenindo a formação de semiquinonas intermediárias e de EROS (figura 7) (MIKAMI *et al.*, 1998; JOSEPH *et al.*, 2000; GUTIERREZ, 2000; WINSKI *et al.*, 2001; STRASSBURG *et al.*, 2002; NIOI; HAYES, 2004). Porém, essas hidroquinonas podem sofrer auto-oxidação e formar novas semiquinonas (CADENAS, 1995; MUNDAY, 1997). Logo, a redução catalizada por NQOs tem tanto um papel pró quanto antioxidante (detoxificação).

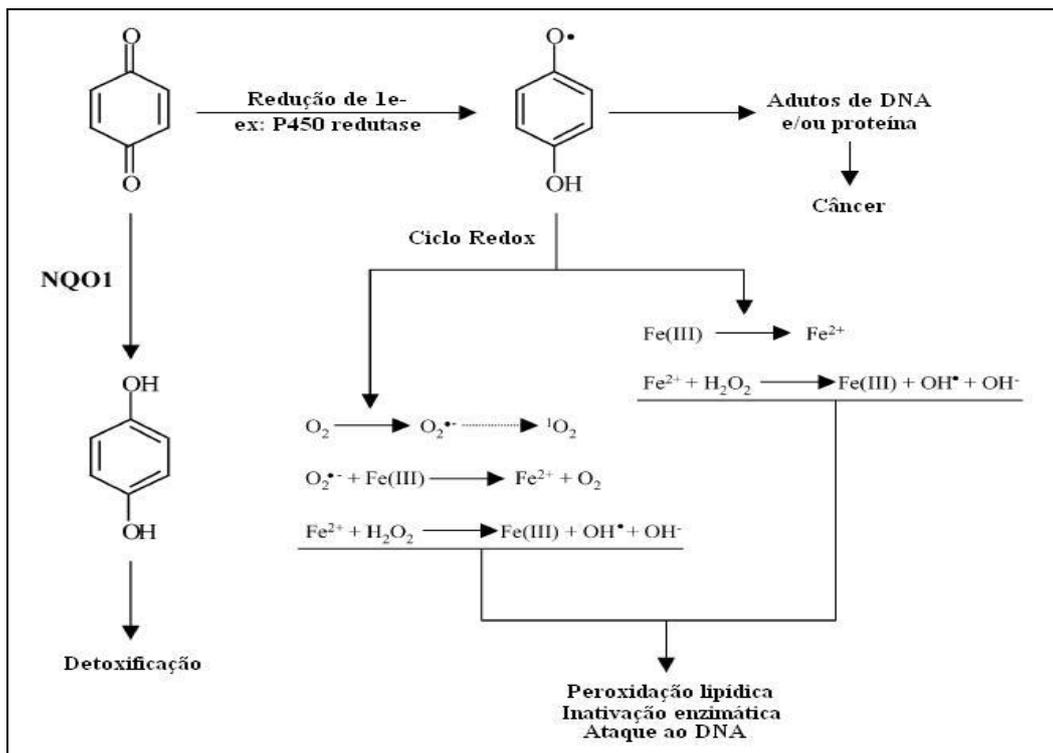


Figura 7 - Esquema de metabolização de quinona (1,4-benzoquinona)

Fonte: Adaptado de Nioi e Hayes (2004).

Agentes antitumorais bioreduzíveis formam uma importante classe de drogas anticâncer que incluem, por exemplo, a mitomicina C, indoloquinona (EO9) e análogos, antraquinonas, antraciclina dentre outras (GUTIERREZ, 2000; FOURIE *et al.*, 2002). Os elementos bioreduzíveis mais comumente encontrados nessas drogas antitumorais bioreduzíveis são os grupos quinonas e óxido de nitrogênio (TRUSH *et al.*, 1982; FOURIE *et al.*, 2002). Esses grupos podem ser ativados pela NQOs e/ou NADPH-citocromo P450 redutase.

Dentre as principais enzimas da família das NQOs, destaca-se a enzima NAD(P)H:quinona oxidoreductase 1 (NQO1; DT-diaforase, EC 1.6.99.2). A NQO1 é uma enzima com atividade controversa. Geralmente ela é aceita como uma enzima protetora contra a toxicidade das quinonas (ISKANDER; JAISWAL, 2005), mas por outro lado, em muitos casos, a NQO1 está relacionada com a ativação de várias quinonas, contribuindo com seus efeitos citotóxicos (WORKMANN; STRATFORD, 1993, 1994; RAUTH *et al.*, 1997; BOYER, 1997; JOSEPH, 1998).

A atividade redutora da NQO1 associada com os altos níveis de expressão dessa enzima em certos tipos de tumores (ex: pulmão, cólon, mama, rins e pâncreas) em relação aos tecidos normais, tem levado a uma incessante busca por novos agentes quimioterapêuticos bioreduzíveis (SCHLAGER; POWIS, 1990; CRESTEIL; JAISWAL, 1991; ROSS *et al.*, 1994; WORKMANN, 1994; NEMEIKAITÉ-CENIENE *et al.*, 2003; PHILLIPS *et al.*, 2004).

Vários pesquisadores têm reportado que a atividade enzimática de NQO1 é um fator determinante sobre a citotoxicidade da β -lapachona frente a várias linhagens celulares tumorais que superexpressam NQO1 (PINK *et al.*, 2000a; PLANCHON *et al.*, 2001; OUGH *et al.*, 2005; BEY *et al.*, 2007). Porém, β -lapachona também induz citotoxicidade na linhagem leucêmica humana HL-60 (PLANCHON *et al.*, 1995, 1999; CHAU *et al.*, 1997; DA SILVA JÚNIOR *et al.*, 2007b; 2010), que é deficiente na expressão de NQO1 (PINK *et al.*, 2000a; TUDOR *et al.*, 2003; 2005; BELLO *et al.*, 2005), assim como outras linhagens leucêmicas humanas (FITZSIMMONS *et al.*, 1996). Em contrapartida, células HL-60 possuem níveis elevados de algumas enzimas da família P450 (KROVAT *et al.*, 2000; NAGAI *et al.*, 2002; KAWAI *et al.*, 2003), o que sugere que a β -lapachona possa ser metabolizada e bioativada por outras enzimas (SAVAGE *et al.*, 2008) que não as NQOs.

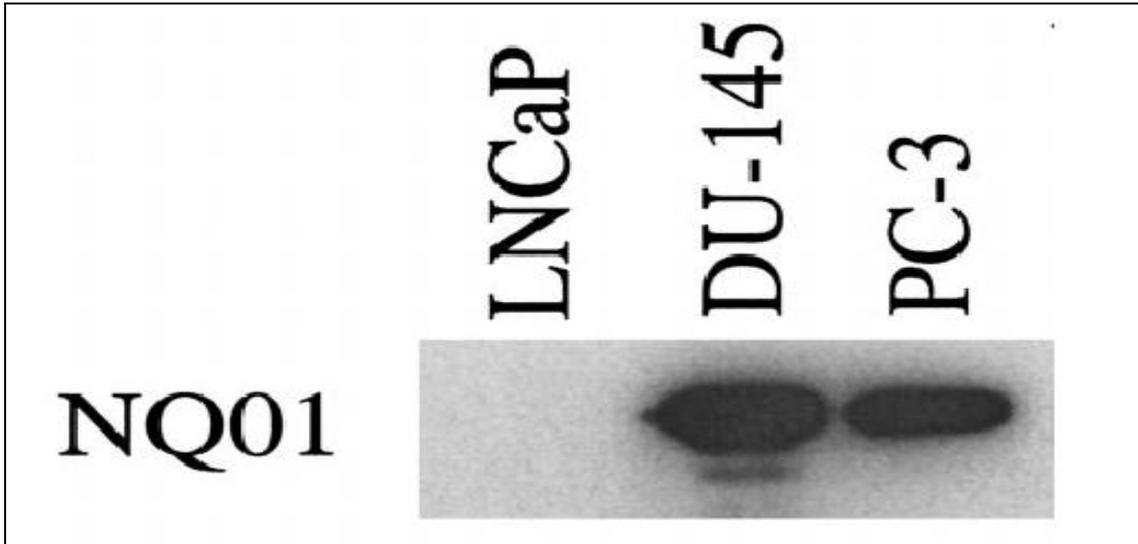


Figura 8 - Expressão de NQO1 em três linhagens de carcinoma de próstata humano analisados por *Western blot*

Fonte: Adaptado de Planchon *et al.* (2001).

Tabela 1 - Atividade enzimática de NQO1, citocromo *b5* redutase e citocromo P450 redutase em linhagens de carcinoma de próstata humano.

Linhagem celular	NQO1	b5R	P450
LNCaP	9,0 ± 2,4	17 ± 3,2	7,0 ± 2,3
DU-145	500 ± 48	39 ± 3,3	6,8 ± 0,6
PC-3	740 ± 100	38 ± 5,1	7,9 ± 1,1

Fonte: Adaptado de Planchon *et al.* (2001)

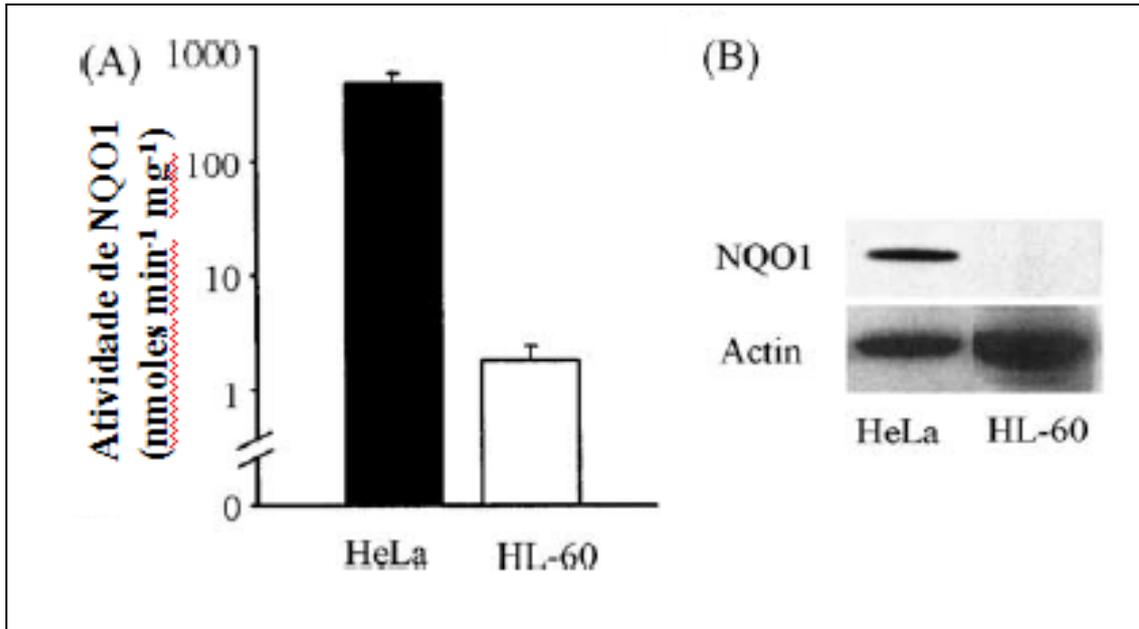


Figura 9 - Atividade enzimática de NQO1 em células de carcinoma humano epitelial (HeLa) e células leucêmicas HL-60 (A), expressão de NQO1 nas linhagens HeLa e HL-60 analisados por *Western blot* (B).

Fonte: Adaptado de Bello *et al.* (2005).

Como o principal foco da quimioterapia do câncer é aumentar ou melhorar a seletividade das drogas antitumorais em relação as células cancerosas, os agentes antitumorais bio-redutíveis são considerados por muitos, como sendo drogas mais seletivas através de uma abordagem enzima-direcionada. Porém, nenhum desses agentes bio-redutíveis na atualidade é ativado por apenas uma única enzima redutora (FOURIE *et al.*, 2002). O que motiva o desenvolvimento de novas drogas antitumorais bio-redutíveis, levando-se em consideração os fatores estruturais que confirmam seletividade sobre sua ativação por uma redutase específica.

1.2 Morte celular: apoptose e necrose

1.2.1 Apoptose

A apoptose ou morte celular programada, proposta primeiramente por Kerr *et al.* (1972) é uma forma de morte celular, geneticamente regulada, caracterizada por mudanças morfológicas, bioquímicas e alterações genética moleculares. Desequilíbrios entre os processos de apoptose e proliferação celular resultam em distúrbio na homeostase do tecido e

a sua desregulação está relacionada com o desenvolvimento de diversas doenças como o câncer, doenças autoimunes, neurodegenerativas e infecções virais (DLAMINI *et al.*, 2004).

A apoptose participa de forma complementar, ainda que oposta, ao processo de divisão celular como um mecanismo homeostático da morfogênese e reconstrução tecidual normal (VANENEGLAND *et al.*, 1997; MEIER *et al.*, 2000; KIMURA *et al.*, 2003). Igualmente, esse processo é importante na remoção de células danificadas, infectadas ou potencialmente neoplásicas (NAGATA, 1996; SAIKUMAR *et al.*, 1999). É um evento importante e bem caracterizado, na citotoxicidade induzida por fármacos anticâncer (KIM *et al.*, 2002; MADDIKA *et al.*, 2007). O tratamento de tumores por radiação e quimioterapia, por exemplo, envolve a ativação seletiva da apoptose nas células neoplásicas (SAIKUMAR *et al.*, 1999; RICCI; ZONG, 2006).

Morfológicamente, a apoptose é caracterizada pela degeneração de células esparsas com condensação e fragmentação da cromatina, condensação citoplasmática e redução do volume celular, mantendo, porém, a integridade das organelas citoplasmáticas e da membrana celular, em suas fases iniciais. Em seqüência, ocorre a formação de corpos apoptóticos e fagocitose pelas células vizinhas normais e macrófagos. Bioquimicamente, a degradação do DNA não é casual, ocorrendo pela ação de endonucleases nos espaços internucleossomais, originando fragmentos de 180 a 200 pares de bases (VAN CRUCHTEN; VAN DEN BROECK, 2002; DLAMINI *et al.*, 2004; FINK; COOKSON, 2005; ELMORE, 2007).

A degradação celular e as mudanças morfológicas observadas em células apoptóticas são decorrentes da ativação de caspases (SARASTE; PULKKI, 2000). As caspases, proteases específicas de aspartato contendo cisteína, que clivam seus substratos protéicos especificamente após um resíduo de ácido aspártico, estão presentes no núcleo como pró-enzimas inativas (zimogênios), que após estímulo apoptótico são ativadas por clivagem proteolítica (NICHOLSON, 1999; STRASSER *et al.*, 2000; BOATRIGT; SALVESEN, 2003). A ativação das caspases iniciadoras, tais como as caspases-2, -8, -9 e -10, por sinais pró-apoptóticos leva à ativação proteolítica das caspases efetoras-3, -6 e -7. Essas caspases clivam um grupo de proteínas vitais (lamininas e gelsolinas) e ativam proteoliticamente enzimas latentes, como as endonucleases, iniciando e executando o processo apoptótico.

Diversos são os fatores que podem desencadear a apoptose, dentre eles: ligação de moléculas a receptores de membrana, agentes quimioterápicos, radiação ionizante, danos no DNA, choque térmico, deprivação de fatores de crescimento, baixa quantidade de nutrientes e níveis aumentados de EROS (HENGARTNER *et al.*, 2000; BAIGI *et al.*, 2008). Três vias celulares de sinalização distintas têm sido descritas como responsáveis pelo início da

apoptose: via extrínseca ou de sinalização externa, via intrínseca ou mitocondrial e a terceira via, ativada pelo fator de indução de apoptose (AIF) (JOZA *et al.*, 2001; GREEN, 2005; GUPTA *et al.*, 2006).

A via extrínseca é desencadeada pela ligação de ligantes específicos a um grupo de receptores de membrana da superfamília dos receptores de fatores de necrose tumoral (rTNF). Esta ligação é capaz de ativar a cascata das caspases (BUDIHardjo *et al.*, 1999). Todos os membros da família de rTNF possuem um subdomínio extracelular rico em cisteína, o qual permite que eles reconheçam seus ligantes. Tal fato resulta na trimerização e conseqüente ativação dos receptores de morte específicos (figura. 10). A sinalização a seguir é mediada pela porção citoplasmática desses receptores que contém uma seqüência de 65 aminoácidos chamada "domínio de morte" sendo, por isso, chamados de "receptores de morte celular" (NAISMITH *et al.*, 1998). Quando os receptores de morte celular reconhecem um ligante específico, os seus domínios de morte interagem com moléculas conhecidas como FADD/MORT-1. Essas moléculas têm a capacidade de recrutarem a caspase-8 que irá ativar a caspase-3, executando a morte por apoptose (DANIEL *et al.*, 2001).

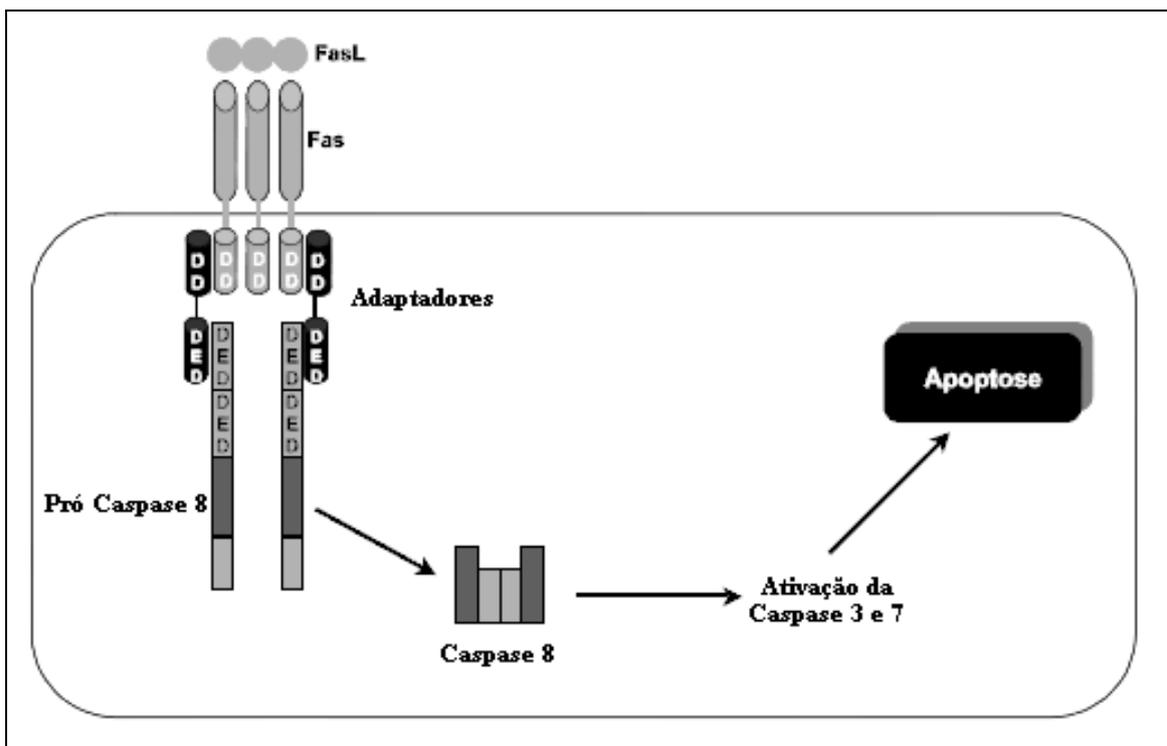


Figura 10 - Via extrínseca de ativação da apoptose.

Fonte: Grivicich *et al.* (2007).

A via intrínseca ou mitocondrial é ativada por estresse intracelular ou extracelular como a deprivação de fatores de crescimento, danos no DNA, hipóxia ou ativação de

oncogenes, e envolvem a participação dos membros da família de proteínas Bcl-2, considerados os mediadores essenciais de sobrevivência e apoptose celular (ASHE; BERRY, 2003). A família de proteínas Bcl-2 é composta por cerca de 15 membros com função pró-apoptótica (Bax, Bak, Bad, Bim, Bid, Bik, Blk e Hrk) que aumentam a permeabilização mitocondrial contribuindo para o extravasamento dos fatores apoptóticos, e anti-apoptóticos (Bcl-2, Bcl-w, Bcl-xl, Mcl-1, Bfl-1 e BHRF) que estabilizam a membrana mitocondrial. Essas proteínas localizam-se na membrana mitocondrial externa, na carioteca e no retículo endoplasmático das células (DLAMINI *et al.*, 2004).

Os sinais que são transduzidos em resposta ao estresse celular convergem principalmente para a mitocôndria (HENGARTNER *et al.*, 2000). Inúmeros estudos sobre apoptose apontam a mitocôndria como o principal mediador desse tipo de morte (SMALI *et al.*, 2003; GALLUZZI *et al.*, 2009). Essa organela integra os estímulos de morte celular, induzindo a permeabilização mitocondrial e conseqüente liberação de moléculas pró-apoptóticas nela presentes (DESAGHER; MARTINOU, 2000).

Quando sinais de morte alcançam a mitocôndria, levam ao colapso do potencial da membrana mitocondrial interna ($\Delta\psi_m$), bem como a uma transição da permeabilidade mitocondrial (TPM). Ao mesmo tempo, a água do espaço entre membranas passa para a matriz mitocondrial, levando à ruptura da organela e conseqüente liberação de proteínas pró-apoptóticas para o citoplasma (LOEFFLER; KREMER, 2000; GUPTA, 2003). Além da liberação de moléculas pela mitocôndria, a indução do $\Delta\psi_m$ e o aumento do TPM levam à perda da homeostasia celular, interrompendo a síntese de ATP e aumentando a produção de espécies reativas do oxigênio (EROS) (KROEMER; REED, 2000). O aumento nos níveis de EROS leva à oxidação de lipídios, proteínas e ácidos nucléicos, aumentando o colapso do $\Delta\psi_m$ (GREEN; KROEMER, 2004). A resposta da mitocôndria ao dano oxidativo é uma via importante no início da apoptose. Além disso, é sabido que as EROS induzem a ativação das caspases -9 e -3 (GOTTLIEB *et al.* 2000; GOTTLIEB, 2001). Além do mais, o aumento do TPM, facilita o extravasamento de citocromo *c*, que uma vez no citosol, forma um complexo com a APAF-1 (fator ativador de proteases pró-apoptóticas 1) e a caspase-9, o chamado apoptossomo, que promove a clivagem da pró-caspase-9 para ativá-la (BUDIARDJO *et al.*, 1999; ARMSTRONG *et al.*, 2006). Uma vez ativada, a caspase-9 ativa as caspase-3 e -7 que vai executar a apoptose (figura 11).

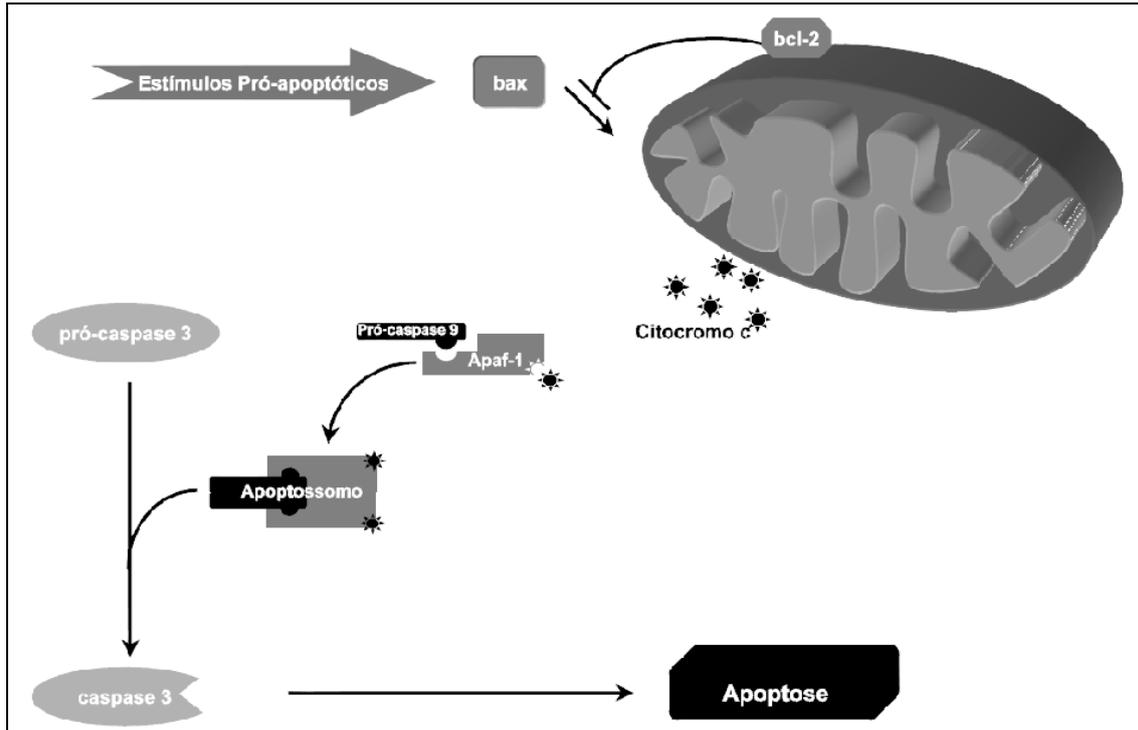


Figura 11 - Via intrínseca de ativação da apoptose

Fonte: Grivicich *et al.* (2007)

A terceira via de sinalização também dependente da mitocôndria, mas independente das caspases, ocorre pela liberação de fatores apoptogênicos, como citocromo *c*, fator de indução da apoptose (AIF), ATP, proteínas *heat shock* e DIABLO/Smac (*direct IAP binding protein with low p1/second mitochondria-derived activator of caspases*), um inibidor de IAPs (proteínas inibidoras de apoptose), neutralizando sua atividade anti-apoptótica (VERHAGEN *et al.*, 2000; DU *et al.*, 2000; HONG *et al.*, 2004).

1.2.2 Necrose

A necrose é considerada uma resposta passiva à injúria celular, entretanto estudos recentes sugerem que a necrose também pode ser regulada geneticamente (ZONG; THOMPSON, 2006). Porém, ao contrário da apoptose, a necrose não tem um mecanismo molecular bem esclarecido. A nível celular, a necrose é caracterizada pelo aumento do volume celular, perda da integridade da membrana plasmática e conseqüente ruptura celular, inchaço de algumas organelas citoplasmáticas e agregação da cromatina. Durante a necrose, o conteúdo celular é liberado, causando dano às células vizinhas e uma reação inflamatória no local (ZIEGLER; GROSCURTH, 2004). Dentre os fatores que podem causar esse tipo de morte celular estão a depleção energética, o desbalanço no fluxo de cálcio (Ca^{2+}) intracelular,

a geração de EROS e a ativação de proteases não-apoptóticas (KROEMER *et al.*, 2005; RICCI; ZONG, 2006).

1.3 Genotoxicidade e mutagenicidade de quinonas

Os efeitos genotóxico e mutagêncio promovidos pelas quinonas estão associados com a produção de EROS intracelular após serem metabolizadas enzimaticamente (OLLINGER; BRUNK, 1995; BOLTON *et al.*, 2000). Radicais superóxido ($O_2^{\bullet-}$), radicais hidroxil (HO^{\bullet}), oxigênio singleto (1O_2) e peróxido de hidrogênio induzem modificações na molécula de DNA (DURNEV; SEREDENIN, 1990; EPE, 1991; PURSCHKE *et al.*, 2002; BARZILAI; YAMAMOTO, 2004; PELICANO *et al.*, 2004). Adicionalmente, compostos como o benzeno, uma vez metabolizados, geram quinonas (benzoquinonas) como metabólitos intermediários que podem induzir a formação de adutos no DNA, estresse oxidativo e efeitos aneugênicos (WHYSNER *et al.*, 2004). E, compostos contendo uma função quinona em suas estruturas químicas, como por exemplo, o antibiótico mitomicina C, após serem metabolizados, formam intermediários reativos que podem formar ligações covalentes (adutos) com as bases nitrogenadas do DNA, em especial a guanina (figura 12) (CUMMINGS, 2000).

Vários trabalhos vêm reportando a atividade genotóxica e mutagênica de naftoquinonas sobre células cancerosas e não cancerosas. Dentre essas naftoquinonas se destacam a juglona, pumblagina, menadiona e lausona (figura 13), que são 1,4-naftoquinonas isoladas de plantas e que induzem quebras de fitas de DNA, aberrações citogenéticas e mutagênese (DEVI *et al.*, 1998; GAIVÃO *et al.*, 1999; KIRKLAND; MARZIN, 2003; KUMAR *et al.*, 2009; AITHAL *et al.*, 2009; DEMMA *et al.*, 2009). Outra naftoquinona bem estudada é a β -lapachona, que induz lesões na molécula de DNA, aberrações cromossômicas e trocas de cromátides irmãs (DEGRASSI *et al.*, 1993; VANNI *et al.*, 1998) e efeitos teratogêncios em ratos (DE ALMEIDA *et al.*, 2009).

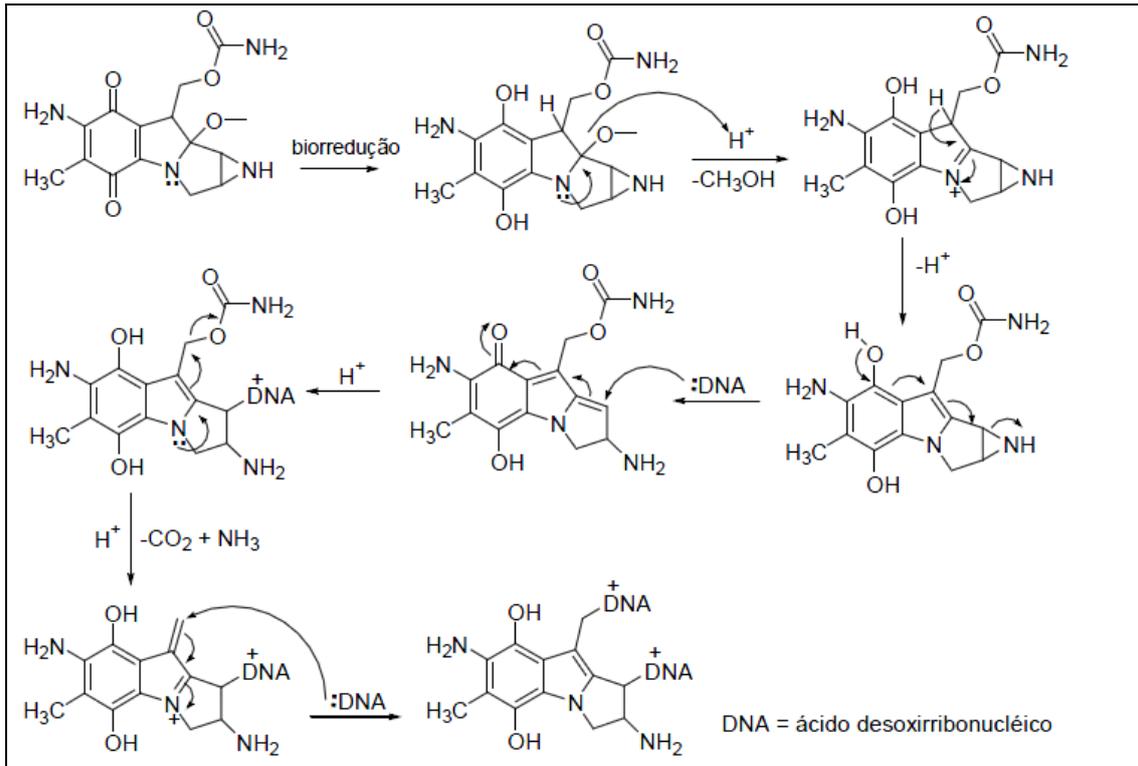


Figura 12 - Ativação biorredutiva da mitomicina C e sua ligação ao DNA

Fonte: Da Silva Júnior (2007a).

A participação de enzimas redutoras pode modular os efeitos mutagênicos induzidos pelas quinonas. A redução da menadiona pela NADPH-citocromo P450 redutase aumenta atividade mutagênica frente a linhagem TA104 de *Salmonella typhimurium* (teste de Ames), mas por outro lado, a adição de enzimas antioxidantes como a superóxido dismutase (SOD) e a catalase reduzem os efeitos mutagênicos da menadiona, reforçando que esses efeitos são estritamente relacionados com a produção de EROS (CHESIS *et al.*, 1984). Em contraste, experimentos conduzidos com células HepG2 (hepatoma humano), cuja principal enzima redutora é a NQO1 revelou que o tratamento com menadiona na presença de dicumarol (inibidor de NQO1) aumentou significativamente os efeitos genotóxicos sobre a linhagem (HASSPIELLER *et al.*, 1996), ressaltando o papel da NQO1 sobre a detoxificação da menadiona (JOSEPH; JAISWAL, 1994; TAMPO; YONAH, 1996; CHIOU; TZENG, 2000).

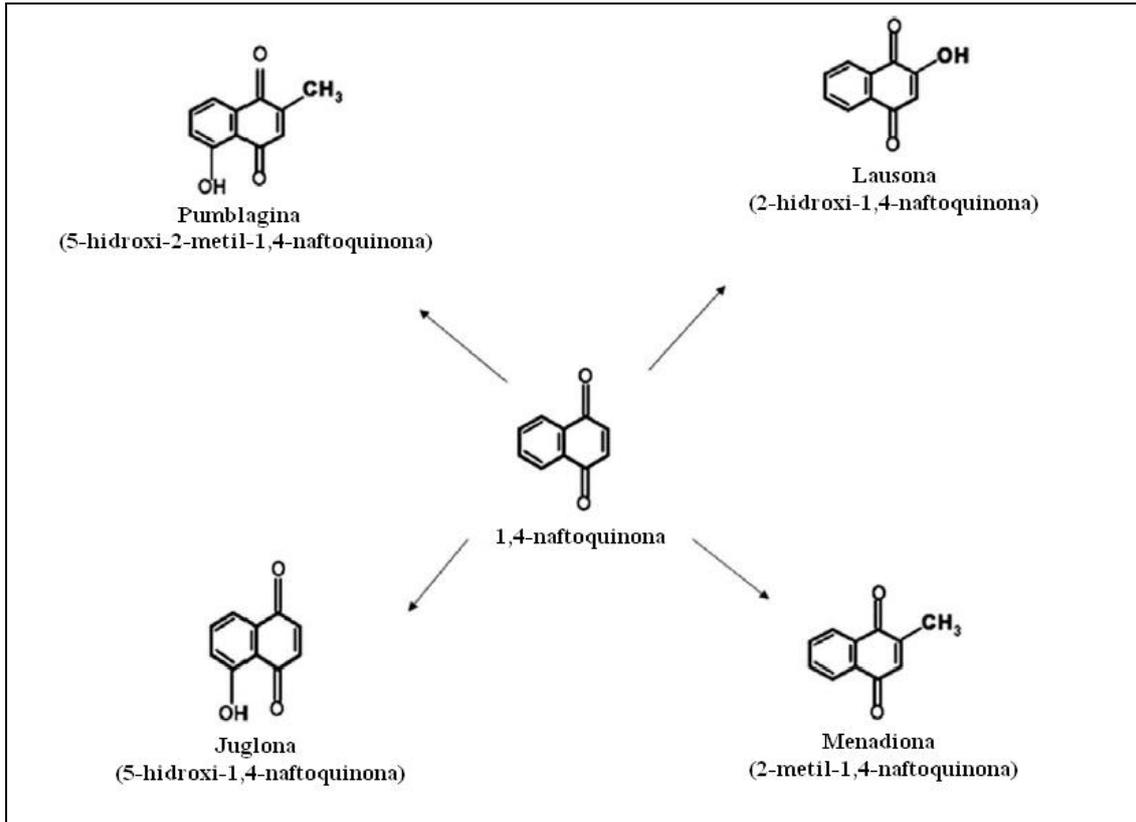


Figura 13 - 1,4-naftoquinonas com potencial genotóxico e mutagêncio

Fonte: Kumar *et al.* (2009).

Objetivos

2 OBJETIVOS

2.1 Geral

Determinar o mecanismo de ação da *nor*- β -lapachona e de quatro derivados arilaminos em modelos biológicos celulares *in vitro*.

2.2 Específicos

- a) Avaliar o potencial antiproliferativo e a seletividade de ação da *nor*- β -lapachona e de seus derivados sobre linhagens tumorais humanas (ensaio do MTT) e células mononucleadas isoladas de sangue periférico humano (ensaio do Alamar Blue);
- b) Avaliar a atividade hemolítica da *nor*- β -lapachona e de seus derivados em modelo de eritrócitos de camundongos Swiss (*Mus musculus*);
- c) Avaliar os prováveis mecanismos de ação responsáveis pela citotoxicidade dos compostos utilizando como modelos experimentais as linhagens de leucemia HL-60 e de carcinoma de próstata DU-145, assim como cepas da levedura *Saccharomyces cerevisiae* defectivas na expressão de enzimas topoisomerasas, através de:
 - *Técnicas de citometria de fluxo*:
 - Integridade de membrana celular;
 - Despolarização mitocondrial;
 - Fragmentação internucleossômica de DNA;
 - Externalização da fosfatidilserina;
 - Ativação de caspases;
 - Produção intracelular de espécies reativas de oxigênio;
 - *Ensaio do cometa (lesões no DNA e cinética de reparo)*.
 - *Ensaio de inibição de crescimento de cepas de S. cerevisiae deficientes em topoisomerasas*.
- d) Avaliar o potencial genotóxico e mutagênico dos compostos em culturas de fibroblastos de pulmão de hamster chinês (V79) através dos ensaios do cometa e de indução de micronúcleos.

Materiais e Métodos

3 MATERIAIS E MÉTODOS

3.1 Materiais utilizados

3.1.1 Equipamentos

- Agitador de placa MLW Modelo Thys 2
- Balança analítica, GEHAKA AG200
- Banho-Maria, MOD. 105 DI DELLA
- Centrífuga Excelsa Baby I FANEN Modelo 206
- Centrífuga de placas Eppendorf Modelo Centrifuge 5403
- Centrífuga de lâminas Shandon Southern Cytospin
- Citômetro de fluxo, Guava EasyCyte Mini
- Cuba de eletroforese horizontal, BioRad
- Espectrofotômetro de placas Packard Spectra Count
- Estufa de secagem e esterilização, FANEM, MOD. 315SE
- Fluxo laminar VECO
- HTS (*High Throuput Screening*, BIOMECK 3000) Beckman Coulter
- Incubadora de células (CO₂ Water-Jacket Incubator) NUAIRE TS Autoflow
- Microscópio de fluorescência Olympus Modelo BX41
- Microscópio óptico Metrimpex Hungary/PZO-Labimex Modelo Studar lab
- Microscópio óptico de inversão Nikon Diaphot
- pHmetro Micronal B474

3.1.2 Soluções e reagentes

- Ácido acético P.A. (MERCK)
- Ácido clorídrico 0,1 N (VETEC)
- Agarose de baixo ponto de fusão (Invitrogen)
- Agarose de ponto de fusão normal (Invitrogen)
- Álcool etílico P.A. (VETEC)
- Bacto-ágar (VETEC)
- BrdU (SIGMA)
- Brometo de 3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5difeniltetrazolio (SIGMA)
- Brometo de etídeo (SIGMA)
- 1-Bromoheptano (SIGMA)
- Ciclosporina A (SIGMA)
- Cítocalasina B (SIGMA)
- Cloreto de sódio (VETEC)
- Colchicina (SIGMA)
- Diaminobenzidina (PROQUÍMICOS)
- Dicumarol (SIGMA)
- DMSO (VETEC)
- Doxorrubicina (ZODIAC)
- EDTA (PROQUÍMICOS)
- Endonuclease III (Endo III) (New England BioLabs[®])
- Entellan (MERCK)

- Estreptavidina-peroxidase (DAKO)
- Extrato de levedura a 1% (Difco)
- Fitohemaglutinina (CULTILAB)
- Formaldeído (VETEC)
- Formamidopirimidina DNA glicosilase (Fpg) (New England BioLabs[®])
- Glutathiona reduzida (SIGMA)
- Hidróxido de Sódio (VETEC)
- Hidroxiurea (SIGMA)
- Histopaque (SIGMA)
- Iodeto de potássio (VETEC)
- Iodeto de propídeo (SIGMA)
- Laranja de acridina (FLUKA)
- Meio de cultura celular RPMI 1640 (CULTILAB)
- Meio de cultura para leveduras YPD (DIFCO)
- Metanol P.A. (MERCK)
- Metil-metano-sulfonado (SIGMA)
- N-acetil-L-cisteína (SIGMA)
- NaOH 10M (VETEC)
- Penicilina-estreptomicina (CULTILAB)
- Peróxido de Hidrogênio (VETEC)
- Rodamina 123 (SIGMA)
- Solução de Azul de Tripan a 4% em água destilada (SIGMA)

- Solução de bactopectona a 2% (Difco)
- Solução de Giemsa a 5% em tampão fosfato (PBS) (SIGMA)
- Solução de glicose a 2% (Difco)
- Solução de KCl 0,075 M em água destilada (LABSYNTH)
- Solução de Triton X-100 a 1% (Vetec)
- Solução salina 0,9% (LABSYNTH)
- Solução tampão fosfato pH 6,8 ($\text{NaHPO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ + $\text{NaHPO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$, LABSYNTH)
- Soro fetal bovino (CULTILAB)
- Tripsina 0,25% (CULTILAB)
- Tris (PROQUÍMICOS)

3.2 Modelos biológicos

3.2.1 Linhagens celulares

As células utilizadas nos ensaios de citotoxicidade, genotoxicidade e mutagenicidade estão listadas quanto ao tipo histológico e a origem na tabela 2.

Tabela 2 - Células utilizadas nos ensaios de citotoxicidade, genotoxicidade e mutagenicidade.

Linhagem	Tipo Histológico	Origem
HL-60	Leucemia promielocítica	Humana
K-562	Leucemia mielocítica crônica	Humana
JURKAT	Leucemia de células T	Humana
MOLT-4	Leucemia de células T	Humana
PC-3	Carcinoma de próstata	Humana
DU-145	Carcinoma de próstata	Humana
Hs 578T	Carcinoma de mama	Humana
MX-1	Carcinoma de mama	Humana
HCT-8	Carcinoma de cólon	Humana
SF-295	Glioblastoma	Humana
CMSP	Linfócitos e Monócitos	Humana
V79	Fibroblasto de pulmão	Murino

3.2.1.1 Obtenção e cultivo das células tumorais

As linhagens tumorais foram gentilmente cedidas pelo *Children's Mercy Hospital* e pelo Instituto Nacional do Câncer (EUA). As células foram cultivadas em frascos plásticos para cultura (75 cm², volume de 250 mL) em meio de cultura RPMI-1640 ou DMEM suplementado com 10 a 20% de soro fetal bovino e 1% de antibióticos. As células foram

incubadas em estufa a 37°C com atmosfera de 5% de CO₂, tendo sido observado o crescimento celular com ajuda do microscópio de inversão a cada 24 horas. Para a manutenção das linhagens que crescem aderidas ao frasco de cultura (próstata, mama, cólon e glioblastoma), tripsina (0,25%) foi utilizada a fim de desaderá-las.

3.2.2 Obtenção das células mononucleares do sangue periférico

As células mononucleares do sangue periférico (CMSP) foram obtidas a partir de sangue periférico de voluntários 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 Histopaque™-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 (figura 1). 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 *pellet* de células foi ressuspensionado 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%).

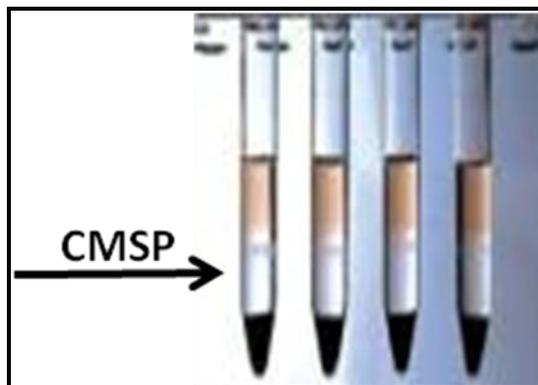


Figura 14 - Obtenção das células mononucleadas do sangue periférico (CMSP) por meio de gradiente de densidade estabelecido pelo Histopaque™-1077.

3.2.3 Obtenção das leveduras *Saccharomyces cerevisiae*

Os experimentos com as leveduras *S. cerevisiae* foram realizados pela aluna de doutorado Dinara Jaqueline Moura da Universidade Federal do Rio Grande do Sul (UFRGS) sob a supervisão conjunta dos professores Dr. João Antônio Pêgas Henriques e Dr^a Jenifer Saffi da UFRGS. As diferentes cepas de *S. cerevisiae* estão listadas abaixo quanto ao genótipo e a fonte na tabela 3.

Tabela 3 - Cepas de *S. cerevisiae* utilizadas no presente estudo.

Cepas	Genótipo Relevante	Fonte
BY4741	MATa <i>his3Δ1; leu2Δ0; met15Δ0; ura3Δ0</i>	Euroscarf
<i>top1Δ</i>	semelhante BY4741, exceto <i>yap1::kanMX4</i>	Euroscarf
<i>top3Δ</i>	semelhante BY4741, exceto <i>gpx3::kanMX4</i>	Euroscarf
<i>top1 Δ top3Δ</i>	semelhante <i>top1Δ</i> , exceto <i>top1::URA3</i>	J.A.P. Henriques

3.2.3.1 Preparo das culturas de *S. cerevisiae*

Meios, soluções e tampões foram preparados de acordo com Burke *et al.* (2000). O meio líquido completo (YPD) contendo 1% de extrato de levedura, 2% de bactopectona e 2% de glucose, foi utilizado, rotineiramente, para o crescimento celular. Para o plaqueamento, o meio YPD foi solidificado com 2% de bactoagar (AUSUBEL *et al.*, 1989). Para todos os tratamentos as leveduras foram ressuspendidas e diluídas em solução salina (NaCl 0,9%).

Culturas em fase exponencial de crescimento, foram obtidas pela inoculação de 5×10^5 células em fase estacionária/mL e cultivadas em meio líquido YPD. Após 18 horas de incubação a 30°C sob agitação, as culturas apresentavam um densidade celular em torno de 1 a 2×10^7 células/mL, com 50 a 70% de brotamento (leveduras em divisão celular). As células foram lavadas em PBS e a densidade celular e a percentagem de brotamento na cultura, foi determinada mediante contagem, usando-se microscópio óptico e câmara de Neubauer.

3.3 Procedimentos Experimentais

3.3.1 Obtenção da *nor*- β -lapachona e de seus derivados arilamino substituídos

A *nor*- β -lapachona assim como seus derivados (**1-4**) foram sintetizados a partir do lapachol, uma naftoquinona natural extraída do cerne do Ipê Roxo (*Tabebuia avellanae*), pelo aluno de doutorado Eufrânio N. da Silva Júnior da Universidade de Brasília (UnB) sob orientação conjunta dos professores Dr. Antônio Ventura Pinto do Núcleo de Pesquisas de Produtos Naturais da Universidade Federal do Rio de Janeiro e Carlos Kleber de Andrade da UnB (DA SILVA JÚNIOR *et al.*, 2007b; DA SILVA JÚNIOR *et al.*, 2010) (figura 15).

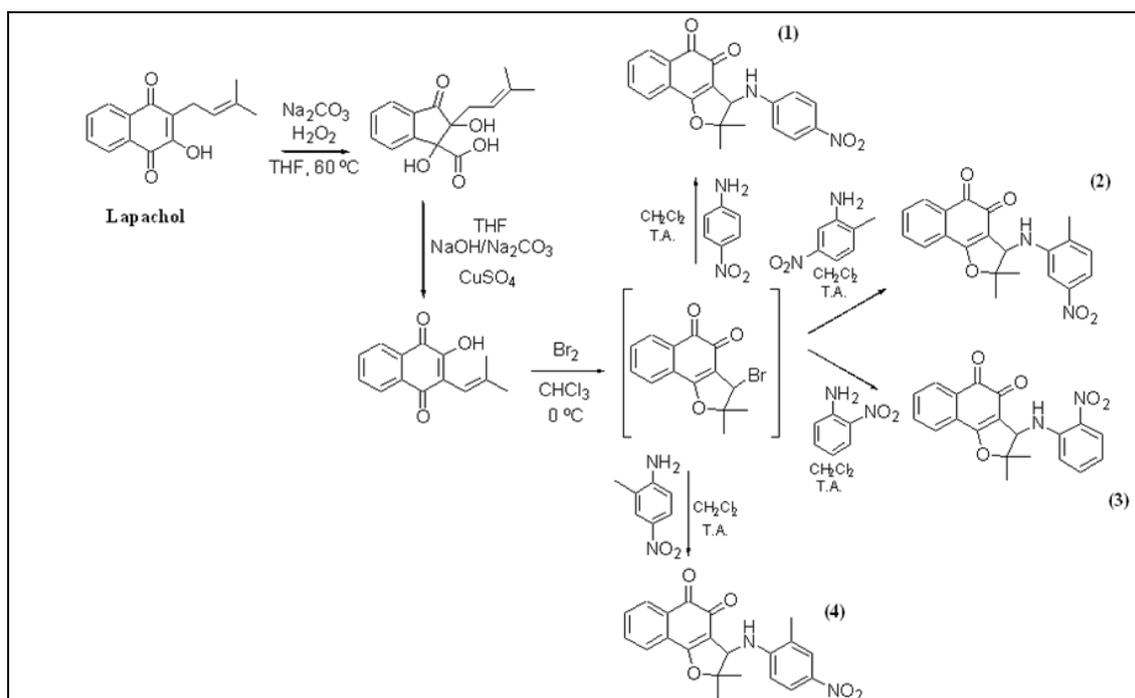


Figura 15 - Rota de síntese dos derivados arilaminos substituídos da *nor*- β -lapachona

- (1) 2,2-dimetil-3-(4-nitro-arilamino)-2,3-diidro-nafto[1,2-b]furan-4,5-diona;
- (2) 2,2-dimetil-3-(2-metil-5-nitro-arilamino)-2,3-diidro-nafto[1,2-b]furan-4,5-diona;
- (3) 2,2-dimetil-3-(2-nitro-arilamino)-2,3-diidro-nafto[1,2-b]furan-4,5-diona;
- (4) 2,2-dimetil-3-(2-metil-4-nitro-arilamino)-2,3-diidro-nafto[1,2-b]furan-4,5-diona.

3.3.2 Estudo da atividade antiproliferativa em células tumorais

A avaliação do potencial antiproliferativo dos compostos estudados frente a diferentes linhagens de células tumorais foi realizada através do método colorimétrico do MTT (MOSMANN, 1983). O ensaio do MTT se baseia na capacidade da succinato desidrogenase, uma enzima do Ciclo de Krebs ativa em mitocôndrias de células metabolicamente viáveis, em

converter o sal 3-(4,5-dimetil-2-tiazol)-2,5-difenil-brometo de tetrazolio (MTT), que é hidrossolúvel e de cor amarela, em cristais de formazan, que são de cor azul escura e não solúveis em água (KONDO *et al.*, 1966; WASSERMAN; TWENTYMAN, 1988). Essa técnica permite analisar a viabilidade e o estado metabólico da célula, sendo assim bastante útil no estudo de citotoxicidade (BERRIDGE, 1996).

3.3.2.1 Procedimento experimental

As linhagens leucêmicas (crescimento em suspensão) e as de tumores sólidos (crescimento em monocamadas) foram distribuídas em multiplacas de 96 cavidades numa densidade de $0,3 \times 10^6$ células/mL, para as linhagens de leucemia, $0,7 \times 10^5$ células/mL para as linhagens de crescimento em monocamadas (aderidas). Os compostos (dissolvidos em DMSO) foram incubados durante 72 horas juntamente com a suspensão de células com concentrações variando de 0,04 a 21,92 μM . A doxorrubicina foi utilizada como controle positivo com concentrações variando de 0,007 a 9,19 μM .

Paralelamente, outro experimento foi conduzido com as linhagens de leucemia HL-60 e de carcinoma de próstata DU-145 na presença ou na ausência de 15 mM de glutatona reduzida (GSH) durante 24 horas de incubação, para avaliar os efeitos dos radicais livres sobre a proliferação celular.

Após o período de incubação (24 ou 72 horas), as placas foram centrifugadas (1500 rpm /15 min), e o sobrenadante foi descartado. Cada cavidade recebeu 200 μL da solução de MTT (10% em meio RPMI 1640) e foi reincubada durante 3 horas, em estufa a 37°C e a 5% CO_2 . Após esse período, as placas foram novamente centrifugadas (3000 rpm/10 min), o sobrenadante foi desprezado, e o precipitado foi ressuspenso em 150 μL de DMSO. Para a quantificação do sal reduzido nas células metabolicamente viáveis, as absorbâncias foram lidas com o auxílio do espectrofotômetro de placa, no comprimento de onda de 550 nm.

3.3.2.2 Análise dos dados

As substâncias foram testadas em diluições seriadas, em duplicata ou triplicata. Foi registrada a percentagem de inibição x log da concentração e determinado suas CI_{50}

(concentração inibitória média capaz de provocar 50% do efeito máximo) e seus respectivos intervalos de confiança (IC 95%) realizado a partir de regressão não-linear utilizando o programa Prism versão 4.0 (GraphPad Software, San Diego, CA, EUA).

3.3.3 Estudo da atividade antiproliferativa em células não tumorais

Para avaliar os efeitos citotóxicos dos compostos sobre a proliferação de células não tumorais, o ensaio do Alamar Blue foi realizado utilizando células mononucleadas do sangue periférico (CMSP) como modelo. O Alamar Blue, recentemente identificado como resazurina (O'BRIEN *et al.*, 2000), é um indicador fluorescente/colorimétrico com propriedades redox. Como os sais de tetrazolio, o Alamar Blue é reduzido em células proliferantes. A forma oxidada é azul (não fluorescente/célula não viável) e a forma reduzida é rósea (fluorescente/célula viável). Portanto, a redução do Alamar Blue reflete a proliferação celular. Este ensaio foi inicialmente utilizado para indicar o crescimento e/ou a viabilidade celular durante o monitoramento da proliferação de linfócitos (AHMED *et al.*, 1994).

3.3.3.1 Procedimento experimental

As células foram distribuídas em multiplacas de 96 cavidades numa densidade de 4×10^5 células/mL. Após 24 horas de incubação, as células foram expostas aos compostos (0,04 a 21,92 μ M) durante 72 horas. Vinte e quatro horas antes do término do período de exposição, 10 μ L da solução de Alamar Blue (0,312 mg/mL) foram adicionados a cada poço da multiplaca. As absorbâncias foram mensuradas nos comprimentos de onda de 570 nm (reduzido) e 595 nm (oxidado), com o auxílio do espectrofotômetro de placa (AHMED *et al.* 1994).

3.3.3.2 Análise dos dados

A proliferação celular foi calculada utilizando a seguinte fórmula: % proliferação = $A_{LW} - (A_{HW} \times R_0) \times 100$. Onde, A_{LW} e A_{HW} são as absorbâncias no menor e maior comprimento de onda, respectivamente. O R_0 foi calculado utilizando a seguinte fórmula: $R_0 = AO_{LW}/AO_{HW}$. Onde, AO_{LW} e AO_{HW} são as absorbâncias do meio adicionado ao alamar

blue subtraído das absorbâncias do meio isolado nos comprimentos de onda menor e maior, respectivamente. As substâncias foram testadas em diluições seriadas, em duplicata ou triplicata. Foi registrada a percentagem de inibição x log da concentração e determinado suas CI_{50} e seus respectivos intervalos de confiança (IC 95%) realizado a partir de regressão não-linear utilizando o programa Prism versão 4.0 (GraphPad Software, San Diego, CA, EUA).

3.3.4 Avaliação da atividade hemolítica em eritrócitos de camundongos

Esta metodologia permite avaliar o potencial da substância teste em causar lesões na membrana plasmática da célula, seja pela formação de poros ou pela ruptura total. Este teste utiliza hemácias de camundongos que guardam grande semelhança às hemácias humanas, principalmente em relação à sensibilidade (Costa-Lotufu, 1998; 2002; DRESCH *et al.*, 2005).

3.3.4.1 Procedimento experimental

Foi coletado o sangue de três camundongos (*Mus musculus* Swiss) por via orbital (animais previamente anestesiados com éter etílico), sendo diluído em 1:30 de solução salina (NaCl 0,85% + CaCl₂ 10 mM). Os eritrócitos foram lavados 2 vezes em solução salina por centrifugação (1500 rpm/3 min.) para redução da contaminação plasmática e ressuspensos em solução salina para obtenção de uma suspensão de eritrócitos (SE) a 2%. Os ensaios foram realizados em multiplacas com 96 cavidades. Cada poço da 1ª fileira recebeu 100 µL da solução salina. Na 2ª, os poços receberam 50 µL da solução salina e 50 µL do veículo de diluição da substância teste, neste caso, DMSO 10%. Aos poços da 3ª fileira, foram adicionados 100 µL de solução salina e 100 µL das substâncias teste em solução. Da 4ª fileira em diante os poços receberam 100 µL da solução salina, excetuando-se os da última fileira, que receberam 80 µL de solução salina e 20 µL de Triton X – 100 1% (controle positivo). As diluições foram feitas da 3ª à 11ª cavidade, retirando-se 100 µL da solução da cavidade anterior e transferindo para a seguinte de modo que as concentrações foram sempre diluídas pela metade, variando de 0,21 a 219,29 µM. Em seguida, 100 µL da suspensão de eritrócitos foram adicionadas em todos os poços. As placas permaneceram sob agitação constante por no mínimo 1 hora à temperatura ambiente (26 ± 2°C). Após esse período, as placas foram

centrifugadas (5000 rpm/3 min.) e o sobrenadante transferido para outra placa para a leitura da absorbância da hemoglobina no espectrofotômetro de placas a 540 nm. A atividade das substâncias teste foi determinada de maneira relativa ao valor dos controles positivo e negativo.

3.3.5 Estudo dos mecanismos de ação citotóxico

O estudo dos mecanismos de ação responsáveis pela citotoxicidade dos compostos foi realizado utilizando a linhagem leucêmica HL-60 e de próstata DU-145.

Para avaliar a importância da enzima NAD(P)H:quinona óxido-redutase (NQO1) sobre a citotoxicidade dos compostos, foi utilizada a linhagem HL-60, que é deficiente na expressão da enzima NQO1 (FITZSIMMONS *et al.*, 1996; PINK *et al.*, 2000; TUDOR *et al.*, 2003) e a linhagem de carcinoma de próstata DU-145 que superexpressa a enzima NQO1 (FITZSIMMONS *et al.*, 1996; PLANCHON *et al.*, 2001).

As concentrações dos compostos (*nor*- β -lapachona e seus derivados) utilizadas nos experimentos subsequentes foram baseadas nos valores de CI_{50} após 24 horas de exposição, avaliados pelo método do MTT (subitem 3.3.2.). As concentrações celulares utilizadas nos estudos de mecanismos de ação foram: $0,3 \times 10^6$ células/mL (HL-60) e $0,7 \times 10^5$ células/mL (DU-145).

3.3.5.1 Avaliação da inibição da síntese de DNA replicativa através da técnica da incorporação da 5-bromo-2-deoxiuridina em células HL-60

A 5-bromo-2-desoxiuridina (BrDU) é uma base nitrogenada análoga a timina. Quando as células estão sintetizando DNA o BrDU é incorporado no lugar da timina. A detecção do BrDU incorporado nas células é feita por técnicas imunohistoquímicas (PERA *et al.*, 1977; HOLM *et al.*, 1998). O BrDU é adicionado 3h antes do término do período de incubação (24 horas), para que esse seja incorporado ao DNA das células em mitose. Em seguida são adicionados os anticorpos e um cromógeno específico, a diaminobenzidina (DAB). Para corar as células não marcadas pelo cromógeno, utiliza-se Hematoxilina (0,1%). São contadas 200 (duzentas) células com o auxílio do microscópio óptico. Consideram-se positivas para proliferação, as células de núcleo corado pelo DAB (cor marrom) e, negativas, as células de núcleo corado com Hematoxilina (cor azul).

3.3.5.1.1 Procedimento experimental

Culturas de HL-60 foram tratadas com os compostos (0,5, 1 e 4 μM) durante 24 horas. Três horas após a adição do BrdU (10 mM) nas culturas, lâminas para cada amostra foram confeccionadas e postas para secar por 2 h. Após o período de secagem, as lâminas foram fixadas em metanol por 1 minutos. As células foram lavadas com tampão Tris (TBS) e incubadas em solução desnaturante por 90 minutos a 60° C e pH 7,4. Após uma segunda lavagem com TBS, as células foram incubadas com anticorpo primário e deixadas na geladeira durante a noite em câmara úmida. As células foram incubadas com anticorpo secundário biotilado por 20 minutos e, em seguida, com a solução de estreptavidina-fluoresceína por mais 20 minutos. Foi adicionado o cromógeno diaminobenzidina (DAB) por 1-5 minutos e, em seguida, removido com água destilada. A contracoloração das células foi realizada com hematoxilina de Hanks a 0,1%. A Doxorubicina (0,6 μM) foi usada como controle positivo.

3.3.5.1.2 Análise dos dados

Os dados foram analisados a partir da média \pm E.P.M. de 3 experimentos independentes. Para verificação da ocorrência de diferenças significativas entre os diferentes grupos, os dados foram comparados por análise de variância (ANOVA) seguida de Student Newman Keuls ($p < 0,05$) utilizando o programa Prism versão 4.0 (GraphPad Software, San Diego, CA, EUA).

3.3.5.2 Análise morfológica de células HL-60 através da coloração diferencial por brometo de etídio/laranja de acridina

O método de coloração pelo brometo de etídio / laranja de acridina (MCGAHON *et al.*, 1995) permite diferenciar células viáveis daquelas em processo de morte por apoptose ou necrose através da coloração diferencial por fluorescência. Este método baseia-se na revelação das células (controle e tratadas) com a coloração por brometo de etídio (BE) e laranja de acridina (LA) no núcleo. A laranja de acridina intercala-se ao DNA, conferindo aparência verde ao núcleo celular, sendo capaz de atravessar membranas intactas

(lipossolúvel). O brometo de etídio é incorporado majoritariamente por células não viáveis (com instabilidade de membrana), intercalando-se ao DNA corando-o de laranja; ligando-se fracamente ao RNA, que se mostrará com uma coloração vermelha. As células viáveis com membrana intacta apresentam núcleo uniformemente corado de verde pela LA; O BE marca muito fracamente ou muitas vezes não marca, pois não atravessa a membrana íntegra. As células em apoptose inicial (membrana ainda intacta) apresentam manchas verdes brilhantes no núcleo (condensação da cromatina) e não são marcadas por BE; morfologicamente observam-se alterações da membrana em decorrência da formação de corpúsculos apoptóticos. As células em necrose (lesão de membrana) apresentam um padrão de coloração uniforme, laranja-avermelhada e não há formação de corpos apoptóticos (BASKIC *et al.*, 2006).

3.3.5.2.1 Procedimento experimental

As culturas de HL-60 foram tratadas com os compostos (0,5, 1 e 4 μM) durante 4 e 24 horas. A suspensão de células foi transferida para um tubo eppendorf e centrifugada (1000 rpm/5min). O sobrenadante foi descartado e as células foram ressuspensas em 20 μL de solução de PBS. Em seguida, 1 μL da solução de BE/LA (1:1) foi adicionado a cada tubo e uma alíquota dessas células transferido para uma lâmina e montado com lamínula e em seguida levadas ao microscópio de fluorescência para observação dos eventos celulares.

3.3.5.2.2 Análise dos dados

Para a quantificação percentual, trezentas células foram contadas diferenciando-as entre células viáveis, apoptóticas e necróticas. Os dados foram analisados a partir da média \pm E.P.M. de 3 experimentos independentes. Para verificação da ocorrência de diferenças significativas entre os diferentes grupos, os dados foram comparados por análise de variância (ANOVA) seguida de Student Newman Keuls ($p < 0,05$) utilizando o programa Prism versão 4.0 (GraphPad Software, San Diego, CA, EUA).

3.3.5.3 Avaliação dos efeitos dos compostos sobre a integridade da membrana celular de HL-60

Este método consiste na capacidade do iodeto de propídeo (IP) se ligar ao DNA de células cuja membrana plasmática esteja rompida, como nos casos de apoptose tardia e necrose, emitindo uma alta fluorescência quando excitado pelo laser de argônio (488nm). Nas células cuja membrana permanece íntegra (células viáveis ou estágios iniciais da apoptose), o IP não consegue penetrar e, portanto emite uma fluorescência mais baixa, com isso as células com membrana íntegra podem ser diferenciadas daquelas com membrana rompida (MACKLIS; MADISON, 1990).

3.3.5.3.1 Procedimento experimental

A determinação da integridade da membrana celular foi avaliada por citometria de fluxo utilizando o IP como agente fluorogênico. As células (HL-60) foram cultivadas em placas de 24 poços e tratadas com os compostos (0,5, 1 e 4 μM) durante 4 e 24 horas. Após o período de exposição, uma alíquota de 50 μL da suspensão celular foi transferida para um tubo eppendorf e incubada por mais 5 minutos com 100 μL de IP (50 $\mu\text{g}/\text{mL}$) na ausência de luz (MILITÃO *et al.*, 2006). A doxorrubicina (0,6 μM) foi utilizada como controle positivo e o DMSO (0,1 %) serviu como controle negativo. Os ensaios foram realizados em três experimentos independentes realizados em triplicatas. Cinco mil eventos foram analisados em cada amostra.

3.3.5.3.2 Análise dos dados

Os dados foram analisados a partir da média \pm E.P.M. de 3 experimentos independentes. Para verificação da ocorrência de diferenças significativas entre os diferentes grupos, os dados foram comparados por análise de variância (ANOVA) seguida de Student Newman Keuls ($p < 0,05$) utilizando o programa Prism versão 4.0 (GraphPad Software, San Diego, CA, EUA).

3.3.5.4 Estudo dos efeitos dos compostos sobre o potencial transmembrânico mitocondrial ($\Delta\psi_m$) de células HL-60

A apoptose pode ser ativada por duas vias, extrínseca e intrínseca. A via intrínseca, ao contrário da extrínseca, envolve a participação mitocondrial durante a iniciação do processo apoptótico. Quando bcl-2/xl é liberado da membrana externa da mitocôndria, forma-se um poro permitindo a saída de H^+ , causando despolarização mitocondrial, e também o extravasamento de fatores apoptóticos como citocromo c, Smac/Diablo, dentre outros (STRASSER *et al.*, 2000; ELMORE, 2007).

A rodamina 123, um corante fluorescente nucleofílico, é sequestrado para dentro da mitocôndria quando esta apresenta $\Delta\psi_m$ inalterado. Assim, as células viáveis emitirão alta fluorescência verde devido à maior quantidade de rodamina 123 ligada às cargas positivas internas, enquanto que as mitocôndrias despolarizadas terão menor afinidade pelo corante, gerando eventos que emitirão menor fluorescência. Deste modo, este ensaio foi utilizado para a investigação da ativação da via apoptótica intrínseca por parte da substância em estudo através da observação da alteração do $\Delta\psi_m$ (MARCHETTI *et al.*, 1996).

3.3.5.4.1 Procedimento experimental

A determinação do $\Delta\psi_m$ foi avaliada por citometria de fluxo utilizando a rodamina 123 como agente fluorogênico. As células (HL-60) foram cultivadas em placas de 24 poços e tratadas com os compostos (0,5, 1 e 4 μM) durante 4 e 24 horas.

Um segundo experimento foi realizado com o objetivo de correlacionar a participação mitocondrial sobre o processo de morte celular. Nesse experimento, as culturas de HL-60 foram pré-tratadas com 5 μM ciclosporina A (CsA), um inibidor da transição da permeabilidade mitocondrial (TPM), durante 30 minutos e depois expostas aos compostos em uma única concentração (4 μM) por 4 horas.

Após os tratamentos, uma alíquota de 50 μL da suspensão de células foi transferida para um tubo eppendorf e incubada por 15 minutos com 200 μL de solução de rodamina 123 (1 $\mu g/mL$ em PBS), na ausência de luz e a 37 °C. Após o período de incubação as células foram centrifugadas e o sobrenadante foi descartado. O precipitado foi ressuspenso em PBS e reincubado por 30 minutos e, então, analisadas por citometria de fluxo (MILITÃO *et al.*, 2006). Os ensaios foram realizados em três experimentos independentes realizados em triplicatas. Cinco mil eventos foram analisados em cada amostra.

3.3.5.4.2 Análise dos dados

Os dados foram analisados a partir da média \pm E.P.M. de 3 experimentos independentes. Para verificação da ocorrência de diferenças significativas entre os diferentes grupos, os dados foram comparados por análise de variância (ANOVA) seguida de Student Newman Keuls ($p < 0,05$) utilizando o programa Prism versão 4.0 (GraphPad Software, San Diego, CA, EUA).

3.3.5.5 Estudos dos efeitos dos compostos sobre a progressão do ciclo celular de células HL-60

O ciclo celular é constituído pelas seguintes fases: G_1 , S, G_2 e M. Durante o período de crescimento celular (fase G_1) uma célula diplóide apresenta um conteúdo $2n$ (n – conteúdo de um conjunto haplóide de cromossomos) de DNA nuclear, possui duas cópias de cada gene. Durante a fase S ocorre a duplicação do genoma nuclear ($2 \rightarrow 4n$) e na fase seguinte (fase G_2) ocorre o segundo período de crescimento celular, durante o qual o conteúdo em DNA nuclear é mantido no nível $4n$. Em seguida ocorre a mitose (fase M, $4n$) durante a qual a célula se divide, formando duas células filhas, cada uma com um conteúdo $2n$ em DNA. As células que não se encontram em divisão celular (G_0) apresentam um conteúdo $2n$ de DNA. Assim, as diferentes fases do ciclo celular podem ser determinadas a partir do conteúdo de DNA que elas apresentam. Deste modo, o resultado da distribuição do conteúdo de DNA nuclear de uma população de células pode dar-se em G_0/G_1 , S e G_2/M . Adicionalmente, DNA fragmentado (hipodiplóide) pode ser detectado (baixa fluorescência) devido a diferenças na emissão de fluorescência quando comparados ao DNA íntegro (SHAPIRO, 1985; CIBAS, 1995).

3.3.5.5.1 Procedimento experimental

A determinação do conteúdo de DNA nuclear da célula, que reflete as fases do ciclo celular e sua fragmentação foi avaliada por citometria de fluxo utilizando o IP como agente fluorogênico. Após o tratamento a membrana plasmática das células é lisada por um detergente para que o IP possa se ligar ao núcleo. Assim, as fases do ciclo celular foram

determinadas através do conteúdo do DNA que elas apresentavam (MELAMED *et al.*, 1979; SHAPIRO, 1985; CIBAS, 1995).

As células (HL-60) foram cultivadas em placas de 24 poços e tratadas com os compostos (0,5, 1 e 4 μM) durante 4 e 24 horas. Em paralelo, outro ensaio foi realizado com o propósito de avaliar a participação mitocondrial sobre a fragmentação do DNA nuclear (sub- G_0/G_1). Nesse ensaio, as culturas de HL-60 foram pré-tratadas com CsA (5 μM) durante 30 minutos e depois expostas aos compostos em uma única concentração (4 μM) por 4 horas.

Após os tratamentos, uma alíquota de 50 μL da suspensão celular foi transferida para um tubo eppendorf e incubadas com uma solução de lise contendo o IP (0,1% de citrato de sódio, 0,1 % de triton X-100 e 2 $\mu\text{g}/\text{mL}$ IP em PBS), na ausência de luz e a 37 °C, e, após 30 minutos, analisadas por citometria de fluxo (MILITÃO *et al.*, 2006). A doxorrubicina (0,6 μM) foi utilizada como controle positivo e o DMSO (0,1 %) serviu como controle negativo. Os ensaios foram realizados em três experimentos independentes realizados em triplicatas. Cinco mil eventos foram analisados em cada amostra.

3.3.5.5.2 Análise dos dados

Os dados foram analisados a partir da média \pm E.P.M. de 3 experimentos independentes. Para verificação da ocorrência de diferenças significativas entre os diferentes grupos, os dados foram comparados por análise de variância (ANOVA) seguida de Student Newman Keuls ($p < 0,05$) utilizando o programa Prism versão 4.0 (GraphPad Software, San Diego, CA, EUA).

3.3.5.6 Estudos dos efeitos dos compostos sobre a externalização da fosfatidilserina em células HL-60

Durante o processo apoptótico, a fosfatidilserina (PS), um fosfolípídeo de membrana interna, é externalizado para a superfície da membrana celular, servindo como marcação para que a célula seja fagocitada por macrófagos (VERMES *et al.*, 1995). A anexina V é uma proteína cálcio-dependente que possui uma alta afinidade por PS e, portanto, pode se ligar ao PS externalizado na célula em apoptose (KRYSKO *et al.*, 2008).

3.3.5.6.1 Procedimento experimental

A detecção da externalização da fosfatidilserina foi avaliada por citometria de fluxo utilizando anexina V conjugada com fluoresceína (FITC) (Guava Nexin kit, Guava Technologies, Inc., Hayward, CA, EUA) e IP (indicador de células necróticas).

As células (HL-60) foram cultivadas em placas de 24 poços e tratadas com os compostos (0,5, 1 e 4 μM) durante 4 horas. Após o período de incubação, uma alíquota de 50 μL da suspensão celular foi transferida para um tubo eppendorf, lavadas com PBS e ressuspendidas em uma solução contendo anexina V-FITC e IP na ausência de luz e a 37 °C e, após 20 minutos, analisadas por citometria de fluxo. A doxorrubicina (0,6 μM) foi utilizada como controle positivo e o DMSO (0,1 %) serviu como controle negativo. Os ensaios foram realizados em três experimentos independentes realizados em triplicatas. Cinco mil eventos foram analisados em cada amostra.

3.3.5.6.2 Análise dos dados

Os dados foram analisados a partir da média \pm E.P.M. de 3 experimentos independentes. Para verificação da ocorrência de diferenças significativas entre os diferentes grupos, os dados foram comparados por análise de variância (ANOVA) seguida de Student Newman Keuls ($p < 0,05$) utilizando o programa Prism versão 4.0 (GraphPad Software, San Diego, CA, EUA).

3.3.5.7 Avaliação dos efeitos dos compostos sobre a ativação de caspases (3 e 7) em células HL-60

As caspases pertencem a família de proteases cisteínas, podendo ser divididas em caspases inflamatórias e caspases apoptóticas, as quais podem ser incluídas nos grupos de caspases iniciadoras (como no caso da apoptose as caspases-8 e -9) e efetoras (como no caso da apoptose as caspases-3 e -7). A ativação das caspase-3 e -7 possui papel central no mecanismo de apoptose. As efetoras são as responsáveis pela clivagem de vários componentes celulares relacionados ao reparo e controle do DNA. Assim, a quantificação de caspases ativadas permite o estudo de mecanismos apoptóticos (MEHMET, 2002).

3.3.5.7.1 Procedimento experimental

A detecção das caspases-3 e -7 ativadas foi avaliada por citometria de fluxo utilizando o kit Guava Caspases 3/7 FAM (Guava Technologies, Inc., Hayward, CA, EUA). As células (HL-60) foram cultivadas em placas de 24 poços e tratadas com os compostos (0,5, 1 e 4 μM) durante 4 horas.

Um segundo experimento foi conduzido com o propósito de avaliar a participação mitocondrial sobre a ativação das caspases-3 e -7. Nesse ensaio, as culturas de HL-60 foram pré-tratadas com CsA (5 μM) durante 30 minutos e depois expostas aos compostos (0,5, 1 e 4 μM) por 4 horas.

Após os tratamentos, as células foram incubadas por 1 hora na ausência de luz e a 37 °C com FLICATM (fluorocromo inibidor de caspases que se liga covalentemente as caspases-3 e -7 ativadas). Posteriormente, 80 μL do tampão de lavagem (fabricante) foram adicionados aos tubos e, então, centrifugados (2000 rpm/5 min). Em seguida, as células foram ressuspensas em uma solução composta de IP e tampão de lavagem e analisadas por citometria de fluxo. A doxorrubicina (0,6 μM) foi utilizada como controle positivo e o DMSO (0,1 %) serviu como controle negativo. Os ensaios foram realizados em três experimentos independentes realizados em triplicatas. Cinco mil eventos foram analisados em cada amostra.

3.3.5.7.2 Análise dos dados

Os dados foram analisados a partir da média \pm E.P.M. de 3 experimentos independentes. Para verificação da ocorrência de diferenças significativas entre os diferentes grupos, os dados foram comparados por análise de variância (ANOVA) seguida de Student Newman Keuls ($p < 0,05$) utilizando o programa Prism versão 4.0 (GraphPad Software, San Diego, CA, EUA).

3.3.5.8 Avaliação dos efeitos dos compostos sobre a produção de espécies reativas de oxigênio intracelular em células HL-60 e DU-145

As espécies reativas de oxigênio (EROS) geradas intracelularmente foram avaliadas utilizando diacetato 2',7'-diclorodihidrofluoresceína (H2DCFDA). H2DCFDA se difunde através das membranas celulares e é facilmente hidrolisado por esterases intracelulares para

formar o DCFH (não fluorescente), que depois é rapidamente oxidado ao DFC (2'7'-diclorohidrofluoresceína), altamente fluorescente, por uma ampla diversidade de EROS (CROW, 1997; HEMPEL *et al.*, 1999; GOMES *et al.*, 2005), podendo detectar além dos radicais hidroxil (HO^\bullet), peroxil (ROO^\bullet) e peroxinitrito (ONOO^\bullet), outros compostos que estão envolvidos em reações que geram radicais livres, como o peróxido de hidrogênio (H_2O_2) e o oxigênio singlete ($^1\text{O}_2$) (BARTOSZ, 2006). A intensidade de fluorescência do DCF é proporcional à quantidade de ROS formadas intracelularmente (LEBEL *et al.*, 1992).

3.3.5.8.1 Procedimento experimental

Com o intuito de averiguar a participação da enzima NQO1 sobre a produção de EROS, as células (HL-60 e DU-145) foram cultivadas em placas de 24 poços e tratadas com os compostos (0,5, 1 e 4 μM) durante 4 horas na presença ou na ausência de 50 μM do inibidor enzimático dicumarol (Dic).

Além disso, foi estudada a influência da modulação do conteúdo intracelular de glutathiona (antioxidante enzimático) sobre a produção de EROS. Para esse ensaio, as células (HL-60 e DU-145) foram pré-tratadas durante 24 horas com 50 μM de 1-bromoheptano (BH), um agente depletor de glutathiona ou 5 mM de N-acetil-L-cisteína (NAC), agente restaurador dos níveis intracelulares de glutathiona, antes de serem expostas aos compostos (4 μM) por 4 horas.

Dentre as EROS produzidas pelas células, peróxido de hidrogênio e os radicais hidroxil (HO^\bullet) são os mais reativos e mais potentes agentes oxidantes (CHENG *et al.*, 2002) capazes de oxidar carboidratos, lipídios, proteínas e DNA (BARBOSA *et al.*, 2006). Com a finalidade de se detectar a presença dessas espécies reativas, as células (HL-60 e DU-145) foram tratadas com os compostos (4 μM) durante 4 horas na presença ou na ausência de 5 mM de iodeto de potássio (IK), agente seqüestrador de radicais hidroxil e de H_2O_2 (EBLIN *et al.*, 2008).

Após os diferentes tratamentos, as células foram incubadas na presença de H2DCFDA (20 μM) na ausência de luz e a 37 °C por 30 minutos. Posteriormente as células foram lavadas e ressuspendidas em PBS e analisadas por citometria de fluxo. A β -lapachona (0,5 a 4 μM) foi utilizada como controle positivo e o DMSO (0,1 %) serviu como controle negativo. Os ensaios foram realizados em três experimentos independentes realizados em triplicatas. Cinco mil eventos foram analisados em cada amostra.

3.3.5.8.2 Análise dos dados

Os dados foram analisados a partir da média \pm E.P.M. de 3 experimentos independentes. Para verificação da ocorrência de diferenças significativas entre os diferentes grupos, os dados foram comparados por análise de variância (ANOVA) seguida de Student Newman Keuls ($p < 0,05$) utilizando o programa Prism versão 4.0 (GraphPad Software, San Diego, CA, EUA).

3.3.5.9 Ensaio do Cometa

Desenvolvido por Ostling e Johanson (1984) e modificado por Singh *et al.* (1988) e, posteriormente, por Olive (1989), o teste do cometa, também conhecido como *Single-cell gel electrophoresis* (SCGE) 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).

3.3.5.9.1 Procedimento experimental

1) Tratamento

- a) Para avaliar a indução de quebras de fita simples na molécula de DNA, o ensaio foi realizado em condições alcalinas (KLAUDE *et al.*, 1996; TICE *et al.*, 2000; LIAO *et al.*, 2009) e para estimativa de quebras de fitas duplas na molécula de

DNA, o ensaio foi conduzido em condições neutras (WOJEWODZKA *et al.*, 2002). Nesse experimento, as células (HL-60 e DU-145) foram cultivadas em placas de 24 poços e tratadas com os compostos (0,5, 1 e 4 μM) durante 4 horas. β -lapachona (0,5 a 4 μM) serviu como controle positivo;

b) Com o objetivo de correlacionar a participação enzimática de NQO1 sobre a indução de quebras de fitas no DNA, as células (HL-60 e DU-145) foram cultivadas em placas de 24 poços e tratadas com os compostos (0,5, 1 e 4 μM) durante 4 horas na presença ou na ausência de 50 μM do inibidor enzimático dicumarol. β -lapachona (0,5 a 4 μM) serviu como controle positivo. Nesse experimento, o ensaio do cometa foi conduzido em condições alcalinas;

c) Para avaliar a influência da modulação do conteúdo intracelular de glutathiona sobre a indução de quebras de fitas do DNA, as células (HL-60 e DU-145) foram pré-tratadas durante 24 horas com 50 μM de BH ou 5 mM de NAC antes de serem expostas aos compostos (4 μM) por 4 horas. β -lapachona (4 μM) serviu como controle positivo. Nesse experimento, o ensaio do cometa foi conduzido em condições alcalinas;

d) Para o estudo de reparo das lesões no DNA, as células de carcinoma de próstata DU-145 foram tratadas com os compostos (4 μM) durante 4 horas. Após a exposição, as células foram lavadas com RPMI-1640, centrifugadas (1000 rpm por 5 minutos) e re-incubadas, na ausência dos compostos. Alíquotas da suspensão celular foram analisadas depois de 2, 4 e, 24 horas para avaliar a cinética de reparo das lesões induzidas através do teste do cometa em condições alcalinas. β -lapachona (4 μM) foi utilizada como controle positivo;

e) Para analisar a influência dos compostos sobre a persistência dos danos induzidos pelo metil-metano-sulfonado (MMS), as células DU-145 foram expostas a 80 μM de MMS por 1 hora e pós-tratadas como os compostos (0,5 μM) durante 2, 4 e, 24 horas. O MMS é um agente alquilante que induz lesões na molécula de DNA e tais lesões são reparadas por mecanismos celulares específicos, como detalhado na literatura científica (JANION *et al.*, 1989; GRZESIUK; JANION, 1996). O ensaio do cometa foi conduzido em condições alcalinas.

2) Preparo das laminas

As lâminas foram previamente cobertas com agarose de ponto de fusão normal (0,5%) a uma temperatura de 60°C em solução de PBS livre de Ca^{2+} e Mg^{2+} , mantidos a temperatura ambiente até a solidificação. As células tratadas foram embebidas em uma solução de agarose de baixo ponto de fusão (1,5%) a 37°C e adicionadas as lâminas pré-cobertas com agarose de ponto de fusão normal. Posteriormente, as lâminas foram cobertas com lamínulas para uniformizar a distribuição do material na lâmina e mantidas a 4°C para solidificação da agarose.

3) Lise Celular

Após a solidificação da agarose, a lamínula foi delicadamente removida e as lâminas imersas na solução de lise (5 M NaCl, 100 mL EDTA, 10mM Tris, 1% N-Lauroyl sarcosine, 1% Triton X-100, 10% DMSO, pH 10,0), abrigada da luz a 4°C por no mínimo 1 hora.

4) Neutralização e Eletroforese

Após o procedimento anterior, as lâminas foram imersas em uma solução de neutralização (0,4 M Tris, pH 7,5) por 15 minutos. Posterior a esta etapa, as lâminas foram dispostas horizontalmente na cuba de eletroforese e preenchida com uma solução alcalina (pH > 13,0) a 4°C (1mM Na_2EDTA , 300 mM NaOH), ou solução alcalina (pH 8,5) a 4°C (100 mM Tris, 300 mM acetato de sódio). As lâminas repousaram por 20 minutos (versão alcalina) e por 1 hora (versão neutra) para permitir o relaxamento do DNA e a conversão de sítios álcali-lábeis em quebra de fitas simples e duplas. A corrida eletroforética foi conduzida a baixa temperatura (4°C) durante 20 minutos na versão alcalina (25 V; 300 mA) e por 60 minutos (14 V; 12 mA) na versão neutra. Todos esses passos foram realizados na ausência de luz. Após a eletroforese, as lâminas foram novamente neutralizadas por 5 minutos e fixadas em etanol a 100%.

5) Coloração e Análise

As lâminas foram coradas com brometo de etídio (20 µg/mL) e analisadas com o auxílio de microscópio de fluorescência. A análise foi realizada de acordo com o padrão de escores previamente determinados pelo tamanho e intensidade da cauda do cometa (figura 16). Foram contados 100 cometas por lâmina (LOVELL *et al.*, 1999) e classificados, por análise visual, dentre cinco categorias (0, 1, 2, 3 e 4) que representam a percentagem de DNA na cauda do cometa, indicando o grau de lesão sofrido pela célula.

O índice de dano (ID) ao DNA foi obtido pela seguinte fórmula:

$$ID = \sum_{i=0}^4 n_i \times i,$$

onde n_i é o número de células com nível de dano i (0, 1, 2, 3 ou 4).

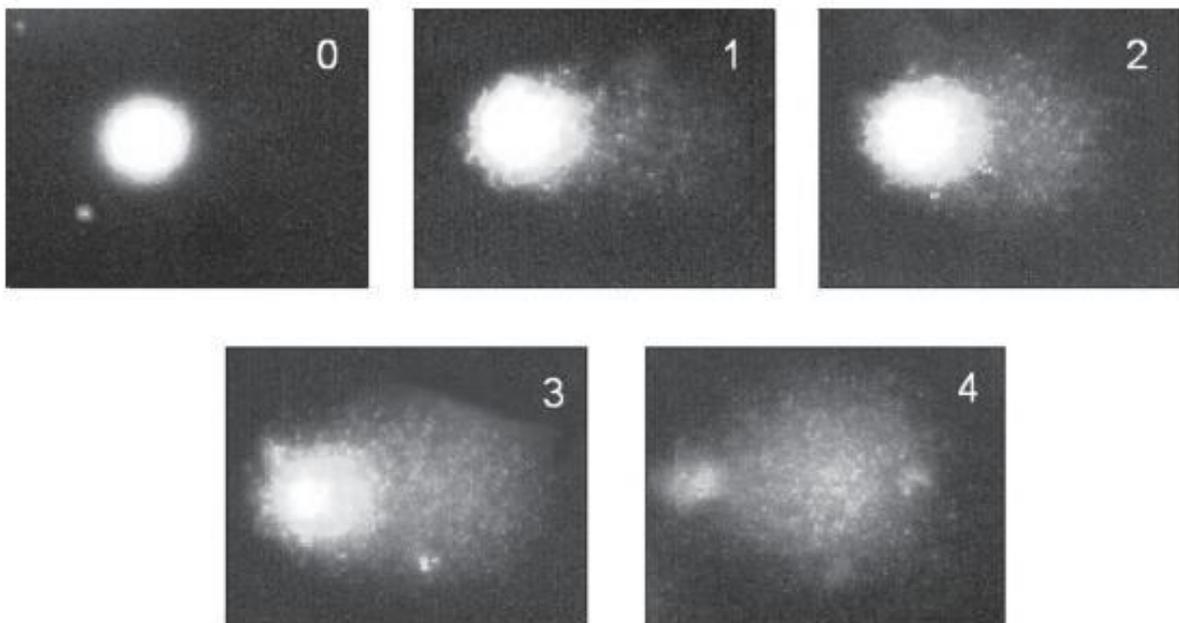


Figura 16 - Tipos de cometa

Classificação por categoria de dano:

- (0) sem dano (< 5%);
- (1) Baixo nível de dano (5 - 20%);
- (2) médio nível de dano (20 - 40%);
- (3) alto nível de dano (40 - 95%);
- (4) dano máximo (> 95%).

Fonte: Collins (2004).

3.3.5.9.2 Análise dos dados

Os dados foram analisados a partir da média \pm E.P.M. de 3 experimentos independentes. Para verificação da ocorrência de diferenças significativas entre os diferentes grupos, os dados foram comparados por análise de variância (ANOVA) seguida de Student Newman Keuls ($p < 0,05$) utilizando o programa Prism versão 4.0 (GraphPad Software, San Diego, CA, EUA).

3.3.5.10 Análise da síntese de DNA não-programada em células DU-145

A análise da síntese de DNA não-programada, também conhecida como *Unscheduled DNA Synthesis* (UDS) tem por objetivo avaliar a síntese de DNA após a excisão e remoção de segmentos das fitas de DNA danificadas por agentes químicos e físicos (CLEAVER, 2004). A hidroxiuréia (HU) é um quimioterápico antimetabólico que inibe a síntese replicativa de DNA sem afetar a síntese de DNA associada com o reparo das lesões na molécula de DNA (COLLINS; OATES, 1987b; HAMMOND *et al.*, 2003). MMS foi utilizado como controle positivo por induzir a síntese de DNA não-programada (YU *et al.*, 1983).

3.3.5.10.1. Procedimento experimental

Culturas de DU-145 foram tratadas com os compostos (4 μ M) durante 4 horas ou pré-tratadas com MMS (80 μ M) por 1 hora antes de serem pós-tratadas com os compostos (4 μ M) durante 4 horas. Após os tratamentos, as culturas foram lavadas com RPMI-1640 para a remoção dos compostos. Posteriormente, uma solução de HU a 3 mM foi adicionada as culturas celulares durante 30 minutos. Após a incubação com HU, foi adicionado uma solução de BrdU (10 mM) as culturas e incubada durante 3 horas. A detecção da incorporação de BrdU foi realizada como descrito no subitem 3.3.5.1.1. Duzentas células foram contadas diferenciando-as entre núcleo marrom (incorporação de BrdU) e não-marrom (sem incorporação de BrdU).

3.3.5.10.2 Análise dos dados

Os dados foram analisados a partir da média \pm E.P.M. de 3 experimentos independentes. Para verificação da ocorrência de diferenças significativas entre os diferentes grupos, os dados foram comparados por análise de variância (ANOVA) seguida de Student Newman Keuls ($p < 0,05$) utilizando o programa Prism versão 4.0 (GraphPad Software, San Diego, CA, EUA).

3.3.5.11 Estudo dos efeitos dos compostos sobre o crescimento de cepas de *S. cerevisiae* deficientes em topoisomerasas

O uso de cepas mutantes de leveduras deficientes na expressão de topoisomerasas tem servido como modelo no estudo dos mecanismos de ação de drogas que afetam a atividade da enzima ou que tem como alvo primário a inibição das topoisomerasas (BERGER; WANG, 1996; REID *et al.*, 1998; ROGOJINA; NITISS, 2008).

3.3.5.11.1 Procedimento experimental

Nesse estudo, cepas selvagem (BY4741) de *S. cerevisiae* e mutantes que não expressam a enzima topoisomerase I (*Top1 Δ*), topoisomerase III (*Top3 Δ*) e que expressam somente topoisomerase II (*Top1 Δ Top3 Δ*) foram utilizadas a fim de avaliar a possível participação das topoisomerasas sobre a citotoxicidade dos compostos.

Culturas das diferentes cepas de *S. cerevisiae* em fase exponencial de crescimento foram diluídas em PBS a uma concentração de 1×10^7 células/mL para a realização do ensaio de inibição de crescimento. Um inóculo da suspensão celular foi estriada do centro para a borda da placa de Petri em uma estria contínua. Concentrações crescentes dos compostos (10, 20, 40 e 80 $\mu\text{g/mL}$) foram adicionadas sobre um papel filtro em disco presente no centro da placa de Petri. Em seguida, as placas foram incubadas por 48 horas a 30°C. A citotoxicidade foi determinada pela medida da inibição do crescimento da borda do papel filtro em disco ao início do crescimento das células (halo de inibição). Nesse experimento, os valores do halo de inibição podem variar de 0 mm milímetros (ausência de citotoxicidade) até 30 mm (ausência total de crescimento). β -lapachona (10, 20, 40 e 80 $\mu\text{g/mL}$) foi utilizada como controle positivo.

3.3.5.11.2 Análise dos dados

Os dados foram analisados a partir da média \pm E.P.M. de 2 experimentos independentes. Para verificação da ocorrência de diferenças significativas entre os diferentes grupos, os dados foram comparados por análise de variância (ANOVA) seguida de Student Newman Keuls ($p < 0,05$) utilizando o programa Prism versão 4.0 (GraphPad Software, San Diego, CA, EUA).

3.3.6 Estudo da atividade genotóxica e mutagênica

Para os ensaios de genotoxicidade e mutagenicidade, a linhagem V79 (fibroblastos de pulmão de hamster chinês), gentilmente cedida pelo prof. Dr. João Antônio Pêgas Henriques (UFRGS), foi escolhida devido ao fato dessas células terem crescimento rápido e curto período de adaptação, tempo de geração muito curto (~12 horas), elevada eficiência de clonagem (75 a 95%), cariótipo estável (22 ± 1 cromossomos), baixa frequência de mutação espontânea (BRADLEY *et al.*, 1981) e por serem extensivamente utilizadas para esses tipos de avaliações (PEREZ *et al.*, 2002; CAVALCANTI *et al.*, 2006).

A atividade genotóxica foi avaliada pelo ensaio do cometa e o potencial mutagênico foi determinado pelo ensaio de indução de micronúcleos com o emprego de citocalasina B (bloqueador da citocinese).

3.3.6.1 Cultivo e manutenção da linhagem celular V79

As células foram cultivadas em frascos plásticos para cultura (75 cm^2 , volume de 250 mL) em meio de cultura DMEM suplementado com 10% de soro fetal bovino e 1% de antibióticos. As células foram incubadas em estufa a 37°C com atmosfera de 5% de CO_2 , tendo sido observado o crescimento celular com ajuda do microscópio de inversão a cada 24 horas.

3.3.6.2 Estudo da atividade antiproliferativa em células V79

A avaliação do potencial antiproliferativo dos compostos sobre as células V79 foi realizada através do método colorimétrico do MTT, como descrito no subitem 3.3.2., após 24 horas de exposição.

3.3.6.3 Avaliação da indução de danos ao DNA pelo ensaio do cometa

a) Para verificar a ocorrência de quebras (simples e dupla) nas fitas do DNA, as células V79 foram cultivadas em placas de 24 poços e tratadas com os compostos (2,5, 5 e 10 μM) durante 4 horas. Após esse período, o ensaio do cometa foi realizado tanto em condições alcalinas quanto em condições neutras. β -lapachona (2,5 a 10 μM) serviu como controle positivo;

b) Para se detectar a presença de bases nitrogenadas oxidadas (purinas e pirimidinas) após a exposição aos compostos (10 μM) durante 4 horas, as células foram incubadas com 70 μL das enzimas Fpg (30 min, 37°C) ou Endo III (45 min, 37°C) que reconhecem algumas bases purínicas e pirimidínicas oxidadas, respectivamente, no DNA e as convertem em quebras de fitas simples. Células expostas ao peróxido de hidrogênio (10 μM) durante 5 minutos (4°C) serviram como controle positivo. O ensaio do cometa foi conduzido em condições alcalinas.

A condução dos ensaios foi realizada de acordo como descrito no subitem 3.3.5.9.1.

3.3.6.3.1 Análise dos dados

Os dados foram analisados a partir da média \pm E.P.M. de 3 experimentos independentes. Para verificação da ocorrência de diferenças significativas entre os diferentes grupos, os dados foram comparados por análise de variância (ANOVA) seguida de Student Newman Keuls ($p < 0,05$) utilizando o programa Prism versão 4.0 (GraphPad Software, San Diego, CA, EUA).

3.3.6.4 Teste do Micronúcleo

O ensaio de micronúcleo *in vitro* é hoje um dos testes citogenéticos mais bem estabelecidos, com validação internacional e aplicável a qualquer população celular nucleada (FENECH *et al.*, 2000; 2006).

Micronúcleos são estruturas cromatídicas delimitada por membrana, separados do núcleo principal e visíveis em células interfásicas. Podem ser resultantes de fragmentos cromossômicos acêntricos ou cromossomos inteiros que não foram incluídos no núcleo principal (FENECH *et al.*, 2000). Logo, o micronúcleo representa perda de cromatina (mutagênese cromossômica) em consequência de danos cromossômicos (clastogênese) ou dano no aparelho mitótico (aneugênese).

É importante ressaltar que os micronúcleos são formados durante a mitose, independentemente do tipo de dano ocorrido durante o ciclo celular. Por isso, os danos no DNA causados pela exposição de agentes mutagênicos, por exemplo, somente serão expressos em micronúcleos após um ciclo de divisão celular, sendo dependentes da proporção de células que estão se dividindo. Conseqüentemente, a comparação da frequência de micronúcleos entre populações de células em divisão só seria segura quando a cinética de divisão nuclear após o dano ao DNA fosse idêntica (FENECH, 1997; 2000, 2006; CLARE *et al.*, 2006).

Diante desse fato, Fenech e Morley (1985) modificaram a metodologia do ensaio empregando a citocalasina B. A citocalasina B é um inibidor da polimerização da actina requerida para a citocinese (CARTER, 1967). O uso da citocalasina B induz o bloqueio da citocinese, mas não da divisão nuclear, resultando em um acúmulo de células binucleadas a partir de células que passaram por apenas um ciclo de divisão, independentemente do grau de sincronia e da proporção das células em divisão (FENECH, 2000).

3.3.6.4.1 Procedimento experimental

O ensaio foi realizado de acordo com Matsuoka *et al.* (1992) com pequenas modificações (BONACKER *et al.*, 2004). As células pré-tratadas ou não com NAC (5 mM) durante 24 horas foram incubadas com concentrações crescentes dos compostos (2,5, 5 e 10 μ M) durante 4 horas. Após o tratamento, as culturas foram lavadas com DMEM e, posteriormente, uma solução de citocalasina B (3 μ g/mL) em meio de cultura foi adicionada. As culturas foram re-incubadas e 21 horas após a adição da citocalasina B, as culturas foram

centrifugadas (1000 rpm/5 min) e o sobrenadante desprezado. Posteriormente, as células foram resuspendidas com uma solução hipotônica de KCl (0,075 M) gelada (4°C) por 3 minutos e após, foram fixadas com metanol/ácido acético (3:1) gelado (4°C). Duas a quatro gotas (dependendo da quantidade do material) do material fixado foram transferidas para lâminas de microscopia limpas e depois de secas, estas foram coradas com uma solução de Giemsa (5%) por 7 minutos. β -lapachona (10 μ M) serviu como controle positivo.

3.3.6.4.2 Análise dos dados

As lâminas foram analisadas com o auxílio de microscópio óptico binocular com aumento de 1000 vezes. Os critérios adotados de identificação dos micronúcleos foram os descritos por Fenech (2000). Assim, somente células binucleadas (2000 células/lâmina) com núcleos intactos, com tamanhos aproximadamente iguais e com o mesmo padrão de coloração foram analisadas.

Os dados foram analisados a partir da média \pm E.P.M. de 2 experimentos independentes. Para verificação da ocorrência de diferenças significativas entre os diferentes grupos, os dados foram comparados por análise de variância (ANOVA) seguida de Student Newman Keuls ($p < 0,05$) utilizando o programa Prism versão 4.0 (GraphPad Software, San Diego, CA, EUA).

Resultados

4 RESULTADOS

4.1 Citotoxicidade induzida pela *nor*- β -lapachona e seus derivados arilaminos

O potencial antiproliferativo dos compostos foi analisado pelos métodos colorimétricos do MTT (células tumorais) e do Alamar Blue (CMSP). Após 72 horas de exposição aos compostos (tabela 4) a *nor*- β -lapachona apresentou elevado potencial citotóxico em todas as linhagens celulares tumorais utilizadas, com valores de CI_{50} variando de 0,38 μ M a 1,98 μ M entre as linhagens de mama MX-1 e de próstata PC-3, respectivamente. A β -lapachona, usada como controle positivo, também apresentou potencial citotóxico significativo contra todas as linhagens celulares tumorais utilizadas, com valores de CI_{50} variando de 0,52 μ M a 1,93 μ M entre as linhagens de mama MX-1 e de próstata DU-145, respectivamente. Dos quatro derivados da *nor*- β -lapachona, apenas o composto **2** não apresentou atividade citotóxica para nenhuma das linhagens tumorais humanas ($CI_{50} > 13,21 \mu$ M). Tanto a β -lapachona como a *nor*- β -lapachona mostraram ter ação citotóxica seletiva para células tumorais, uma vez que nenhuma dessas duas naftoquinonas interferiu sobre a proliferação de células não tumorais (CMSP). Por outro lado, os derivados **1**, **3** e **4** da *nor*- β -lapachona apresentaram moderada atividade citotóxica sobre CMSP, com valores de CI_{50} igual a 5,02 μ M (**1**), 12,02 μ M (**2**) e 10,65 μ M (**3**). Enquanto o composto **2** não foi citotóxico para CMSP ($CI_{50} > 13,21 \mu$ M).

Nos experimentos de 24 horas de exposição aos compostos, os valores de CI_{50} (tabela 5) para as linhagens HL-60 e DU-145 não diferem muito dos valores de CI_{50} após 72 horas de incubação (tabela 4), sugerindo que os efeitos antiproliferativos não são tempo-dependentes. O co-tratamento com GSH (15 mM) diminuiu os efeitos citotóxicos (aumento dos valores de CI_{50}), ressaltando a importância dos radicais livres sobre a citotoxicidade da *nor*- β -lapachona e seus derivados (**1**, **3** e **4**).

Os resultados dos ensaios hemolíticos, utilizando como modelo eritrócitos de camundongos, sugerem que a atividade citotóxica dos compostos seja através de mecanismos mais específicos, uma vez que nem a *nor*- β -lapachona e nem seus derivados arilaminos (**1-4**) foram capazes de romper as membranas eritrocitárias (hemólise) em altas concentrações ($EC_{50} > 219,29 \mu$ M).

Tabela 4 – Atividade citotóxica *in vitro* da β -lapachona, nor- β -lapachona e derivados arilaminos nor- β -lapachônicos frente a linhagens tumorais humanas pelo ensaio do MTT e células mononucleadas do sangue periférico humano (CMSP) pelo ensaio do Alamar Blue após 72h de exposição.

Linhagens celulares – CI_{50} μ M (IC95%)*											
Compostos	HL-60	MOLT-4	Jurkat	K562	HCT8	SF295	PC-3	DU-145	MX-1	HS578t	CMSP
	1,65	0,82	nd	1,47	0,83	0,91	1,56	1,93	0,52	0,61	>20,6
β-lapachona	(1,49-1,78)	(0,74-0,96)		(1,23-1,78)	(0,74-0,87)	(0,74-1,11)	(1,34-1,98)	(1,67-2,29)	(0,47-0,56)	(0,52-0,70)	
	1,75	0,92	1,34	1,62	1,36	1,58	1,98	1,30	0,38	0,53	>21,9
Nor-β-lapachona	(1,59-1,83)	(0,87-1,00)	(1,12-1,47)	(1,44-1,79)	(1,18-1,53)	(1,31-1,88)	(1,53-2,23)	(1,12-1,75)	(0,27-0,42)	(0,38-0,61)	
	0,96	1,53	1,72	1,67	0,76	0,82	0,51	1,25	0,47	0,32	5,02
1	(0,79-1,15)	(1,34-1,70)	(1,39-2,16)	(1,45-1,92)	(0,54-0,87)	(0,38-1,70)	(0,37-0,64)	(1,16-1,42)	(0,29-0,63)	(0,27-0,51)	(1,70-5,54)
2	>13,21	>13,21	>13,21	>13,21	>13,21	>13,21	>13,21	>13,21	>13,21	>13,21	>13,21
	1,18	1,50	1,23	1,31	1,59	1,78	0,66	0,78	0,98	0,43	12,02
3	(0,82-1,70)	(1,37-1,61)	(0,98-1,50)	(1,09-1,59)	(1,39-1,81)	(1,61-1,97)	(0,52-0,90)	(0,31-0,94)	(0,74-1,26)	(0,32-0,68)	(10,31-13,99)
	1,87	1,03	1,32	1,29	1,32	1,85	0,89	1,09	0,76	0,68	10,65
4	(1,66-2,11)	(0,95-1,11)	(1,08-1,63)	(1,11-1,48)	(1,13-1,53)	(1,66-2,06)	(0,63-1,29)	(0,98-1,42)	(0,52-1,03)	(0,34-1,34)	(8,82-12,87)

*Valores originados de 3 experimentos independentes e apresentados em valores de CI_{50} obtidos por regressão não-linear com intervalo de confiança de 95%.

Tabela 5 – Atividade citotóxica *in vitro* da *nor*- β -lapachona e derivados arilaminos *nor*- β -lapachônicos (**1-4**) frente às linhagens tumorais humanas HL-60 e DU-145 na presença ou ausência de glutathiona (GSH, 15 mM) pelo ensaio do MTT e células mononucleadas do sangue periférico humano (CMSP) pelo ensaio do Alamar Blue após 24 horas de exposição.

Compostos	Linhagens celulares – CI ₅₀ μ M (IC95%) [*]				
	HL-60	HL-60 + GSH	DU-145	DU-145 + GSH	CMSP
Nor-β-lapachona	1,89 (1,47-2,12)	8,43 (7,15-11,24)	2,15 (2,03-2,49)	7,61 (7,08-8,14)	>21,9
1	0,83 (0,71-0,97)	5,32 (3,81-6,46)	1,19 (1,06-1,28)	6,32 (5,18-7,11)	11,97 (11,56-12,08)
2	>13,21	>13,21	>13,21	>13,21	>13,21
3	1,03 (0,86-1,12)	6,57 (5,16-8,29)	0,71 (0,56-0,87)	5,04 (4,30-6,73)	>13,72
4	1,93 (1,79-2,05)	5,83 (4,21-7,39)	0,82 (0,77-0,91)	4,27 (3,02-5,99)	>13,21

*Valores originados de 3 experimentos independentes e apresentados em valores de CI₅₀ obtidos por regressão não-linear com intervalo de confiança de 95%.

4.2 Inibição da Síntese replicativa de DNA através da incorporação de BrdU

Na análise da incorporação do BrdU, foi identificado que o tratamento com os compostos reduziram a taxa de incorporação do BrdU pelas células HL-60. A *nor*- β -lapachona reduziu significativamente ($p < 0,05$), de maneira concentração-dependente, a incorporação (%) de BrdU nas células HL-60 em todas as concentrações avaliadas ($69,35 \pm 2,08\%$; $58,21 \pm 2,08\%$ e $31,66 \pm 2,02\%$ correspondente as concentrações de 0,5, 1 e 4 μ M, respectivamente), após 24 horas de exposição, (figura 17). Resultado muito semelhante foi observado para os derivados **1**, **3** e **4**, os quais reduziram significativamente a taxa de incorporação do BrdU de maneira dependente de concentração. A redução do percentual de células que incorporaram o BrdU nas concentrações de 0,5, 1 e 4 μ M para os derivados **1** foi respectivamente igual a $62,00 \pm 2,00\%$, $43,33 \pm 2,02\%$ e $21,33 \pm 1,45\%$, para o derivado **3** a redução foi respectivamente igual a $63,00 \pm 2,88\%$, $49,33 \pm 1,76\%$ e $32,33 \pm 1,85\%$ e para o derivado **4** foi respectivamente igual a $62,00 \pm 1,15\%$, $46,33 \pm 2,72\%$ e $32,33 \pm 1,20\%$. Enquanto para o derivado **2** não houve interferência na taxa de incorporação do BrdU, frente

as 3 diferentes concentrações testadas, cujas taxas foram de $73,10 \pm 1,73\%$, $71,18 \pm 1,52\%$ e $73,33 \pm 1,76\%$, para as concentrações de 0,5, 1 e 4 μM , respectivamente, se assemelhando muito ao grupo controle negativo (DMSO) cuja taxa de incorporação de BrdU após 24 horas foi igual a $78,10 \pm 1,73\%$. Doxorubicina (0,6 μM), utilizada como controle positivo, reduziu significativamente ($p < 0,05$) a incorporação do BrdU pelas células ($43,25 \pm 2,12\%$).

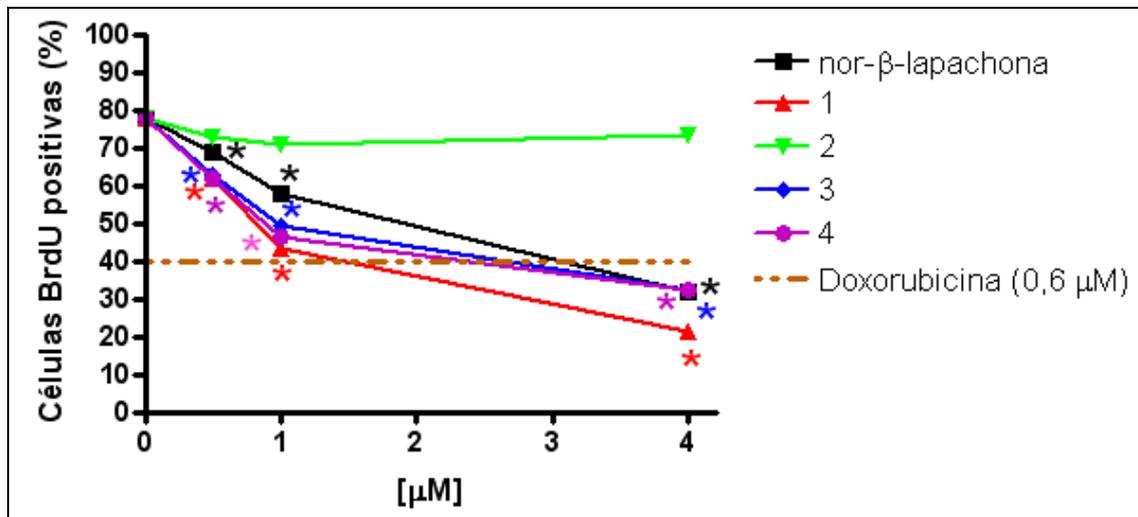


Figura 17 - Efeito da *nor*- β -lapachona e seus derivados (1-4) sobre a incorporação do BrdU por células HL-60 após 24 horas de exposição.

DMSO (0,1%) e a doxorubicina (0,6 μM) serviram como controle negativo e positivo, respectivamente.

Os dados correspondem a média \pm E.P.M. de 3 experimentos independentes.

* $p < 0,05$ comparado com o grupo controle negativo por ANOVA seguido por student Newman-Keuls.

4.3 Análise morfológica – coloração diferencial por brometo de etídio/laranja de acridina (BE/LA)

A análise morfológica foi avaliada pelo método de coloração diferencial usando dois corantes fluorescentes (BE/LA), após incubação de 4 e 24 horas com os compostos nas culturas de HL-60. A figura 18-A mostra que após 4 horas de exposição, foi observado nas culturas tratadas com *nor*- β -lapachona e com os derivados 1, 3 e 4, na maior concentração (4 μM), uma redução da viabilidade celular em relação ao grupo controle negativo ($90,33 \pm 1,45\%$) igual a $80,33 \pm 2,66\%$, $80,33 \pm 0,33\%$, $82,66 \pm 1,45\%$ e $82,00 \pm 2,08\%$, respectivamente. A redução do percentual de células viáveis foi acompanhada por um aumento significativo ($p < 0,05$), quando comparada ao grupo controle negativo ($9,66 \pm 1,45\%$), na frequência de células com características apoptóticas (redução do volume celular, condensação periférica de cromatina e corpos apoptóticos) nas culturas tratadas com *nor*- β -

lapachona e seus derivados (**1**, **3** e **4**) apenas na maior concentração (4 μ M), cujos valores foram $20,33 \pm 2,02\%$, $19,66 \pm 0,33\%$, $17,33 \pm 1,45\%$ e $18,00 \pm 2,08\%$ respectivamente. Nesse intervalo de tempo, não foi observado incrementos no percentual de células necróticas.

Com o aumento do tempo de exposição (24 horas), os resultados foram muito semelhantes aos das culturas expostas por um curto período (4 horas). Onde o grupo controle negativo teve uma viabilidade de $89,00 \pm 1,73\%$, enquanto a redução da viabilidade celular foi identificada para as culturas expostas na maior concentração testada (4 μ M) de *nor*- β -lapachona e dos derivados **1**, **3** e **4**: $54,33 \pm 2,33\%$, $50,33 \pm 0,88\%$, $56,33 \pm 2,02\%$ e $57,66 \pm 1,45\%$, respectivamente (figura 18-B). As células expostas a 4 μ M de *nor*- β -lapachona e dos derivados **3** e **4**, apresentaram aumento no percentual de células com características apoptóticas com percentual igual a $46,00 \pm 1,52\%$, $43,66 \pm 2,02\%$ e $39,00 \pm 2,08\%$, respectivamente, em relação as culturas tratadas com DMSO ($11,00 \pm 1,73\%$). Já o derivado **1** induziu aumento significativo ($p < 0,05$) na frequência de células apoptóticas em todas as concentrações testadas: $17,00 \pm 2,08\%$, $18,50 \pm 1,50\%$ e $49,66 \pm 0,88\%$ para as concentrações de 0,5, 1 e 4 μ M, respectivamente. Não foi observado aumento significante na população de células necróticas.

Células HL-60 tratadas com o derivado **2** não apresentaram diminuição da viabilidade celular e nem características morfológicas de apoptose e/ou necrose após 4 e 24 horas de tratamento. Doxorubicina (0,6 μ M), usada como controle positivo, reduziu a viabilidade celular apenas 24 horas após a exposição ($36,07 \pm 2,60\%$) quando comparada ao controle negativo ($89,00 \pm 1,73\%$), mas induziu apoptose em culturas de HL-60 tratadas por 4 horas ($38,33 \pm 2,84\%$) e 24 horas ($67,59 \pm 2,19\%$).

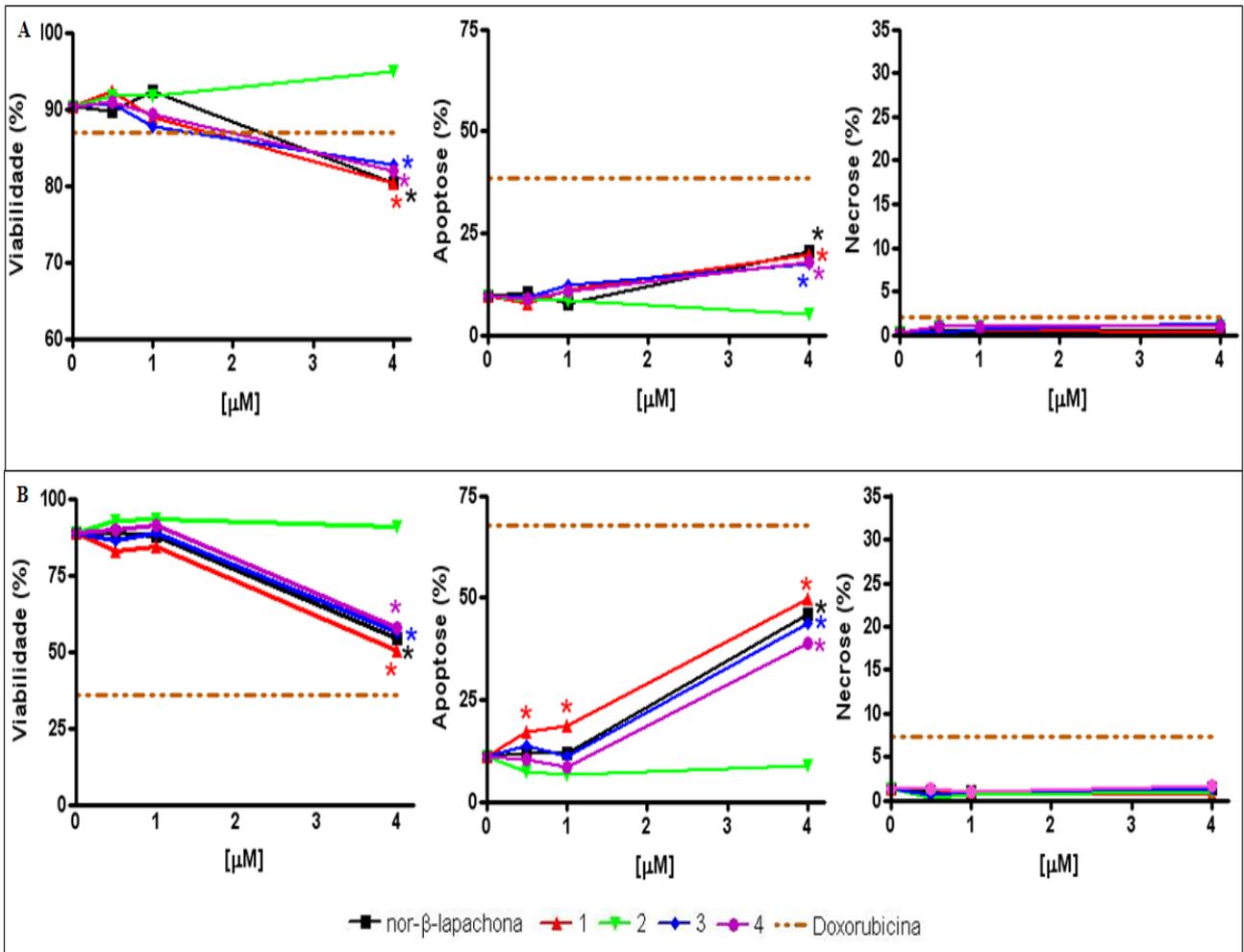


Figura 18 – Efeitos da nor-β-lapachona e seus derivados (1, 3 e 4) sobre a viabilidade celular, indução de apoptose e necrose após 4 horas (A) e 24 horas (B) de exposição analisados morfologicamente através da coloração diferenciada por brometo de etídio e laranja de acridina. DMSO (0,1%) e a doxorubicina (0,6 μM) serviram como controle negativo e positivo, respectivamente. Os dados correspondem a média ± E.P.M. de 3 experimentos independentes. * $p < 0,05$ comparado com o grupo controle negativo por ANOVA seguido por student Newman-Keuls.

4.4. Efeitos da *nor*- β -lapachona e seus derivados sobre a integridade da membrana celular de HL-60

A integridade da membrana celular foi avaliada após a exposição de 4 e 24 horas aos compostos, pela exclusão do iodeto de propídio (IP). Nenhum dos compostos testados promoveu redução da integridade das membranas plasmáticas celulares após 4 horas de exposição (figura 19-A). Por outro lado, com o prolongamento do tempo de exposição (24 horas), todos os compostos reduziram significativamente ($p < 0,05$), na maior concentração avaliada (4 μM), o número de células com membranas íntegras, isto é, sem lesões ou rupturas que permitam a entrada do IP para o interior celular, em comparação ao grupo controle negativo ($96,41 \pm 0,52\%$). Nesta concentração, o percentual de células com membranas íntegras foi de $80,08 \pm 1,11$, $78,07 \pm 1,19\%$, $75,17 \pm 0,48\%$ e $81,97 \pm 1,16\%$, para *nor*- β -lapachona e os derivados **1**, **3** e **4**, respectivamente (figura 19-B). Doxorubicina (0,6 μM), utilizada como controle positivo, não alterou a integridade de membrana em nenhum dos experimentos analisados.

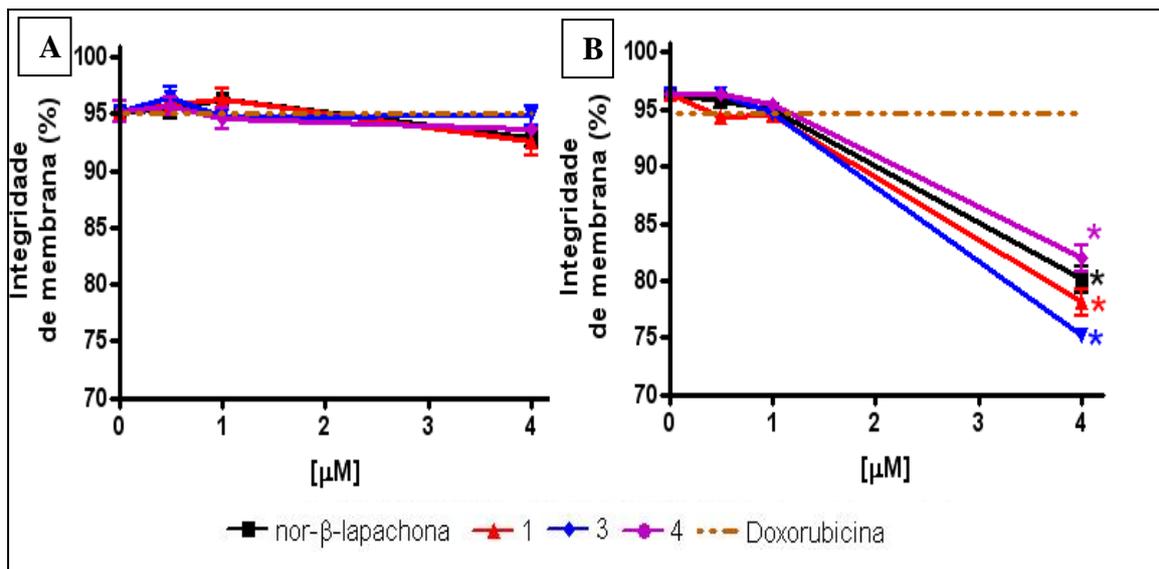


Figura 19 – Efeito da *nor*- β -lapachona e seus derivados (**1**, **3** e **4**) sobre a integridade da membrana plasmática de células HL-60 após 4 horas (**A**) e 24 horas (**B**) de exposição através do método de exclusão por iodeto de propídio por citometria de fluxo.

DMSO (0,1%) e a doxorubicina (0,6 μM) serviram como controle negativo e positivo, respectivamente.

Os dados correspondem a média \pm E.P.M. de 3 experimentos independentes.

* $p < 0,05$ comparado com o grupo controle negativo por ANOVA seguido por student Newman-Keuls.

4.5 Efeitos da *nor*- β -lapachona e seus derivados sobre o potencial transmembrânico mitocondrial ($\Delta\psi_m$) de células HL-60

Após o tratamento das células com os compostos estudados, estas foram incubadas com rodamina 123 a fim de se detectar o percentual de células com baixo $\Delta\psi_m$. A figura 20-A mostra que nas culturas de HL-60 expostas durante 4 horas aos derivados **1**, **3** e **4**, houve um aumento do percentual de células com baixo $\Delta\psi_m$ quando comparado ao controle negativo ($2,21 \pm 0,02\%$) nas concentrações de 1 e 4 μM de $7,33 \pm 1,07\%$, $9,67 \pm 0,35\%$ e $7,24 \pm 0,56\%$ para a concentração de 1 μM dos derivados **1**, **3** e **4**, respectivamente, e $23,44 \pm 1,15\%$, $22,87 \pm 1,59\%$ e $27,41 \pm 1,63\%$ para a concentração de 4 μM dos derivados **1**, **3** e **4**, respectivamente. Enquanto a despolarização mitocondrial em culturas tratadas com *nor*- β -lapachona só foi observada na maior concentração testada (4 μM) cujo percentual de células com baixo $\Delta\psi_m$ foi de $13,51 \pm 0,26\%$ após 4 horas de incubação. Doxorubicina (0,6 μM), utilizada como controle positivo, aumentou, após 4 horas de incubação, o número de células com baixo $\Delta\psi_m$ ($8,82 \pm 1,24\%$).

Como ilustrado na figura 20-B, com o prolongamento do tempo de incubação (24 horas), o aumento do percentual de células com baixo $\Delta\psi_m$ foi observado em culturas tratadas com os derivados **1**, **3** e **4** a partir da menor concentração (0,5 μM) testada, quando comparado com o grupo controle negativo ($4,27 \pm 0,44\%$): $11,87 \pm 0,53\%$, $11,43 \pm 1,46\%$ e $12,13 \pm 1,17\%$ para os derivados **1**, **3** e **4**, respectivamente. Enquanto os efeitos da *nor*- β -lapachona sobre a despolarização mitocondrial, somente foi detectado a partir da concentração intermediária (1 μM): $14,73 \pm 0,88\%$. Após 24 horas, a maior concentração testada (4 μM) induziu um crescimento significativo ($p < 0,05$) na percentagem de células com $\Delta\psi_m$ reduzido, semelhante a doxorubicina ($55,29 \pm 1,75\%$), nas culturas expostas a cada composto: $47,50 \pm 1,97\%$, $58,23 \pm 1,91\%$, $54,45 \pm 0,66\%$ e $53,27 \pm 2,47\%$ para *nor*- β -lapachona e os derivados **1**, **3** e **4**, respectivamente.

A fim de corroborar o papel central das mitocôndrias sobre a ativação da via intrínseca durante o processo apoptótico induzido pelos compostos, as células HL-60 foram pré-tratadas com ciclosporina A (CsA) e pós-tratadas com os compostos em uma única concentração (4 μM) durante 4 horas. Como observado na figura 20-C, na presença de CsA, houve uma redução do percentual de células com baixo $\Delta\psi_m$, o qual foi observado tanto para *nor*- β -lapachona quanto para seus derivados (**1**, **3** e **4**) quando comparados com os experimentos realizados na ausência de CsA (barras pretas do gráfico). Esses dados reforçam a importância mitocondrial sobre a ativação apoptótica para os compostos em questão.

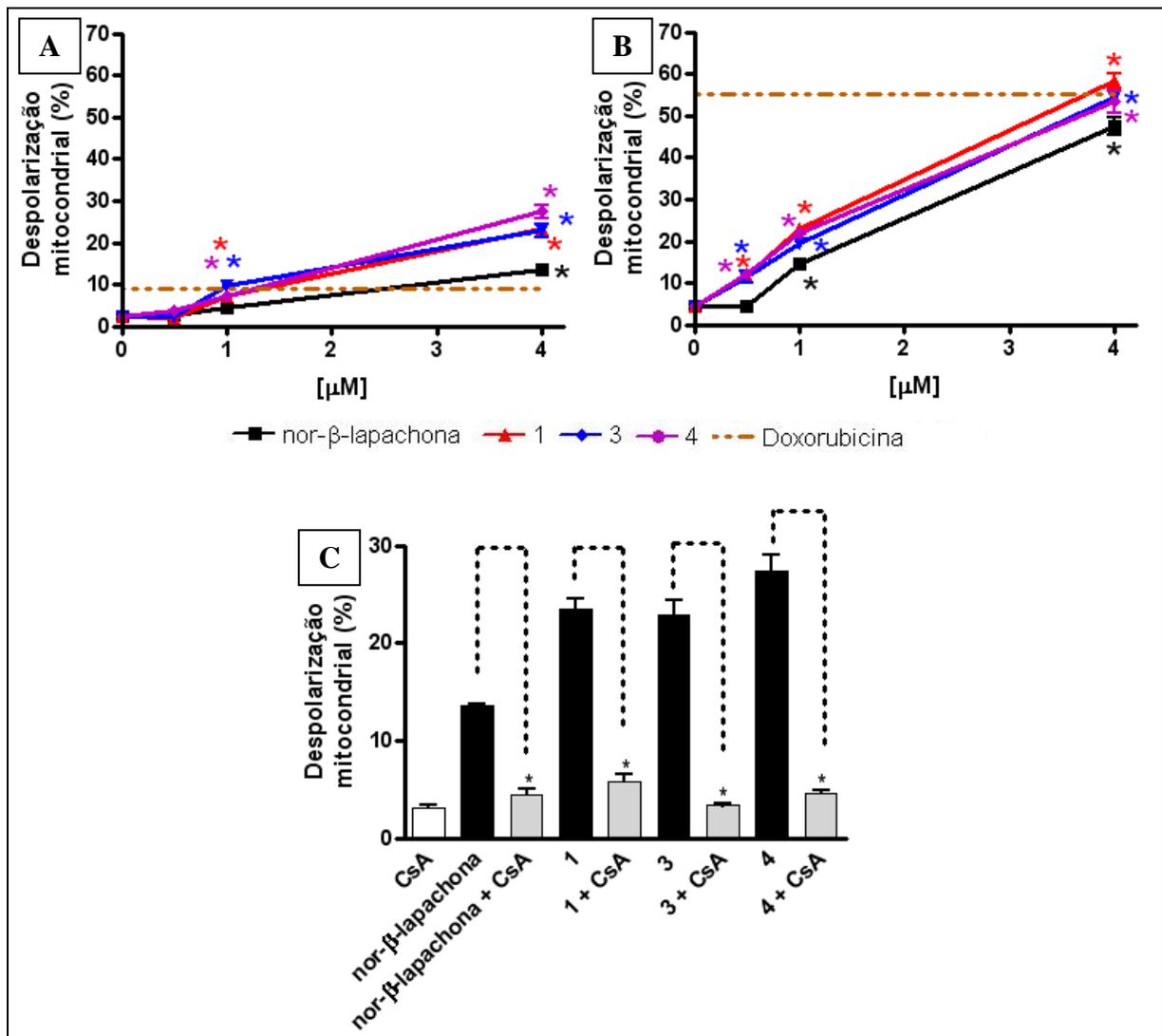


Figura 20 – Efeito da *nor*- β -lapachona e seus derivados (**1**, **3** e **4**) sobre o $\Delta\psi_m$ de células HL-60 após 4 horas (**A**) e 24 horas (**B**) de exposição aos compostos. E efeito da ciclosporina A (CsA, 5 μM) sobre o $\Delta\psi_m$ de células HL-60 tratadas com os compostos por 4 horas (**C**).

DMSO (0,1%) e a doxorubicina (0,6 μM) serviram como controle negativo e positivo, respectivamente.

Os dados correspondem a média \pm E.P.M. de 3 experimentos independentes.

* $p < 0,05$ comparado com o grupo controle negativo por ANOVA seguido por student Newman-Keuls.

4.6 Efeitos da *nor*- β -lapachona e seus derivados sobre a progressão do ciclo celular de células HL-60

Após o tratamento, as células (tratadas e não tratadas) foram incubadas com uma solução de lise de modo a permitir a entrada do IP para o interior celular, permitindo, desta forma, a quantificação do conteúdo de DNA nuclear inerente a cada fase do ciclo celular (G_1 , S e G_2). A tabela 6 mostra que após 4 horas de exposição, nenhum dos compostos avaliados apresentou efeito ciclo-específico, uma vez que não foi observado acúmulo de células ou reduções significativas no percentual de células em nenhuma das três fases do ciclo celular analisadas. Porém, com o prolongamento do tempo de exposição (24 horas), como ilustra a tabela 7, a *nor*- β -lapachona (4 μ M) induziu um discreto, mas significativo ($p < 0,05$) acúmulo de células HL-60 na fase S do ciclo celular ($79,83 \pm 0,25\%$) quando comparado ao grupo controle negativo ($71,54 \pm 0,45\%$). Já os derivados **1** e **3**, na maior concentração (4 μ M), induziram maior citotoxicidade nas células HL-60 que se encontravam na fase de transição G_2/M , quando comparado ao grupo controle negativo ($5,16 \pm 0,25\%$), tendo em vista a redução do percentual de células que se encontravam nessa fase ($1,04 \pm 0,14\%$ para **1** e $2,24 \pm 0,69\%$ para **3**). Enquanto o derivado **4**, na concentração de 4 μ M, exerceu maior citotoxicidade nas células que se encontravam na fase G_1 do ciclo celular ($14,31 \pm 0,54\%$) quando comparado ao grupo controle negativo ($23,08 \pm 1,17\%$).

Tabela 6 - Efeito da *nor*- β -lapachona e seus derivados (**1**, **3** e **4**) sobre a progressão do ciclo celular após 4 horas de exposição.

Amostras	Tratamento	Conteúdo de DNA (%)		
		G ₁	S	G ₂ /M
C^a	-	20,45 ± 0,21	75,12 ± 1,15	5,27 ± 0,87
Doxorubicina	0,6 μ M	22,31 ± 0,71	72,46 ± 1,61	6,43 ± 0,55
<i>nor</i>-β-lapachona	0,5 μ M	21,16 ± 2,08	75,07 ± 2,15	4,60 ± 0,33
	1 μ M	24,47 ± 0,10	71,05 ± 1,39	4,21 ± 0,76
	4 μ M	21,34 ± 0,14	70,82 ± 0,10	5,45 ± 0,33
1	0,5 μ M	22,44 ± 1,39	70,16 ± 1,07	6,31 ± 1,75
	1 μ M	24,18 ± 0,73	71,22 ± 0,10	4,87 ± 0,25
	4 μ M	21,36 ± 1,76	70,10 ± 1,12	5,73 ± 1,61
3	0,5 μ M	19,69 ± 0,33	76,08 ± 0,25	4,34 ± 1,10
	1 μ M	23,71 ± 0,56	72,15 ± 0,14	5,22 ± 0,33
	4 μ M	19,44 ± 0,71	72,88 ± 1,54	6,68 ± 0,25
4	0,5 μ M	20,29 ± 0,16	76,43 ± 1,39	4,98 ± 0,81
	1 μ M	22,79 ± 0,73	73,10 ± 0,17	4,89 ± 0,14
	4 μ M	22,54 ± 0,10	72,65 ± 1,61	6,67 ± 0,33

^aDMSO (0,1%). Os dados correspondem a média \pm E.P.M. de 3 experimentos independentes.

*p<0,05 comparado com o grupo controle negativo por ANOVA seguido por student Newman-Keuls.

Tabela 7 - Efeito da *nor*- β -lapachona e seus derivados (**1**, **3** e **4**) sobre a progressão do ciclo celular após 24 horas de exposição.

Amostras	Tratamento	Conteúdo de DNA (%)		
		G ₁	S	G ₂ /M
C^a	-	23,08 ± 1,17	71,54 ± 0,45	5,16 ± 0,25
Doxorubicina	0,6 μ M	24,38 ± 1,09	66,72 ± 4,15	6,41 ± 3,33
<i>nor</i>-β-lapachona	0,5 μ M	21,32 ± 0,53	68,19 ± 1,54	6,88 ± 0,14
	1 μ M	19,75 ± 1,15	73,26 ± 0,71	5,19 ± 0,56
	4 μ M	17,46 ± 3,33	79,83 ± 0,25*	4,41 ± 0,11
1	0,5 μ M	20,64 ± 0,45	72,19 ± 0,33	6,50 ± 0,21
	1 μ M	22,68 ± 0,70	70,42 ± 1,61	6,84 ± 1,07
	4 μ M	25,11 ± 0,55	72,37 ± 1,15	1,04 ± 0,14*
3	0,5 μ M	21,69 ± 1,08	70,42 ± 2,02	7,90 ± 1,61
	1 μ M	22,87 ± 0,57	71,30 ± 0,33	6,22 ± 0,57
	4 μ M	25,43 ± 0,25	72,98 ± 0,21	2,24 ± 0,69*
4	0,5 μ M	20,61 ± 2,02	73,40 ± 1,54	7,16 ± 0,14
	1 μ M	22,48 ± 1,17	69,31 ± 0,55	5,74 ± 0,33
	4 μ M	14,31 ± 0,54*	73,14 ± 5,71	6,27 ± 0,25

^aDMSO (0,1%). Os dados correspondem a média \pm E.P.M. de 3 experimentos independentes.

* $p < 0,05$ comparado com o grupo controle negativo por ANOVA seguido por student Newman-Keuls.

Os compostos *nor*- β -lapachônicos também induziram fragmentação internucleossômica de DNA após o tratamento. Quando comparada com o controle negativo ($10,79 \pm 0,36\%$), todas as culturas analisadas de HL-60 tratadas com os compostos na maior concentração (4 μ M) durante 4 horas, promoveram um aumento significativo ($p < 0,05$) na frequência de células com conteúdo de DNA nuclear hipodiplóide (baixa fluorescência), o que é um indicativo de fragmentação internucleossômica de DNA gerado por endonucleases durante o processo apoptótico correspondente a : $22,14 \pm 0,61\%$, $36,28 \pm 1,06\%$, $31,49 \pm 1,11\%$ e $29,42 \pm 2,13\%$ para *nor*- β -lapachona e os derivados **1**, **3** e **4**, respectivamente (figura 21-A).

Por outro lado, a figura 21-B mostra que após 24 horas de exposição, as células tratadas com os derivados **1**, **3** e **4**, quando comparadas com o controle negativo ($12,44 \pm 0,53\%$), apresentaram aumento significativo ($p < 0,05$) no percentual de células com conteúdo hipodiplóide de DNA nuclear em todas as concentrações testadas: $21,52 \pm 1,28\%$, $32,80 \pm 1,67\%$ e $25,38 \pm 1,80\%$ para a concentração de 0,5 μ M dos derivados **1**, **3** e **4**, respectivamente; $33,68 \pm 3,26\%$, $52,41 \pm 2,24\%$ e $41,32 \pm 1,29\%$ para a concentração de 1

μM dos derivados **1**, **3** e **4**, respectivamente, e $64,81 \pm 2,44\%$, $60,01 \pm 3,67$ e $56,46 \pm 3,53\%$ para a concentração de $4 \mu\text{M}$ dos derivados **1**, **3** e **4**, respectivamente. Enquanto os efeitos da *nor*- β -lapachona sobre a fragmentação internucleossômica de DNA somente foi observado nas concentrações de $1 \mu\text{M}$ ($34,12 \pm 2,10\%$) e de $4 \mu\text{M}$ ($66,15 \pm 3,76\%$). A doxorubicina ($0,6 \mu\text{M}$), utilizada como controle positivo, induziu fragmentação de DNA tanto no menor período de incubação, 4 h ($16,76 \pm 1,33\%$) quanto em 24 horas ($69,34 \pm 1,63\%$).

Segundo a figura 21-C, quando comparados com os experimentos realizados na ausência de CsA (barras pretas do gráfico), os compostos não induziram fragmentação internucleossômica de DNA em culturas pré-tratadas com CsA.

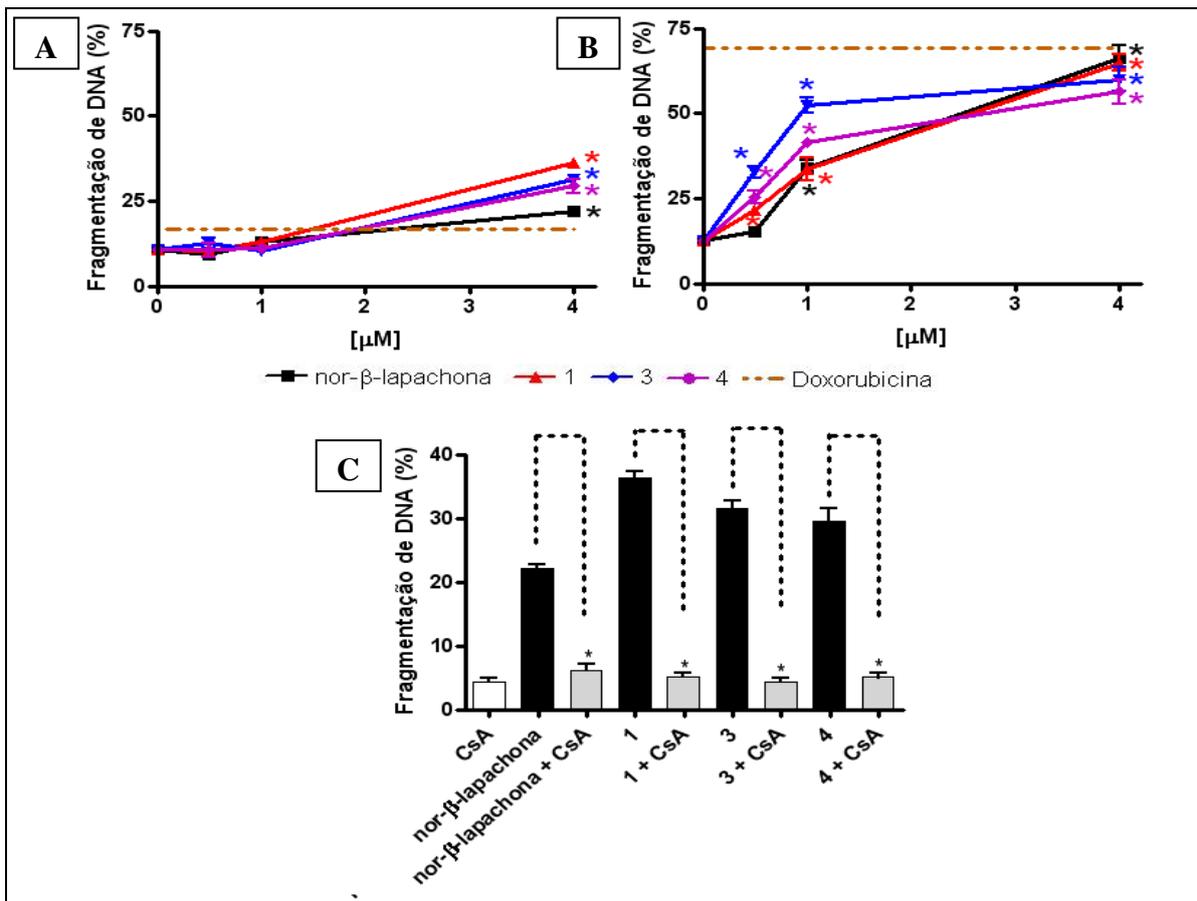


Figura 21 - Efeito da *nor*- β -lapachona e seus derivados (**1**, **3** e **4**) sobre a fragmentação internucleossômica de DNA em células HL-60 após 4 horas (**A**) e 24 horas (**B**) de exposição. E efeito da ciclosporina A (CsA, $5 \mu\text{M}$) sobre a fragmentação internucleossômica de DNA de células HL-60 tratadas com os compostos por 4 horas (**C**).

DMSO ($0,1\%$) e a doxorubicina ($0,6 \mu\text{M}$) serviram como controle negativo e positivo, respectivamente.

Os dados correspondem a média \pm E.P.M. de 3 experimentos independentes.

* $p < 0,05$ comparado com o grupo controle negativo por ANOVA seguido por student Newman-Keuls.

4.7 Detecção da fosfatidilserina (PS) externalizada após a exposição de células HL-60 à *nor*- β -lapachona e seus derivados

A externalização de PS é considerada um marco importante nas fases iniciais da ativação do processo apoptótico (MARTIN *et al.*, 1995). Logo, as células tratadas com os compostos durante 4 horas e os controles (DMSO, 0,1%) foram incubadas com anexina V (proteína com alta afinidade por PS) com o objetivo de avaliar a porcentagem de células com PS externalizado sobre a superfície da membrana celular.

Após a exposição, todos os compostos induziram aumentos significativos na frequência de células com PS externalizado nas duas maiores concentrações avaliadas quando confrontadas com o controle negativo ($2,49 \pm 0,19\%$). Para a concentração de $1 \mu\text{M}$, a porcentagem de células com PS conjugada com anexina V para células expostas a *nor*- β -lapachona e os derivados **1**, **3** e **4**, foi, respectivamente, igual a $4,57 \pm 0,33\%$, $8,51 \pm 0,20\%$, $5,65 \pm 0,51\%$ e $6,06 \pm 0,44\%$, com $p < 0,05$ para todas as amostras. Já para a concentração de $4 \mu\text{M}$, a porcentagem de células detectadas com PS externalizado para células tratadas com *nor*- β -lapachona e os derivados **1**, **3** e **4**, foi, respectivamente, igual a $12,48 \pm 0,92\%$, $18,10 \pm 0,34\%$, $17,27 \pm 0,65\%$ e $16,96 \pm 1,56\%$ (figura 22). Para a doxorubicina ($0,6 \mu\text{M}$), usada como controle positivo, o percentual de células detectadas com PS externalizado foi igual a $13,55 \pm 0,22\%$.

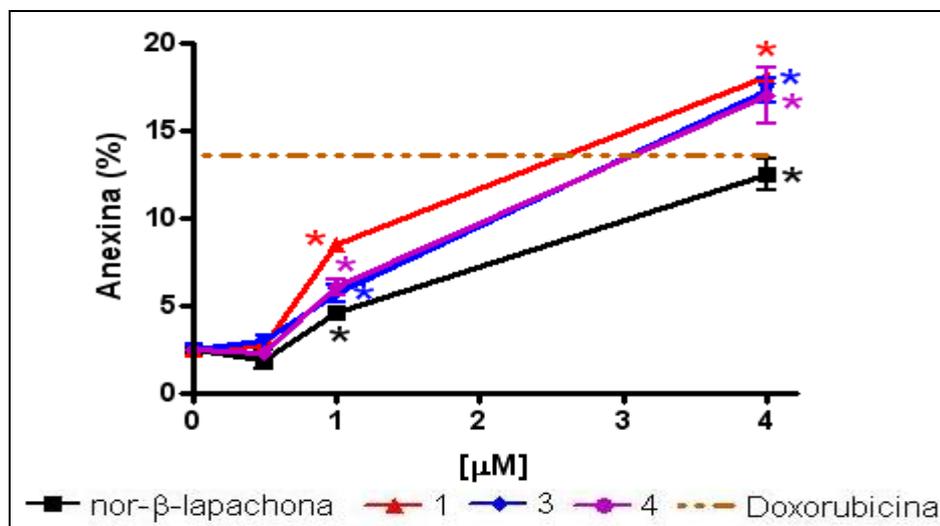


Figura 22 - Efeito da *nor*- β -lapachona e seus derivados (**1**, **3** e **4**) sobre a externalização da fosfatidilserina em células HL-60 após 4 horas.

DMSO (0,1%) e a doxorubicina ($0,6 \mu\text{M}$) serviram como controle negativo e positivo, respectivamente.

Os dados correspondem a média \pm E.P.M. de 3 experimentos independentes.

* $p < 0,05$ comparado com o grupo controle negativo por ANOVA seguido por student Newman-Keuls.

4.8 Efeitos da *nor*- β -lapachona e seus derivados sobre a ativação das caspases efetoras 3 e 7 em células HL-60

Uma vez ativadas, as caspases efetoras são as responsáveis pelas mudanças morfológicas observadas durante o processo apoptótico, como a fragmentação do DNA e a condensação de cromatina (MARCELLI *et al.*, 1999; NICHOLSON *et al.*, 1999).

Após 4 horas de exposição, foi observado significativa ativação das caspases efetoras (3 e 7) apenas nas duas maiores concentrações testadas (1 e 4 μ M), para todos os compostos avaliados. A porcentagem de células com caspases-3 e -7 ativas após 4 horas de tratamento com *nor*- β -lapachona e os derivados **1**, **3** e **4**, para a concentração de 1 μ M foi, respectivamente, igual a $6,19 \pm 0,37\%$, $5,74 \pm 0,31\%$, $5,97 \pm 0,72\%$ e $4,44 \pm 0,45\%$. Já para a concentração de 4 μ M, o percentual de células com caspases-3 e-7 ativadas foi igual a $15,87 \pm 1,17\%$, $12,11 \pm 0,97\%$, $11,52 \pm 0,32\%$ e $12,32 \pm 0,98\%$ para culturas tratadas com *nor*- β -lapachona e os derivados **1**, **3** e **4**, respectivamente (figura 23). Culturas tratadas com doxorubicina (0,6 μ M), utilizada como controle positivo, durante 4 horas elevou de modo significativo ($p < 0,05$) o percentual de células HL-60 com caspases-3 e -7 clivadas ($8,68 \pm 0,32\%$) em relação as culturas expostas somente ao DMSO ($1,66 \pm 0,36\%$).

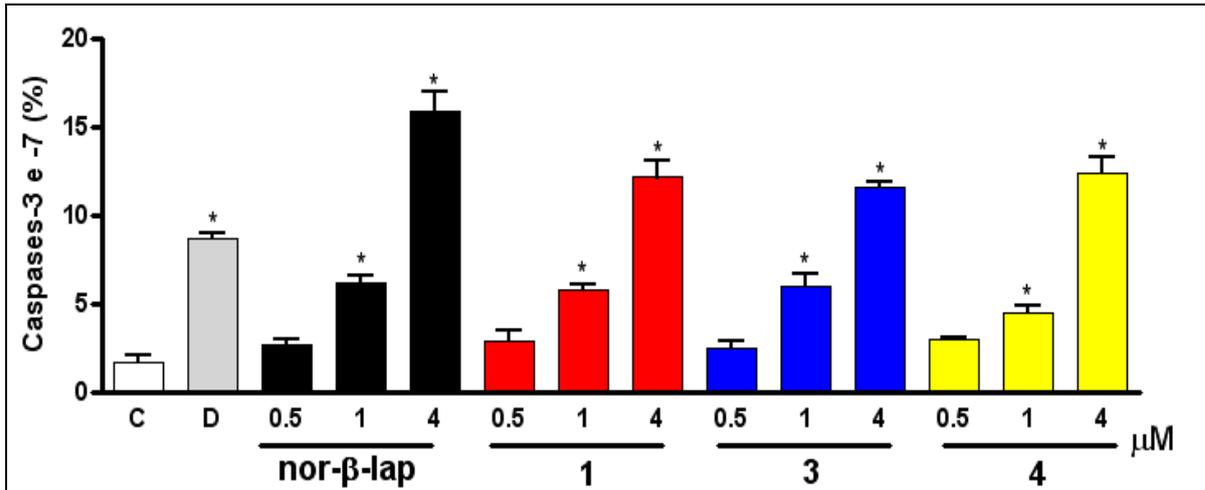


Figura 23 - Efeito da *nor*-β-lapachona (*nor*-β-lap) e seus derivados (**1**, **3** e **4**) sobre a ativação das caspases efetoras-3 e -7 em células HL-60 após 4 horas.

DMSO (0,1%) e a doxorubicina (0,6 μM) serviram como controle negativo e positivo, respectivamente.

Os dados correspondem a média ± E.P.M. de 3 experimentos independentes.

*p<0,05 comparado com o grupo controle negativo por ANOVA seguido por student Newman-Keuls.

Com o intuito de avaliar se o bloqueio da transição da permeabilidade mitocondrial afetaria a ativação das caspases-3 e -7, as células HL-60 foram pré-tratadas com CsA e pós-tratadas com os compostos (0,5, 1 e 4 μM). Foi observado que na presença de CsA, não houve ativação de caspases-3 e -7 em níveis significativos (figura 24).

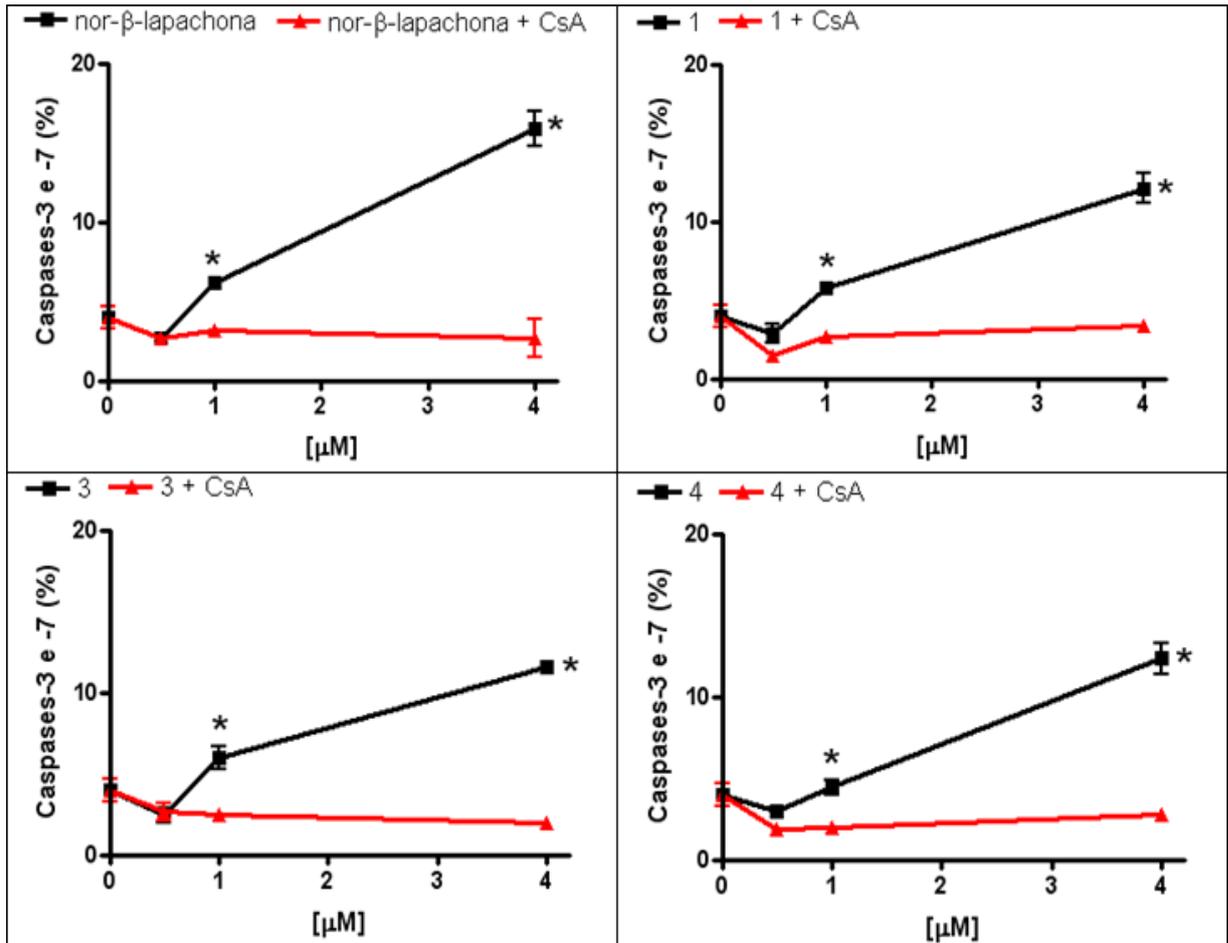


Figura 24 – Efeito da ciclosporina A (CsA, 5 μM) sobre a ativação de caspases 3 e 7 induzidas pela *nor*-β-lapachona e seus derivados (**1**, **3** e **4**) após 4 horas de incubação em células HL-60.

DMSO (0,1%) e a doxorubicina (0,6 μM) serviram como controle negativo e positivo, respectivamente.

Os dados correspondem a média ± E.P.M. de 3 experimentos independentes.

*p<0,05 comparado com o grupo controle negativo por ANOVA seguido por student Newman-Keuls.

4.9 Efeitos da *nor*- β -lapachona e seus derivados sobre a produção intracelular de espécies reativas de oxigênio (EROS) por oxidação do DCFH

Ao final de 4 horas de exposição, as células HL-60 e DU-145 (tratadas e controles) foram incubadas com o composto 2'7'-diclorodihidrofluoresceína (H2DCFDA) por 30 minutos. O produto de hidrólise do H2DCFDA é o composto não fluorescente diclorohidrofluoresceína (DCFH), que na presença de EROS é convertido para um composto altamente fluorescente.

Os tratamentos aumentaram significativamente ($p < 0,05$), de maneira concentração-dependente, a produção intracelular de EROS para ambas linhagens tumorais. Porém, não houve diferenças entre os níveis de formação de radicais livres entre as duas linhagens celulares. A naftoquinona β -lapachona (2 μ M) serviu como controle positivo. A tabela 8 mostra a produção de EROS, em porcentagem, para cada linhagem celular.

Tabela 8 - Efeito da β -lapachona, *nor*- β -lapachona e seus derivados (**1**, **3** e **4**) sobre a geração de EROS em culturas de HL-60 e DU-145 após 4 horas de exposição.

Linhagens celulares			
Amostras	Tratamento	HL-60	DU-145
		EROS (%) \pm E.P.M.	EROS (%) \pm E.P.M.
C^a	-	2,07 \pm 0,33	3,96 \pm 0,14
β-lapachona^b	2 μ M	80,00 \pm 2,39*	73,00 \pm 1,15*
	0,5 μ M	23,66 \pm 1,76*	20,67 \pm 0,48*
<i>nor</i>-β-lapachona	1 μ M	32,66 \pm 1,45*	32,33 \pm 1,85*
	4 μ M	64,00 \pm 2,30*	68,66 \pm 1,45*
	0,5 μ M	32,33 \pm 1,85*	35,10 \pm 1,54*
1	1 μ M	46,00 \pm 1,00*	56,00 \pm 2,51*
	4 μ M	60,66 \pm 2,90*	64,00 \pm 2,08*
	0,5 μ M	27,00 \pm 1,52*	23,66 \pm 1,00*
3	1 μ M	67,33 \pm 1,20*	68,00 \pm 2,51*
	4 μ M	73,00 \pm 2,51*	71,00 \pm 2,64*
4	0,5 μ M	29,33 \pm 2,90*	21,62 \pm 0,31*
	1 μ M	54,33 \pm 1,45*	49,66 \pm 3,28*
	4 μ M	63,33 \pm 2,60*	59,00 \pm 1,52*

^aDMSO (0,1%). Os dados correspondem a média \pm E.P.M. de 3 experimentos independentes.

* $p < 0,05$ comparado com o grupo controle negativo por ANOVA seguido por student Newman-Keuls.

A figura 25-A mostra que, para a linhagem HL-60, o co-tratamento com dicumarol (bloqueador da enzima NQO1) não bloqueou a produção de EROS intracelular. Apesar de não ter suprimido a formação de EROS, houve uma redução em sua produção, quando comparado aos dados da tabela 8. O percentual de produção de EROS após a co-administração com dicumarol pelos compostos nas concentrações de 0,5, 1 e 4 μM foi, respectivamente, igual a $15,80 \pm 0,60\%$, $23,66 \pm 2,72\%$ e $38,00 \pm 1,52\%$ para *nor*- β -lapachona, $22,66 \pm 1,45\%$, $32,33 \pm 2,18\%$ e $44,66 \pm 5,69\%$ para o derivado **1**, $21,00 \pm 1,15\%$, $53,33 \pm 1,76\%$ e $46,33 \pm 1,76\%$ para o derivado **3**, e $21,33 \pm 2,40\%$, $33,00\% \pm 3,21\%$, $49,66 \pm 2,40\%$ para o derivado **4**, e $27,00 \pm 2,51\%$, $40,33 \pm 2,90\%$ e $49,33 \pm 2,33\%$ para a β -lapachona. Por outro lado, para a linhagem de carcinoma de próstata (DU-145), a geração de EROS foi completamente abolida na presença de dicumarol (figura 25-B).

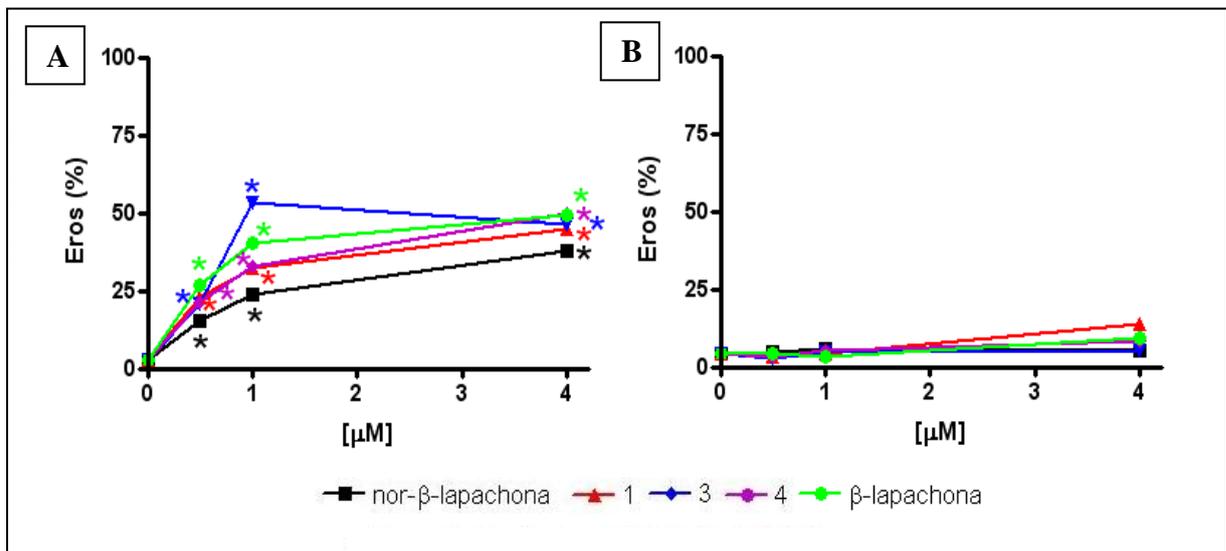


Figura 25 – Efeito do dicumarol (50 μM) sobre a produção de EROS induzida pela *nor*- β -lapachona e seus derivados (**1**, **3** e **4**) após 4 horas de incubação em células HL-60 (A) e DU-145 (B).

DMSO (0,1%) serviu como controle negativo.

Os dados correspondem a média \pm E.P.M. de 3 experimentos independentes.

* $p < 0,05$ comparado com o grupo controle negativo por ANOVA seguido por student Newman-Keuls.

Foi observado que a modulação intracelular das reservas de glutathiona altera a formação de EROS em ambas linhagens tumorais. De acordo com a figura 26-A e 26-B, o pré-tratamento com N-acetil-L-cisteína (NAC) antes da exposição aos compostos (4 μM) inibiu a formação de EROS quando comparados com os experimentos realizados na ausência de NAC (barras cinzas do gráfico). Porém, com a redução das reservas intracelulares de glutathiona promovida pelo pré-tratamento com 1-bromoheptano (BH), a produção de EROS,

após a exposição aos compostos (4 μ M), foi significativamente superior as detectadas nos experimentos conduzidos na ausência de BH (barras cinzas do gráfico).

A co-administração de iodeto de potássio (IK), um agente neutralizador de H₂O₂ e OH[•] reduziu significativamente a produção de EROS intracelular em relação aos dados da tabela 8, sugerindo que os radicais OH[•] estão presentes dentre as outras espécies de EROS. O percentual de produção de EROS após a co-administração com IK pelos compostos na concentração de 4 μ M, para células HL-60, foi igual a 30,00 \pm 3,21%, 30,66 \pm 2,60%, 44,00 \pm 4,00% e 32,66 \pm 4,37% para *nor*- β -lapachona e para os derivados **1**, **3** e **4**, respectivamente (figura 26-A), e para DU-145 foi igual a 34,33 \pm 3,38%, 38,33 \pm 2,72%, 33,00 \pm 3,21% e 38,66 \pm 5,23% para *nor*- β -lapachona e para os derivados **1**, **3** e **4**, respectivamente (figura 26-B).

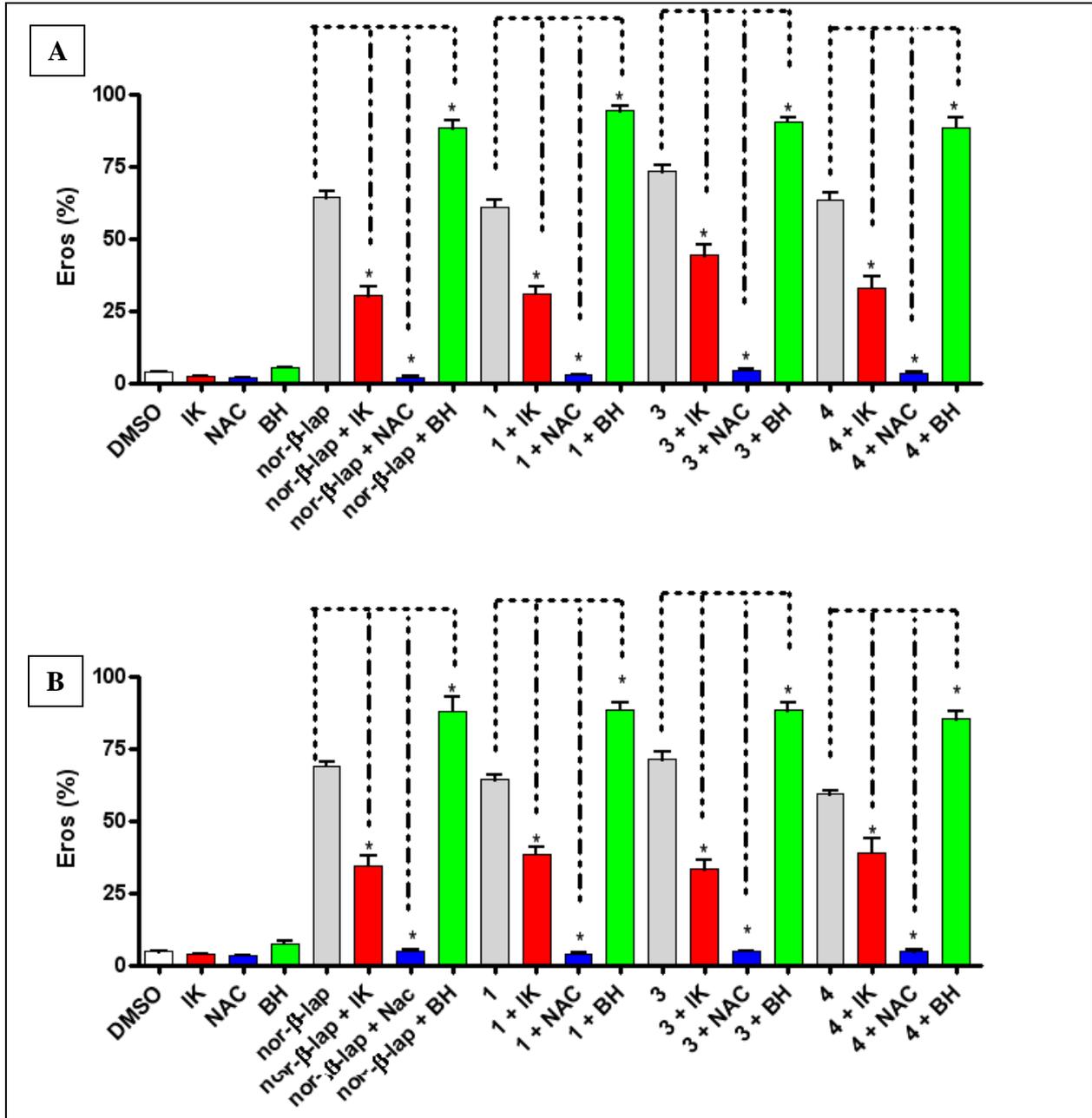


Figura 26 – Efeito do iodeto de potássio (IK, 5 mM), N-acetil-L-cisteína (NAC, 5 mM) e 1-bromoheptano (BH, 50 μ M) sobre a geração de EROS induzida pela *nor*- β -lapachona (*nor*- β -lap) e seus derivados (**1**, **3** e **4**) em culturas de HL-60 (**A**) e DU-145 (**B**) após 4 horas de exposição a concentração de 4 μ M.

DMSO (0,1%) serviu como controle negativo.

Os dados correspondem a média \pm E.P.M. de 3 experimentos independentes.

* $p < 0,05$ comparado com o grupo controle negativo por ANOVA seguido por student Newman-Keuls.

4.10 Efeitos da *nor*- β -lapachona e seus derivados sobre a indução de quebras de fitas da molécula de DNA

A tabela 9 revela que para células HL-60, os compostos só induziram quebras de fitas de DNA apenas na maior concentração (4 μ M) e para a linhagem DU-145 foi observado aumento da migração do DNA a partir da concentração intermediária (1 μ M) para todos os compostos estudados. Para verificar a ocorrência de quebras duplas, o cometa em condições neutras foi realizado e os resultados reportados na tabela 10. Após a eletroforese, foi observado quebras duplas apenas para os derivados **1** e **3** na maior concentração (4 μ M) na célula HL-60. Já para a linhagem DU-145, todos os compostos induziram quebras de fita dupla a partir da concentração intermediária (1 μ M).

Para as culturas de HL-60, a co-administração com dicumarol não impediu a indução de quebras de fitas do DNA, porém uma pequena redução nos valores de ID foi observada (figura 27-A). Quando comparada com os valores de ID reportados na Tabela 9, o co-tratamento com dicumarol reduziu ligeiramente o valor de ID apenas na maior concentração (4 μ M): $17,00 \pm 2,51$, $14,66 \pm 1,45$, $17,15 \pm 1,52$, $14,35 \pm 3,21$ e $16,66 \pm 1,76$ para β -lapachona, *nor*- β -lapachona e derivados **1**, **3** e **4**, respectivamente. Por outro lado, para a linhagem de carcinoma de próstata (DU-145), como ilustrado na figura 27-B, o bloqueio da enzima NQO1 exercido pelo dicumarol impediu a quebra das fitas da molécula de DNA.

Como ilustrado nas figuras 28-A e 28-B, a restauração das reservas intracelulares de glutathiona, promovida pelo pré-tratamento com NAC, protegeu o material genético das linhagens HL-60 e DU-145 contra as agressões promovidas pelos compostos (4 μ M) quando comparado com os experimentos conduzidos na ausência de NAC (barras cinzas do gráfico). Na presença de NAC, os valores de ID para a linhagem HL-60 foram iguais a $8,33 \pm 1,45$, $9,66 \pm 0,88$, $7,33 \pm 1,45$, $5,00 \pm 0,57$ e $9,66 \pm 1,85$, para β -lapachona, *nor*- β -lapachona e derivados **1**, **3** e **4**, respectivamente. E para a linhagem DU-145, os valores de ID foram iguais a $5,33 \pm 0,48$, $4,25 \pm 1,02$, $6,33 \pm 2,45$, $4,33 \pm 1,25$ e $4,00 \pm 0,18$, para β -lapachona, *nor*- β -lapachona e derivados **1**, **3** e **4**, respectivamente.

Contudo, a depleção intracelular de glutathiona, induzida pelo BH, resultou em um aumento significativo do padrão de migração do DNA, para as duas linhagens celulares, quando confrontados com os experimentos realizados na ausência de BH (barras cinzas do gráfico). Os valores de ID para células HL-60 pré-tratadas com BH e pós-tratadas com os compostos foram iguais a $89,66 \pm 3,18$, $64,66 \pm 2,60$, $74,66 \pm 3,28$, $68,00 \pm 4,35$, $75,66 \pm 3,18$, para β -lapachona, *nor*- β -lapachona e derivados **1**, **3** e **4**, respectivamente. E para a

linhagem DU-145, os valores de ID foram iguais a $111,66 \pm 1,18$, $91,66 \pm 2,08$, $106,33 \pm 1,75$, $72,33 \pm 0,96$ e $77,00 \pm 1,15$, para β -lapachona, *nor*- β -lapachona e derivados **1**, **3** e **4**, respectivamente.

Tabela 9 – Indução de quebras totais de DNA após 4 horas de exposição a β -lapachona, *nor*- β -lapachona e seus derivados (**1**, **3** e **4**) em culturas de HL-60 e DU-145, analisadas pela versão alcalina do teste do cometa.

Linhagens celulares			
Amostras	Tratamento	HL-60	DU-145
		Índice de dano \pm E.P.M.	Índice de dano \pm E.P.M.
C^a	-	$8,66 \pm 0,88$	$8,00 \pm 1,15$
β-lapachona	0,5 μ M	$5,22 \pm 2,08$	$9,18 \pm 0,21$
	1 μ M	$9,25 \pm 1,73$	$50,33 \pm 1,76^*$
	4 μ M	$17,25 \pm 0,56^*$	$66,66 \pm 2,33^*$
<i>nor</i>-β-lapachona	0,5 μ M	$7,33 \pm 1,15$	$12,23 \pm 1,15$
	1 μ M	$4,66 \pm 1,85$	$18,33 \pm 1,45^*$
	4 μ M	$23,66 \pm 1,66^*$	$47,66 \pm 1,76^*$
1	0,5 μ M	$10,33 \pm 0,88$	$5,66 \pm 0,88$
	1 μ M	$9,00 \pm 1,15$	$30,15 \pm 2,51^*$
	4 μ M	$28,66 \pm 1,45^*$	$63,33 \pm 2,40^*$
3	0,5 μ M	$11,33 \pm 1,45$	$8,33 \pm 1,20$
	1 μ M	$10,66 \pm 1,45$	$28,18 \pm 2,30^*$
	4 μ M	$24,33 \pm 1,76^*$	$43,33 \pm 1,45^*$
4	0,5 μ M	$5,66 \pm 1,20$	$9,37 \pm 2,64$
	1 μ M	$8,38 \pm 1,73$	$30,45 \pm 2,08^*$
	4 μ M	$29,10 \pm 3,00^*$	$57,66 \pm 1,45^*$

^aDMSO (0,1%).

Os dados correspondem a média \pm E.P.M. de 3 experimentos independentes.

* $p < 0,05$ comparado com o grupo controle negativo por ANOVA seguido por student Newman-Keuls.

Tabela 10 – Indução de quebras duplas de DNA após 4 horas de exposição a β -lapachona, *nor*- β -lapachona e seus derivados (**1**, **3** e **4**) em culturas de HL-60 e DU-145, analisadas pela versão neutra do teste do cometa.

		Linhagens celulares	
Amostras	Tratamento	HL-60	DU-145
		Índice de dano \pm E.P.M.	Índice de dano \pm E.P.M.
C^a	-	$5,66 \pm 0,66$	$4,00 \pm 0,15$
β-lapachona	0,5 μ M	$6,31 \pm 1,00$	$9,15 \pm 2,30$
	1 μ M	$7,33 \pm 0,88$	$29,45 \pm 3,52^*$
	4 μ M	$8,10 \pm 1,52$	$37,33 \pm 1,15^*$
<i>nor</i>-β-lapachona	0,5 μ M	$2,33 \pm 0,66$	$7,22 \pm 1,15$
	1 μ M	$8,33 \pm 0,66$	$10,33 \pm 0,88^*$
	4 μ M	$8,31 \pm 0,66$	$30,33 \pm 1,45^*$
1	0,5 μ M	$6,25 \pm 1,00$	$5,66 \pm 0,66$
	1 μ M	$5,33 \pm 1,20$	$19,32 \pm 1,20^*$
	4 μ M	$13,40 \pm 1,15^*$	$31,66 \pm 2,02^*$
3	0,5 μ M	$4,00 \pm 0,57$	$8,20 \pm 1,15$
	1 μ M	$6,25 \pm 1,52$	$18,32 \pm 1,85^*$
	4 μ M	$10,66 \pm 1,20^*$	$27,33 \pm 1,45^*$
4	0,5 μ M	$2,66 \pm 0,66$	$9,66 \pm 1,76$
	1 μ M	$7,56 \pm 0,88$	$21,66 \pm 1,20^*$
	4 μ M	$5,66 \pm 1,45$	$18,40 \pm 1,52^*$

^aDMSO (0,1%).

Os dados correspondem a média \pm E.P.M. de 3 experimentos independentes.

* $p < 0,05$ comparado com o grupo controle negativo por ANOVA seguido por student Newman-Keuls.

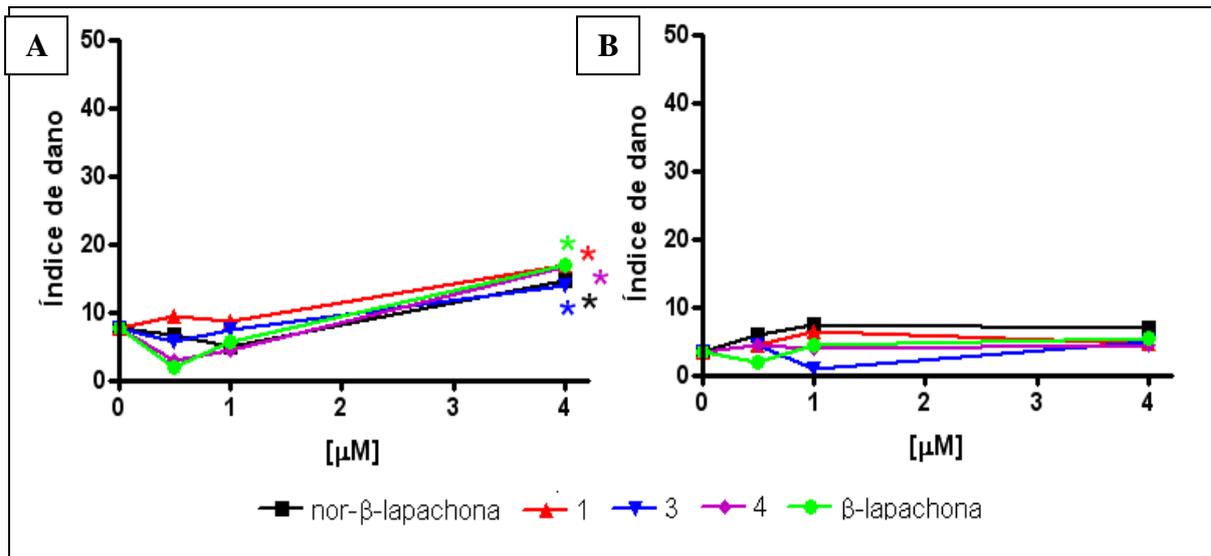


Figura 27 - Efeito do dicumarol (50 μM) sobre a indução de quebras de DNA promovidas pela β-lapachona, nor-β-lapachona e seus derivados (**1**, **3** e **4**) em culturas de HL-60 (**A**) e DU-145 (**B**) após 4 horas de exposição, analisadas pela versão alcalina do teste do cometa. DMSO (0,1%) serviu como controle negativo.

Os dados correspondem a média ± E.P.M. de 3 experimentos independentes.

*p<0,05 comparado com o grupo controle negativo por ANOVA seguido por student Newman-Keuls.

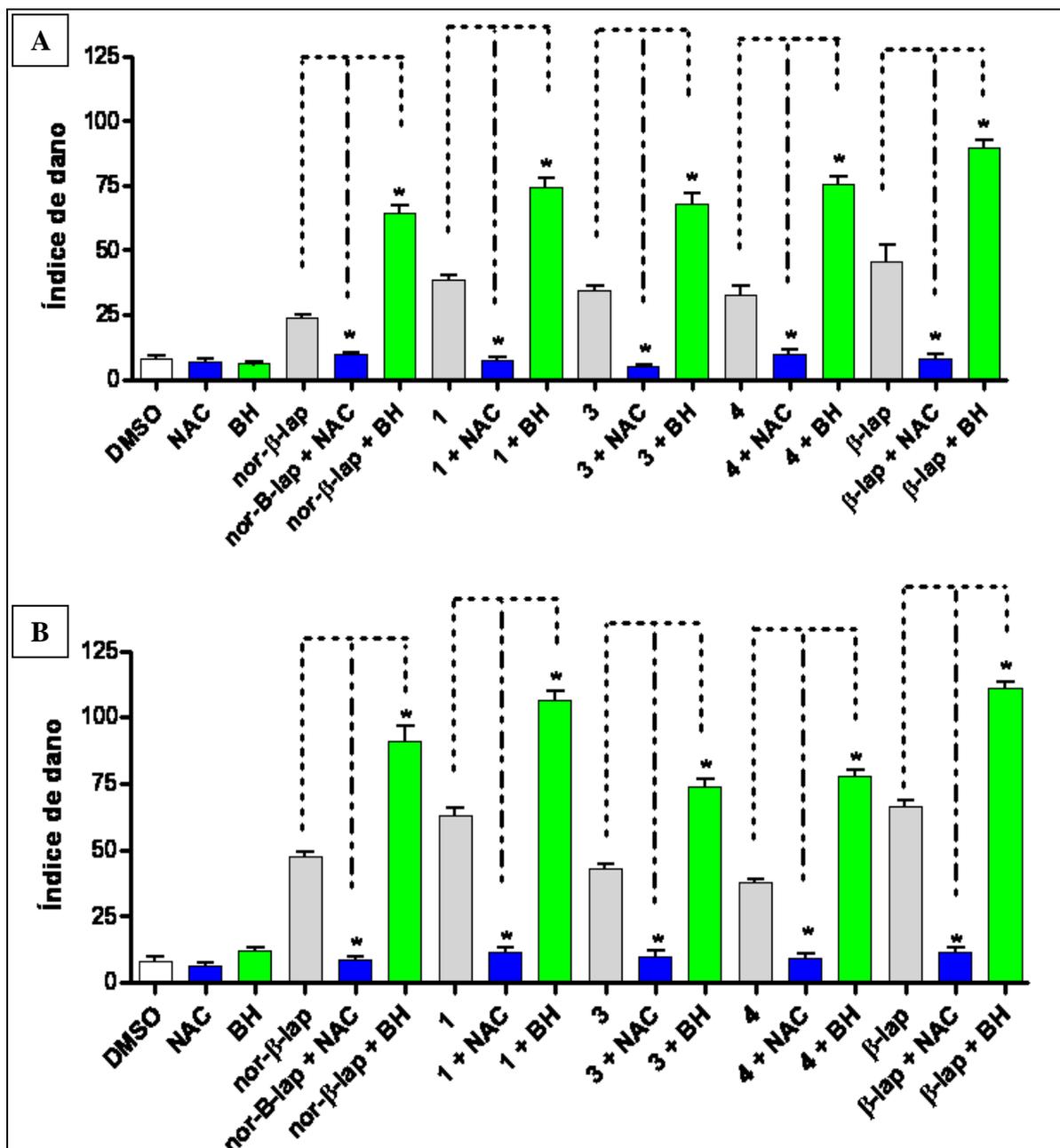


Figura 28 – Efeito do iodeto de potássio (IK, 5 mM), N-acetil-L-cisteína (NAC, 5 mM) e 1-bromoheptano (BH, 50 μ M) sobre a indução de quebras de DNA induzida pela β -lapachona (β -lap), *nor*- β -lapachona (*nor*- β -lap) e seus derivados (**1**, **3** e **4**) em culturas de HL-60 (**A**) e DU-145 (**B**) após 4 horas de exposição a concentração de 4 μ M, analisadas pela versão alcalina do teste do cometa.

DMSO (0,1%) serviu como controle negativo.

Os dados correspondem a média \pm E.P.M. de 3 experimentos independentes.

* $p < 0,05$ comparado com o grupo controle negativo por ANOVA seguido por student Newman-Keuls.

4.11 Estudo da cinética de reparo das lesões ao DNA induzidas por *nor*- β -lapachona e seus derivados em células DU-145

Após 4 horas de exposição aos compostos (4 μ M), as culturas de DU-145 foram lavadas com RPMI-1640 para a remoção dos mesmos e, posteriormente, re-incubadas para, análise do teste do cometa (versão alcalina), avaliar a capacidade celular de reparar as quebras de fitas no DNA.

Quando comparado com os dados da Tabela 9, os danos ao DNA induzidos pelos derivados **1** e **3**, foram significativamente ($p < 0,05$) reduzidos a partir de 2 horas após terem sido tratados (figura 29). Para o derivado **1**, os valores de ID foram iguais a $52,66 \pm 1,76$, $41,66 \pm 3,18$ e $37,33 \pm 1,45$ e para o derivado **3** foram iguais a $34,00 \pm 2,08$, $24,33 \pm 2,18$ e $21,66 \pm 1,66$ para os tempos de reparo equivalentes a 2, 4 e 24 horas, respectivamente. Por outro lado, o reparo parcial das lesões ao DNA induzidas pela β -lapachona, *nor*- β -lapachona e pelo seu derivado **4** só foi observado 4 horas após o tratamento. Para esses compostos, os valores de ID após 4 horas foram iguais a $55,56 \pm 2,30$ (β -lapachona), $38,25 \pm 1,00$ (*nor*- β -lapachona) e $32,00 \pm 1,15$ (**4**), e para 24 horas, os valores de ID foram iguais a $39,66 \pm 4,90$ (β -lapachona), $28,66 \pm 4,09$ (*nor*- β -lapachona) e $23,33 \pm 2,08$ (**4**). A tabela 11 mostra as porcentagens de lesões ao DNA parcialmente reparadas equivalente a redução dos valores de ID.

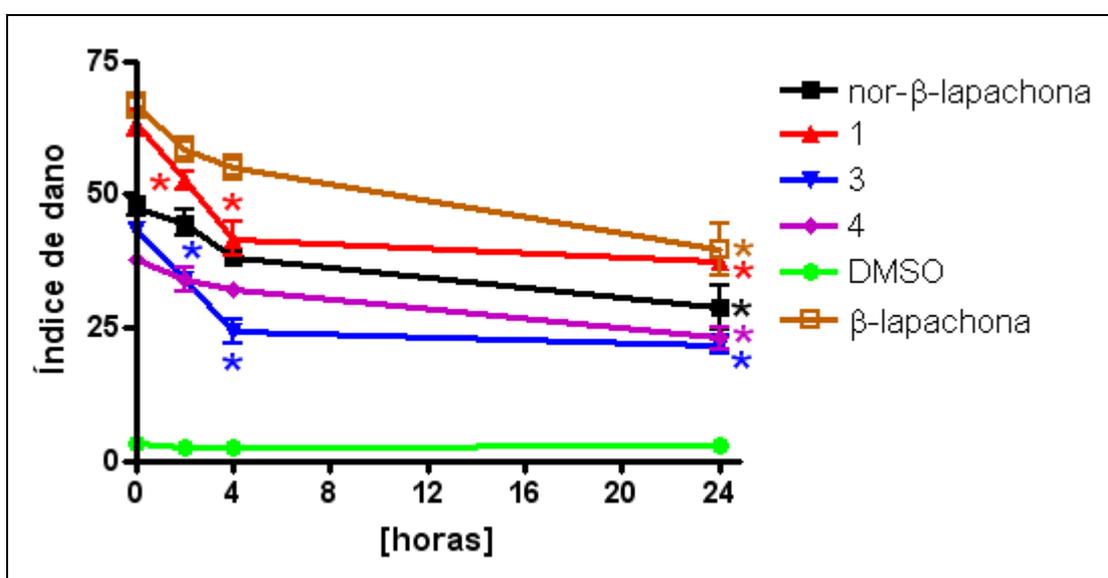


Figura 29 – Reparo parcial das lesões induzidas no DNA pela β -lapachona, *nor*- β -lapachona e derivados *nor*- β -lapachônicos (**1**, **3** e **4**) em culturas de DU-145 após 4 horas de exposição a concentração de 4 μ M, analisadas pela versão alcalina do teste do cometa.

DMSO (0,1%) serviu como controle negativo.

Os dados correspondem a média \pm E.P.M. de 3 experimentos independentes.

* $p < 0,05$ comparado com o grupo controle negativo por ANOVA seguido por student Newman-Keuls.

Tabela 11 – Percentual de lesões reparadas após a exposição de 4 horas aos compostos β -lapachona, *nor*- β -lapachona e derivados *nor*- β -lapachônicos (**1**, **3** e **4**) em culturas de DU-145 após 4 horas de exposição, analisadas pela versão alcalina do teste do cometa.

Amostras	Tratamento	Tempo de reparo pós-tratamento		
		2h	4h	24h
β-lapachona	4 μ M	12,49 \pm 1,51%	17,49 \pm 0,56%*	40,50 \pm 2,16%*
<i>nor</i>-β-lapachona	4 μ M	6,29 \pm 2,45%	20,26 \pm 4,15%*	40,55 \pm 3,22%*
1	4 μ M	16,84 \pm 1,22%*	34,21 \pm 2,08%*	41,05 \pm 0,25%*
3	4 μ M	21,53 \pm 1,18%*	43,84 \pm 3,21%*	50,01 \pm 2,72%*
4	4 μ M	9,71 \pm 2,15%	15,02 \pm 1,17%*	38,92 \pm 0,81%*

Os dados correspondem a média \pm E.P.M. de 3 experimentos independentes.

* $p < 0,05$ comparado com o grupo controle negativo por ANOVA seguido por student Newman-Keuls.

A interferência dos compostos sobre a persistência das lesões induzidas pelo MMS foi avaliada de modo a compreender os possíveis mecanismos envolvidos durante o reparo das lesões no DNA. A concentração de 0,5 μ M dos compostos estudados foi escolhida para esse ensaio, pois para essa concentração não foi observado um aumento na migração do DNA através do ensaio do cometa (tabela 9). De acordo com a figura 30, o MMS (80 μ M) induziu um aumento na migração do DNA das células DU-145 após 1 hora de exposição (ID igual a 237 \pm 2,02). Contudo, após um intervalo de até 24 horas de incubação na ausência da droga, grande parte das quebras de fitas do DNA induzidas pelo MMS foram significativamente ($p < 0,05$) reparadas, como pode ser observada pela redução dos valores de ID: 218,33 \pm 1,76 (2 h), 131,66 \pm 2,02 (4 h) e 71,15 \pm 2,08 (24 h). Por outro lado, o pós-tratamento com os compostos (0,5 μ M) aumentou a persistência das lesões induzidas pelo MMS, indicando a inibição do reparo dessas lesões. Os valores de ID para células pós-tratadas com β -lapachona, *nor*- β -lapachona e com os derivados **1**, **3** e **4** após 24 horas de reparo, por exemplo, foram, respectivamente, iguais a 174 \pm 3,05, 179,66 \pm 1,45, 145,33 \pm 4,37, 134,66 \pm 7,12 e 186,66 \pm 2,02. A tabela 12 mostra as porcentagens de lesões ao DNA parcialmente reparadas equivalente a redução dos valores de ID.

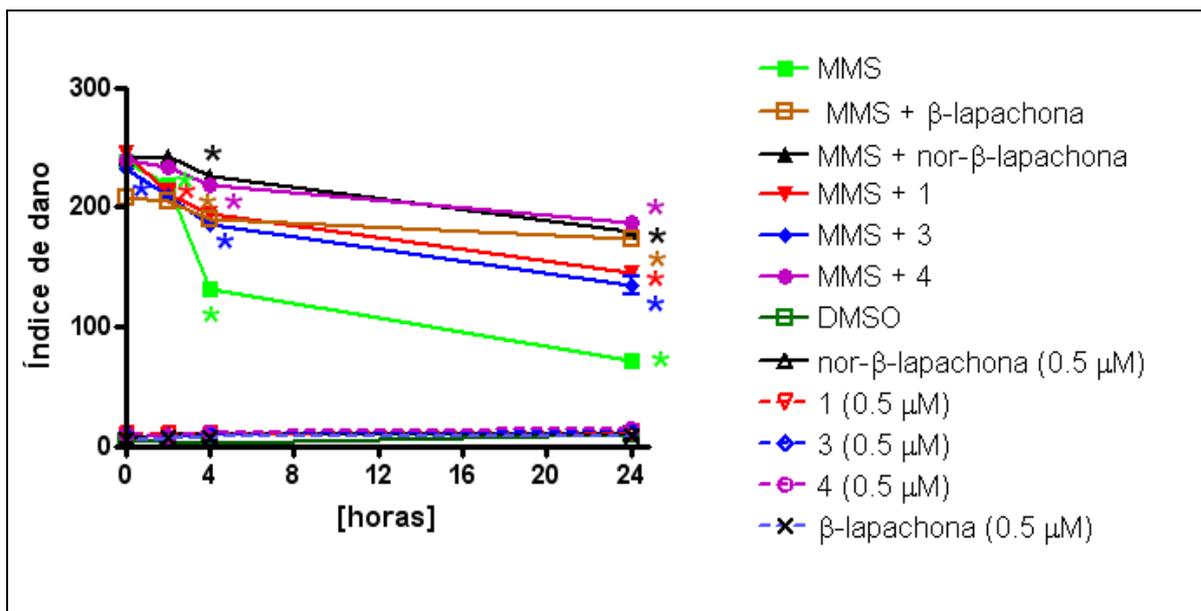


Figura 30 – Influência dos compostos sobre a persistência das lesões ao DNA induzidas pelo metil-metano-sulfonato (MMS, 80 µM) em culturas de DU-145, analisadas pela versão alcalina do teste do cometa.

DMSO (0,1%) serviu como controle negativo.

Os dados correspondem a média ± E.P.M. de 3 experimentos independentes.

*p<0,05 comparado com o grupo controle negativo por ANOVA seguido por student Newman-Keuls.

Tabela 12 – Percentual de lesões ao DNA induzidas pelo MMS (80 µM) reparadas após co-tratamento (0,5 µM) com β-lapachona, nor-β-lapachona e derivados nor-β-lapachônicos (1, 3 e 4) em culturas de DU-145, analisadas pela versão alcalina do teste do cometa.

Tratamento	Tempo de reparo pós-tratamento		
	2h	4h	24h
MMS	8,00 ± 0,51%*	44,52 ± 3,15%*	70,08 ± 5,22%*
MMS + β-lapachona	0,96 ± 0,33%	8,53 ± 0,77%*	15,94 ± 0,81%*
MMS + nor-β-lapachona	0,41 ± 0,17%	6,22 ± 1,15%*	25,45 ± 2,06%*
MMS + 1	13,97 ± 1,08%*	13,97 ± 5,41%*	40,84 ± 3,12%*
MMS + 3	9,73 ± 2,06%*	20,34 ± 1,15%*	42,12 ± 4,15%*
MMS + 4	2,37 ± 0,56%	8,53 ± 3,17%*	21,06 ± 0,75%*

Os dados correspondem a média ± E.P.M. de 3 experimentos independentes.

*p<0,05 comparado com o grupo controle negativo por ANOVA seguido por student Newman-Keuls.

A síntese de DNA não-programada está relacionada com o reparo por excisão dos segmentos de DNA danificados. De acordo com a figura 31, após 4 horas de tratamento com os compostos (4 µM) na presença de HU (3mM) foi observada síntese de DNA não-programada (semelhante ao controle) para todos os compostos avaliados. Para culturas tratadas com nor-β-lapachona e seus derivados (1, 3 e 4) a porcentagem de células BrdU positivas foram, respectivamente, iguais a 8,12 ± 1,15%, 12,00 ± 1,15%, 11,66 ± 2,02% e

9,86 ± 2,64%. O MMS induziu a síntese de DNA não-programada (32,41 ± 2,30% de células BrdU positivas), a qual foi reduzida na presença dos compostos: 14,10 ± 20,8%, 13,33 ± 0,66%, 10,66 ± 3,84% e 11,33 ± 2,40% para *nor*-β-lapachona e derivados **1**, **3** e **4**, respectivamente.

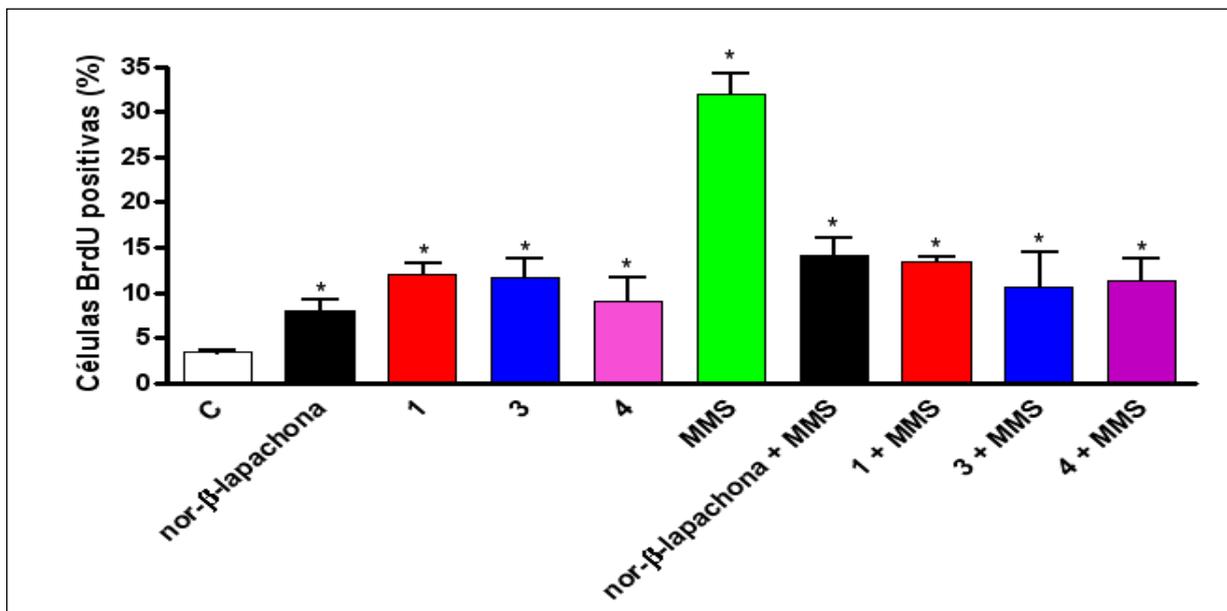


Figura 31 – Efeito dos compostos (4 µM) sobre a síntese de DNA não-programada na presença ou ausência de MMS (80 µM) em células DU-145.

DMSO (0,1%) serviu como controle negativo.

Os dados correspondem a média ± E.P.M. de 3 experimentos independentes.

*p<0,05 comparado com o grupo controle negativo por ANOVA seguido por student Newman-Keuls.

4.12 Efeitos da *nor*-β-lapachona e seus derivados sobre o crescimento de *S. cerevisiae* deficientes em enzimas topoisomerases

As leveduras foram expostas a diferentes concentrações (10 a 80 µg/mL) dos compostos β-lapachônicos durante 48 horas. Após esse período, as cepas selvagens de *S. cerevisiae* (BY4741), não deficientes na expressão de topoisomerases, tiveram uma redução na taxa de crescimento, observado pelo aumento do halo de inibição em relação as culturas tratadas com o solvente (DMSO, 0,1%). Porém, os efeitos inibitórios dos compostos foram mais pronunciados nas cepas mutantes para topoisomerases (*Top1Δ*, *Top3Δ* e *Top1ΔTop3Δ*), como ilustra a figura 32, sugerindo que todos os compostos avaliados interferem na atividade de todas as isoformas dessa enzima (I, II e III).

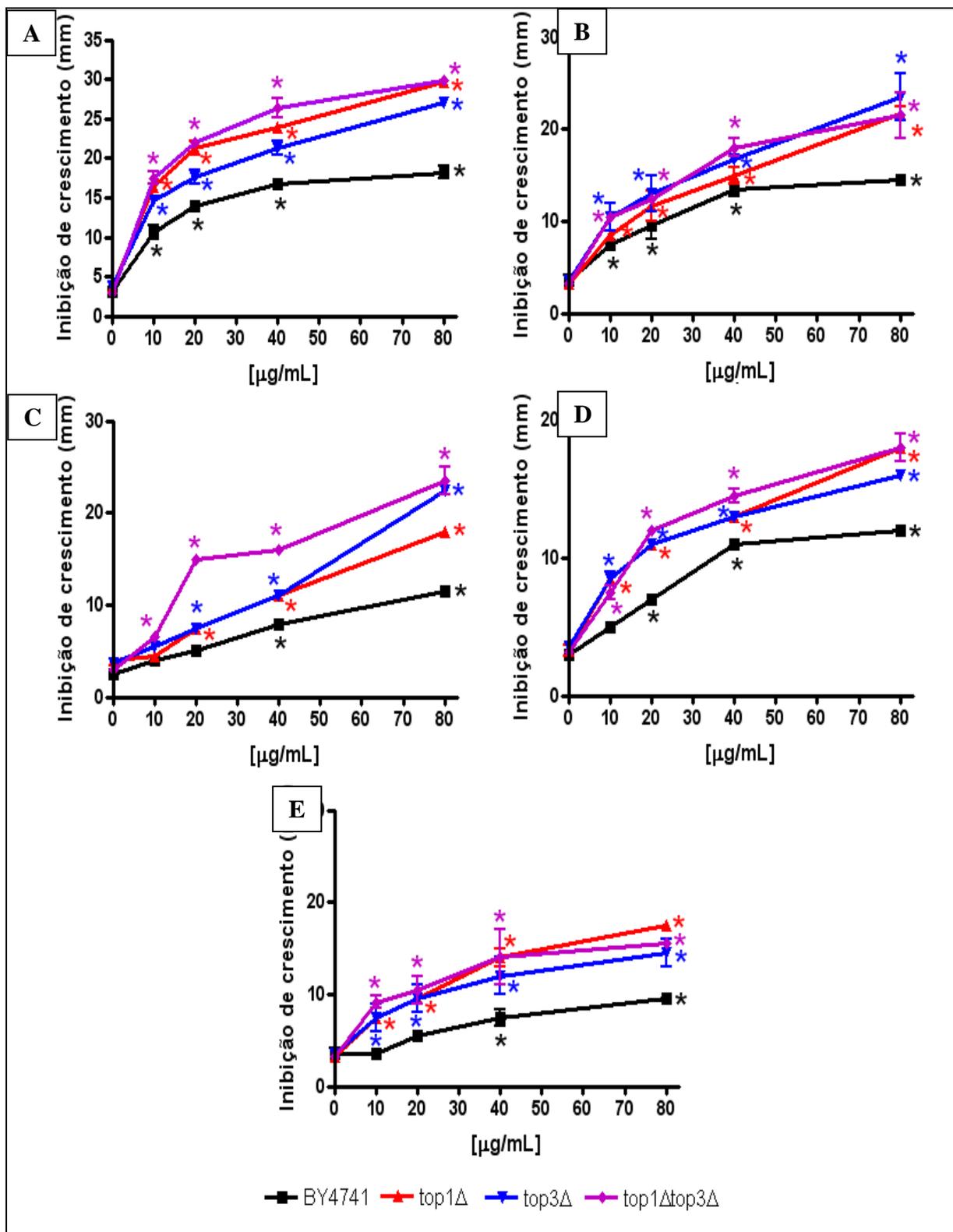


Figura 32 – Efeito da β -lapachona (A), *nor*- β -lapachona (B), derivados 1 (C), 3 (D) e 4 (E) sobre a inibição de crescimento da levedura *S. cerevisiae* (BY4741) e sobre cepas de *S. cerevisiae* defectivas na expressão de topoisomerases (*top1Δ*, *top3Δ* e *top1Δtop3Δ*) após 48 h de exposição.

DMSO (0,1%) serviu como controle negativo.

Os dados correspondem a média \pm E.P.M. de 2 experimentos independentes.

* $p < 0,05$ comparado com o grupo controle negativo por ANOVA seguido por student Newman-Keuls.

4.13 Efeito antiproliferativo da *nor*- β -lapachona e seus derivados sobre células V79

Após 24 horas de exposição, tanto a *nor*- β -lapachona quanto seus derivados apresentaram baixa atividade citotóxica em células V79, com valores de CI_{50} variando entre 10,59 μ M e 13,41 μ M para o derivado **3** e *nor*- β -lapachona, respectivamente (tabela 13). Porém, se comparados com os valores de CI_{50} dos experimentos realizados com células mononucleadas do sangue periférico (CMSP) expostas ao mesmo tempo de incubação (tabela 5), observa-se, com exceção do derivado **1**, que CMSP são menos sensíveis ao tratamento.

Tabela 13 - Atividade citotóxica *in vitro* da *nor*- β -lapachona e derivados arilaminos *nor*- β -lapachônicos frente à linhagem V79 pelo ensaio do MTT após 24 horas de exposição.

Linhagem celular – CI_{50} μ M (IC95%) [*]	
Compostos	V79
<i>nor</i> - β -lapachona	13,41 (13,05-13,82)
1	12,08 (11,56-12,73)
3	10,59 (9,23-11,41)
4	13,19 (12,71-13,65)

*Valores originados de 3 experimentos independentes e apresentados em valores de CI_{50} obtidos por regressão não-linear com intervalo de confiança de 95%.

4.14 Avaliação do potencial genotóxico e mutagênico da *nor*- β -lapachona e seus derivados em células V79

A tabela 14 mostra que após 4 horas de incubação todos os compostos avaliados induziram quebras de fitas simples e duplas no DNA apenas na maior concentração (10 μ M).

Tabela 14 - Indução de quebras de fitas do DNA após 4 horas de exposição a *nor*- β -lapachona e seus derivados (**1**, **3** e **4**) em culturas de V79, analisadas pelas versões alcalina e neutra do teste do cometa.

		Linhagem V79	
Amostras	Tratamento	pH > 13	pH 8,5
		Índice de dano \pm E.P.M.	Índice de dano \pm E.P.M.
C^a	-	12,33 \pm 1,45	5,33 \pm 1,45
β-lapachona	2,5 μ M	9,45 \pm 2,40	3,66 \pm 1,45
	5 μ M	15,56 \pm 1,76	7,56 \pm 1,45
	10 μ M	54,37 \pm 2,45*	22,66 \pm 2,02*
<i>nor</i>-β-lapachona	2,5 μ M	9,33 \pm 2,60	3,00 \pm 1,15
	5 μ M	13,33 \pm 1,20	6,33 \pm 0,88
	10 μ M	48,33 \pm 2,33*	23,66 \pm 2,33*
1	2,5 μ M	14,21 \pm 1,15	5,15 \pm 1,33
	5 μ M	15,66 \pm 0,88	7,40 \pm 1,33
	10 μ M	58,33 \pm 2,40*	19,56 \pm 2,02*
3	2,5 μ M	13,00 \pm 2,08	4,45 \pm 1,85
	5 μ M	14,10 \pm 2,08	2,33 \pm 1,33
	10 μ M	68,25 \pm 2,64*	19,66 \pm 1,76*
4	2,5 μ M	10,00 \pm 1,15	6,00 \pm 1,52
	5 μ M	13,33 \pm 2,08	9,33 \pm 1,76
	10 μ M	59,00 \pm 3,78*	21,33 \pm 1,85*

^aDMSO (0,1%).

Os dados correspondem a média \pm E.P.M. de 3 experimentos independentes.

*p<0,05 comparado com o grupo controle negativo por ANOVA seguido por student Newman-Keuls.

A migração do DNA após a incubação com enzimas que reconhecem bases oxidadas no DNA, Fpg (purinas) e Endo III (pirimidinas), foi significativamente maior quando comparadas aos valores de ID dos experimentos realizados na ausência dessas enzimas (figura 33). Culturas tratadas com *nor*- β -lapachona e pós-incubadas com as enzimas tiveram seus valores de ID aumentados de $48,33 \pm 2,33$ para $125,15 \pm 2,46$ (Fpg) e $101,22 \pm 6,11$ (Endo III). Os valores de ID para o derivado **1** aumentou de $58,33 \pm 2,40$ para $103,33 \pm 6,38$ (Fpg) e $91,25 \pm 3,78$ (Endo III), para o derivado **3**, o aumento de ID foi de $68,25 \pm 2,64$ para $123,33 \pm 3,48$ (Fpg) e $101,66 \pm 2,72$ (Endo III). E para o derivado **4**, o aumento de ID foi de $59,00 \pm 3,78$ para $130,41 \pm 3,60$ (Fpg) e $101,00 \pm 4,58$ (Endo III).

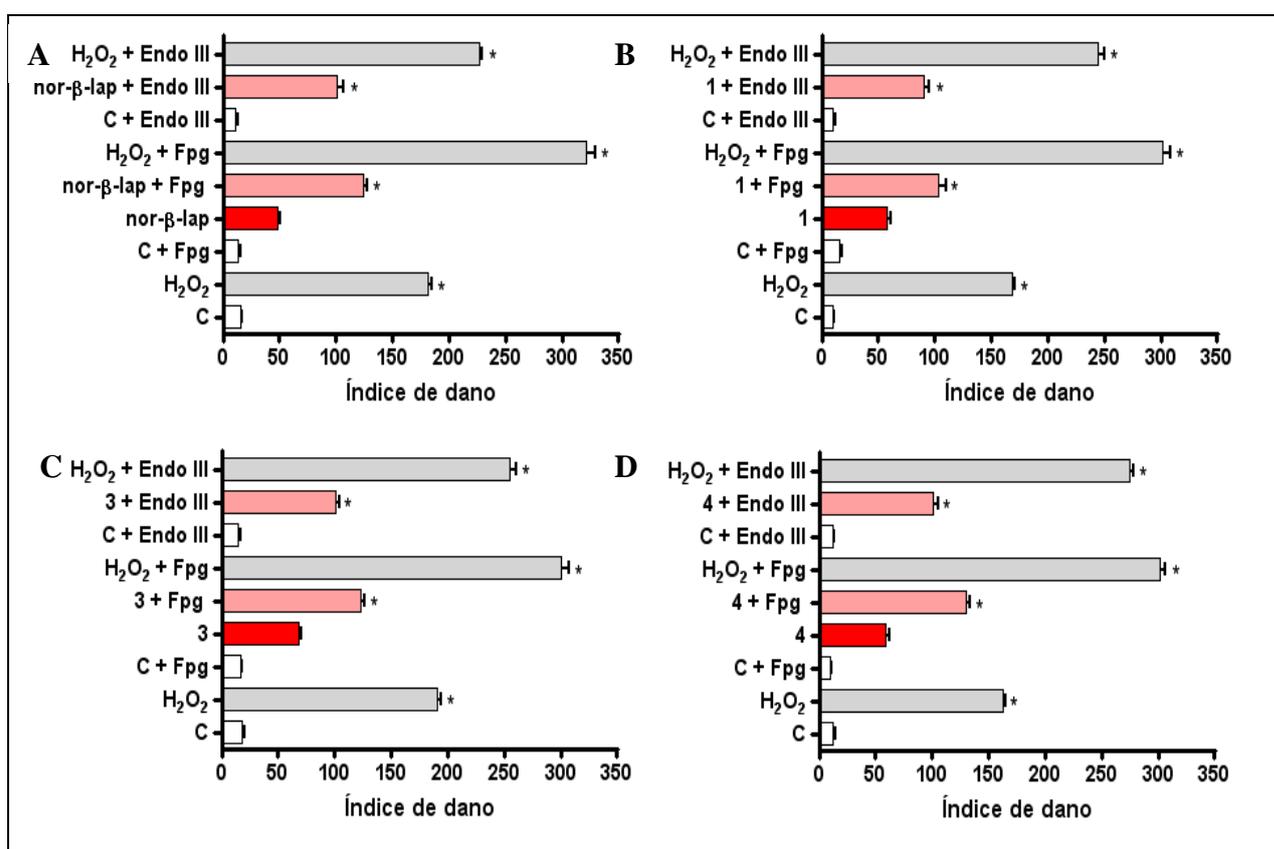


Figura 33 – Danos oxidativos induzidos pela *nor*- β -lapachona (*nor*- β -lap) (A), derivados **1** (B), **3** (C) e **4** (D), após 4 horas de incubação com os compostos (10 μ M), através da versão alcalina do teste do cometa.

DMSO (0,1%) e H₂O₂ (10 μ M) serviram como controles negativo e positivo, respectivamente.

Os dados correspondem a média \pm E.P.M. de 3 experimentos independentes.

* $p < 0,05$ comparado com o grupo controle negativo por ANOVA seguido por student Newman-Keuls.

De acordo com a figura 34, os compostos avaliados só aumentaram de modo significativo a frequência de micronúcleos em células V79 na maior concentração (10 μ M) testada. Em células pré-tratadas com NAC e pós-tratadas com os compostos não foi observado diferença significativa da incidência de micronúcleos em relação ao controle negativo. O tratamento induziu um decréscimo na frequência de células V79 binucleadas apenas na maior concentração (10 μ M), enquanto pré-tratamento com NAC protegeu as células contra os efeitos antiproliferativos induzidos pelos compostos, como exposto na tabela 15.

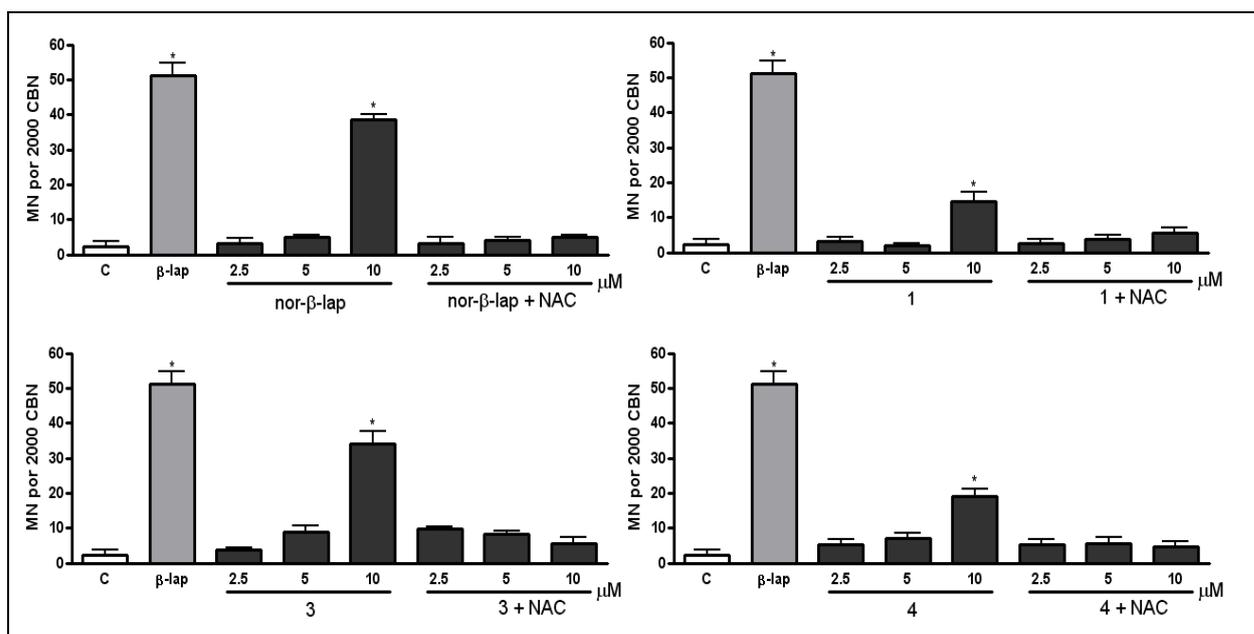


Figura 34 – Efeito da *nor*-β-lapachona e seus derivados (**1**, **3** e **4**) sobre a frequência de micronúcleos (MN), na presença ou na ausência de NAC, em células V79 binucleadas (CBN) após 4 horas de exposição.

DMSO (0,1%) e β-lapachona (β-lap, 10 μ M) serviram como controles negativo e positivo, respectivamente.

Os dados correspondem a média \pm E.P.M. de 3 experimentos independentes.

* $p < 0,05$ comparado com o grupo controle negativo por ANOVA seguido por student Newman-Keuls.

Tabela 15 – Efeito da *nor*- β -lapachona e seus derivados (**1**, **3** e **4**) sobre a frequência de células V79 binucleadas (CBN) após 4 horas de exposição.

Linhagem V79			
Amostras	Tratamento	Sem NAC	Com NAC
		% CBN \pm E.P.M.	% CBN \pm E.P.M.
C^a	-	85,46 \pm 1,15	83,71 \pm 2,56
β-lapachona	10 μ M	57,31 \pm 1,22*	87,14 \pm 3,10
	2,5 μ M	88,05 \pm 0,76	83,17 \pm 0,75
<i>nor</i>-β-lapachona	5 μ M	84,27 \pm 1,05	80,51 \pm 1,17
	10 μ M	59,14 \pm 2,96*	86,44 \pm 0,15
1	2,5 μ M	86,65 \pm 4,12	85,84 \pm 0,33
	5 μ M	82,57 \pm 0,18	87,18 \pm 2,15
	10 μ M	67,54 \pm 4,16*	82,20 \pm 2,16
3	2,5 μ M	89,64 \pm 0,33	81,94 \pm 0,15
	5 μ M	80,12 \pm 1,15	87,49 \pm 3,25
	10 μ M	63,72 \pm 2,15*	82,61 \pm 0,18
4	2,5 μ M	80,78 \pm 2,14	84,09 \pm 0,75
	5 μ M	86,17 \pm 4,12	87,41 \pm 1,25
	10 μ M	68,37 \pm 1,18*	81,80 \pm 0,56

^aDMSO (0,1%).

Os dados correspondem a média \pm E.P.M. de 3 experimentos independentes.

*p<0,05 comparado com o grupo controle negativo por ANOVA seguido por student Newman-Keuls.

Discussão

5 DISCUSSÃO

Os produtos naturais continuam sendo uma das principais fontes de novos compostos para o desenvolvimento de novos fármacos (PEZZUTO, 1997; NEWMAN *et al.*, 2003; AGGARWAL; SHISHODIA, 2006; NEWMAN; CRAGG, 2007). Dentre esses, as quinonas representam uma ampla e variada família de metabólitos de ocorrência natural (MONKS *et al.*, 1992; BARREIRO *et al.*, 1996; MARTÍNEZ; BENITO, 2005) com amplo espectro de atividades biológicas (PERRY *et al.*, 1991; CAMARA *et al.*, 2008; HILLARD *et al.*, 2008; PINTO; DE CASTRO, 2009; TANDON *et al.*, 2009), dentre as quais podem ser ressaltadas suas propriedades anticâncer (PARDEE *et al.*, 2002; ASCHE, 2005; HUANG *et al.*, 2010). O uso clínico de drogas antitumorais que contenham um grupo quinona em suas estruturas químicas (ex: dactinomicina, doxorubicina, bleomicina e mitomicina C) reforça a importância das quinonas no desenvolvimento de novos fármacos antineoplásicos (GEWIRTZ, 1999; GALM *et al.*, 2005; ZHANG *et al.*, 2006).

Existem diferentes classes químicas que apresentam o grupo quinona em suas estruturas, dentre essas podemos destacar as naftoquinonas. Dentre as naftoquinonas podemos ressaltar o lapachol e a β -lapachona, as quais vêm se destacando devido ao grande número de atividades biológicas atribuídas para esses compostos, principalmente atividades microbicidas e citotóxicas. Atualmente o número de trabalhos na literatura científica reportando as atividades biológicas de novas naftoquinonas naturais e seus análogos semi-sintéticos contendo estruturas naftalênicas vem crescendo constantemente (PLYTA *et al.*, 1998; RIFFEL *et al.*, 2002; PHILLIPS *et al.*, 2004; ESTEVES-SOUZA *et al.*, 2007; YAMASHITA *et al.*, 2009; SANDUR *et al.*, 2010).

Em relação a atividade antitumoral das naftoquinonas, a β -lapachona tem recebido especial atenção devido as suas propriedades antiproliferativas, ainda não totalmente elucidadas, exercidas sobre células tumorais em modelos *in vitro* e *in vivo* (KRISHNAN; BASTOW, 2000; LI *et al.*, 2003; MIDDLETON *et al.*, 2008; DONG *et al.*, 2009) e, também, devido a sua baixa citotoxicidade observada em células não tumorais (SUN *et al.*, 2006; DA SILVA JÚNIOR *et al.*, 2010). Recentes estudos clínicos estão sendo conduzidos com a β -lapachona (ARQ 501) com o objetivo de se desenvolver mais uma nova droga antitumoral no tratamento de tumores pancreáticos, cabeça e pescoço e leiomiossarcoma (LI, 2006a, b; YANG *et al.*, 2008; MIAO *et al.*, 2008).

Desse modo, a busca por novos derivados β -lapachônicos que apresentem atividade citotóxica contra diferentes linhagens de células tumorais é parte de uma crescente e contínua

busca por novos compostos ativos, e por prováveis protótipos a fármacos a fim de aliar-se, no futuro, ao arsenal terapêutico disponível (SCHAFFNER-SABBA *et al.*, 1984; FRYDMAN *et al.*, 1997; DI CHENNA *et al.*, 2001; REINICKE *et al.*, 2005).

O presente estudo teve, inicialmente, como objetivo avaliar o potencial citotóxico de quatro derivados arilaminos da *nor*- β -lapachona. A *nor*- β -lapachona é um derivado da β -lapachona cujas estruturas químicas são muito semelhantes (figuras 5 e 6). É importante ressaltar que tem sido relatado o potencial citotóxico da *nor*- β -lapachona e de seus derivados arilaminos substituídos frente a diferentes linhagens de células tumorais. E ao comparar as atividades citotóxicas (valores de CI_{50}) entre a β -lapachona e a *nor*- β -lapachona, pôdesse observar que ambas moléculas possuem perfis semelhantes de citotoxicidade (KONGKATHIP *et al.*, 2003; DA SILVA JÚNIOR, 2007b, 2010).

A determinação da citotoxicidade *in vitro* tem se mostrado eficaz na descoberta de novos agentes antitumorais. A maneira mais rápida, fácil e sensível é a triagem dos compostos testes em modelos celulares *in vitro* (CRAGG; NEWMANN, 2000). No estudo inicial, foi determinada a atividade antiproliferativa dos compostos frente as células tumorais, pelo método colorimétrico do MTT. Com exceção do derivado **2**, todos os outros compostos estudados reduziram a taxa de proliferação celular em todas as linhagens tumorais humanas utilizadas, após 72 horas de exposição.

O potencial citotóxico identificado, vem questionar o que muitos pesquisadores têm observado em relação a atividade enzimática de NQO1 (DT-diaforase), a qual é considerada como um fator determinante sobre a citotoxicidade da β -lapachona (PINK *et al.*, 2000; PLANCHON *et al.*, 2001; OUGH *et al.*, 2005; BEY *et al.*, 2007; SONG *et al.*, 2008).

Pelo fato de que dentre as linhagens tumorais utilizadas no presente estudo, havia linhagens que superexpressam a enzima NQO1, como, por exemplo, as linhagens de carcinoma de próstata PC-3 e DU-145 (PLANCHON *et al.*, 2001) e de mama HS578t (FITZSIMMONS *et al.*, 1996; WANG *et al.*, 1999). Assim como havia linhagens com deficiência na expressão da enzima NQO1, como, por exemplo, as linhagens leucêmicas HL-60, MOLT-4 e K562 (FITZSIMMONS *et al.*, 1996; BELLO *et al.*, 2005). Contudo, de acordo com os resultados obtidos, não foi observada uma correlação clara entre os níveis de expressão de NQO1 e a citotoxicidade exercida pela β -lapachona, uma vez que essa naftoquinona interferiu sobre a proliferação tanto de células NQO1⁺ quanto células NQO1⁻.

Ao contrário, Reinicke *et al.* (2005) reportou que a β -lapachona foi mais citotóxica sobre a linhagem de câncer de mama MDA-MB-231 (NQO1⁺) do que a MDA-MB-468 (NQO1⁻), com valores de LD_{50} igual a $6,6 \pm 1,4 \mu\text{M}$ para células NQO1⁺ e $14,2 \pm 2,1 \mu\text{M}$

para células NQO1⁻. Em outro estudo, Planchon *et al.* (20001) correlacionou a citotoxicidade de β -lapachona aos altos níveis de expressão enzimática de NQO1 em linhagens de carcinoma de próstata humano (PC-3 e DU-145). Recentemente, Ough *et al.* (2005) e Bey *et al.* (2007) reportaram um estudo semelhante com uma linhagem de adenocarcinoma de pâncreas humana (MIA PaCa-2) e de carcinoma pulmonar humano (A549), respectivamente, que superexpressam NQO1. Em todos esses estudos, a administração do dicumarol (inibidor de NQO1), resultou na proteção das células que superexpressam NQO1, mas não teve efeito sobre linhagens com deficiência na expressão da enzima, como por exemplo, a linhagem de carcinoma de mama humano (MDA-MB-468), de carcinoma pulmonar (H596) e de carcinoma de próstata (LNCaP), mostrando a importância dessa enzima sobre a bioativação da β -lapachona.

Adicionalmente, Pan *et al.* (2002) reportou a presença de polimorfismo para o gene que codifica a enzima NQO1 na linhagem HL-60. Esse tipo específico de polimorfismo reduz significativamente ou abole a atividade enzimática dessa redutase. A relevância desses polimorfismos na clínica resulta na falta da resposta terapêutica adequada aos agentes antitumorais bio-redutíveis (ROSS *et al.*, 2000; BEGLEITER *et al.*, 2009). E Dubin *et al.* (1990) demonstrou que a β -lapachona e outras naftoquinonas relacionadas foram capazes de inibir as reações catalisadas pelo citocromo P450. Essas observações associadas com a presença de toxicidade sobre células deficientes na expressão de NQO1 reforçam a hipótese de que a β -lapachona e seus derivados podem ser metabolizados por outras enzimas redutoras além das NQOs e P450 redutases.

Segundo Fourie *et al.* (2002), nenhum agente antitumoral bio-redutível (clínico ou experimental) é ativado por apenas uma única enzima redutora. A mitomicina C, por exemplo, pode ser bioativada tanto pela redução de apenas um elétron (P450 redutases ou xantina desidrogenase) quanto pela redução via dois elétrons, catalisada pela DT-diaforase (KUMAR *et al.*, 1988; ROSS *et al.*, 1996; CUMMINGS *et al.*, 1998). Sawamura *et al.* (1996) demonstrou que células normais derivadas de ovários de hamster chinês (CHO) transfectadas com genes que codificam para alguns tipos de P450 redutases foram duas ou três vezes mais sensíveis a mitomicina C do que as células CHO selvagens. O mesmo ocorre para indoloquinona (EO9), um análogo da mitomicina C que está sendo clinicamente avaliado (PURI *et al.*, 2006; VAN DER SCHOOT *et al.*, 2007), que pode ser bio-reduzido via um ou dois elétrons (WALTON *et al.*, 1991; BAILEY *et al.*, 1992).

Tendo conhecimento que algumas quinonas possuem a capacidade de hemolisar membranas plasmáticas celulares (PROKOFEVA *et al.*, 2004) e muitos derivados

naftoquinônicos são agentes hemolíticos (MUNDAY *et al.*, 1995, 2007). Houve interesse em investigar o potencial hemolítico desses compostos, objetivando-se descartar a possibilidade dos efeitos citotóxicos estarem relacionados a danos na membrana plasmática (hemólise) celular, seja pela formação de poros ou pela ruptura total da membrana, permitindo o extravasamento de íons ou macromoléculas como a hemoglobina para o ambiente externo (BHAKDI *et al.*, 1985; BERNHEIMER; RUDY, 1986; SEKIYA *et al.*, 1993; PALMER *et al.*, 1998). Nessa investigação foi identificado a ausência de atividade hemolítica para *nor*- β -lapachona e seus derivados (1-4), o que sugere mecanismos de ação mais específicos associados aos efeitos antiproliferativos.

É do nosso conhecimento que a produção de espécies bioativas de oxigênio é um dos vários fatores associados a citotoxicidade induzida por quinonas (POWIS, 1989; NEMEIKAITÉ-CENIENE *et al.*, 2003). Nesse sentido, foram escolhidas duas linhagens celulares [HL-60 (NQO1⁻) e DU-145 (NQO1⁺)], as quais foram expostas aos compostos durante 24 horas. Após a exposição, os valores de CI₅₀ foram muito semelhantes aos valores de inibição proliferativa (CI₅₀) obtidos após 72 horas de incubação, mostrando que os efeitos citotóxicos não são dependentes do tempo de exposição. Contudo, a adição exógena de glutathiona reduzida (GSH) às culturas, resultou em uma redução da sensibilidade celular aos compostos, o que indica a importância de EROS sobre a toxicidade celular promovida pelos compostos β -lapachônicos estudados.

Na reação catalisada pela glutathiona peroxidase (GPx), o GSH é utilizado como co-substrato para metabolizar a decomposição de H₂O₂, dentre outros hidroperóxidos orgânicos, em H₂O e glutathiona oxidada (GSSG), diminuindo o potencial lesivo dos radicais livres (BEHNE; KYRIAKOPOULOS, 2001; VALKO *et al.*, 2004, 2007). Assim, a intensidade do estresse oxidativo pode determinar o tipo de morte celular. Tendo sido mostrado que a depleção intracelular de GSH pode modificar a rota de morte celular por apoptose para necrose em culturas celulares expostas a agentes oxidantes ou alguns agentes alquilantes (HALL, 1999; SCHAFFER; BUETTNER, 2001; TROYANO *et al.*, 2003; MINOTTI *et al.*, 2004). O GSH é a defesa predominante contra EROS, particularmente nas mitocôndrias, o maior local de síntese de intermediários reativos de oxigênio (DELEVE; KAPLOWITZ, 1991). Baixos níveis de GSH são frequentemente associados com disfunções mitocondriais, ativação de apoptose mediada pela via mitocondrial e produção de metabólitos de esfingomielina que servem como sinais de ativação do processo apoptótico (LIU *et al.*, 1998; MERAD-SAIDOUNE *et al.*, 1999; COPPOLA; GHIBELLI, 2000).

Corroborando com os resultados antiproliferativos supracitados, a inibição da síntese replicativa de DNA, em células HL-60, pelo método da incorporação do BrdU, reflete uma redução da capacidade proliferativa após 24 horas de exposição. O BrdU é um análogo da timidina que é incorporado às células que se encontram em divisão celular durante a fase de síntese (S) do ciclo celular (HOLM *et al.*, 1998; SHIMADA *et al.*, 2008). Com exceção do derivado **2**, a *nor*- β -lapachona e seus derivados arilaminos substituídos (**1**, **3** e **4**) reduziram a taxa de incorporação celular do BrdU.

Com a finalidade de avaliar a toxicidade das amostras sobre as células mononucleares do sangue periférico (CMSP) foi realizado o ensaio do Alamar Blue (ZHI-JUN *et al.*, 1997). Este ensaio assim como o do MTT permite avaliar a citotoxicidade de compostos pela atividade enzimática, determinada pela mudança de coloração, uma vez que ambos ao serem metabolizados são convertidos em compostos de coloração diferente da original (HAMID *et al.*, 2000). O Alamar Blue foi escolhido, pois é mais sensível e não é tóxico para linfócitos (NAKAYAMA *et al.*, 1997; O'BRIEN *et al.*, 2000). Culturas de CMSP tratadas com β -lapachona ou com *nor*- β -lapachona não apresentaram citotoxicidade. Essa ausência de citotoxicidade para CMSP está de acordo com os achados na literatura (LI *et al.*, 2003; DA SILVA JÚNIOR, 2007b, 2010). Por sua vez, os derivados arilaminos *nor*- β -lapachônicos apresentaram efeitos antiproliferativos sobre CMSP, cuja intensidade variou de fraco (**3** e **4**) a moderado (**1**). Sendo que o derivado **2**, assim como a β -lapachona e a *nor*- β -lapachona não foi citotóxico para CMSP, o que demonstra a seletividade desses compostos para as células tumorais.

De uma forma geral, a presença de grupos retiradores de elétrons (F, Cl, Br e NO₂) no anel arilamino dos derivados *nor*- β -lapachônicos tendem a aumentar a atividade citotóxica, enquanto a presença de grupo doador de elétron (CH₃) tende a reduzir a atividade antiproliferativa desses compostos (DA SILVA JÚNIOR *et al.*, 2007b). Porém, os dados de citotoxicidade (ensaio do MTT), do presente estudo, entre os derivados **2** e **4**, cujos compostos possuem grupos NO₂ e CH₃ no anel arilamino, revelam que apenas a posição do grupo metil em relação ao grupo nitro foi suficiente para abolir a atividade antiproliferativa do derivado **2**, talvez devido a alteração do potencial redox modificado pelo substituinte. Contudo, o derivado **2** induziu citotoxicidade em culturas de melanoma humano (MDA-MB435) apresentando valor de CI₅₀ igual a 2,85 μ M após 72 horas de exposição (DA SILVA JÚNIOR *et al.*, 2010), o que ressalta a necessidade de novos estudos para a compreensão dos mecanismos de ação e da relação entre estrutura e atividade do derivado **2**.

A análise morfológica através da coloração diferencial por meio do uso de corantes intercalantes de DNA (brometo de etídio e laranja de acridina) é considerada uma metodologia adequada nos estudos iniciais de indução de morte celular (LEITE *et al.*, 1999; GASIOROWSKI *et al.*, 2001; SAVITSKIY *et al.*, 2003). A linhagem leucêmica HL-60 representa um modelo exaustivamente utilizado nos estudos dos efeitos de uma droga sobre a proliferação, a progressão do ciclo e indução de morte celular (COLLIN, 1987a; MILITÃO *et al.*, 2006).

A *nor*- β -lapachona e seus derivados (**1**, **3** e **4**) induziram apoptose após um período de incubação relativamente curto (4 horas) e a frequência de células que compartilhavam características apoptóticas aumentou com a extensão do período de exposição (24 horas). A redução da viabilidade celular após o tratamento (4 e 24 horas) pode ser explicada pelo aumento do número de células apoptóticas. Morfologicamente, células apoptóticas podem ser diferenciadas de células necróticas através da redução do volume celular, condensação periférica de cromatina, fragmentação nuclear e formação de corpos apoptóticos (NAKAMURA *et al.*, 2002). Desse modo, após o tratamento, não foi observado indícios de morte celular por indução de necrose.

Durante os estágios iniciais do processo apoptótico, a membrana celular permanece impermeável aos corantes vitais como, por exemplo, o brometo e o iodeto de propídio (VAN CRUCHTEN; VAN DEN BROECK, 2002; BASKIC *et al.*, 2006). E o oposto ocorre durante as fases avançadas da apoptose e durante a necrose (OTSUKI *et al.*, 2003). Logo, a manutenção da integridade da membrana plasmática das células tratadas durante 4 horas, reforça o fato de que durante esse curto espaço de tempo, as células HL-60 apoptóticas (morfologicamente detectadas) encontravam-se nas fases iniciais do processo de morte celular. A evolução do processo, uma vez ativado, foi observada através do aumento do número de células HL-60 com danos nas suas membranas plasmáticas após um intervalo maior de exposição. A ausência de indícios de ativação da via necrótica (análise morfológica) ressalta a importância da apoptose como sendo a principal via de morte celular induzida pela *nor*- β -lapachona e por seus derivados arilaminos substituídos (**1**, **3** e **4**).

De fato, a análise do processo de tumorigênese revela que a capacidade de resistir à morte pode ser adquirida por diferentes mecanismos e acontecer em vários momentos do desenvolvimento tumoral (ZORNIG *et al.*, 2001). A apoptose, na prática clínica, constitui um alvo para um potencial uso terapêutico da morte celular programada ou para o entendimento dos mecanismos de resistência à radio e a quimioterapia (NICHOLSON, 2000; DEBATIN, 2004; GRIVICIVH *et al.*, 2007).

Durante as primeiras fases do processo apoptótico, a redistribuição de fosfolipídios na membrana plasmática resulta na exposição da fosfatidilserina (PS) na superfície externa da membrana celular (FADOK *et al.*, 1992; KOOPMAN *et al.*, 1994; MARTIN *et al.*, 1995). Para a detecção do PS, foi utilizada a anexina V, que é uma proteína com alta afinidade por PS, capaz de se ligar ao PS externalizado (KRYSKO *et al.*, 2008). Após a exposição (4 horas) a *nor*- β -lapachona e derivados (**1**, **3** e **4**), foi observado células HL-60 com PS externalizado conjugada com anexina V, que reforça a participação da apoptose sobre a morte celular.

Apesar dos mecanismos bioquímicos responsáveis pelas alterações na assimetria da bicamada lipídica serem pouco compreendidos, parece que algumas caspases exercem um papel relevante sobre esse processo, visto que inibidores dessas caspases bloqueiam a externalização do PS em vários sistemas biológicos. Alguns estudos têm sugerido que a proteólise da fodrina (um alvo específico das caspases e maior componente de membrana associado ao citoesqueleto) possa ser um dos sítios de ação aonde as alterações na assimetria da bicamada lipídica possam ser iniciadas (MARTIN *et al.*, 1995). Embora os mecanismos de exposição de PS independentes de caspases possam ocorrer (BASSE *et al.*, 1996; ZHOU *et al.*, 1997; FERRARO-PEYRET *et al.*, 2002).

Além disso, muitos estudos têm ressaltado a importância da participação mitocondrial durante o processo apoptótico (SMAILI *et al.*, 2003; GALLUZZI *et al.*, 2009). A redução do tamanho (condensação), aumento da densidade da matriz mitocondrial e a redistribuição das mitocôndrias nas células são algumas das principais alterações mitocondriais descritas durante a apoptose (DESAGHER; MARTINOU, 2000). O aumento da permeabilização da membrana mitocondrial (PMM) é considerado um ponto irreversível na cascata de eventos que levam a ativação da morte celular através da via intrínseca apoptótica (GAO *et al.*, 2006; HSU; YEN, 2007; KROEMER *et al.*, 2007). O aumento do PMM leva a um mau funcionamento mitocondrial, resultando em um colapso do potencial transmembrânico mitocondrial ($\Delta\psi_m$) e no extravasamento para o citosol de proteínas solúveis como, por exemplo, o citocromo *c* e o fator indutor de apoptose (VAN LOO *et al.*, 2002; GALLUZZI *et al.*, 2010). O PMM pode ser controlado através da atividade de uma família de proteínas chamadas ciclofilina que regula a abertura de poros na membrana mitocondrial e por membros da família de proteínas Bcl-2 (VAN LOO *et al.*, 2002). Estudos mostraram que a superexpressão de proteínas antiapoptóticas (Bcl-2 ou Bcl-x_L) em vários tipos celulares expostas a uma gama de agentes citotóxicos, preveniu o extravasamento de citocromo *c* da mitocôndria, a ativação de caspases e a morte celular (KLUCK *et al.*, 1997; YANG *et al.*, 1997; VANDER HEIDEN *et al.*, 1997).

Porém, em relação as outras proteínas liberadas do interior da mitocôndria, apenas o citocromo *c* parece ser essencial na ativação da apoptose (NEAME *et al.*, 1998; JUIN *et al.*, 1999; LI *et al.*, 2000). Contudo, em alguns casos, o extravasamento do citocromo *c* pode resultar na ativação da apoptose sem alteração do $\Delta\psi_m$ (via extrínseca) (KROHN *et al.*, 1999). Independente de qual via for ativada, tanto a via extrínseca quanto a via intrínseca (mitocondrial) irão ativar enzimas catabólicas [proteases (caspases, dentre outras), lipases e endonucleases] que irão executar o programa de morte celular (GALLUZZI *et al.*, 2007).

A *nor*- β -lapachona e seus derivados (**1**, **3** e **4**) induziram despolarização mitocondrial de células HL-60 após um curto período de exposição (4 horas) a esses compostos. Sendo o percentual de células com baixo $\Delta\psi_m$ aumentado com o prolongamento do tempo de tratamento (24 horas). A morte celular via apoptose é precedida pela clivagem da cromatina especificamente nas regiões de ligação entre os nucleossomos por endonucleases específicas resultando em uma extensiva fragmentação do DNA em subunidades oligonucleossômicas (NICOLETTI *et al.*, 1991). De acordo, o tratamento com a *nor*- β -lapachona e derivados (**1**, **3** e **4**) induziu a fragmentação internucleossomal de DNA após 4 e 24 horas de exposição. A fragmentação de DNA em células HL-60 corrobora com a ativação das caspases-3 e -7 induzidas pelos compostos após um curto período de tratamento (4 horas). A correlação entre a despolarização mitocondrial e a fragmentação de DNA indica que a redução do $\Delta\psi_m$ é um evento obrigatório e irreversível para a morte celular de HL-60 induzida pelos compostos *nor*- β -lapachônicos. Reforçando os achados do presente estudo, Chiang *et al.* (1999) reportou que a β -lapachona induziu fragmentação internucleossomal de DNA, externalização de PS (anexina V), liberação de citocromo *c* e ativação da caspase-3 em diversas linhagens tumorais humanas.

A fim de correlacionar o papel da mitocôndria sobre a ativação da via intrínseca da apoptose, as células HL-60 foram pré-tratadas com ciclosporina A (CsA) antes de serem expostas aos compostos *nor*- β -lapachônicos. O CsA se liga a ciclofilina (reguladora do PMM) impedindo que os poros das membranas mitocondriais se abram, prevenindo, dessa forma, o colapso do $\Delta\psi_m$ e o extravasamento do citocromo *c* (LEMASTERS, 1999; JIANG *et al.*, 2001; BRUSTOVETSKY *et al.*, 2002). Existem dois sistemas de controle de PMM. O mecanismo clássico é dependente de cálcio (Ca^{2+}) intracelular, de energia (ATP) e é acompanhado pelo aumento do tamanho mitocondrial e da redução do $\Delta\psi_m$ (Zoratti & Szabo, 1995), o qual pode ser bloqueado por CsA (Armstrong, 2006). Já o mecanismo não clássico de controle de PMM ocorre sem alterações do tamanho mitocondrial e sem redução do $\Delta\psi_m$ (Sultan & Sokolove, 2001).

Vale ressaltar que, o pré-tratamento com CsA resultou na completa abolição dos eventos associados a ativação da apoptose, indicando a participação do modelo clássico de regulação do controle de PMM, reforçando, ainda mais, a contribuição da via intrínseca sobre a ativação da apoptose. O tratamento com CsA preveniu a ativação das caspases-3 e -7, sugerindo que o bloqueio de PMM impediu o extravasamento de citocromo *c* e, conseqüentemente, preveniu a ativação da caspase-9 (caspase dependente de citocromo *c*) e do APAF-1. A caspase-9 é considerada a protease iniciadora da via apoptótica intrínseca e ela participa da cascata de ativação das caspases-3, -6 e -7 (STRASSER *et al.*, 2000). As caspases executoras (3 e 7) são, provavelmente, responsáveis pelas mudanças morfológicas observadas na apoptose, incluindo a fragmentação internucleossomal do DNA, a condensação da cromatina e a formação dos corpos apoptóticos (MARCELLI *et al.*, 1999; NICHOLSON, 1999).

Apesar disso, a mitocôndria não é a única organela envolvida na ativação do processo apoptótico induzido pela β -lapachona. Tagliarino *et al.* (2001) mostrou que o tratamento de células de carcinoma de mama (MCF-7) com β -lapachona induziu estresse no retículo endoplasmático (RE) promovendo a liberação de Ca^{2+} do RE para o citosol, sugerindo que o efluxo de Ca^{2+} é necessário como um fator de iniciação para a ativação da morte celular induzida pela β -lapachona. O pré-tratamento das células MCF-7 com BAPTA-AM (seqüestrador de Ca^{2+}) bloqueou o aumento citoplasmático de Ca^{2+} , evitando a citotoxicidade e condensação nuclear promovida pela β -lapachona (BENTLE *et al.*, 2006). A participação do RE nos processos de morte celular tem se tornado objeto de muitos estudos (WANG *et al.*, 2005; LI *et al.*, 2006c).

Em decorrência desses achados, houve o interesse em esclarecer os prováveis mecanismos envolvidos na citotoxicidade dos compostos. Alguns experimentos foram realizados no sentido de avaliar a interferência do tratamento sobre a progressão do ciclo celular, a produção intracelular de EROS e os efeitos dos compostos sobre a indução de danos ao DNA, bem como a interferência dos compostos sobre o reparo das lesões induzidas sobre o material genético e, por fim, sobre a atividade das enzimas topoisomerases.

Muitos agentes quimioterapêuticos exercem seus efeitos citotóxicos através da indução de apoptose pela ativação indireta de pontos de checagem (*checkpoints*) que controlam a progressão do ciclo celular. A ativação dos pontos de checagem para controlar os danos no DNA, por exemplo, consiste na detecção do dano, na transdução de informação e, finalmente, na execução de respostas aos danos ao DNA por proteínas efetoras (proteínas do

checkpoint). Nessa situação, a apoptose pode ser ativada quando os danos ao DNA são irreparáveis ou quando as condições são adversas para o crescimento celular.

Ao longo dos anos, os pontos de checagem do ciclo celular têm sido considerados importantes alvos na quimioterapia do câncer tanto pela indução de apoptose mediada pela ativação de pontos de checagem específicos ao longo do ciclo, quanto pela exploração da maior sensibilidade química celular devido a perda funcional dos pontos de checagem (FINGERT *et al.*, 1986; DAÍ; GRANT, 2004; WALTON *et al.*, 2010). Apesar de em células cancerosas, os pontos de checagem do ciclo celular serem defectivos ou suprimidos (ZHOU; ELLEDGE, 2000; RICH *et al.*, 2000), vários trabalhos tem correlacionado a ativação indireta dos pontos de checagem, induzidas pela β -lapachona, com a indução de apoptose. Diante do fato de que a β -lapachona induz apoptose via ativação indireta dos pontos de checagem em algumas linhagens tumorais, a associação da β -lapachona com o taxol (indutor de bloqueio na fase de transição G_2/M), por exemplo, aumentou o potencial antitumoral do tratamento de tumores de ovário e mama xenográficos em ratos (LI *et al.*, 1999) e potencializou a indução de apoptose em células de retinoblastoma humano (D'ANNEO *et al.*, 2010).

Huang e Pardee (1999) demonstraram que a β -lapachona na concentração de 0,5 μ M não interferiu na progressão do ciclo celular de células de carcinoma de cólon humano, mas em concentrações elevadas (2,5 a 5 μ M) houve acúmulo de células de cólon na fase S (SW480 e SW620) e G_2/M do ciclo celular (DLD1). Li *et al.* (1995) mostrou acúmulo de células de carcinoma de próstata humano PC-3 na fase G_1 após exposição a β -lapachona e que, também, o mesmo composto na concentração de 4 μ M interferiu sobre a progressão do ciclo celular de células tumorais de próstata (DU-145) devido a ativação indireta do ponto de checagem durante a fase de síntese de DNA (LI *et al.*, 2003), ou promoveu acúmulo de células na fase G_0/G_1 das linhagens PC-3, DU-14, LNCaP (próstata) e de células HL-60 em concentrações semelhantes (PLANCHON *et al.*, 1995). Experimentos com células não tumorais (CHO) mostraram que a β -lapachona induziu acúmulo de células na fase S do ciclo celular apenas em concentração muito superior (30 μ M) do que a necessária para exercer efeitos semelhantes sobre o ciclo celular de algumas linhagens tumorais (Vanni *et al.*, 1998). Por outro lado, Pink *et al.* (2000b) observou que a β -lapachona induziu apoptose em células de carcinoma de mama humano (MCF-7 e T47D) de modo ciclo-independente.

Na avaliação sobre o ciclo celular, foi possível identificar distúrbios sobre o ciclo celular das células HL-60 apenas após 24 horas de exposição. Após esse período, a *nor*- β -lapachona (4 μ M) promoveu um discreto acúmulo de células na fase S do ciclo celular, enquanto seus derivados (4 μ M) induziram redução da porcentagem de células na fase de

transição G₂/M (1 e 3) e G₀/G₁ (4), sugerindo o envolvimento de mecanismos citotóxicos ciclo-específicos.

É importante enfatizarmos que cada célula do corpo humano mantém uma condição de homeostase entre espécies químicas oxidantes e antioxidantes. Ambas espécies são importantes para o metabolismo normal, transdução de sinais e regulação das funções celulares (POLI *et al.*, 2004). O estresse oxidativo pode simplesmente ser definido com um distúrbio no balanço entre espécies oxidantes e antioxidantes que favorece o ambiente oxidativo (CHANDRA *et al.*, 2000). Danos celulares associados ao estresse oxidativo tem sido implicado em várias doenças como, por exemplo, Alzheimer e Parkinson (JENNER, 1994), arteriosclerose (VALKO *et al.*, 2007) e câncer (KASAI; KAZUAKI, 2006; TRACHOOTHAM *et al.*, 2009).

A relação entre câncer e estresse oxidativo tem sido extensamente estudada e sabe-se que células cancerosas estão submetidas a níveis mais altos de estresse oxidativo em relação às células não tumorais (POWIS; BAKER, 1997; PERVAIZ; CLEMENT, 2004), geralmente, devido as baixas concentrações de enzimas antioxidantes como a SOD, GPx, glutaciona redutase e catalase, assim como baixos níveis de vitaminas antioxidantes, como as vitaminas C e E (GUVEN *et al.*, 2000; SENTHIL *et al.*, 2004; BEEVI *et al.*, 2007). A persistente geração de EROS na célula tumoral é uma consequência inevitável da excessiva atividade mitocondrial cujo requerimento elevado de ATP correlaciona-se com a elevada atividade metabólica (PELICANO *et al.*, 2004). Porém, o elevado e persistente estresse oxidativo resultam em danos celulares que as levam a morte. Os danos celulares, mais importantes, associados à produção de EROS são os induzidos sobre o DNA (nuclear e mitocondrial), sobre as membranas mitocondriais que podem resultar na perda das reservas de ATP, sobre fosfolípidios de membrana (peroxidação lipídica) e inativação de proteínas (FARBER *et al.*, 1990; PELICANO *et al.*, 2004). Os danos celulares e a subsequente falta de processos celulares de reparo devido aos constantes danos oxidativos têm sido associados com a carcinogênese (BEHREND *et al.*, 2003; FEDERICO *et al.*, 2007).

O estresse oxidativo intrínseco as células tumorais é uma característica que pode ser explorada do ponto de vista terapêutico. Vários agentes antitumorais (ex: cisplatina, antraciclinas e bleomicina) exercem seus efeitos citotóxicos, através da produção de radicais livres, além de outros mecanismos complementares. A superprodução de EROS pode exaurir as defesas antioxidantes (enzimáticas ou não) e tornar a célula cancerosa mais susceptível a morte celular (KONG *et al.*, 2000). Devido a elevada produção de EROS pelas células tumorais, é razoável especular que quando comparado às células não cancerosas, as células

malignas são mais dependentes das enzimas antioxidantes e de outros sistemas de defesas antioxidantes adaptativas, causando mais danos mediados por EROS em células tumorais do que em células não tumorais (HILEMAN *et al.*, 2003; ZHOU *et al.*, 2003). Portanto, a inibição das defesas antioxidantes e a exposição excessiva de radicais livres podem ser consideradas uma abordagem terapêutica viável no tratamento do câncer.

Tem sido reportado que a geração intracelular de EROS induzida pela β -lapachona é dependente da atividade enzimática de NQO1 (BEY *et al.*, 2007). Como a enzima NQO1 preferencialmente reduz quinonas nas posições *orto* e *para* (DI CHENNA *et al.*, 2001), tanto a β -lapachona, *nor*- β -lapachona e seus derivados arilaminos (**1**, **3** e **4**) podem ser considerados substratos para esta enzima. Contudo, a exposição das células leucêmicas HL-60 (NQO1⁻) e de próstata DU-145 (NQO1⁺), aos compostos durante 4 horas, resultou na produção de EROS, em níveis significativos, em ambas linhagens tumorais. Porém, o bloqueio da enzima NQO1 pelo dicumarol preveniu a formação de radicais livres apenas na linhagem de próstata, mas não foi capaz de impedir a formação de EROS na linhagem leucêmica.

As células HL-60 (NQO1⁻) possuem níveis elevados de algumas enzimas da família P450 (KROVAT *et al.*, 2000; NAGAI *et al.*, 2002; KAWAI *et al.*, 2003), entretanto Dubin *et al.* (1990) demonstrou que a β -lapachona e outras naftoquinonas estruturalmente relacionadas foram capazes de inibir as reações catalisadas por alguns membros dessa família. Esses dados sugerem que a bioativação dos compostos β -lapachônicos possam ser induzidas por outras redutases além da NQO1 e de algumas enzimas citocromais da família P450.

As defesas antioxidantes enzimáticas são de crucial importância para a neutralização de EROS (LEONARD *et al.*, 2002; VOLKOVÁ *et al.*, 2005). Chau *et al.* (1998) reportou que a β -lapachona produziu EROS em níveis mais elevados em linhagens tumorais com baixas concentrações intracelulares de GSH, como em certas linhagens leucêmicas (HL-60, Molt-4 e U937) e, ao contrário, em linhagens com concentrações elevadas de GSH como as de mama (MCF-7), cólon (SW620) e de leucemia mielóide crônica (K562) foram detectados baixos níveis de EROS após exposição a β -lapachona durante um curto período de exposição (2 horas) em concentrações variando de 1 a 4 μ M. Ainda segundo o autor, as altas concentrações de GSH preveniram a ativação de apoptose, mostrando uma correlação entre a indução de apoptose e os níveis de GSH presentes no sistema.

Essas observações corroboram com os resultados do presente estudo obtidos na presença e na ausência de NAC ou de BH. O primeiro restaura as reservas intracelulares de GSH, enquanto o segundo exaure o GSH intracelular. Em culturas celulares (HL-60 e DU-145) pré-tratadas com NAC, não houve formação de EROS induzidos pelos compostos β -

lapachônicos, sugerindo que a GPx possa estar utilizando o GSH como substrato para as reações de neutralização das espécies químicas oxidantes. Esses resultados são condizentes com os encontrados por CHAU *et al.* (1998), o qual demonstrou que o NAC foi capaz de bloquear a produção de EROS na linhagem HL-60 tratadas com β -lapachona. Em contrapartida, o decréscimo dos conteúdos intracelulares de GSH, devido a exposição ao BH, potencializou a produção de espécies químicas reativas de oxigênio após o tratamento. Algumas naftoquinonas (menadiona e plumbagina, por exemplo) promovem redução das reservas intracelulares de GSH em eucariotos [(células tumorais e levedura (BY4741)] potencializando os efeitos deletérios de EROS (CASTRO *et al.*, 2008; AITHAL *et al.*, 2009).

Baseado nos fatos descritos acima e de que β -lapachona (4 μ M) altera a razão GSH/GSSG em células de carcinoma de mama (MDA-MB-468), promovendo um aumento de até 65% de GSSG após exposição (BENTLE *et al.*, 2006), pode-se supor que *nor*- β -lapachona e seus derivados arilaminos (**1**, **3** e **4**) influenciam nos conteúdos de GSH de modo a reduzir as concentrações dessa enzima, facilitando a superexposição de EROS no interior celular, e contribuindo, dessa forma, sobre a citotoxicidade exercida por esses compostos. A redução da quantidade de EROS gerada pelos compostos em células pré-tratadas com IK reflete a participação de H_2O_2 e OH^\bullet como sendo uma das principais espécies reativas de oxigênio produzidas pelo tratamento. Além de elevar os níveis intracelulares de GSH, o NAC também funciona como um antioxidante eficaz *in vivo* e *in vitro* reagindo e neutralizando o H_2O_2 e OH^\bullet (ARUOMA *et al.*, 1989). Dentre os radicais gerados, o OH^\bullet é o mais instável, porém é o mais reativo e, portanto, o mais lesivo (ASAD *et al.*, 2004).

Porém, a produção intracelular de EROS não é o único mecanismo responsável pela citotoxicidade induzida pela β -lapachona e seus derivados. Reinicke *et al.* (2005) demonstrou que a co-administração de NAC em culturas de células tumorais não interferiu sobre a citotoxicidade exercida pela β -lapachona, sugerindo que outros mecanismos possam estar envolvidos em seus efeitos antiproliferativos, além da produção de radicais livres.

Vários agentes antitumorais atuam induzindo, direta ou indiretamente, quebras nas fitas da molécula de DNA por diversos mecanismos de atuação (ZHU *et al.*, 2009). Sabe-se que radicais livres possuem a capacidade de interagir com o DNA, induzindo quebras nas fitas do material genético (HALLIWELL; ARUOMA, 1991; TAN *et al.*, 1999; SALMON *et al.*, 2004; ROWE *et al.*, 2008). E, associado ao fato de que as membranas celulares por serem, freqüentemente, permeáveis as naftoquinonas, facilita, dessa forma, o surgimento de adutos no DNA, e, conseqüentemente, a formação de sítios abásicos e de lesões na molécula do

material genético (ZANGH *et al.*, 1994; LIN *et al.*, 2005), a genotoxicidade dos compostos em estudo foi avaliada.

Tanto a β -lapachona quanto a *nor*- β -lapachona e seus derivados (**1**, **3** e **4**) aumentaram o padrão de migração do DNA após a eletroforese (ensaio do cometa), indicando a ocorrência de lesões sobre a molécula de DNA. De modo pertinente, pareceu haver uma maior indução de quebras no DNA das células de próstata DU-145 (NQO1⁺) em relação a linhagem leucêmica HL-60 (NQO1⁻), sugerindo, talvez, uma maior contribuição da enzima NQO1 sobre as lesões ao DNA induzidas pelos compostos β -lapachônicos mediada via produção de radicais livres. Os resultados de indução de quebras de fitas do DNA promovido pela β -lapachona e *nor*- β -lapachona, aqui reportados, corroboram com os demonstrados por Bentle *et al.* (2006) em células de carcinoma de mama MCF-7 e Arêas (2007) em células leucêmicas K562.

O ensaio do cometa, em sua versão alcalina, é capaz de detectar tanto quebras de fitas simples quanto de dupla fita (CAVALCANTI *et al.*, 2006). As quebras de dupla fita da molécula de DNA são lesões difíceis de serem reparadas, podendo culminar na morte celular ou em mutações deletérias, além disso, as quebras de fitas simples podem ser convertidas em quebras duplas durante o progresso da forquilha de replicação (KHANNA; JACKSON, 2001; KUZMINOV, 2001). Devido a importância das quebras de dupla fita sobre a citotoxicidade, conduzimos a análise do ensaio do cometa em sua versão neutra de modo a detectar esses tipo de lesão. Após o ensaio, lesões de dupla fita foram observadas, principalmente, na linhagem de próstata DU-145.

Devido a maior prevalência de lesões no DNA de células de carcinoma de próstata, utilizamos o dicumarol (bloqueador de NQO1) para tentar correlacionar os danos ao DNA através das EROS produzidas mediante redução di-eletrônica dos compostos β -lapachônicos. Logo, o bloqueio enzimático induzido pelo dicumarol foi capaz, como discutido acima, de abolir a formação de EROS e, conseqüentemente, prevenir o material genético das células DU-145 contra as lesões ao DNA. O mesmo não pôde ser observado para células HL-60, reforçando a idéia de que esses compostos possam estar sendo reduzidos via participação de outras redutases que não a NQO1. Esses resultados corroboram com os achados de Bey *et al.* (2007) que demonstrou que as EROS geradas após exposição a β -lapachona, em células de câncer de pulmão que superexpressam NQO1 (A549), promoveram quebras de fitas de DNA e que o bloqueio de NQO1 mediante co-tratamento com dicumarol aboliu a produção de radicais livres bem como evitou a formação das quebras de fitas da molécula de DNA.

Como esperado, a modulação das reservas intracelulares de GSH influenciou o nível dos danos ao DNA das células tumorais (HL-60 e DU-145) tratadas com os compostos β -lapachônicos. O pré-tratamento com NAC não favoreceu a formação de quebras de fitas no DNA, enquanto a exposição prévia ao BH facilitou a indução das lesões ao DNA induzidas pelos compostos estudados, reforçando a participação das EROS como agente indutor de quebras das cadeias da molécula de DNA, bem como a importância do GSH como agente antioxidante enzimático ao prevenir lesões ao DNA mediada por EROS.

Recentemente, Oliveira-Brett *et al.* (2002) e Da Silva Júnior *et al.* (2009) demonstraram, por meio de ensaios eletroquímicos (voltametria cíclica), que a β -lapachona e a *nor*- β -lapachona não interagem diretamente com o DNA, reforçando a idéia de que essas duas naftoquinonas induzem danos secundários ao DNA (ex: via produção de EROS ou inativação enzimática) e não por meio de ação direta sobre a molécula do material genético (ex: intercalação ou alquilação). O mesmo não ocorre com os derivados **1** e **3**, cujos dados experimentais de eletroquímica (ainda não publicados), conduzidos pelo grupo de pesquisa da professora Dr^a. Marília O. F. Goulart (UFAL) revelaram que esses dois derivados interagem diretamente com a molécula de DNA, porém a natureza do tipo de interação está sendo averiguada pelo referido grupo. Ainda segundo os dados de eletroquímica para os derivados **1** e **3**, foi observado que o composto **1** não forma diânion radical (mais reativo que a semiquinona), ao contrário do derivado **3**, cujo diânion radical foi gerado. Essas observações levantam a hipótese de que o composto **3** seria mais reativo (maior produção de EROS) em relação ao **1**, mas estudos de quantificação temporal de EROS precisam ser conduzidos de modo a confirmar a hipótese. No presente estudo, em relação aos parâmetros analisados, não foi possível observar uma relação direta entre os substituintes inseridos no anel arilamino e a atividade citotóxica.

As respostas aos agentes antitumorais indutores de danos as moléculas de DNA dependerão de como as células cancerosas irão responder as lesões induzidas, o que pode envolver a parada da progressão do ciclo celular devido a ativação, direta ou indireta, dos pontos de checagem (*checkpoints*) e a ativação da maquinaria celular para reparar as lesões (ASAD *et al.*, 2004; GARBER *et al.*, 2005; HOUTGRAAF *et al.*, 2006). As células não tumorais são proficientes no reparo das lesões induzidas por vários agentes antineoplásicos devido a ativação de mecanismos de reparo apropriados. Porém, em alguns casos, as células malignas têm a capacidade de reconhecer e ativar as vias dos processos de reparo das lesões ao DNA, o que pode contribuir ao aumento da resistência terapêutica a esses quimioterápicos (LEHNE *et al.*, 1998).

Os processos moleculares que envolvem ativação das vias de reparo e o aumento da resistência aos quimioterápicos são muito complexos. Por exemplo, algumas células tumorais deficientes em mecanismos específicos de reparo podem conferir resistência para alguns quimioterápicos (cisplatina e inibidores de topoisomerase II), mas por outro lado, essas células mantêm a sensibilidade ao tratamento a agentes indutores de ligações cruzadas (ligações covalentes entre as cadeias de DNA ou entre proteínas nucleares e DNA) como a mitomicina C e agentes inibidores de topoisomerase I (BIGNAMI *et al.*, 2003).

Portanto, agentes farmacológicos que possam manipular os sistemas de reparo das células tumorais possuem uma grande importância na terapêutica, pois podem potencializar os efeitos citotóxicos das drogas antitumorais (ZHOU; BARTEK, 2004; LONGLEY; JOHNSTON, 2005). Por exemplo, as quebras de dupla fita induzidas pela β -lapachona ativam vias de reparo que tendem corrigir os danos, mas o bloqueio genético ou químico dessas vias aumentou a citotoxicidade dessa naftoquinona sobre linhagens de glioblastomas (BENTLE *et al.*, 2007).

Considerando o fato dos compostos β -lapachônicos, aqui estudados, induzirem quebras de fitas simples e dupla, preferencialmente, em células de carcinoma de próstata DU-145, essa linhagem foi eleita como modelo para avaliar a cinética de reparo das lesões ao DNA induzidas pelos compostos estudados. Os mecanismos de reparo das lesões ao DNA induzidas por EROS ou por radiação ionizante, por exemplo, são ativados rapidamente após o reconhecimento das lesões (FRANKENBERG-SCHWAGER, 1989; JIANG *et al.*, 1999; RZESZOWSKA-WOLNY *et al.*, 2005).

A cinética de reparo das lesões ao DNA induzidas após 4 horas de exposição aos compostos β -lapachônicos em células DU-145, foi estudada utilizando-se o ensaio do cometa, em sua versão alcalina, por ser considerado um método adequado para essa finalidade (COLLINS, 2004). Após a exposição, alíquotas de células DU-145 tratadas foram coletadas em diferentes tempos (2, 4 e 24 horas), na ausência dos compostos, para observar a regressão dos valores de ID após a eletroforese. Somente após 4 horas, para culturas tratadas com β -lapachona, *nor*- β -lapachona e o derivado **4**, foi detectado uma redução, significativa, nos valores de ID, indicando um reparo parcial das lesões geradas. Já para os derivados **1** e **3**, reduções significativas do padrão de migração do DNA foi observada após 2 horas. Apesar do reparo das lesões induzidas pelos derivados **1** e **3** terem sido iniciadas precocemente, em relação a β -lapachona, *nor*- β -lapachona e o derivado **4**, o resultado parcial (%) das lesões reparadas foram semelhantes para todos os compostos avaliados, após 24 horas.

Os dados citados acima sugerem que, de alguma maneira, os compostos β -lapachônicos estudados possam estar interferindo nos mecanismos de reparo das lesões induzidas por eles. Logo, foi realizado um ensaio objetivando-se detectar a síntese de DNA envolvida nos processos de reparo dessas lesões. Para isso, após a exposição das células DU-145 aos compostos, foi adicionada a cada cultura uma solução de hidroxauréia por 30 minutos. A hidroxauréia inibe a síntese replicativa de DNA, associada a proliferação celular, mas não afeta a síntese de DNA envolvida nos processos de reparo das lesões do DNA (COLLINS; OATES, 1987; HAMMOND *et al.*, 2003). A síntese de DNA não-programada (*Unscheduled DNA Synthesis*) que está associada ao reparo por excisão dos segmentos de DNA danificados, foi detectada pela adição de uma solução de BrdU. Portanto, 4 horas depois da adição do BrdU, toda célula com BrdU incorporado em seu DNA foi considerada como sintetizante de DNA não-programado (reparo). Os resultados mostraram detecção de síntese não-programada de DNA para todos os compostos β -lapachônicos avaliados, o que corrobora com os dados supracitados referentes a cinética de reparo, parcial, das lesões induzidas por esses compostos. Os dados encontrados reforçam os achados por Boorstein e Pardee (1984) que demonstraram que β -lapachona inibe mecanismos específicos de reparo das lesões ao DNA promovidas por essa naftoquinona, sem, contudo, bloquear a síntese de DNA não-programada.

Schuerch e Wehrli (1978) mostraram que a β -lapachona foi capaz de inibir a enzima DNA polimerase- α eucariótica, envolvida no início da síntese replicativa de DNA, mas não alterou a atividade da DNA polimerase- β , a qual está relacionada com mecanismos de reparo do DNA (SCHMIDT *et al.*, 1982; PAVLOV; SHCHERBAKOVA *et al.*, 2010). Por outro lado, Boothman *et al.* (1987, 1989a) reportou que a β -lapachona aumentou a letalidade de células de carcinoma epidermoide de laringe (HEp-2) após exposição a radiação ionizante (raios-X), ao inibir os componentes rápidos (enzimas) dos mecanismos envolvidos no reparo de lesões induzidas por raios-X, durante ou imediatamente após a exposição a radiação, e que também, a β -lapachona potencializou os efeitos citotóxicos do agente antineoplásico neocarzinostatina (indutor de danos no DNA) em células de melanoma resistentes a radioterapia (U1-Mel) via inibição das enzimas envolvidas no reparo das lesões induzidas pela neocarzinostatina. Adicionalmente, Boothman e Pardee (1989b) demonstraram que a β -lapachona diminuiu a taxa de re-ligamento das quebras de fitas de DNA e aumentou os níveis de quebras de dupla fita em células irradiadas devido a conversão de quebras simples em quebras dupla (BOOTHMAN *et al.*, 1989a). Já Bentle *et al.* (2006), em experimentos com células MCF-7, mostrou que a supressão dos mecanismos de reparo das lesões ao DNA induzidas pela β -lapachona ($\geq 5 \mu\text{M}$) estão associados as depleções dos níveis intracelulares

tanto de NAD^+ quanto de ATP, mostrando, dessa forma, também, que dentre os vários fatores envolvidos na citotoxicidade induzida pela β -lapachona, as perdas intracelulares de NAD^+ e ATP são eventos cruciais durante a morte celular induzida por essa naftoquinona.

Devido as várias evidências de que a β -lapachona inativa, de alguma forma, o reparo das lesões ao DNA e associado ao fato de que os danos no DNA de células DU-145 expostas a β -lapachona, *nor*- β -lapachona e seus derivados arilaminos (**1**, **3** e **4**) foram parcialmente corrigidos após um extenso intervalo de tempo (24 horas), ensaios foram conduzidos para avaliar uma possível influência dos compostos β -lapachônicos sobre a funcionalidade dos mecanismos de reparo do DNA. Para isso, células DU-145 foram pré-tratadas com MMS antes da exposição aos compostos estudados.

O MMS é um agente alquilante mono-funcional que alquila diretamente os átomos de nitrogênio e de oxigênio das bases do DNA (KIM; LEBRETON, 1994) induzindo lesões (quebras simples e dupla) no material genético (BRUNBORG *et al.*, 1995; SCHWARTZ; KMIEC, 2005). O reparo das bases nitrogenadas alquiladas pelo MMS ocorre principalmente via reparo por excisão de bases (*BER*) e, em menor extensão, via reparo por excisão de nucleotídeos (*NER*). Outras vias podem, também, serem ativadas devido a presença de quebras de dupla fita induzidas pelo MMS, como, por exemplo, o reparo através da ligação das extremidades não-homólogas (*NHEJ*) sujeito a erros e/ou através da recombinação homóloga (*HR*) livre de erros (SCHWARTZ; KMIEC, 2005). A ativação de ambas vias de reparo contribuem para a geração de cometas através da formação de intermediários resultantes dos processos de correções das lesões de DNA. A via *BER*, por exemplo, remove as bases alquiladas mediante glicosilases específicas, levando a formação de sítios apurínicos (AP). Subseqüentemente, os sítios AP são removidos por endonucleases específicas e o espaço antes ocupado pelas bases nitrogenadas, será preenchido com novo DNA sintetizado pelas DNA polimerases. Por fim, as extremidades das fitas de DNA recém sintetizadas serão re-ligadas a fita parental via DNA ligases (SANCAR *et al.*, 2004).

Segundo Viau *et al.* (2009), o aumento observado nos níveis de danos ao DNA após exposição ao MMS, pelo ensaio do cometa, reflete a excisão dos nucleotídeos danificados, enquanto a redução da migração do DNA está associada ao processo de re-ligamento das fitas de DNA recém sintetizadas. Boorstein e Pardee (1984) relataram que a β -lapachona aumenta a letalidade do MMS, em culturas de fibroblastos humanos, devido a inibição irreversível do processo de re-ligamento do DNA recém sintetizado à fita de DNA parental.

No presente estudo, a concentração utilizada para os compostos β -lapachônicos de 0,5 μM foi escolhida, pois, tal concentração não induziu danos ao DNA das células DU-145. Mas

foi capaz de inibir o processo de reparo dos danos ao DNA induzidos pelo MMS durante o período de pós-tratamento (24 horas). A persistência dos danos ao DNA nas células tratadas com MMS e pós-tratadas com os compostos pode indicar que a presença dos compostos β -lapachônicos possa estar inibindo os processos de polimerização ou de re-ligação do DNA mediada pelas vias de reparo aos danos induzidos pelo MMS. A síntese de DNA não-programada foi observada para culturas tratadas com MMS durante o período de re-incubação na ausência da droga, mostrando que as vias de reparo envolvidas nas correções das lesões induzidas pelo MMS estão ativas. Porém, essas mesmas células pós-tratadas com β -lapachona, *nor*- β -lapachona e seus derivados arilaminos (**1**, **3** e **4**) reduziram, significativamente, a capacidade celular de sintetizar DNA não-programado, sugerindo uma possível interferência nos mecanismos de reparo.

Portanto, danos ao DNA podem ser induzidos por agentes que promovam direta ou indiretamente lesões na molécula do material genético através de modificações nas estruturas dos nucleotídeos, inibição da síntese de DNA pelo bloqueio de enzimas alvo ou de complexos DNA-proteínas que são necessárias para uma replicação adequada do DNA. Como, por exemplo, antineoplásicos como o 5-fluoracil, citarabina, gemcitabina, metotrexato e fludarabina, tem seus mecanismos de ação baseados na habilidade desses compostos de bloquear o metabolismo normal dos nucleotídeos e, conseqüentemente, promovem lesões no DNA como quebras de dupla fita na molécula do material genético, por exemplo (KINSELLA; SMITH, 1998).

No entanto, outro mecanismo importante que interfere sobre os processos normais de replicação e transcrição gênica é utilizado por inibidores de enzimas topoisomerases, que atuam por meio da estabilização do complexo topoisomerae-DNA ou através da inibição catalítica da enzima. As topoisomerases são enzimas celulares essenciais para a manutenção da estrutura do DNA. Atuando sobre o relaxamento do estresse gerado pela torção do DNA durante a transcrição, replicação e divisão celular (mitose/meiose). Essas enzimas atuam por meio da introdução de quebras transientes das fitas do DNA e re-ligamento seqüencial de uma fita (topoisomerase I) ou das duas fitas do DNA (topoisomerase II) (GODARD *et al.*, 2002; SOE *et al.*, 2006). Drogas antitumorais que inibem a topoisomerase I (ex: toptotecano e irinotecano) ou topoisomerase II (ex: doxorubicina, mitoxantrona, etoposídeo e irinotecano) bloqueiam os processos de re-ligação das fitas de DNA, clivadas pelas topoisomerases, tornando as quebras das cadeias do DNA (simples ou dupla) em lesões persistentes (ZHU *et al.*, 2009).

As leveduras *Saccharomyces cerevisiae* tem sido consideradas como um modelo de eucarioto para se investigar os papéis enzimológicos e fisiológicos das topoisomerases, bem como nos estudos de mecanismos de ação de drogas que interferem na atividade ou que inibem a ação das topoisomerases. Assim como nas células humanas, *S. cerevisiae* contém duas isoformas da topoisomerase I, que são a topoisomerase I (equivalente a isoforma I α humana) e a topoisomerase III (equivalente a isoforma I β humana), codificadas pelos genes *TOP1* e *TOP3*, respectivamente (REID *et al.*, 1998). O gene que codifica a topoisomerase II (*TOP2*) é essencial para a sobrevivência de *S. cerevisiae* e guarda homologia e funcionalidade com as topoisomerases II expressas por outros eucariotos (WYCKOFF; HSIEH, 1988; WASSERMAN *et al.*, 1993). Logo, a disrupção do gene *TOP2* na linhagem diplóide da levedura cria uma mutação recessiva letal (GOTO; WANG, 1984). Ao contrário da topoisomerase II, a isoforma I dessa enzima não é essencial para a sobrevivência de *S. cerevisiae* e a deficiência de *TOP1* pode ser compensada pela topoisomerase II (HSIUNG *et al.*, 1996).

Vários trabalhos têm reportado que os efeitos antiproliferativos atribuídos a β -lapachona sobre células tumorais estão relacionados à inibição da atividade das enzimas topoisomerases I e II (LI *et al.*, 1993a; DEGRASSI *et al.*, 1993; FRYDMAN *et al.*, 1997; HUEBER *et al.*, 1998; KRISHNAN; BASTOW, 2000). Logo, para avaliar os efeitos dos compostos β -lapachônicos, do presente estudo, sobre a atividade das enzimas topoisomerases, cepas mutantes de *S. cerevisiae* que não expressão topoisomerase I (*Top1 Δ*) e topoisomerase III (*Top3 Δ*) foram utilizadas. E devido ao fato da topoisomerase II ser essencial para a sobrevivência da levedura, o grupo de pesquisa dos professores Dr. João Antônio Pêgas Henriques e Dr^a Jenifer Saffi, da UFRGS, desenvolveu uma cepa duplo mutante (*top1 Δ top3 Δ*) para que fosse possível correlacionar a interferência dos compostos β -lapachônicos sobre a atividade da topoisomerase II.

Os resultados do presente estudo revelaram que todos os compostos interferiram sobre a taxa de crescimento da cepa selvagem (BY4741) que expressa todas as isoformas de topoisomerases. Contudo, a interferência sobre a taxa de crescimento foi mais acentuada nas cepas mutantes (*top1 Δ* , *top3 Δ* e *top1 Δ top3 Δ*), mostrando que a β -lapachona, *nor*- β -lapachona e seus derivados arilaminos substituídos (**1**, **3** e **4**) de alguma forma, interferem sobre a atividade dessas enzimas. Frydman *et al.* (1997) reportou que a β -lapachona inibe a função catalítica da topoisomerase I via interação direta com a enzima e induz alterações conformacionais sobre a topoisomerase II que dificulta a formação do complexo de clivagem enzima-DNA.

O principal elemento funcional da molécula de GSH são os resíduos cisteinil que fornece o reativo grupo tiol, permitindo que ele participe das reações do tipo redox, de adição e de deslocamento nucleofílico (MEISTER; TATE, 1976; GILBERT, 1982; HINCHMAN; BALLATORI, 1994). O GSH é a principal fonte não protéica intracelular de grupos tiol e é necessária para manter um ambiente redutor celular que é essencial para a manutenção da atividade ótima da maioria das enzimas e macromoléculas celulares. O equilíbrio óxido-redutivo do par tiol/dissulfeto pode regular algumas vias metabólicas celulares via ativação ou inativação de enzimas-chaves. Considerando que muitas proteínas são ativas quando o grupo sulfidrílico encontra-se sob a forma tiol, outras requerem que o grupo sulfidrílico esteja em sua forma oxidada (dissulfeto). Sem o processo para reduzir proteínas-dissulfeto, por exemplo, resíduos cisteinil de enzimas essenciais poderão permanecer oxidados, resultando em mudanças na atividade catalítica (HAMMOND *et al.*, 2001). Essas observações são relevantes visto que a β -lapachona é capaz de reduzir os níveis de GSH, o que favorece a existência de um ambiente oxidativo intracelular, contribuindo para a inativação ou alteração da atividade catalítica de enzimas importantes.

Adicionalmente, a topoisomerase II possui quinze resíduos essenciais de cisteína que são susceptíveis a oxidação (OLNEY *et al.*, 1990; NEDER *et al.*, 1998) ou a outras reações com quinonas (ex: β -lapachona), podendo levar formação de adutos instáveis, o que poderia interferir sobre formação do complexo de clivagem enzima-DNA (OLIVEIRA-BRETT *et al.*, 2002). Dessa maneira vem sendo sugerido, também, que a ação da β -lapachona e de outras naftoquinonas sobre a topoisomerase II, em parte, resulta da alquilação dos grupos tiol expostos no complexo de clivagem enzima-DNA (NEDER *et al.*, 1998).

O balanço entre os efeitos terapêuticos e toxicológicos de um composto químico é um parâmetro importante quando se quer verificar a aplicabilidade farmacológica do composto. Muitas drogas citotóxicas não tendem a serem seletivas em suas ações, agindo e danificando as células de tecidos saudáveis (ANAZETTI *et al.*, 2003). A avaliação dos efeitos genotóxicos e mutagênicos de drogas antitumorais são de suma importância devido a possibilidade delas induzirem tumores secundários em pacientes portadores de neoplasias (Cavalcanti *et al.*, 2008). No geral, os ensaios de indução de aberrações cromossômicas, de micronúcleos e o teste do cometa são considerados marcadores essenciais nos estudos de genotoxicidade e mutagenicidade *in vitro* (GIANNOTTI *et al.*, 2002; NORPPA, 2004).

Os ensaios de mutagênese empregando células de mamífero em cultura datam de 1968 e as primeiras linhagens celulares utilizadas, para essa finalidade, foram os fibroblastos de pulmão de hamster chinês (linhagem V79) e a linhagem CHO derivada de células de ovário

de hamster chinês (BRADLEY *et al.*, 1981). A linhagem tem sido amplamente empregada em estudos sobre estresse oxidativo (KIM *et al.*, 2007), mecanismos de morte celular (GROSICKA *et al.*, 2005) e mutagênese (CAMPA *et al.*, 2004; JAGETIA *et al.*, 2007).

O potencial antiproliferativo da β -lapachona, *nor*- β -lapachona e seus derivados (**1**, **3** e **4**) sobre a linhagem V79 foi avaliado após 24 horas de exposição pelo ensaio colorimétrico do MTT. Comparados aos experimentos conduzidos com CMSP, durante o mesmo período de incubação, observou-se que os fibroblastos foram mais sensíveis ao tratamento (**3** e **4**). A maior sensibilidade de células V79 parece estar relacionada ao tempo de geração dessas células ser mais curto (~12 horas) (BRADLEY *et al.*, 1981). No caso de CMSP, composta principalmente por leucócitos, a atividade mitogênica da fitohemaglutinina irá estimular principalmente as células-T (55 a 75% dos linfócitos presentes em CMSP) e a maioria das mitoses observadas após 48 horas de cultura, representam células que passaram por apenas um ciclo de divisão celular, enquanto após 72 horas de cultura, a maioria já tem completado seu segundo ciclo de divisão (BROWN; LAWCE, 1991). Portanto, células com alta taxa de proliferação são mais sensíveis aos efeitos citotóxicos, como, por exemplo, as drogas antitumorais (DE ALMEIDA *et al.*, 2005), devido ao fato do DNA de células em intensa atividade replicativa, ser mais susceptível as possíveis interações ou agressões induzidas por agentes químicos.

Os elementos básicos estruturais e os mecanismos de reparo do DNA de células V79 são similares, mas não idênticos, aos de células humanas (CMSP). Portanto, as conseqüências das interações químicas de xenobióticos com o DNA de células humanas e de fibroblastos de hamster chinês, são similares. Logo, os resultados obtidos com a linhagem V79 são extremamente relevantes para seres humanos, sendo inclusive mais importantes que a extrapolação dos dados obtidos em organismos procarióticos (BRADLEY *et al.*, 1981).

A análise do DNA de células V79 tratadas durante um intervalo relativamente curto de tempo (4 horas) com os compostos β -lapachônicos, revelaram um aumento nos níveis de quebras de fitas (simples e dupla) da molécula de DNA, apenas na maior concentração testada (10 μ M). Esses resultados colocam em evidência a importância dos danos ao DNA promovidos pelos compostos estudados, sobre a citotoxicidade na linhagem V79. Os efeitos genotóxicos e citotóxicos induzidos pelos compostos só foram observados em concentrações elevadas, o que reforça a seletividade de ação dessas moléculas sobre as células tumorais. O que vem a enfatizar a observação de Hueber *et al.* (1998) que demonstrou que a β -lapachona induziu quebras de fitas do DNA em células epiteliais de pigmento da retina nas mesmas condições (tempo de exposição e concentração) utilizadas no presente estudo.

E com o objetivo final de correlacionar parte dos danos induzidos ao DNA com a produção de EROS, detectamos a presença de bases nitrogenadas oxidadas após exposição aos compostos β -lapachônicos, através do teste do cometa com o auxílio de enzimas (Fpg e ENDO III) que reconhecem essas bases e as convertem em quebras de fita simples.

Dentre as bases constituintes dos ácidos nucleicos, a guanina, por exibir o menor potencial de ionização, é o principal alvo de agentes oxidantes de um elétron (CADET *et al.*, 2003), como, por exemplo, os radicais OH^\bullet (BERRA *et al.*, 2006). A guanina oxidada tem grande importância biológica por representar uma alteração estrutural de elevado potencial mutagênico, uma vez que essa base oxidada pode causar emparelhamento errôneo com a adenina, gerando uma transversão de guanina/citosina para timina/adenina (BOITEUX *et al.*, 1990; KROKAN *et al.*, 1997). A enzima Fpg é específica na detecção de purinas oxidadas como a 8-oxo-7,8-dihidroguanina (8-oxoG) e bases purínicas com o anel aberto. Enquanto a enzima ENDO III reconhece, principalmente, pirimidinas oxidadas, incluindo a timina, uracil e citosina glicol, que são produtos de consecutivas reações com o radical OH^\bullet (ONUKE *et al.*, 2002). Adicionalmente, alguns produtos das reações secundárias de oxidação da 8-oxoG, o principal produto da oxidação do DNA, são excisados pela Fpg (ácido oxalúrico, oxazoleno e hidantoínas) e ENDO III (ácido oxalúrico e oxazoleno) (KIM *et al.*, 2001).

No presente estudo, o peróxido de hidrogênio foi utilizado como controle positivo por ser um mutágeno clássico capaz de produzir radical OH^\bullet e, conseqüentemente, modificar bases e causar quebras na fita de DNA (SLUPPHAUG *et al.*, 2003). O pós-tratamento das células V79 com as enzimas induziram um aumento nos sítios do DNA sensíveis a Fpg e ENDO III, o que resultou na elevação da quantidade de DNA migrado após a eletroforese (ensaio do cometa). O aumento dos valores de ID dos experimentos conduzidos na presença das enzimas em relação aos testes realizados na ausência delas indica a presença de bases (purínicas e pirimidínicas) oxidadas no DNA, devido a conversão dessas bases em quebras de fita simples.

Os resultados do teste de indução de células micronucleadas, revelaram que as lesões geradas pelos compostos β -lapachônicos (10 μM) em células V79 não são eficientemente reparadas e fixam-se no genoma na forma de quebras cromossômicas, originando os micronúcleos observados. Os danos ao DNA (quebras de fitas e indução de micronúcleos) são características importantes do mecanismo de ação dos compostos, visto que, nas culturas tratadas com a maior concentração, houve uma forte redução da frequência de células binucleadas. A mensuração da taxa de células binucleadas no ensaio do micronúcleo é considerada um excelente parâmetro para se detectar citotoxicidade ou interferência sobre a

progressão do ciclo celular (SURRALLÉS *et al.*, 1995). O presente resultado corrobora com os estudos conduzidos por Degrassi *et al.* (1993) que demonstrou que a β -lapachona induziu aberrações cromossômicas e trocas de cromátides irmãs em células de hamster chinês.

Considerando-se o envolvimento do estresse oxidativo na mutagênese e carcinogênese (NAKABEPPU *et al.*, 2006), decidiu-se avaliar a repercussão do efeito protetor do NAC na proteção contra os efeitos mutagênicos (micronúcleos) induzida pelos compostos estudados. O pré-tratamento das células com NAC impediu a formação de células micronucleadas e não interferiu sobre a taxa de células binucleadas, reforçando, desse modo, a importância de EROS sobre os efeitos mutagênicos promovidos pelos compostos.

Conclusão

6 CONCLUSÃO

A *nor*- β -lapachona e seus derivados arilaminos substituídos [2,2-dimetil-3-(4-nitro-arilamino)-2,3-diidro-nafto[1,2-b]furan-4,5-diona (**1**), 2,2-dimetil-3-(2-nitro-arilamino)-2,3-diidro-nafto[1,2-b]furan-4,5-diona (**3**) e 2,2-dimetil-3-(2-metil-4-nitro-arilamino)-2,3-diidro-nafto[1,2-b]furan-4,5-diona (**4**)] exerceram elevado e seletivo potencial citotóxico frente as células tumorais humanas. Porém, a inserção dos substituintes no anel arilamino dos derivados (**1**, **3** e **4**) não resultou no aumento da citotoxicidade sobre as células tumorais em relação a *nor*- β -lapachona. Em contrapartida, as diferenças estruturais entre o precursor e seus derivados, influenciam sobre os mecanismos de ação, visto que a *nor*- β -lapachona não interage diretamente com o DNA, ao contrário dos derivados (**1** e **3**) que interagem de forma direta com a molécula do material genético. Os mecanismos associados a citotoxicidade induzida por todos os compostos estudados estão relacionados com a produção intracelular de EROS, indução de quebras de fitas de DNA, interferência sobre os mecanismos de reparo das lesões no DNA e sobre a atividade de topoisomerasas I e II. A *nor*- β -lapachona e seus derivados (**1**, **3** e **4**) tem baixo potencial genotóxico e mutagênico em células V79.

Referências

REFERÊNCIAS

- AGGARWAL, B.B.; SHISHODIA, S. Molecular targets of dietary agents for prevention and therapy of cancer. **Biochem. Pharmacol.**, v. 71, p. 1397 – 1421, 2006.
- AHMED, S.A.; GOGAL, R.M.; WALSH, J. E. A new rapid and simple non-radioactive assay to monitor and determine the proliferation of lymphocytes: an alternative to [3H] thymidine incorporation assay. **J. Immunol. Methods**, v. 170, p. 211-224, 1994.
- AITHAL, B. K.; KUMAR, S.; RAO, B. N.; UDUPA, N.; RAO, B. S. S. Juglone, a naphthoquinone from walnut, exerts cytotoxic and genotoxic effects against cultured melanoma tumor cells. **Cell Biol. Int.**, v. 33, p. 1039-1049, 2009.
- ALLEY, M. C. Feasibility of drugs screening with panel of human tumor cells lines using microculture tetrazolium assay. **Cancer Res.**, v. 48, p. 589-601, 1998.
- ANAZETTI, M. C.; MELO, P. S.; DURAN, N.; HAUN, M. Comparative cytotoxicity of dimethylamide-crotonin in the promyelocytic leukemia cell line (HL-60) and human peripheral blood mononuclear cells. **Toxicology**, v. 188, p. 261-274, 2003.
- ARAÚJO, E. L.; ALENCAR, J. R. B.; ROLIM NETO, P. J. Lapachol: segurança e eficácia na terapêutica. **Rev. Bras. Farmacogn.**, v. 12, supl. 1, p. 57-59, 2002.
- ARÊAS, P.C.F. **Avaliação da atividade antitumoral de naftoquinonas**. Dissertação (Mestrado) - Universidade Federal Fluminense, 2007.
- ARMSTRONG, J. S. The role of the mitochondrial permeability transition in cell death. **Mitochondrion**, v. 6, p. 225-234, 2006.
- ARUOMA, O.I.; HALLIWELL, B.; HOEY, B.M.; BUTLER, J. The antioxidant action of N-acetylcysteine: Its reaction with hydrogen peroxide hydroxyl radical, superoxide, and hypochlorous acid. **Free Rad. Biol. Med.**, v. 6, p. 593-597, 1989.
- ASAD, N.R.; ASAD, L.M.B.O.; DE ALMEIDA, C.E.B.; FELZENSZWALB, I.; CABRAL-NETO, J.B.; LEITÃO, A.V. Several pathways of hydrogen peroxide action that damage the E. coli genome. **Genet. Mol. Biol.**, v. 27, p. 291-303, 2004.
- ASCHE, C. Antitumour quinones. **Mini Rev. Med. Chem.**, v. 5, p. 449-467, 2005.
- ASHE, P.C.; BERRY, M.D. Apoptotic signaling cascades. **Prog. Neuropsychopharmacol. Biol. Psychiatry**, v. 27, p. 199-214, 2003.
- AUSUBEL, F.; BRENT, R.; KINGSTON, R.E. **Current protocols in molecular biology**. New York: John Wiley and Sons, 1989.
- BAIGI, M.G.; BRAULT, L.; NÉGUESQUE, A.; BELEY, M.; HILALI, R.E.; GAÜZÈRE, F.; BAGREL, D. Apoptosis/necrosis switch in two different cancer cell lines: influence of benzoquinone- and hydrogen peroxide-induced oxidative stress intensity, and glutathione. **Toxicol. Vitro**, v. 22, p. 1547-1554, 2008.

BAILEY, S.M.; SUGGETT, N.; WALTON, M.I.; WORKMAN, P. Structure–activity relationships for DT-diaphorase reduction of hypoxic cell directed agents: indoloquinones and diaziridinyl benzoquinones. **Int. J. Rad. Oncol. Biol. Phys.**, v. 22, p. 649–653, 1992.

BAILEY, S.M.; LEWIS, A.D.; PATTERSON, L.H.; FISHER, G.R.; KNOX, R.J.; WORKMAN, P. Involvement of NADPH: cytochrome P450 reductase in the activation of indoloquinone EO9 to free radical and DNA damaging species. **Biochem. Pharmacol.**, v. 62, p. 461-468, 2001.

BALASSIANO, I. I.; PAULO, S. A.; SILVA, N. H.; CABRAL, M. C.; CARVALHO, M.C. Demonstration of the lapachol as a potential drug for reducing cancer metastasis. **Oncol. Rep.**, v. 13, p. 329-333, 2005.

BALUNAS, M.J.; KINGHORN, A.D. Drug discovery from medicinal plants. **Life Sci.**, v. 78, p. 431-441, 2005.

BARBOSA, L.F.; DE MEDEIROS, M.H.G.; AUGUSTO, O. Danos oxidativos e neurodegeneração: o quê aprendemos com animais transgênicos e nocautes? **Quím. Nova**, v. 29, p. 1352-1360, 2006.

BARREIRO, E. J.; DA SILVA, J. E. M.; FRAGA, C. A. M. Noções sobre metabolismo de fármacos. **Quím. Nova**, v. 19, p. 641-650, 1996.

BARTOSZ, G. Use of spectroscopic probes for detection of reactive oxygen species. **Clin. Chim. Acta**, v. 368, n. ½, p. 53-76, 2006.

BARZILAI, A.; YAMAMOTO, K.I. DNA damage responses to oxidative stress. **DNA Repair**, v. 3, p. 1109-1115, 2004.

BASKIC, D.; POPOVIC, S.; RISTIC, P.; ARSENIJEVIC, N.N. Analysis of cycloheximide-induced apoptosis in human leukocytes: Fluorescence microscopy using annexin V/propidium iodide versus acridin orange/ethidium bromide. **Cell Biol. Int.**, v. 30, p. 924-932, 2006.

BASSE, F.; STOUT, J.G.; SIMS, P.J.; WIEDMER, T. Isolation of an erythrocyte membrane protein that mediates Ca²⁺-dependent transbilayer movement of phospholipid. **J. Biol. Chem.**, v. 271, p. 17205-17210, 1996.

BEALL, H.D.; WINSKI, S.L. Mechanisms of action of quinine-containing alkylating agents I: NQO1-directed drug development. **Frontiers Biosci.**, v. 5, p. 693-648, 2000.

BEEVI, S.S.; RASHEED, M.H.; GEETHA, A. Evidence of oxidative and nitrosative stress in patients with cervical squamous cell carcinoma. **Clin. Chim Acta**, v. 375, p. 119–123, 2007.

BEGLEITER, A.; HEWITT, D.; GIBSON, S.B.; JOHNSTON, J.B. Investigation of an NQO1 polymorphism as a possible risk and prognostic factor for chronic lymphocytic leukemia. **Leuk. Res.**, v. 33, p. 74-81, 2009.

BEHNE, D.; KYRIAKOPOULOS, A. Mammalian selenium-containing proteins. **Annu. Rev. Nutr.**, v. 21, p. 453-473, 2001.

BEHREND, L.; HENDERSON, G.; ZWACKA, R.M. Reactive oxygen species in oncogenic transformation. **Biochem. Soc. Trans.**, v. 31, p. 1441-1444, 2003.

BELLO, R.I., GÓMEZ-DÍAZ, G.; LÓPEZ-LLUCH, G.; FORTHOFFER, N.; CÓRDOBA-PEDREGOSA, M.C.; NAVAS, P.; VILLALBA, J. M. Dicoumarol relieves serum withdrawal-induced G_{0/1} blockade in HL-60 cells through a superoxide-dependent mechanism. **Biochem. Pharmacol.**, v. 69, p. 1613-1625, 2005.

BENTLE, M.S.; REINICKE, K.E.; BEY, E.A.; SPITZ, D.R.; BOOTHMAN, D.A. Calcium-dependent modulation of poly(ADP-ribose) polymerase-1 alters cellular metabolism and DNA repair. **J. Biol. Chem.**, v. 281, p. 33684-33696, 2006.

BENTLE, M.S.; REINICKE, K.E.; DONG, Y.; BEY, E.A.; BOOTHMAN, D.A. Nonhomologous end joining is essential for cellular resistance to the novel antitumor agent, β -lapachone. **Cancer Res.**, v. 67, p. 6936-6945, 2007.

BERGER, J.M.; WANG, J.C. Recent developments in DNA topoisomerase II structure and mechanism. **Curr. Opin. Struct. Biol.**, v. 6, p. 84-90, 1996.

BERNHEIMER, A. W.; RUDY, B. interactions between membranes and cytolytic peptides. **Biochim. Biophys. Acta**, v. 864, p. 123-141, 1986.

BERRA, C.M.; MENCK, C.F.M.; DI MASCIO, P. Estresse oxidativo, lesões no genoma e processos de sinalização no controle do ciclo celular. **Quím. Nova**, v. 29, p. 1340-1344, 2006.

BERRIDGE, M. The biochemical and cellular basis of cell proliferation assays that use tetrazolium salts. **Biochemical**, v. 4, p. 14-19, 1996.

BEY, E.A.; BENTLE, M.S.; REINICKE, K.E.; DONG, Y.; YANG, C.R.; GIRARD, L.; MINNA, J.D.; BORNHANN, W.G.; GAO, J.; BOOTHMAN, D.A. An NQO1- and PARP-1-mediated cell death pathway induced in non-small-cell lung cancer cells by β -lapachone. **Proc. Natl. Acad. Sci. USA**, v. 104, p. 11832-11837, 2007.

BHAKDI, S.; TRANUN-JENSEN, J.; SZIEGOLEIT, A. Mechanism of membrane damage by Streptolysin-O. **Infect. Immune.**, v. 47, p. 52-60, 1985.

BIGNAMI, M.; CASORELLI, I.; KARRAN, P. Mismatch repair and response to DNAdamaging antitumor therapies. **Eur. J. Cancer**, v. 39, p. 2142-2149, 2003.

BLOCK, J.B.; SERPICK, A.A.; MILLER, W.; WIERNIK, P.H. Early clinical studies with lapachol (NSC-11905). **Cancer Chemother. Rep** 2, v. 4, p. 27-28, 1974.

BOATRIGT, K.M.; SALVESEN, G.S. Mechanisms of caspase activation. **Curr. Opin. Cell Biol.**, v. 15, p. 725-731, 2003.

BOITEUX, S.; O'CONNOR, T.R.; LEDERER, F.; GOUYETTE, A.; LAVAL, J. Homogeneous *Escherichia coli* FPG protein. A DNA glycosylase which exercises imidazole ring-opened purines and nicks DNA at apurinic/aprimidinic sites. **J. Biol. Chem.**, v. 265, p. 3916-3922, 1990.

- BOLTON, J.L.; TRUSH, M.A.; PENNING, T.M.; DRYHURST, G.; MONKS, T.J. Role of quinones in toxicology. **Chem. Res. Toxicol.**, v. 13, p. 135–160, 2000.
- BONACKER, D.; STOIBER, T.; WANG, M.; BOHM, K.J.; PROTS, I.; UNGER, E.; THEIR, R.; BOLT, H.M.; DEGEN, G.H. Genotoxicity of inorganic mercury salts based on disturbed microtubule function. **Arch. Toxicol.**, v. 78, p. 575–583, 2004.
- BOORSTEIN, R.J.; PARDEE, A.B. β -lapachone greatly enhances MMS lethality to human fibroblasts. **Biochem. Biophys. Res. Commun.**, v. 118, p. 828-834, 1984.
- BOOTHMAN, D.A.; GREER, S.; PARDEE, A.B. Potentiation of halogenated pyrimidine adiosensitizers in human carcinoma cells by beta-lapachone (3,4-dihydro-2,2-dimethyl-2H-naphtho[1,2-b]pyran-5,6-dione), a novel DNA repair inhibitor. **Cancer Res.**, v. 47, p. 5361-5366, 1987.
- BOOTHMAN, D.A.; TRASK, D.K.; PARDEE, A.B. Inhibition of potentially lethal DNA damage repair in human tumor cells by beta-lapachone, an activator of topoisomerase I. **Cancer Res.**, v. 49, p. 605-612, 1989a.
- BOOTHMAN, D. A.; PARDEE, A. B. Inhibition of radiation-induced neoplastic transformation by beta-lapachone. **Proc. Natl. Acad. Sci. USA**, v. 86, p. 4963-4967, 1989b.
- BOYER, M.J. Bioreductive agents – a clinical update. **Oncol. Res.**, v. 9, p. 391-395, 1997.
- BRADLEY, M.; BHUYAN, B.; FRANCIS, M.C.; LANGENBACH, R.; PETERSON, A.; HUBERMAN, E. Mutagenesis by chemical agents in V79 Chinese hamster cells: a review and analysis of literature. **Mutat. Res.**, v. 87, p. 81-142, 1981.
- BROWN, M.G.; LAWCE, H.J. Peripheral blood cytogenetic methods. In: _____. **The AGT Cytogenetics Laboratory Manual**. Philadelphia: Lippincott-Raven Publishers, 1991.
- BRUNBORG, G.; HOLME, J.A.; HONGSLO, J.K. Inhibitory effects of paracetamol on DNA repair in mammalian cells. **Mutat. Res.**, v. 342, p. 157-170, 1995.
- BRUSTOVETSKY, N.; BRUSTOVETSKY, T.; JEMMERSON, R.; DUBINSKY, J.M. Calcium-induced cytochrome c release from CNS mitochondria is associated with the permeability transition and rupture of the outer membrane. **J. Neurochem.**, v. 80, p. 207-218, 2002.
- BUDIHardjo, I.; OLIVER, H.; LUTTER, M.; LUO, X.; WANG, X. Biochemical pathways of caspase activation during apoptosis. **Annu. Rev. Cell Dev. Biol.**, v. 15, p. 269-290, 1999.
- BURKE, D., DAWSON, D., STEARNS, T. Methods in yeast genetics. In: _____. **Cold Spring Harbour Laboratory Course Manual**. [S.l.]: CSH Laboratory Press, Cold Spring Harbour, 2000.
- CADENAS, E. Antioxidant and prooxidant functions of DT-diaphorase in quinine metabolism. **Biochem. Pharmacol.**, v. 49, p. 127-140, 1995.
- CADET, J.; DOUKI, T.; FRELON, S.; GASPARUTTO, D.; RAVANAT, J.L.; SAUVAIGO, S.; MARTINEZ, G. R.; MEDEIROS, M. H. G.; DI MASCIO, P. Oxidative Damage to DNA: formation and measurement and biochemical features. **Mutat. Res.**, v. 531, p. 5-23, 2003.

CAMARA, C.A.; SILVA, T.M.S.; DA SILVA, T.G.; MARTINS, R.M.; BARBOSA, T.P.; PINTO, A.C.; VARGAS, M.D. Molluscicidal activity of 2-hydroxy-[1,4]naphthoquinone and derivatives. **An. Acad. Bras. Ciênc.**, v. 80, p. 329-334, 2008.

CAMPA, A.; ESPOSITO, G.; BELLI, M.; SIMONE, G.; TABOCCHINI, M.A. DNA fragmentation in V79 cells irradiated with light ions as measured by pulse-field gel electrophoresis. II. Simulation with a generalized broken stick model. **Int. J. Radiat. Biol.**, v. 80, p. 229-238, 2004.

CARTER, S.B. Effects of cytochalasin on mammalian cells. **Nature**, v. 213, p. 261-264, 1967.

CASTRO, F.A.V.; MARIANI, D.; PANEK, A.D.; ELEUTHERIO, C.A.; PEREIRA, M.C. Cytotoxicity mechanism of two naphthoquinones (menadione and plumbagin) in *Saccharomyces cerevisiae*. **PLoS ONE**, v. 3, p. e3999, 2008.

CAVALCANTI, B.C.; COSTA-LOTUFO, L.V.; MORAES, M.O.; BURBANO, R.R.; SILVEIRA, E.R.; CUNHA, K.M.A.; RAO, V.S.N.; MOURA, D.J.; ROSA, R.M.; HENRIQUES, J.A.P.; PESSOA, C. Genotoxicity evaluation of kaurenoic acid, a bioactive diterpenoid present in Copaiba oil. **Food Chem. Toxicol.**, v. 44, p. 388-392, 2006.

CAVALCANTI, B.C.; SOMBRA, C.M.L.; DE OLIVEIRA, J.H.H.L.; BERLINCK, R.G.S.; MORAES, M.O.; PESSOA, C. Cytotoxicity and genotoxicity of ingenamine G isolated from the Brazilian marine sponge *Pachychalina alcaloidifera*. **Comp. Biochem. Physiol. Part C, Toxicol. Pharmacol.**, v. 147, p. 409-415, 2008.

CHANDRA, J.; SAMALI, A.; ORRENIUS, S. Triggering and modulation of apoptosis by oxidative stress. **Free Rad. Med. Biol.**, v. 29, p. 323-333, 2000.

CHAU, Y.P.; SHIAH, S.G.; DON, M.J.; KUO, M.L. Involvement of hydrogen peroxide in topoisomerase inhibitor β -lapachone-induced apoptosis and differentiation in human leukemia cells. **Free Rad. Biol. Med.**, v. 24, p. 660-670, 1998.

CHENG, Z.; REN, J.; LI, Y.; CHANG, W.; CHEN, C. Study on the multiple mechanisms underlying the reaction between hydroxyl radical and phenolic compounds by qualitative structure and activity relationship. **Bioorg. Med. Chem.**, v. 10, p. 4067-4073, 2002.

CHESIS, P.L.; LEVIN, D.E.; SMITH, M.T.; ERNSTER, L.; AMES, B.N. Mutagenicity of quinines: pathways of metabolic activation and detoxification. **Proc. Natl. Acad. Sci. USA**, v. 81, p. 1696-1700, 1984.

CHIOU, T.J.; TZENG, W.F. The roles of glutathione and antioxidant enzymes in menadione-induced oxidative stress. **Toxicology**, v. 154, p. 75-84, 2000.

CHOI, Y.H.; KANG, H.S.; YOO, M.A. Suppression of human prostate cancer cell growth by β -lapachone via down-regulation of pRB phosphorylation and induction of Cdk inhibitor p21^{WAF1/CIP1}. **J. Biochem. Mol. Biol.**, v. 36, p. 223-229, 2003.

CHOI, E.K.; TERAJ, K.; JIZ, I.M.; KOOKZ, Y.H.; PARKZ, K.H.; OHZ, E.T.; GRIFFINY, R.J.; LIMZ, B.U.; KIM, J.S.; LEEB, D.S.; BOOTHMAN, D.A.; LORENY, M.; SONGY,

C.W.; PARK, H.J. Upregulation of NAD(P)H:quinone oxidoreductase by radiation potentiates the effect of bio-reductive β -Lapachone on cancer cells. **Neoplasia**, v. 9, p. 634-642, 2007.

CHUNG, Y.; IM, J.K.; LEE, S.; CHO, H. Synthesis and cytotoxicity of anilinomethyl-1,4-naphthoquinones. **Bull. Korean Chem. Soc.**, v. 25, p. 1408-1410, 2004.

CIBAS, E.S. Applications of flow cytometric DNA analysis to diagnostic cytology. **Diagn. Cytopathol**, v. 13, p. 166 – 171, 1995.

CLARE, M.G.; LOREZON, G.; AKHURST, L.C.; MARZIN, D.; DELFT, J.; MONTERO, R.; BOTTA, A.; BERTENS, A.; CINELLI, S.; THYBAUD, V.; LORGE, E. SFTG international collaborative study on *in vitro* micronucleus test II. Using human lymphocytes. **Mutat. Res.**, v. 607, p. 37-60, 2006.

CLEAVER, J.E. Excision repair: the first steps into mammalian cells. **DNA Repair.**, v. 3, p. 91-99, 2004.

COJOCEL, C.; NOVOTOVY, L.; VACHALKOVA, A. Mutagenic and carcinogenic potential of menadione. **Neoplasma**, v. 53, p. 316-323, 2006.

COLLIN, S.J. The promyelocytic leukemia cell line: proliferation, differentiation, and cellular oncogene expression. **Blood**, v. 70, p. 1233-1244, 1987a.

COLLINS, A.; OATES, D.J. Hydroxyurea: effects on deoxyribonucleotide pool sizes correlated with effects on DNA repair in mammalian cells. **Eur. J. Biochem.**, v. 169, p. 299-305, 1987b.

COLLINS, A.R.; DOBSON, V.L.; DUSINKÁ, M.; KENNEDY, G.; STETINA, R. The comet assay: what can it really tell us? **Mutat. 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.

COPPOLA, S.; GHIBELLI, L. GSH extrusion and the mitochondrial pathway of apoptotic signaling. **Biochem. Soc. Trans.**, v. 28, p. 56-61, 2000.

COSTA-LOTUFO, L. V. **Substâncias bioativas em *Phallusia nigra* (savigny, 1816) (Urochordata, Ascidiacea)**. Tese (Doutorado) - Universidade de São Paulo, São Paulo, 1998.

COSTA-LOTUFO, L.V.; CUNHA, G.M.A.; FARIAS, P.A.M.; VIANA, G.S.B.; CUNHA, K.M.A.; PESSOA, C.; MORAES, M.O.; SILVEIRA, E.R.; GRAMOSA, N.V.; RAO, V.S.N. The Cytotoxic and embryotoxic effects of kaurenoic acid, a diterpene isolated from *Copaifera langsdorffi* oleo-resin. **Toxicon**, v. 40, p. 1231-1234, 2002.

CRAGG, G.M.; NEWMAN, D.J. Antineoplastic agents from natural sources: achievements and future directions. **Exp. Opin. Investig. Drugs**, v. 9, p. 2783 – 2797, 2000.

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

CRESTEIL, T.; JAISWAL, A. K. High levels of expression of the NAD(P)H: quinone oxidoreductase (NQO1) gene in tumor cells compared to normal cells of the same origin. **Biochem. Pharmacol.**, v. 42, p. 1021–1027, 1991.

CROW, J.P. Dichlorodihydrofluorescein and dihydrorhodamine 123 are sensitive indicators of peroxynitrite in vitro: implications for intracellular measurement of reactive nitrogen and oxygen species. **Nitric Oxide**, v. 1, p. 147–157, 1997.

CUMMINGS, J.; SPANSWICK, V.J.; TOMASZ, M.; SMYTH, J.J. Enzymology of mitomycin C metabolic activation in tumour tissue: implications for cancer enzyme-directed bioreductive drug development. **Biochem. Pharmacol.**, v. 56, p. 405-414, 1998.

CUMMINGS, J. The role of reductive enzymes in cancer cell resistance to mitomycin C. **Drug Resist. Updates**, v. 3, p. 143-148, 2000.

D'ANNEO, A.; AUGELLO, G.; SANTULLI, A.; GIULIANO, M.; DI FIORE, R.; MESSINA, C.; TESORIERE, G.; VENTO, R. Paclitaxel and beta-lapachone synergistically induce apoptosis in human retinoblastoma Y79 cells by downregulating the levels of phospho-Akt. **J. Cell Physiol.**, v. 222, p. 433-443, 2010.

DA ROCHA, A.B.; LOPES, R.M.; SCHWARTSMANN, G. Natural products in anticancer therapy. **Curr. Opin. Pharmacol.**, v. 1, p. 364-369, 2001.

DA SILVA, M.N.; FERREIRA, V.F.; DE SOUZA, M.C.B.V. Um panorama atual da química e da farmacologia de naftoquinonas, com ênfase na β -lapachona e derivados. **Quím. Nova**, v. 3, p. 407-416, 2003.

DA SILVA JÚNIOR, E.N. **Síntese de novos derivados de lapachonas e nor-lapachonas:** veredas à atividade farmacológica. Dissertação (Mestrado) - Universidade Federal Fluminense, Rio de Janeiro, 2007a.

DA SILVA JÚNIOR, E.N.; SOUZA, M.C.B.V.; PINTO, A.V.; PINTO, M.C.F.R.; GOULART, M.O.F.; BARROS, F.W.A.; PESSOA, C.; COSTA-LOTUFO, L.V.; MONTENEGRO, R.C.; MORAES, M.O.; FERREIRA, V.F. Synthesis and potent antitumor activity of new arylamino derivatives of nor- β -lapachone and nor- α -lapachone. **Bioorg. Med. Chem.**, v. 15, p. 7035-7041, 2007b.

DA SILVA JÚNIOR, E.N.; de DEUS, C.F.; CAVALCANTI, B.C.; PESSOA, C.; COSTA-LOTUFO, L.V.; MONTENEGRO, R.C.; MORAES, M.O.; PINTO, M.C.F.R.; de SIMONE, C.A.; FERREIRA, V.F.; GOULART, M.O.F.; ANDRADE, C.K.Z.; PINTO, A.V. 3-Arylamino and 3-alkoxy-nor- β -lapachone derivatives: synthesis and cytotoxicity against cancer cell lines. **J. Med. Chem.**, v. 53, p. 504-508, 2010.

DA SILVA JÚNIOR, E.N.; DE MOURA, M.A.B.F.; PINTO, A.V.; PINTO, M.C.F.R.; DE SOUZA, M.C.B.V.; ARAÚJO, A.J.; PESSOA, C.; COSTA-LOTUFO, L.V.; MONTENEGRO, R.C.; MORAES, M.O.; FERREIRA, V.F.; GOULART, M.O.F. Cytotoxic, trypanocidal activities and physicochemical parameters of nor- β -lapachone-based 1,2,3-triazoles. **J. Braz. Soc. Chem.**, p. 635-643, 2009.

DAI, Y.; GRANT, S. Small molecule inhibitors targeting cyclin-dependent kinases as anticancer agents. **Curr. Oncol. Rep.**, v. 6, p. 123-130, 2004.

DANIEL, P.T.; WIDER, T.; STURM, I.; SCHULZE-OSTHOFF, K. The kiss of death: promises and failures of death receptors and ligands in cancer therapy. **Leukemia**, v. 15, p. 1022-1032, 2001.

DE ABREU, F.C.; FERREIRA, D.C.M.; WADHAWAN, J.; AMATORE, C.; FERREIRA, V.F.; DA SILVA, M.N.; DE SOUZA, M.C.B.V.; GOMES, T.S.; XIMENES, E.A.; GOULART, M.O.F. Electrochemistry of β -lapachone and its diazoderivative: relevance to their compared antimicrobial activities. **Electrochem. Commun.**, v. 7, p. 767-772, 2005.

DE ABREU, F.C.; FERREIRA, D.C.M.; GOULART, M.O.F.; BURIEZ, O.; AMATORE, C. Electrochemical activation of β -lapachone in β -cyclodextrin inclusion complexes and reactivity of its reduced form towards oxygen in aqueous solutions. **J. Electroanal. Chem.**, v. 608, p. 125-132, 2007.

DE ALMEIDA, E.V.; LUCENA, F.R.S.; SOARES SILVA, C.V.N.; COSTA-JÚNIOR, W.S.; CAVALCANTI, J.B.; COUTO, G.B.L.; DA SILVA, L.L.S.; DA MOTA, D.L.; DA SILVEIRA, A.B.; DE SOUSA FILHO, S.D.; DA SILVA, A.C.P. Toxicological assessment of beta-lapachone on organs from pregnant and non-pregnant rats. **Phytother. Res.**, v. 23, p. 1276-1280, 2009.

DE ALMEIDA, V.L.; LEITÃO, A.; REINA, L.C.B.; MONTANARI, C.A.; DONNICI, C.L.; LOPES, M.T.P. Câncer e agentes antineoplásicos ciclo-celular específicos e ciclo-celular não específicos que interagem com o DNA: uma introdução. **Quím. Nova**, v. 28, p.: 118-129, 2005.

DE MOURA, M.A.B.F. **Atividade antitumoral de nitroquinona derivada da nor- β -lapachona**: contribuição da farmacoeletoquímica na pesquisa do mecanismo de ação de novos fármacos. Tese (Doutorado) – Universidade Federal de Alagoas, 2008.

DE OLIVEIRA, M.M.; LINARDI, M.C.F.; SAMPAIO, M.R.P. Effects of quinone derivatives on an experimental tumor. **J. Pharm. Sci.**, v. 67, p. 562-563, 1978.

DEBATIN, K.M. Apoptosis pathways in cancer and cancer therapy. **Cancer Immunol. Immunother.**, v. 53, p. 153-159, 2004.

DEGRASSI, F.; DE SALVIA, R.; BERGHELLA, L. The production of chromosomal alterations by β -lapachone an activator of topoisomerase I. **Mutat. Res.**, v. 288, p. 263-297, 1993.

DELEVE, L.D.; KAPLOWITZ, N. Glutathione metabolism and its role in hepatotoxicity. **Pharmacol. Ther.**, v. 52, p. 287-305, 1991.

DEMMA, J.; HALLBERG, K.; HELLMAN, B. Genotoxicity of plumbagin and its effects on catechol and NQNO-induced DNA damage in mouse lymphoma cells. **Toxicol. Vitro**, v. 23, p. 266-271, 2009.

DESAGHER, S.; MARTINOU, J.C. Mitochondria as the central control point of apoptosis. **Cell Biol.**, v. 10, p. 369-377, 2000.

DEVI, P.U.; RAO, B.S.; SOLOMON, F.E. Effect of plumbagin on the radiation induced cytogenetic and cell cycle changes in mouse Ehrlich ascites carcinoma *in vivo*. **Indian J. Exp. Biol.**, v. 36, p. 891-895, 1998.

DEWICK, P.M. Pharmacopoeial and related drugs of biological origin. In: _____. **Trease and Evans' pharmacognosy**. London: Saunders, 1996. p. 409-425.

DI CHENNA, P. H.; BENEDETTI-DOCTOROVICH, V.; BAGGIO, R.F.; GARLAND, M.T.; BURTON, G. Preparation and cytotoxicity toward cancer cells of mono(arylimino) derivatives of beta-lapachone. **J. Med. Chem.**, v. 44, p. 2486-2489, 2001.

DIAZ, F.; MEDINA, J.D. Furanonaphthoquinones from *Tabebuia ochracea* ssp. **J. Nat. Prod.**, v. 59, p. 423-424, 1996.

DLAMINI, Z.; MBITA, Z.; ZUNGU, M. Genealogy, expression and molecular mechanisms in apoptosis. **Pharmacol. Ther.**, v. 101, p. 1-15, 2004.

DOCAMPO, R.; CRUZ, F.S.; BOVERIS, A.; MUNIZ, R.P.; ESQUIVEL, D.M. β -lapachone enhancement of lipid peroxidation and superoxide anion and hydrogen peroxide formation by sarcoma 180 ascites tumor cells. **Biochem. Pharmacol.**, v. 28, p. 723-728, 1979.

DONG, Y.; CHIN, S. F.; BLANCO, E.; BEY, E.A.; KABBANI, W.; XIE, X.J.; BORNHANN, W.G.; BOOTHMAN, D.A.; GAO, J. Intratumoral Delivery of β -Lapachone via polymer implants for prostate cancer therapy. **Clin. Cancer Res.**, v. 15, p. 131-139, 2009.

DRESCH, R.R.; HAESER, A.S.; LERNER, C.; MOTHE, B.; VOZÁRI-HAMPE, M.M.; HENRIQUES, A.T. Detecção de atividade lectínica e atividade hemolítica em extratos de esponjas (Porífera) nativas da costa atlântica do Brasil. **Rev. Brás. Farmacog.**, v. 15, p. 16 - 22, 2005.

DRISCOLL, J. S.; HAZARD, G. F.; WOOD, H. B.; GOLDIN, A. Structure-antitumor activity relationships among quinone derivatives. **Cancer Chemother. Rep** 2, v. 4, p. 1-362, 1974a.

DRISCOLL, J. S. Quinone structure-antitumor activity relationships. **Cancer Chemother. Rep** 2, v. 4, p. 3-4, 1974b.

DU, C.; FANG, M.; LI, Y.; LI, L.; WANG, X. Smac, a mitochondrial protein that promotes cytochrome *c*-dependent caspase activation by eliminating IAP inhibition. **Cell**, v. 102, p. 33-42, 2000.

DUBIN, M.; VILLAMIL, S.H.F.; STOPPANI, A.O.M. Inhibition of microsomal lipid peroxidation and cytochrome P-450-catalyzed reactions by β -lapachone and related naphthoquinones. **Biochem. Pharmacol.**, v. 39, p. 1151-1160, 1990.

DURNEV, A.D.; SEREDENIN, S.B. Role of oxygen free radicals in the mutagenic effects of drugs and other xenobiotics. **Pharm. Chem. J.**, v. 24, p. 685-695, 1990.

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

EBLIN, K.E.; HAU, A.M.; JENSEN, T.J.; FUTSCHER, B.W.; GANDOLFI, A.J. The role of reactive oxygen species in arsenite and monomethylarsonous acid-induced signal transduction in human bladder cells: acute studies. **Toxicology**, v. 250, p. 47-54, 2008.

ELMORE, S. Apoptosis: A Review of Programmed Cell Death. **Toxicol. Pathol.**, v. 35, p. 495-516, 2007.

EPE, B. Genotoxicity of singlet oxygen. **Chemico-Biological Interactions**, v. 80, p. 239-260, 1991.

ESTEVEZ-SOUZA, A.; FIGUEIREDO, D.V.; ESTEVES, A.; CÂMARA, C.A.; VARGAS, M.D.; PINTO, A.C.; ECHVARRIA, A. Cytotoxic and DNA-topoisomerase effects of lapachol amine derivatives and interactions with DNA. **Braz. J. Med. Biol. Res.**, v. 40, p. 1399-1402, 2007.

FADOK, V.A.; VOELKER, D.R.; CAMPBELL, P.A.; COHEN, J.J.; BRATTON, D.L.; HENSON, P.M. Exposure of phosphatidylserine on the surface of apoptotic lymphocytes triggers specific recognition and removal by macrophages. **J. Immunol.**, v. 148, p. 2207-2216, 1992.

FARBER, J. L.; KYLE, M.E.; COLEMAN, J.B. Mechanisms of cell injury by activated oxygen species. **Lab. Investig.**, v. 62, p. 670-679, 1990.

FEDERICO, A.; TUCCILLO, C.; CIARDIELLO, F.; LOGUERCIO, C. Chronic inflammation and oxidative stress in human carcinogenesis. **Int. J. Cancer**, v. 121, p. 2381-2386, 2007.

FENECH, M.; MORLEY, A. Solutions to the kinetic problem in the micronucleus test. **Cytobios**, v. 43, p. 223-246, 1985.

FENECH, M. The advantages and disadvantages of the cytokinesis-block micronucleus method. **Mutat. Res.**, v. 392, p. 11-18, 1997.

FENECH, M. The in vitro micronucleus technique. **Mutat. Res.**, v. 455, p. 81-95, 2000.

FENECH, M. Cytokinesis-block micronucleus assay evolves into a "cytome" assay of chromosomal instability, mitotic dysfunction and cell death. **Mut. Res.**, v. 600, p. 58-66, 2006.

FERRARO-PEYRET, C.; QUEMENEUR, L.; FLACHER, M.; JEAN-PIERRE, R.; GENESTIER, L. Caspase-independent phosphatidylserine exposure during apoptosis of primary T lymphocytes. **J. Immunol.**, v. 169, p. 4805-4810, 2002.

FINK, S.L.; COOKSON, B.T. Apoptosis, pyroptosis, and necrosis: mechanistic description of dead and dying eukaryotic cells. **Infect. Immun.**, v. 73, p. 1907-1916, 2005.

FITZSIMMONS, S.A.; WORKMAN, P.; GREVER, M.; PAUL, K.; CAMALIER, R.; LEWIS, A.D. Reductase enzyme expression across the National Cancer Institute tumor cell line panel: correlation with sensitivity to mitomycin C and EO9. **J. Natl. Cancer Inst.**, v. 88, p. 259-269, 1996.

FOURIE, J.; OLESCHUK, C.J.; GUZIEC JR, F.; GUZIEC, L.; FITERMAN, D.J.; MONTERROSA, C.; BEGLEITER, A. The effect of functional groups on reduction and activation of quinine bioreductive agents by DT-diaphorase. **Cancer Chemother. Pharmacol.**, v. 49, p. 101-110, 2002.

FRANKENBERG-SCHWAGER, M. Review of repair kinetics for DNA damage induced in eukaryotic cells *in vitro* by ionizing radiation. **Radiother. Oncol.**, v. 14, p. 307–320, 1989.

FRYDMAN, B.; MARTON, L. J.; SUN, J. S.; NEDER, K.; WITIAK, D. T.; LIU, A. A.; WANG, H. M.; MAO, Y.; WU, H. Y.; SANDERS, M. M.; LIU, L. F. Induction of DNA topoisomerase II-mediated DNA cleavage by b-lapachone and related naphthoquinones. **Cancer Res.**, v. 57, p. 620–627, 1997.

GAIVÃO, I.; SIERRA, L.M.; COMENDADOR, M.A. The w/w+ SMART assay of *Drosophila melanogaster* detects the genotoxic effects of reactive oxygen species inducing compounds. **Mutat. Res.**, v. 440, p. 139-145, 1999.

GALLUZZI, L.; MAIURI, M.C.; VITALE, I.; ZISCHKA, H.; CASTEDO, M.; ZITVOGEL, L.; KROEMER, G. Cell death modalities: classification and pathophysiological implications, **Cell Death Differ.**, v. 14, p. 1237–1243, 2007.

GALLUZZI, L.; MORSELLI, E.; KEPP, O.; KROEMER, G. Targeting post-mitochondrial effectors of apoptosis for neuroprotection. **Biochim. Biophys. Acta**, v. 1787, p. 402-413, 2009.

GALLUZZI, L.; MORSELLI, E.; KEPP, O.; VITALE, I.; RIGONI, A.; VACCHELLI, E.; MICHAUD, M.; ZISCHKA, H.; CASTEDO, M.; KROEMER, G. Mitochondrial gateways to cancer. **Mol. Aspects Med.**, v. 31, n. 1, p. 1-20, 2010.

GALM, U.; HAGER, M.H.; LANEN, S.G.V.; JU, J.; THORSON, J.S.; SHEN, B. Antitumor antibiotics: bleomycin, enediynes, and mitomycin. **Chem. Rev.**, v. 105, p. 739-758, 2005.

GAO, S.Y.; WANG, Q.J.; JI, Y.B. Effect of solanine on the membrane potential of mitochondria in HepG2 cells and [Ca²⁺]_i in the cells. **World J. Gastroenterol.**, v. 12, p. 3359-3367, 2006.

GARBER, P.M.; VIDANES, G.M.; TOCZYSKI, D.P. Damage in transition. **Trends Biochem. Sci.**, v. 30, p. 63-66, 2005.

GASIOROWSKI, K.; BROKOS, B.; KULMA, A.; OGORZALEK, A.; SKORKOWSKA, K. A comparison of the methods applied to detect apoptosis in genotoxically-damaged lymphocytes cultured in the presence of four antimutagens. **Cell Mol. Biol. Lett.**, v. 6, p. 141-159, 2001.

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.

GIANNOTTI, E.; VANDIN, L.; REPETO, P.; COMELLI, R. A comparison of the *in vitro* comet assay with the *in vitro* chromosome aberration assay using whole human blood or

Chinese hamster lung cells: validation study using a range of novel pharmaceuticals. **Mutatagenesis**, v. 17, p. 163–170, 2002.

GODARD, T.; DESLANDES, E.; SICHEL, F.; POUL, J.M.; GAUDUCHON, P. Detection of topoisomerase inhibitor-induced DNA strand breaks and apoptosis by the alkaline comet assay. **Mutat. Res.**, v. 520, p. 47-56, 2002.

GOMES, A.; FERNANDEZ, E.; LIMA, J.L.F.C. Fluorescence probes used for detection of reactive oxygen species. **J. Biochem. Biophys Methods**, v. 65, p. 45-80, 2005.

GOTO, T.; WANG, J.C. Yeast DNA topoisomerase II is encoded by a single-copy, essential gene. **Cell**, v. 36, p. 1073-1080, 1984.

GOTTLIEB, E.; VANDER HEIDEN, M.G.; THOMPSON, C.B. Bcl-XL prevents the initial decrease in mitochondrial membrane potential and subsequent reactive oxygen species production during tumor necrosis factor alpha-induced apoptosis. **Mol. Cell Biol.**, v. 20, p. 5680-5689, 2000.

GOTTLIEB, R.A. Mitochondrial and apoptosis. **Biol. Signals Recept.**, v. 10, p. 147-161, 2001.

GREEN, D.R.; KROEMER, G. The pathophysiology of mitochondrial cell death. **Science**, v. 305, p. 626-629, 2004.

GREEN, D.R. Apoptotic pathway: ten minutes to dead. **Cell**, v. 121, p. 671-674, 2005.

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

GRZESIUK, E.; JANION, C. MMS-induced mutagenesis and DNA repair in *Escherichia coli dnaQ49*: contribution of UmuD' to DNA repair. **Mutat. Res.**, v. 362, p. 147-154, 1996.

GUPTA, S. Molecular signaling in death receptor and mitochondrial pathways of apoptosis. **Int. J. Oncol.**, v.22, p. 15-20, 2003.

GUPTA, S.; AGRAWAL, A.; AGRAWAL, S.; SU, H.; GOLLAPUDI, S. A paradox of immunodeficiency and inflammation in human aging: lessons learned from apoptosis. **Immun. Ageing**, v. 3, p. 5, 2006.

GUTIERREZ, P.L. The role of NAD(P)H oxidoreductase (DT-diaphorase) in the bioactivation of quinine-containing antitumor agents: a review. **Free Radic. Biol. Med.**, v. 29, p. 263-275, 2000.

GUVEN, M.; OZTURK, B.; SAYAL, A.; OZET, A. Lipid peroxidation and antioxidant system in blood of patients with Hodgkin's disease. **Clin. Biochem.**, v. 33, p. 209–212, 2000.

HALL, A.G. The role of glutathione in the regulation of apoptosis. **Eur. J. Clin. Invest.**, v. 29, p. 238–245, 1999.

HALLIWELL, B.; ARUOMA, O.I. DNA damage by oxygen-derived species. Its mechanisms and measurement in mammalian systems. **FEBS Lett.**, v. 281, p. 9-19, 1991.

HALLIWELL, B.; CROSS, C.E. Oxygen-derived species: their relation to human disease and environmental stress. **Environ. Health Perspect**, v. 102, p. 5-12, 1994.

HAMID, R.; ROTSHTEYN, Y.; RABADI, L.; PARIKH, R.; BULLOCK, P. Comparison of Alamar blue and MTT assays for high through-put screening. **Toxicol. Vitro**, v. 18, p. 703-710, 2000.

HAMMOND, E.M.; GREEN, S.L.; GIACCIA, A.M. Comparison of hypoxia-induced replication arrest with hydroxyurea and aphidicolin-induced arrest. **Mutat. Res.**, v. 532, p. 205-213, 2003.

HANSEN, S.K.; MILLER, L.L. Regulatory strategies for the development of adjunctive cancer chemotherapies. **Drug Inform. J.**, v. 31, p. 789-803, 1997.

HASSPIELLER, B.M.; HAFFNER, G.D.; ADELI, K. Influence of DT-diaphorase on quinine-mediated genotoxicity in human and fish cell lines. **Mutat. Res.**, v. 360, p. 43-49, 1996.

HEMPEL, S.L.; BUETTNER, G.R.; O'MALLEY, Y.Q.; WESSELS, D.A.; FLAHERTY, D.M. Dihydrofluorescein diacetate is superior for detecting intracellular oxidants: comparison with 2',7'-dichlorodihydrofluorescein diacetate, 5 (and 6)-carboxy-2',7'-dichlorodihydrofluorescein diacetate, and dihydrorhodamine 123. **Free Radic. Biol. Med.**, v. 27, p.146-159, 1999.

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

HILLARD, E. A.; DE ABREU, F. C.; FERREIRA, D.C.M.; JAOUEN, G.; GOULART, M.O.F.; AMATORE, C. Electrochemical parameters and techniques in drug development, with an emphasis on quinones and related compounds. **Chem. Commun.**, p. 2612-2628, 2008.

HOLM, M.; THOMSEN, M.; HOYER, M.; HOKLAND, P. Optimization of a flow cytometric method for the simultaneous measurement of cell surface antigen, DNA content, and in vitro BrdU incorporation into normal and malignant hematopoietic cells. **Cytometry**, v. 32, p. 28-36, 1998.

HONG, S.J.; DAWSON, T.M.; DAWSON, V.L. Nuclear and mitochondrial conversations in cell death: *PARP-1* and *AIF* signaling. **Trends Pharmacol. Sci.**, v. 25, p. 259-264, 2004.

HOUTGRAAF, J.H.; VERSMISSEN, J.; VAN DER GIESSEN, W.J. A concise review of DNA damage checkpoints and repair in mammalian cells. **Cardiovasc. Revasc. Med.**, v. 7, p. 165-172, 2006.

HSIUNG, Y.; JANNATIPOUR, M.; ROSE, A.; MCMAHON, J.; DUNCAN, D.; NITISS, J.L. Functional expression of human topoisomerase II α in yeast: mutations at amino acids 450 or 803 of topoisomerase II α result in enzymes that can confer resistance to anti-topoisomerase II agents. **Cancer Res.**, v. 56, p. 91-99, 1996.

HSU, C.L.; YEN, G.C. Effects of capsaicin on induction of apoptosis and inhibition of adipogenesis in 3T3-L1 cells. **J. Agric. Food Chem.**, v. 55, p. 1730-1736, 2007.

HUANG, L.; PARDEE, A.B. β -lapachone induces cell cycle arrest and apoptosis in human colon cancer cells. **Mol. Med.**, v. 5, p.711-720, 1999.

HUANG, W.Y.; CAI, Y.Z.; ZHANG, Y. Natural phenolic compounds from medicinal herbs and dietary plants: potential use for cancer prevention. **Nutr. Cancer**, v. 62, p. 1-20, 2010.

HUEBER, A.; ESSER, P.; HEIMANN, K.; KOCIOK, N.; WINTER, S.; WELLER, M. The topoisomerase I inhibitors, camptothecin and β -lapachone, induce apoptosis of human retinal pigment epithelial cells. **Exp. Eye Res.**, v. 67, p. 525-530, 1998.

HUSSAIN, H.; KROHN, K.; AHMAD, V.U.; MIANA, G.A.; GREEND, I.V. Lapachol: an overview. **Arch. Organ. Chem.**, v. 2, p. 145-171, 2007.

ISKANDER, K.; JAISWAL, A.N. Quinone oxidoreductases in protection against myelogenous hyperplasia and benzene toxicity. **Chem. Biol. Interact.**, v. 153/154, p. 147-157, 2005.

JAGETIA, A.; JAGETIA, G.C.; JHA, S. Naringin, a grapefruit flavone, protects V79 cells against the bleomycin-induced genotoxicity. **J. Appl. Toxicol.**, v. 27, p. 122-132, 2007.

JANION, C.; PLEWAKO, S.; BEBENEK, K.; SLEDZIEWSKA-GOJSKA, E. Influence of dam and mismatch repair system on mutagenic and SOS-inducing activity of methyl methanesulfonate in *Escherichia coli*. **Mutat. Res.**, v. 210, p. 15-22, 1989.

JENNER, P. Oxidative damage in neurodegenerative disease. **Lancet**, v. 344, p. 796-798, 1994.

JIANG, Y.; LIN, W.Z.; LIN, N.Y.; ZHU, D.Y. Fast repair of oxidizing OH adducts of DNA by hydroxycinnamic acid derivatives: a pulse radiolytic study. **Radiat. Phys. Chem.**, v. 54, p. 355-359, 1999.

JIANG, D.; SULLIVAN, P.G.; SENSI, S.L.; STEWARD, O.; WEISS, J.H. Zn(2+) induces permeability transition pore opening and release of pro-apoptotic peptides from neuronal mitochondria. **J. Biol. Chem.**, v. 276, p. 47524-47529, 2001.

JOSEPH, P.; JAISWAL, A.K. NAD(P)H:quinone oxidoreductase1 (DT diaphorase) specifically prevents the formation of benzo[a]pyrene quinone–DNA adducts generated by cytochrome P4501A1 and P450 reductase. **Proc. Natl. Acad. Sci. USA**, v. 91, p. 8413-8417, 1994.

JOSEPH, P.; KLEIN-SZANTO, A.J.P.; JAISWAL, A.K. Hydroquinones cause specific frame shift mutations involving deletion of a single cytosine from the DNA sequence 5'-CCCCC-3' and lead to cellular transformation and *in vivo* tumorigenesis. **Br. J. Cancer**, v. 18, p. 312-320, 1998.

JOSEPH, P.; LONG II, D.J.; KLEIN-SZANTO, A.J.P.; JAISWAL, A.K. Role of NAD(P)H:quinone oxidoreductase 1 (DT diaphorase) in protection against quinone toxicity. **Biochem. Pharmacol.**, v. 60, p. 207-214, 2000.

JOZA, N.; SUSIN, S.A.; DAUGAS, E.; STANFORD, W.L.; CHO, S.K.; LI, C.Y.; SASAKI, T.; ELIA, A.J.; CHENG, H.Y.; RAVAGNAN, L.; FERRI, K.F.; ZAMZAMI, N.; WAKEHAM, A.; HAKEM, R.; YOSHIDA, H.; KONG, T.W.; ZÚÑIGA-PFLÜCKER, J.C.;

KROEMER, G.; PENNINGER, J.M. Essential role of the mitochondrial apoptosis-inducing factor in programmed cell death. **Nature**, v. 410, p. 549-554, 2001.

JUIN, P.; HUEBER, A.O.; LITTLEWOOD, T.; EVAN, G. *c-myc*-induced sensitization to apoptosis is mediated through cytochrome *c* release. **Genes Dev.**, v. 13, p. 1367–1381, 1999.

KASAI, H.; KAZUAKI, K. Oxidative DNA damage: mechanisms and significance in health and disease. **Antioxid. Redox Signal.**, v. 8, n. 5/6, p. 981-983, 2006.

KAWAI, M.; CHEN, J.; CHEUNG, C.Y.S.; CHANG, T.K.H. Transcript profiling of cytochrome P450 genes in HL-60 human leukemic cells: Upregulation of CYP1B1 by all-*trans*-retinoic acid. **Mol. Cell. Biochem.**, v. 248, p. 57-65, 2003.

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

KHANNA, K.K.; JACKSON, S.P. DNA double-strand breaks: signaling, repair and the cancer connection. **Nat. Genet.**, v. 27, p. 247–254, 2001.

KIM, H.S.; LEBRETON, P.R. UV photoelectron and ab initio quantum mechanical characterization of valence electrons in Na(+)-water-2'-deoxyguanosine 5'-phosphate clusters: electronic influences on DNA alkylation by methylating and ethylating carcinogens. **Proc. Natl. Acad. Sci. USA**, v. 91, p. 3725-3729, 1994.

KIM, J.E.; YOU, H.J.; CHOI, J.Y.; DOETSCH, P.W.; KIM, J.S.; CHUNG, M.H. Ntg2 of *Saccharomyces cerevisiae* repairs the oxidation products of 8-hydroxyguanine. **Biochem. Biophys. Res. Commun.**, v. 285, p.1186-1191, 2001.

KIM, R.; EMI, M.; TANABE, K.; UCHIDA, Y.; ARIHIRO, K. The role of apoptotic or nonapoptotic cell death in determining cellular response to anticancer treatment. **Eur. J. Surg. Oncol.**, v. 32, p. 269-277, 2006.

KINGSTON, D.G.I. Recent advances in the chemistry of taxol. **J. Nat. Prod.s**, v. 63, p. 726 - 734, 2000.

KINSELLA, A.R.; SMITH, D. Tumor resistance to antimetabolites. **Gen. Pharmacol.**, v. 30, p. 623–626, 1998.

KIRKLAND, D.; MARZIN, D. An assessment of the genotoxicity of 2-hydroxy-1,4-naphthoquinone, the natural dye ingredient of henna. **Mutat. Res.**, v. 537, p. 183-199, 2003.

KLAUDE, M.; ERIKSON, S.; NYGREN, J.; AHNSTROM, G. The Comet assay: mechanisms and technical considerations. **Mutat. Res.**, v. 363, p. 89–96, 1996.

KLUCK, R.M.; BOSSY-WETZEL, E.; GREEN, D.R.; NEWMAYER, D.D. The release of cytochrome *c* from mitochondria: a primary site for Bcl-2 regulation of apoptosis. **Science**, v. 275, p. 1132–1136, 1997.

KONDO, T.; IMAMURA, T.; ICHIHASHI, H. In vitro test for sensitivity of tumor to carcinostatic agents. **Gann**, v. 57, p. 113-121, 1966.

KONG, Q.; BEEL, J.A.; LILLEHEI, K.O. A threshold concept for cancer therapy. **Med. Hypotheses**, v. 55, p. 29–35, 2000.

KONGKATHIP, N.; KONGKATHIP, B.; SIRIPONG, P.; SANGMA, C.; LUANGKAMIN, S.; NIYOMDECHA, M.; PATTANAPA, S.; PIYAVIRIYAGUL, S.; KONGSAEREE, P. Potent antitumor activity of synthetic 1,2-naphthoquinones and 1,4-naphthoquinones. **Bioorg. Med. Chem.**, v. 11, p. 3179-3191, 2003.

KOOPMAN, G.; REUTELINGSPERGER, C.P.M.; KUIJTEN, G.A.M.; KEEHNEN, R.M.J.; PALS, S.T.; VAN OERS, M.H.J. Annexin V for flow cytometry detection of phosphatidylserine expression on B cells undergoing apoptosis. **Blood**, v. 84, p. 1415-1420, 1994.

KRISHNAN, P.; BASTOW, K.F. Novel mechanisms of DNA topoisomerase II inhibition by pyranonaphthoquinone derivatives - eleutherin, α -lapachone, and β -lapachone. **Biochem. Pharmacol.**, v. 60, p.1367-1379, 2000.

KROEMER, G.; REED, J.C. Mitochondrial control of cell death. **Nat. Med.**, v. 6, p. 513-516, 2000.

KROEMER, G.; EL-DEIRY, W. S.; GOLSTEIN, P.; PETER, M. E.; VAUX, D.; VANDENABEELE, P.; ZHIVOTOVSKY, B.; BLAGOSKLONNY, M.V.; MALORNI, W.; KNIGHT, R.A.; PIACENTINI, M.; NAGATA, S.; MELINO, G. Classification of cell death: recommendations of the Nomenclature Committee on Cell Death. **Cell Death Differ.**, v. 2, suppl. 2, p. 1463-1467, 2005.

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

KROHN, A.J.; WAHLBRINK, T.; PREHN, J.H.M. Mitochondrial depolarization is not required for neuronal apoptosis. **J. Neurosci.**, v. 19, p. 7394–7404, 1999.

KROKAN, H.E.; STANDAL, R.; SLUPPHAUG, G. DNA glycosylases in the base excision repair of DNA. **Biochem. J.**, v. 325, pt. 1, p. 1-16, 1997.

KROVAT, B.C.; TRACY, J.H.; OMIECINSKI, C.J. Fingerprint of cytochrome P450 and microsomal epoxide hydrolase gene expression in human blood cells. **Toxicol. Sci.**, v. 55, p. 352-360, 2000.

KRYSKO, D.V.; BERGHE, T.V.; D'HERDE, K.; VANDENABEELE, P. Apoptosis and necrosis: detection, discrimination and phagocytosis. **Methods**, v. 44, p. 205-221, 2008.

KUMAR, G.S.; LIPMAN, R.; CUMMINGS, J.; TOMASZ, M. Mitomycin C-DNA adducts generated by DT-diaphorase: revised mechanism of enzymatic reductive activation of mitomycin C. **Biochemistry**, v. 27, p. 2608-2614, 1988.

KUMAR, M.R.S.; AITHAL, K.; RAO, B.N.; UDUPA, N.; RAO, B.S.S. Cytotoxic, genotoxic and oxidative stress induced by 1,4-naphthoquinone in B16F1 melanoma tumor cells. **Toxicol. Vitro**, v. 23, p. 242-250, 2009.

KUNG, H.N.; CHIEN, C.L.; CHAU, G.Y.; DON, M.J.; LU, K.S.; CHAU, Y.P. Involvement of NO/cGMP signaling in the apoptotic and anti-angiogenic effects of β -lapachone on endothelial cells *in vitro*. **J. Cell. Physiol.**, v. 211, p. 522-532, 2007.

KUZMINOV, A. Single-strand interruptions in replicating chromosomes cause double-strand breaks. **Proc. Natl. Acad. Sci. USA**, v. 98, p. 8241-8246, 2001.

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

LEE, J.H.; CHEONG, J.H.; PARK, Y.M.; CHOI, Y.H. Down-regulation of cyclooxygenase-2 and telomerase activity by β -lapachone in human prostate carcinoma cells. **Pharmacol. Res.**, v. 51, p. 553-560, 2005.

LEE, J.I.; CHOI, D.Y.; CHUNG, H.S.; SEO, H.G.; WOO, H.J.; CHOI, B.T.; CHOI, Y. H. β -Lapachone Induces Growth Inhibition and Apoptosis in Bladder Cancer Cells by Modulation of Bcl-2 Family and Activation of Caspases. **Exp. Oncol.**, v. 28, p. 30-35, 2006.

LEHNE, G.; ELONEN, E.; BAEKELANDT, M.; SKOVSGAARD, T.; PETERSON, C. Challenging drug resistance in cancer therapy – review of the first Nordic conference on chemoresistance in cancer treatment. **Acta Oncol.**, v. 37, p. 431-439, 1998.

LEITE, M.; QUINTA-COSTA, M.; LEITE, P.S.; GUIMARAES, J.E. Critical evaluation of techniques to detect and measure cell death-study in a model of UV radiation of the leukemic cell line HL-60. **Anal. Cell Pathol.**, v. 19, p. 139-151, 1999.

LEMASTERS, J. J. Mechanisms of Hepatic Toxicity V. Necrapoptosis and the mitochondrial permeability transition: shared pathways to necrosis and apoptosis. **Am. J. Physiol.**, v. 276, p. 1-6, 1999.

LEONARD, S.S.; CUTLER, D.; DING, M.; VALLYATHAN, V.; CASTRANOVA, V.; SHI, X. Antioxidant properties of fruit and vegetable juices: more to the story than ascorbic acid. **Ann. Clin. Lab. Sci.**, v. 32, p. 193-200, 2000.

LI, C.J.; AVERBOUKH, L.; PARDEE, A.B. β -Lapachone: a novel DNA topoisomerase I inhibitor with a mode of action different from camptothecin. **J. Biol. Chem.**, v. 268, p. 22463-22468, 1993a.

LI, C.J.; ZHANG, L.J.; DEZUBE, B.J.; CRUMPACKER, C.S.; PARDEE, A.B. Three inhibitors of type 1 human immunodeficiency virus long terminal repeat-directed gene expression and virus replication. **Proc. Natl. Acad. Sci. USA**, v. 90, p. 1839-1842, 1993b.

LI, C.J.; WANG, C.; PARDEE, A.B. Induction of apoptosis by β -lapachone in human prostate cancer cells. **Cancer Res.**, v. 55, p. 3712-3715, 1995.

LI, C.J.; LI, Y.Z.; PINTO, A.V.; PARDEE, A.B. Potent inhibition of tumor survival *in vivo* by β -lapachone plus taxol: combining drugs imposing different artificial checkpoints. **Proc. Natl. Acad. Sci. USA**, v. 96, p. 13369-13374, 1999.

- LI, K.; LI, Y.; SHELTON, J.M.; RICHARDSON, J.A.; SPENCER, E.; CHEN, Z.J.; XIADONG, W.; WILLIAMS, R.S. Cytochrome *c* deficiency causes embryonic lethality and attenuates stress-induced apoptosis. **Cell**, v. 101, p. 389–399, 2000.
- LI, Y.; SUN, X.; LAMONT, J.T.; PARDEE, A.B.; LI, C.J. Selective killing of cancer cells by β -lapachone: direct checkpoint activation as a strategy against cancer. **Proc. Natl. Acad. Sci. USA**, v. 100, p. 2674–2678, 2003.
- LI, C.J. Therapeutic Biology: checkpoint pathway activation therapy, HIV tat, and transkingdom RNA interference. **J. Cell. Physiol.**, v. 209, p. 695-700, 2006a.
- LI, C.; NEMUNAITIS, J.; SENZER, N.; EDELMAN, G.; GLASNER, S.; DOMBAL, G.; DOVHOLUK, A.; CUNNINGHAM, C. A phase Ib trial of ARQ 501, a selective checkpoint activator, in combination with docetaxel in patients with advanced solid tumors. **J. Clin. Oncol.**, v. 24, suppl., p. 13053, 2006b.
- LI, J.; LEE, B.; LEE, A.M. Endoplasmic reticulum stress-induced apoptosis: multiple pathways and activation of p53-up-regulated modulator of apoptosis (puma) and noxa by p53. **J. Biol. Chem.**, v. 281, p.7260-7270, 2006c.
- LIAO, W.; MCNUTT, M.A.; ZHU, W.G. The comet assay: A sensitive method for detecting DNA damage in individual cells. **Methods**, v. 48, p. 46-53, 2009.
- LIU, B.; ANDRIEU-ABADIE, N.; LEVADE, T.; ZHANG, P.; OBEID, L.M.; HANNUN, Y.A. Glutathione regulation of neutral sphingomyelinase in tumor necrosis factor-alpha-induced cell death. **J. Biol. Chem.**, v. 273, p. 11313-11320, 1998.
- LIU, T.J.; LIN, S.Y.; CHAU, Y.P. Inhibition of poly(ADP-ribose) polymerase activation attenuates β -lapachone-induced necrotic cell death in human osteosarcoma cells. **Toxicol. Appl. Pharmacol.**, v. 182, p.116-125, 2002.
- LOEFFLER, M.; KREMER, G. The mitochondrion in cell death control: certainties and incognita. **Exp. Cell. Res.**, v. 256, p. 19-26, 2000.
- LONGLEY, D.B.; JOHNSTON, P.G. Molecular mechanisms of drug resistance. **J. Pathol.**, v. 205, p. 275–292, 2005.
- LOVELL, D.P.; THOMAS, G.; DUBROW, R. Issue related to the experimental design and subsequent statistical analysis of *in vivo* and *in vitro* comet assay. **Teratog. Carcinog. Mutag.**, v. 19, p. 109-119, 1999.
- LYONS, A. S.; PETRUCCELLI, R. J. **Medicine**: an illustrated history. New York: Harry Adams, 1987.
- MACKLIS, J.D.; MADISON, R.D. Progressive incorporation of propidium iodide in cultured mouse neurons correlates with declining electrophysiological status: a fluorescence scale of membrane integrity. **J. Neurosci. Methods**, v. 31, p. 43 – 46, 1990.
- MADDIKA, S.; ANDE, S.R.; PANIGRAHI, S.; PARANJOTHY, T.; WEGLARCZYK, K.; ZUSE, A.; ESHRAGHI, M.; MANDA, K.D.; WIECHEC, E.; LOS, M. Cell survival, cell death and cell cycle pathways are interconnected: implications for cancer therapy. **Drug Resist. Updat.**, v. 10, p. 13-29, 2007.

MAEDA, M.; MURAKAMI, M.; TAKEGAMI, T.; OTA, T. Promotion or suppression of experimental metastasis of B16 melanoma cells after oral administration of lapachol. **Toxicol. Appl. Pharmacol.**, v. 229, p. 232-238, 2008.

MARCELLI, M.; CUNNINGHAM, G.R.; WALKUP, M.; HE, Z.; STURGIS, L.; KAGAN, C.; MANNUCCI, R.; NICOLETTI, I.; TENG, B.; DENNER, L. Signaling pathway activated during apoptosis of the prostate cancer cell line LNCaP: overexpression of caspase-7 as a new gene therapy strategy for prostate cancer. **Cancer Res.**, v. 59, p. 382-390, 1999.

MARCHETTI, P.; CASTEDO, M.; SUSIN, S.A.; ZAMZAMI, N.; HIRSCH, T.; MACHO, A.; HAEFFNER, N.; HIRSCH, F.; GEUSKENS, M.; KROEMER, G. Mitochondrial permeability transition is a central coordinating event of apoptosis. **J. Exp. Med.**, v. 184, p. 1155 – 1160, 1996.

MARKMAN, M. Cancer drug development: problems and opportunities. **Drugs Inform. J.**, v. 32, p. 1-5, 1998.

MARTIN, S.J.; REUTELINGSPERGER, C.P.M.; MCGAHON, A.J.; RADER, J.A.; VAN SCHIE, R.C.A.A.; LAFACE, D.M.; GREEN, D.R. Early redistribution of plasma membrane phosphatidylserine is a general feature of apoptosis regardless of the initiating stimulus: inhibition by overexpression of Bcl-2 and abl. **J. Exp. Med.**, v. 182, p. 1545-1556, 1995.

MARTIN, Y.C.; CRITCHLOW, R.E. Beyond mere diversity: tailoring combinatorial libraries for drug discovery. **J. Comb. Chem.**, v. 1, p. 32-45, 1999.

MARTÍNEZ, M.J.A.; BENITO, P.B. Biological activity of quinones. **Stud. Nat. Prod. Chem.**, v. 30, p. 303-366, 2005.

MATSUOKA, A.; YAMAZAKI, N.; SUZUKI, T.; HAYASHI, M.; SOFUNI, T. Evaluation of the micronucleus test using a Chinese hamster cell line as an alternative to the conventional in vitro chromosomal aberration test. **Mutat. Res.**, v. 272, n. 3, p. 223–236, 1992.

MCGAHON, A. J.; MARTIN, S. M.; BISSONNETTE, R. P.; MAHBOUBI, A.; SHI, Y.; MOGIL, R. J.; NISHIOKA, W. K.; GREEN, D.R. The end of the (cell) line: methods for the study of apoptosis in vitro. **Meth. Cell Biol.**, v. 46, p. 153 – 185, 1995.

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

MELAMED, M. R.; MULLANEY, P. F.; MENDELSON, M. L. **Flow cytometry and sorting**. New York: John Wilwy & Sons, 1979.

MERAD-SAIDOUNE, M.; BOITIER, E.; NICOLE, A.; MARSAC, C.; MARTINOU, J. C.; SOLA, B. Overproduction of Cu/Zn-superoxide dismutase or Bcl- 2 prevents the brain mitochondrial respiratory dysfunction induced by glutathione depletion. **Exp. Neurol.**, v. 158, p. 428-436, 1999.

MI, Q.; LANTVIT, D.; REYES-LIM, E.; CHAI, H.; ZHAO, W.; LEE, I.S.; PERAZ-SÁNCHEZ, S.; NGASSAPA, O.; KARDONO, L.B.S.; RISWAN, S.; HOLLINGSHEAD, M.G.; MAYO, J.G.; FARNSWORTH, N.R.; CORDELL, G.A.; KINGHORN, A.D.; PEZZUTO, J.M. Evaluation of the potential cancer chemotherapeutic efficacy of natural product isolates employing *in vivo* hollow fiber tests. **J. Nat. Prod.**, v. 65, p. 842-850, 2002.

MIAO, X.S.; SONG, P.; SAVAGE, R.E.; ZHONG, C.; YANG, R.Y.; KIZER, D.; WU, H.; VOLCKOVA, E.; ASHWELL, M.A.; SUPKO, J.G.; HE, X.; CHAN, T.C.K. Identification of the *in Vitro* Metabolites of 3,4-Dihydro-2,2-dimethyl-2H-naphthol[1,2-b]pyran-5,6-dione (ARQ 501; β -Lapachone) in Whole Blood. **Drug Metab. Dispos.**, v. 36, p. 641-648, 2008.

MIDDLETON, G.; GHANEH, P.; COSTELLO, E.; GREENHALF, W.; NEOPTOLEMOS, J.P. New treatment options for advanced pancreatic cancer. **Exp. Rev. Gastroenterol. Hepatol.**, v. 2, p. 673-696, 2008.

MIKAMI, K.; NAITO, M.; ISHIGURO, T.; YANO, H.; TOMIDA, A.; YAMADA, T.; TANAKA, N.; SHIRAKUSA, T.; TSURUO, T. Immunological quantitation of DT-diaphorase in carcinoma cell lines and clinical colon cancers: advanced tumors express greater levels of DT-diaphorase. **Jpn. J. Cancer Res.**, v. 89, p. 910-915, 1998.

MILITAO, G.C.G.; DANTAS, I.N.F.; PESSOA, C.; FALCÃO, M.J.C.; SILVEIRA, E.R.; LIMA, M.A.S.; CURI, R.; LIMA, T.; MORAES, M.O.; COSTA-LOTUFO, L.V. Induction of apoptosis by pterocarpanes from *Platymiscium floribundum* in HL-60 human leukemia cells. **Life Sci.**, v. 78, p. 2409 - 2417, 2006.

MINOTTI, G.; MENNA, P.; SALVATORELLI, E.; CAIRO, G.; GIANNI, L. Anthracyclines: molecular advances and pharmacologic developments in antitumor activity and cardiotoxicity. **Pharmacol. Rev.**, v. 56, p. 185-229, 2004.

MONKS, T.J.; HANZLIK, R.P.; COHEN, G.M.; ROSS, D.; GRAHAM, D.G. Quinone chemistry and toxicity. **Toxicol. Appl. Pharmacol.**, v. 112, p. 2-16, 1992.

MOSMANN, T. Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: application to proliferation and cytotoxicity assays. **J. Immunol. Methods**, v. 16, p. 55 - 63, 1983.

MUNDAY, R.; SMITH, B.L.; MUNDAY, C.M. Comparative toxicity of 2-hydroxy-3-alkyl-1,4-naphthoquinones in rats. **Chem. Biol. Interact.**, v. 98, p. 185-192, 1995.

MUNDAY, R. Autoxidation of naphthohydroquinones: effects of metals, chelating agents and superoxide dismutase. **Free Radic. Biol. Med.**, v. 22, p. 689-695, 1997.

MUNDAY, R.; SMITH, B.L.; MUNDAY, C.M. Structure-activity relationships in the haemolytic activity and nephrotoxicity of derivatives of 1,2- and 1,4-naphthoquinone. **J. Appl. Toxicol.**, v. 27, p. 262-269, 2007.

NAGAI, F.; HIYOSHI, Y.; SUGIMACHI, K.; TAMURA, H.O. Cytochrome P450 (CYP) expression in human myeloblastic and lymphoid cell lines. **Biol. Pharm. Bull.**, v. 25, p. 383-385, 2002.

NAISMITH, J.H.; SPRANG, S.R. Modularity in the TNF-receptor family. **Trends Biochem. Sci.**, v. 23, p. 74-79, 1998.

NAKABEPPU, Y.; SAKUIMI, K.; SAKAMOTO, K.; TSUCHIMOTO, D.; TSUZUKI, T.; NAKATSU, Y. Mutagenesis and carcinogenesis caused by the oxidation of nucleic acids. **Biol. Chem.**, v. 387, p. 373-379, 2006.

NAKAMURA, Y.; KAWAKAMI, M.; YOSHIHIRO, M.A.; MIYOSHI, N.; OHIGASHI, H.; KAWAI, K.; OSAWA, T.; UCHIDA, K. Involvement of mitochondrial death pathway in chemopreventive benzyl isothiocyanate-induced apoptosis. **J. Biol. Chem.**, v. 277, p. 8492-8499, 2002.

NAKAYAMA, G.R.; CATON, M.C.; NOVA, M.P.; PARANDOOSH, Z. Assessment of the Alamar blue assay for cellular growth and viability in vitro. **J. Immunol. Methods**, v. 204, p. 205-208, 1997.

NASONGKLA, N.; WIEDMANN, A.F.; BRUENING, A.; BEMAN, M.; RAY, D.; BORNMANN, W.G.; BOOTHMAN, D.A.; GAO, J. Enhancement and bioavailability of beta-lapachone using cyclodextrin inclusion complexes. **Pharm. Res.**, v. 20, p. 1626-1633, 2003.

NEAME, S.J.; RUBBIN, L.L.; PHILPOTT, K.L. Blocking cytochrome *c* activity within intact neurons inhibits apoptosis. **J. Cell Biol.**, v. 142, p. 1583-1593, 1998.

NEMEIKAITĖ-CENIENE, A.; SARLAUSKAS, J.; ANUSEVICIUS, Z.; NIVINSKAS, H.; CENAS, N. Cytotoxicity of RH1 and related aziridinybenzoquinones: involvement of activation by NAD(P)H:quinine oxidoreductase (NQO1) and oxidative stress. **Arch. Biochem. Biophys.**, v. 416, p. 110-118, 2003.

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

NEWMAN, D.J.; CRAGG, G.M. Natural products as sources of new drugs over the last 25 years. **J. Nat. Prod.**, v. 70, p. 461-477, 2007.

NICHOLSON, D.W. Caspase structure, proteolytic substrates, and function during apoptotic cell death. **Cell Death Differ.**, v. 6, p. 1028-1042, 1999.

NICHOLSON, D.W. From bench to clinic with apoptosis-based therapeutic agents. **Nature**, v. 407, p. 810-816, 2000.

NICOLETTI, I.; MIGLIORATI, G.; PAGLIACCI, M.C.; GRIGNANI, F.; RICCARDI, C. 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.

NIOI, P.; HAYES, J.D. Contribution of NAD(P)H:quinone oxidoreductase 1 to protection against carcinogenesis, and regulation of its gene by the Nrf2 basic-region leucine zipper and the arylhydrocarbon receptor basic helix-loop-helix transcription factors. **Mutat. Res.**, v. 555, p. 149-171, 2004.

NORPPA, H. Cytogenetic biomarkers. **IARC Sci. Publ.**, v. 157, p. 179-205, 2004.

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

O'BRIEN, J.; WILSON, I.; ORTON, T.; POGNAN, F. Investigation of the Alamar Blue (Resazurin) fluorescent dye for the assessment of mammalian cell cytotoxicity. **Eur. J. Biochem.**, v. 267, p. 5421-5426, 2000.

O'BRIEN, J.; WILSON, I.; ORTON, T.; POGNAN, F. Investigation of the Alamar Blue (resazurin) fluorescent dye for the assessment of mammalian cell cytotoxicity. **Eur. J. Biochem.**, v. 267, p. 5421-5426, 2000.

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. 56, p. 53-55, 2002.

OLLINGER, K.; BRUNK, U.T. Oxidative stress-induced cellular injury is mediated through lysosomal damage. **Free Radic. Biol. Med.**, v. 19, p. 565-574, 1995.

ONUKE, J.; TEIXEIRA, P.C.; MEDEIROS, M.H.G.; DI MASCIO, P.D. Danos ao DNA promovidos por ácido 5-aminolevulínico: possível associação com o desenvolvimento de carcinoma hepatocelular em portadores de porfiria guda intermitente. **Quím. Nova**, v. 25, p. 594-608, 2002.

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

OTSUKI, Y.; LI, Z.; SHIBATA, M.A. Apoptotic detection methods: from morphology to gene. **Progr. Histochem. Cytochem.**, v. 38, p. 275-340, 2003.

OUGH, M.; LEWIS, A.; BEY, E.A.; GAO, J.; RITCHIE, J.M.; BORNEMANN, W.; BOOTHMAN, D.A.; OBERLEY, L.W.; CULLEN, J.J. Efficacy of beta-lapachone in pancreatic cancer treatment: exploiting the novel, therapeutic target NQO1. **Cancer. Biol. Ther.**, v. 4, p. 95-102, 2005.

PALMER, M.; VULICEVIC, I.; SAWELJEW, P.; VALEVA, A.; KEHOE, M.; BHAKDI, S. Streptolysin-O: a proposed model of allosteric interaction between a pore-forming protein and its target lipid bilayer. **Biochemistry**, v. 37, p. 2378-2383, 1998.

PARDEE, A.B.; LI, Y.Z.; LI, C.J. Cancer therapy with beta-lapachone. **Curr. Cancer Drug Targets**, v. 2, p. 227-242, 2002.

PATERSON, I.; ANDERSON, A. The renaissance of natural products as drug candidates. **Science**, v. 310, p. 451-453, 2005.

PAVLOV, Y.I.; SHCHERBAKOVA, P.V. DNA polymerases at the eukaryotic fork - 20 years later. **Mutat. Res.**, v. 685, n. ½, p. 45-33, 2010.

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

- PERA, F.; MATTIAS, P.; DETZER, K. Methods for determining the proliferation kinetics of cells by means of 5-bromodeoxyuridine. **Cell Tissue Kinet.**, v.10, p. 255–264, 1977.
- PEREZ, C.; DE CERAIN, L.; BELLO, J. Induction of micronuclei in V79 cells after combined treatments with heterocyclic aromatic amines. **Food Chem. Toxicol.**, v. 40, p. 1463-1467, 2002.
- PERRY, N.B.; BLUNT, J.W.; MUNRO, M.H.G. A cytotoxic and antifungal 1,4-naphthoquinone and related compounds from a New Zealand brown alga, *Landsburgia quercifolia*. **J. Nat. Prod.**, v. 54, p. 978-985, 1991.
- PERVAIZ, S.; CLEMENT, M.V. Tumor intracellular redox status and drug resistance- serendipity or a casual relationship? **Curr. Pharm. Desing**, v. 10, p. 1969-1977, 2004.
- PETER, A.G.M. The role of plant-derived drugs and herbal medicines in healthcare. **Drugs**, v. 54, p. 801-840, 1997.
- PETROVA, S.A.; KOLODYAZHNY, M.V.; KSENZHEK, O.S. Electrochemical properties of some naturally occurring quinones. **J. Electroanal. Chem.**, v. 277, p. 189-196, 1990.
- PEZZUTO, J.M. Plant-derived anticancer agents. **Biochem. Pharmacol.**, v. 53, p. 121-113, 1997.
- PFUHLER, S.; WOLF, H.U. Detection of DNA-crosslinking agents with the alkaline comet assay. **Environ. Mol. Mutagen.**, v. 27, p. 196-201, 1996.
- PHILLIPS, R.M.; JAFFAR, M.; MAITLAND, D.J.; LOADMAN, P.M.; SHNYDER, S.D.; STEANS, G.; COOPER, P.A.; RACE, A.; PATTERSON, A.V.; STRATFORD, I.J. Pharmacological and biological evaluation of a series of substituted 1,4-naphthoquinone bioreductive drugs. **Biochem. Pharmacol.**, v. 68, p. 2107-2116, 2004.
- PINK, J.J.; PLANCHON, S.M.; TAGLIARINO, C.; VARNES, M.E.; SIEGEL, D.; BOOTHMAN, D.A. NAD(P)H: quinone oxidoreductase activity is the principal determinant of β -lapachone cytotoxicity. **J. Biol. Chem.**, v. 275, p. 5416-5424, 2000a.
- PINK, J.J.; WUERZBERGER-DAVIS, S.; TAGLIARINO, C.; PLANCHON, S.M.; YANG, X.H.; FROELICH, C.J.; BOOTHMAN, D.A. Activation of a cysteine protease in MCF-7 and T47D breast cancer cells during β -lapachone-mediated apoptosis. **Exp. Cell Res.**, v. 255, p. 144-155, 2000b.
- PINTO, A.C.; SILVA, D.H.S.; BOLZANI, V.S.; LOPES, N.P.; EPIFANIO, R.A. Produtos naturais: atualidade, desafios e perspectivas. **Quím. Nova**, v. 25, p. 45 -61, 2002.
- PINTO, A.V.; DE CASTRO, S.L. The trypanocidal activity of naphthoquinones: a review. **Molecules**, v. 14, p. 4570-4590, 2009.
- PLANCHON, S.M.; WUERZBERGER, S.; FRYDMAN, B.; WITIAK, D.T.; HUTSON, P.; CHURCH, D.R.; WILDING, G.; BOOTHMAN, D.A. β -lapachone-mediated apoptosis in human promyelocytic leukemia (HL-60) and human prostate cancer cells: a p53-independent response. **Cancer Res.**, v. 55, p. 3706-3711, 1995.

PLANCHON, S.M.; WUERZBERGER-DAVIS, S.M.; PINK, J.J.; ROBERTSON, K.A.; BORNMANN, W.G.; BOOTHMAN, D.A. Bcl-2 protects against β -lapachone-mediated caspase 3 activation and apoptosis in human myeloid leukemia (HL-60) cells. **Oncol. Rep.**, v. 6, p. 485-492, 1999.

PLANCHON, S.M.; PINK, J.J.; TAGLIARINO, C.; BORNMANN, W.G. β -Lapachone-induced apoptosis in human prostate cancer cells: involvement of NQO1/xip3. **Exp. Cell Res.**, v. 267, p. 95-106, 2001.

PLYTA, Z.F., LI, T.; PAPAGEORGIOU, V.P.; MELLIDIS, A.S.; ASSIMOPOULOU, A.N.; PITSINOS, E.N.; COULADOUROS, E.A. Inhibition of topoisomerase I by naphthoquinone derivatives. **Bioorg. Med. Chem. Lett.**, v. 8, p. 3385-3390, 1998.

POLI, G.; BIASI, F.; CHIARPOTTO, E. Oxidative stress and cell signaling. **Curr. Med. Chem.**, v. 11, p. 1163-1182, 2004.

PORTELA, M.P.M.; STOPPANI, A.O.M. Redox cycling of beta-lapachone and related *o*-naphthoquinones in the presence of dihydrolipoamide and oxygen. **Biochem. Pharmacol.**, v. 51, p. 275-283, 1996.

POWIS, G. Free radical formation by antitumor quinines. **Free Radic. Biol. Med.**, v. 6, p. 63-101, 1989.

POWIS, G.; BAKER, A. Redox signaling and the control of cell growth and death. **Adv. Pharmacol.**, v. 38, p. 329-359, 1997.

PROKOFEVA, N.G.; UTKINA, N.K.; CHAIKINA, E.L.; MAKARCHENKO, A.E. Biological activities of marine sesquiterpenoid quinones: structure-activity relationships in cytotoxic and hemolytic assays. **Comp. Biochem. Physiol. B Biochem. Mol. Biol.**, v. 139, p. 169-173, 2004.

PURI, R.; PALIT, V.; LOADMAN, P.M.; FLANNIGAN, M.; SHAH, T.; CHOUDRY, G.A.; BASU, S.; DOUBLE, J.A.; LENAZ, G.; CHAWLA, S.; BEER, M.; VAN KALKEN, C.; DE BOER, R.; BEIJNEN, J.H.; TWELVES, C.J.; PHILLIPS, R.M. Phase I/II pilot study of intravesical apaziquone (EO9) for superficial bladder cancer. **J. Urol.**, v. 176, p. 1344-1348, 2006.

PURSCHE, M.; JACOBI, H.; WITTE, I. Differences in genotoxicity of H₂O₂ and tetrachlorohydroquinone in human fibroblasts. **Mutat. Res.**, v. 513, p. 159-167, 2002.

QUEIROZ, M.L.S.; VALADARES, M.C.; TORELLO, C.O.; RAMOSA, A.L.; OLIVEIRA, A.B.; ROCHA, F.D.; ARRUDA, V.A.; ACCORCI, W.R. Comparative studies of the effects of *Tabebuia avellaneda* bark extract and β -lapachone on the hematopoietic response of tumour-bearing mice. **J. Ethnopharmacol.**, v. 117, p. 228-235, 2008.

RADJENDIRANE, V.; JOSEPH, P.; JAISWAL, A.K. Gene expression of DT-diaphorase in cancer cells. In: **Oxidative Stress and Signal Transduction**. New York: Chapman and Hall, 1997. p. 441-475.

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.

RAO, K.V. Quinone natural products: streptonigrin (NSC-45383) and lapachol (NSC-11905) structure-activity relationships. **Cancer Chemother. Rep** 2, v. 4, p. 11-17, 1974.

RAUTH, A.M.; GOLDBERG, Z.; MISRA, V. DT-diaphorase: possible roles in cancer chemotherapy and carcinogenesis. **Oncol. Res.**, v. 9, p. 339-349, 1997.

RAVELO, A.G.; ESTEVEZ-BRAUN, A.; CHAVEZ-ORELLANA, H.; PEREZ-SACAU, E.; MESA-SIVERIO, D. Recent studies on natural products as anticancer agents. **Curr. Top. Med. Chem.**, v. 4, p. 241-265, 2004.

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

REID, R.J.D.; BENEDETTI, P.; BJORNSTI, M.A. Yeast as a model organism for studying the actions of DNA topoisomerase-targeted drugs. **Biochim. Biophys. Acta**, v. 1400, n. 1/3, p. 289-300, 1998.

REINICKE, K.E.; BEY, E.A.; BENTLE, M.S.; PINK, J.J.; INGALLS, S.T.; HOPPEL, C.L.; MISICO, R.I.; ARZAC, G.M.; BURTON, G.; BORNMANN, W.G.; SUTTON, D.; GAO, J.; BOOTHMAN, D.A. 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.

RICCI, M. S.; ZONG, W-X. Chemotherapeutic approaches for targeting cell death pathways. **Oncologist**, v. 1, p. 342-357, 2006.

RIFFEL, A.; MEDINA, L.F.; STEFANI, V.; SANTOS, R.C.; BIZANI, D.; BRANDELLI, A. *In vitro* antimicrobial activity of a new series of 1,4-naphthoquinones. **Braz. J. Med. Biol. Res.**, v. 35, p. 811-818, 2002.

ROGOJINA, A.T.; NITISS, J.L. Isolation and Characterization of mAMSA-hypersensitive mutants: cytotoxicity of Top2 covalent complexes containing DNA single strand breaks. **J. Biol. Chem.**, v. 283, p. 29239-29250, 2008.

ROSS, D.; BEALL, H.; TRAVER, R.D.; SIEGEL, D.; PHILLIPS, R.M.; GIBSON, N.W. Bioactivation of quinones by DT-diaphorase, molecular, biochemical, and chemical studies. **Oncol. Res.**, v. 6, p. 493-500, 1994.

ROSS, D.; BEAL, H.D.; SIEGEL, D.; TRAVER, R.D.; GUSTAFSON, D.L. Enzymology of bioreductive drug activation. **Br. J. Cancer**, v. 74, p. S1-S8, 1996.

ROSS, D.; KEPA, J.K.; WINSKI, S.L.; BEALL, H.D.; ANWAR, A.; SIEGEL, D. NAD(P)H:quinone oxidoreductase 1 (NQO1): chemoprotection, bioactivation, gene regulation and genetic polymorphisms. **Chem. Biol. Interact.**, v. 129, p. 77-97, 2000.

ROWE, L.A.; DEGTYAREVA, N.; DOETSCH, P.W. DNA damage-induced reactive oxygen species (ROS) stress response in *Saccharomyces cerevisiae*. **Free Radic. Biol. Med.**, v. 45, p. 1167-1177, 2008.

RZESZOWSKA-WOLNY, J.; POLANSKA, J.; PIETROWSKA, M.; PALYVODA, O.; JAWORSKA, J.; BUTKIEWICZ, D.; HANCOCK, R. Influence of polymorphisms in DNA repair genes XPD, XRCC1 and MGMT on DNA damage induced by gamma radiation and its repair in lymphocytes in vitro. **Radiat. Res.**, v. 164, p. 132–140, 2005.

SALMON, T. B.; EVERT, B. A.; SONG, B.; DOETSCH, P. W. Biological consequences of oxidative stress-induced DNA damage in *Saccharomyces cerevisiae*. **Nucleic Acids Res.**, v. 32, p. 3712–3723, 2004.

SALUSTIANO, E.J.S.; NETTO, C.D.; FERNANDES, R.F.; DA SILVA, A.J.M.; BACELAR, T.S.; CASTRO, C.P.; BUARQUE, C.D.; MAIA, R.C.; RUMJANEK, V.M.; COSTA, P.R. Comparison of the cytotoxic effect of lapachol, α -lapachone and pentacyclic 1,4-naphthoquinones on human leukemic cells. **Invest. New Drugs**, v. 28, n. 2, p. 139-144, 2010.

SANCAR, A.; LINDSEY-BOLTZ, L.A.; UNSAL-KACMAZ, K.; LINN, S. Molecular mechanisms of mammalian DNA repair and the DNA damage checkpoints. **Annu. Rev. Biochem.**, v. 73, p. 39-85, 2004.

SANDUR, S.K.; PANDEY, M.K.; SUNG, B.; AGGARWALL, B.B. 5-hydroxy-2-methyl-1,4-naphthoquinone, a vitamin K3 analogue, suppresses STAT3 activation pathway through induction of protein tyrosine phosphatase, SHP-1: potential role in chemosensitization. **Mol. Cancer Res.**, v. 8, p. 107-118, 2010.

SARASTE, A.; PULKKI, K. Morphologic and biochemical hallmarks of apoptosis. **Cardiovasc. Res.**, v. 45, p. 528-537, 2000.

SAVAGE, R.E.; TYLER, A.N.; MIAO, X.S.; CHAN, T.C.K. Identification of a novel glucosylsulfate conjugate as a metabolite of 3,4-dihydro-2,2-dimethyl-2H-naphtho[1,2-b]pyran-5,6-dione (ARQ 501, β -Lapachone) in mammals. **Drug Metab. Dispos.**, v. 36, p. 753-758, 2008.

SAVITSKIY, V.P.; SHMAN, T.; POTAPNEV, M.P. Comparative measurement of spontaneous apoptosis in pediatric acute leukemia by different techniques. **Cytometry**, v. 56, p. 16-22, 2003.

SAWAMURA, A. O.; AOYAMA, T.; TAMAKOSHI, K.; MIZUNO, K.; SUGANUMA, N.; KIKKAWA, F.; TOMODA, Y. Transfection of human cytochrome P-450 reductase cDNA and its effect on the sensitivity to toxins. **Oncology**, v. 53, p. 406-411, 1996.

SCHAFFNER-SABBA, K.; SCHMIDT-RUPPIN, K.H.; WEHRLI, W.; SCHUERCH, A.R.; WASLEY, J.W. β -lapachone: synthesis of derivatives and activities in tumor models. **J. Med. Chem.**, v. 27, p. 990-994, 1984.

SCHAFFER, F.Q.; BUETTNER, G.R. Redox environment of the cell as viewed through the redox state of the glutathione disulfide/glutathione couple. **Free Radic. Biol. Med.**, v. 30, p. 1191–1212, 2001.

SCHLAGER, J.J.; POWIS, G. Cytosolic NAD(P)H:(quinone-acceptor) oxidoreductase in human normal and tumor tissue: effects of cigarette smoking and alcohol. **Int. J. Cancer**, v. 45, p. 403–409, 1990.

SCHMIDT, T. J.; BOLLUM, F.J.; LITWACK, G. Correlations between the activities of DNA polymerase α and the glucocorticoid receptor. **Proc. Natl. Acad. Sci. USA**, v. 79, p. 4555-4559, 1982.

SCHUERCH, A.R.; WEHRLI, W. A.R. β -Lapachone, an inhibitor of oncornavirus reverse transcriptase and eucaryotic DNA polymerase alfa. **Eur. J. Biochem.**, v. 84, p. 197-205, 1978.

SCHWARTZ, T.R.; KMIEC, E.B. Using methyl methanesulfonate (MMS) to stimulate targeted gene repair activity in mammalian cells. **Gene Therapy Mol. Biol.**, v. 9, p. 193-202, 2005.

SEKIYA, K.; SATOH, R.; DANBARA, H.; FUTAESAKU, Y. A ring-shaped structure with a crown formed by Streptolysin-O on the erythrocyte membrane. **J. Bacteriol.**, v. 175, p. 5953-5961, 1993.

SENTHIL, K.; ARANGANATHAN, S.; NALINI, N. Evidence of oxidative stress in the circulation of ovarian cancer patients. **Clin. Chim. Acta**, v. 339, p. 27-32, 2004.

SHAPIRO, H.M. **Practical flow cytometry**. New York: Alan R. Liss, Inc., 1985.

SHIMADA, A.; SHIBATA, T.; KOMATSU, K.; NIFUJI, A. Improved methods for immunohistochemical detection of BrdU in hard tissue. **J. Immunol. Methods**, v. 339, p. 11-16, 2008.

SIEBER, S.M.; MEAD, J.A.R.; ADAMSON, R.H. Pharmacology of antitumor agents from higher plants. **Cancer Treat. Rep.**, v. 60, p. 1127-1139, 1976.

SINGH, M.P.; MCCOY, M.; TICE, R.R.; SCHINEIDER, P. A simple technique for quantitation of low levels of DNA in individual cells. **Exp. Cell Res.**, v. 175, p. 184-191, 1988.

SKOV, K.A.; ADORNAT, H.; FARREL, N.P. Radiosensitization by nickel lapachol. **Int. J. Radiat. Biol.**, v. 64, p. 707-713, 1993.

SLUPPHAUG, G.; KAVLI, B.; KROKAN, H.E. The interacting pathways for prevention and repair of oxidative DNA damage. **Mutat. Res.**, v. 531, p. 231-251, 2003.

SMAILI, S.S.; HSU, Y.T.; CARVALHO, A.C.P.; ROSENSTOCK, T.R.; SHARPE, J.C.; YOULE, R.J. Mitochondria, calcium and pro-apoptotic proteins as mediators in cell death signaling. **Braz. J. Med. Biol. Res.**, v. 36, p. 183-190, 2003.

SOE, K.; HARTUNG, S.; GROSSE, F. Human topoisomerase I forms double cleavage complexes on natural DNA. **Biochem. Biophys. Res. Commun.**, v. 349, p. 178-185, 2006.

SONG, C.W.; CHAE, J.J.; CHOI, E.K.; HWANG, T.S.; KIM, C.; LIM, B.U.; PARK, H.J. Anti-cancer effect of bio-reductive drug beta-lapachon is enhanced by activating NQO1 with heat shock. **Int. J. Hyperthermia**, v. 24, p. 161-169, 2008.

STRASSBURG, A.; STRASSBURG, C.P.; MANNS, M.P.; TUKEY, R.H. Differential gene expression of NAD(P)H:quinone oxidoreductase and NRH:quinone oxidoreductase in human hepatocellular and biliary tissue. **Mol. Pharmacol.**, v. 61, p. 320-325, 2002.

STRASSER, A.; O'CONNOR, L.; DIXIT, V.M. Apoptosis signaling. **Annu. Rev. Biochem.**, v. 69, p. 217-245, 2000.

SULTAN, A.; SOKOLOVE, P.M. Palmitic acid opens a novel CsA-insensitive pore in the inner mitochondrial membrane. **Arch. Biochem. Biophys.**, v. 386, p. 37-51, 2001.

SUN, X.; LI, Y.; LI, W.; ZHANG, B.; WANG, A.J.; SUN, J.; MIKULE, K.; JIANG, Z.; LI, C.J. Selective induction of necrotic cell death in cancer cells by β -lapachona through activation of DNA damage response pathway. **Cell Cycle**, v. 5, p. 2029-2035, 2006.

SURRALLÉS, J.; XAMENA, N.; CREUS, A.; CATALÁN, J.; NORPPA, H.; MARCOS, R. Induction of micronuclei by five pyrethroid insecticides in whole blood and isolated human lymphocyte cultures. **Mutat. Res.**, v. 341, p. 169-184, 1995.

TAGLIARINO, C.; PINK, J.J.; DUBYAK, G.R.; NIEMINEN, A.L.; BOOTHMAN, D.A. Calcium is a key signaling molecule in β -lapachone-mediated cell death. **J. Biol. Chem.**, v. 276, p. 19150-19159, 2001.

TAMPO, Y.; YONAHARA, M. Enzymatic and molecular aspects of the antioxidant effect of menadione in hepatic microsomes. **Arch. Biochem. Biophys.**, v. 334, p. 163-174, 1996.

TAN, X.Z.; GROLLMAN, A.P.; SHIBUTANI, S. Comparison of the mutagenic properties of 8-oxo-7,8-dihydro-2'-deoxyadenosine and 8-oxo-7,8-dihydro-2'-deoxyguanosine DNA lesions in mammalian cells. **Carcinogenesis**, v. 20, p. 2287-2292, 1999.

TANDOM, V.K.; MAURYA, H.K.; MISHRA, N.N.; SHUKLA, P.K. Design, synthesis and biological evaluation of novel nitrogen and sulfur containing hetero-1,4-naphthoquinones as potent antifungal and antibacterial agents. **Eur. J. Med. Chem.**, v. 44, p. 3130-3137, 2009.

TICE, R.R.; AGURELL, E.; ANDERSON, D.; BURLINSON, B.; HARTMANN, A.; KOBAYASHI, H.; MIYAMAE, Y.; ROJAS, E.; RYU, J.C.; SASAKI, Y.F. Single cell gel/Comet assay: guidelines for in vitro and in vivo genetic toxicology testing. **Environ. Mol. Mutagen.**, v. 35, p. 206-221, 2000.

TRACHOOTHAM, D.; ALEXANDRE, J.; HUANG, P. Targeting cancer cells by ROS-mediated mechanisms: a radical therapeutic approach? **Nat. Rev. Drug Discov.**, v. 8, p. 579-591, 2009.

TROYANO, A.; SANCHO, P.; FERNANDEZ, C.; DE BLAS, E.; BERNARDI, P.; ALLER, P. The selection between apoptosis and necrosis is differentially regulated in hydrogen peroxide-treated and glutathione-depleted human promonocytic cells. **Cell Death Differ.**, v. 10, p. 889-898, 2003.

TRUSH, M.A.; MIMNAUGH, E.G.; GRAM, T.E. Activation of pharmacological agents to reactive intermediates: implications for the role of free radicals in drug action and toxicity. **Biochem. Pharmacol.**, v. 31, p. 3335-3346, 1982.

TUDOR, G.; GUTIERREZ, P.; AGUILERA-GUTIERREZ, A.; SAUSVILLE, E.A. Cytotoxicity and apoptosis of benzoquinones: redox cycling, cytochrome *c* release, and BAD protein expression. **Biochem. Pharmacol.**, v. 65, p. 1061-1075, 2003.

TUDOR, G.; ALLEY, M.; NELSON, C.M.; HUANG, R.; COVELL, D.G.; GUTIERREZ, P.; SAUSVILLE, E.A. Cytotoxicity of RH1: NAD(P)H:quinone acceptor oxidoreductase (NQO1)-independent oxidative stress and apoptosis induction. **Anticancer Drugs**, v. 16, p. 381-391, 2005.

VALKO, M.; IZAKOVIC, M.; MAZUR, M.; RHODES, C.J.; TELSER, J. Role of oxygen radicals in DNA damage and cancer incidence. **Mol Cell Biochem.**, v. 266, p. 37-56, 2004.

VALKO, M.; LEIBFRITZ, D.; MONCOL, J.; CRONIN, M.T.D.; MAZUR, M. Free radicals and antioxidants in normal physiological functions and human diseases. **Int. J. Biochem. Cell Biol.**, v. 39, p. 44-84, 2007.

VAN CRUCHTEN, S.; VAN DEN BROECK, W. Morphological and biochemical aspects of apoptosis, oncosis and necrosis. **Anat. Histol. Embryol.**, v. 31, p. 214-223, 2002.

VAN DER SCHOOT, S.C.; VAINCHTEIN, L.D.; BEIJNEN, J.H.; GORE, A.; MIREJOVSKY, D.; LENAZ, L.; NUIJEN, B. EO-9 bladder instillations: formulation selection based on stability characteristics and in vitro simulation studies. **Int. J. Pharm.**, v. 329, p. 135-141, 2007.

VAN LOO, G.; SAELENS, X.; VAN GURP, M.; MACFARLANE, M.; MARTIN, S.J.; VANDENABEELE, P. The role of mitochondrial factors in apoptosis: a Russian roulette with more than one bullet. **Cell Death Differ.**, v. 9, p. 1031-1042, 2002.

VANDER HEIDEN, M.G.; CHANDEL, N.S.; WILLIAMSON, E.K.; SCHUMACKER, P.T.; THOMPSON, C.B. Bcl-xL regulates the membrane potential and volume homeostasis of mitochondria. **Cell**, v. 91, p. 627-637, 1997.

VANNI, A.; FIORE, M.; DE SALVIA, R.; CUNDARI, E.; RICORDY, R.; CECCARELLI, R.; DEGRASSI, F. DNA damage and cytotoxicity induced by β -lapachone: relation to poly(ADP-ribose) polymerase inhibition. **Mutat. Res.**, v. 401, p. 55-63, 1998.

VERHAGEN, A.M.; EKERT, P.G.; PAKUSCH, M.; SILKE, J.; CONNOLY, L.M.; REID, G.E.; MORITZ, R.L.; SIMPSON, R.J.; VAUX, D.L. Identification of DIABLO, a mammalian protein that promotes apoptosis by binding to and antagonizing IAP proteins. **Cell**, v. 102, p. 43-53, 2000.

VERMES, I.; HAANEN, C.; STEFFENS-NAKKEN, H.; REUTELINGSPERGER, C. A novel assay for apoptosis. Flow cytometric detection of phosphatidylserine expression on early apoptotic cells using fluorescein labelled Annexin V. **J. Immunol. Methods**, v. 184, p. 39-51, 1995.

VIAU, C.M.; GUECHEVA, T.N.; SOUZA, F.G.; PUNGARTNIK, C.; BRENDDEL, M.; SAFFI, J.; HENRIQUES, J.A.P. SnCl₂-induced DNA damage and repair inhibition of MMS-caused lesions in V79 Chinese hamster fibroblasts. **Arch. Toxicol.**, v. 83, p. 769-775, 2009.

VIEGA JÚNIOR, C.; BOLZANI, V.S.; BARREIRO, E.J. Os produtos naturais e a química medicinal moderna. **Quím. Nova**, v. 29, p. 326-337, 2006.

VOLKOVOVÁ, K.; DUSINSKA, M.; COLLINS, A.R. From oxidative DNA damage to molecular epidemiology. **J. Appl. Biomed.**, v. 4, p. 39-43, 2005.

WALL, M.E.; WANI, M.C. Camptothecin and taxol: from discovery to clinic. **J. Ethnopharmacol.**, v. 51, p. 239-254, 1996.

WALTON, M.I.; SMITH, P.J.; WORKMAN, P. The role of NAD(P)H: quinone reductase (EC 1.6.99.2, DT-diaphorase) in the reductive activation of the novel indoloquinone antitumour agent EO9. **Cancer Commun.**, v. 3, p. 199–206, 1991.

WALTON, M.I.; EVE, P.D.; HAYES, A.; VALENTI, M.; DE HAVEN BRANDON, A.; BOXALL, K.J.; AHERNE, G.W.; ECCLES, S.A.; RAYNAUD, F.I.; WILLIAMS, D.H.; READER, J.C.; COLLINS, I.; GARRETT, M.D. The preclinical pharmacology and therapeutic activity of the novel CHK1 inhibitor SAR-020106. **Mol. Cancer Ther.**, v. 9, p. 89-100, 2010.

WANG, X.; DOHERTY, G.P.; LEITH, M.K.; CURPHEY, T.J.; BEGLEITER, A. Enhanced cytotoxicity of mitomycin C in human tumour cells with inducers of DT-diaphorase. **Br. J. Cancer**, v. 80, p. 1223-1230, 1999.

WANG, Z.B.; LIU, Y.Q.; CUI, Y.F. Pathways to caspase activation. **Cell Biol. Int.**, v. 29, p. 489-496, 2005.

WASSERMAN, T.H.; TWENTYMAN, P. Use of a colorimetric microtiter (MTT) assay in determining the radiosensitivity of cells from murine solid tumors. **Int. J. Radiat. Oncol. Biol. Phys.**, v. 15, p. 699-702, 1988.

WASSERMAN, R.; AUSTIN, C. A.; FISHER, L. M.; WANG, J. C. Use of yeast in the study of anticancer drugs targeting DNA topoisomerase: expression of a functional recombinant topoisomerase II α in yeast. **Cancer Res.**, v. 53, p. 3591-3596, 1993.

WHYSNERA, J.; REDDY, M.V.; ROSS, P.M.; MOHANA, M., LAX, E.A. Genotoxicity of benzene and its metabolites. **Mutat. Res.**, v. 566, p. 99-130, 2004.

WINSKI, F.L.; SWANN, E.; HARGREAVES, R.H.J.; DEHN, D.L.; BUTLER, J.; MOODY, C.J.; ROSS, D. Relationship between NAD(P)H:quinone oxidoreductase 1 (NQO1) levels in a series of stably transfected cell lines and susceptibility to antitumor quinines. **Biochem. Pharmacol.**, v. 61, p. 1509-1516, 2001.

WOJEWODZKA, M.; BURACZEWSKA, I.; KRUSZEWSKI, M. A modified neutral comet assay: elimination of lysis at high temperature and validation of the assay with anti-single-stranded DNA antibody. **Mutat. Res.**, v. 518, p. 9–20, 2002.

WORKMAN, P.; STRATFORD, I.J. The experimental development of bioreductive drugs and their role in cancer therapy. **Cancer Metast. Rev.**, v. 12, p. 73-82, 1993.

WORKMAN, P. Enzyme-directed bioreductive drug development revisited. A commentary on recent progress and future prospects with emphasis on quinone anticancer agents and quinone metabolizing enzymes particularly DT-diaphorase. **Oncol. Res.**, v. 6, p. 461-475, 1994.

WUERZBERGER, S.M.; PINK, J.J.; PLANCHON, S.M.; BYERS, K.L.; BORNMANN, W.G.; BOOTHMANN, D.A. Induction of bapoptosis in MCF-7:WS8 breast cancer cells by β -lapachone. **Cancer Res.**, v. 58, p. 1876-1885, 1998.

WYCKOFF, E.; HSIEH, T. Functional expression of a *Drosophila* gene in yeast: genetic complementation by DNA topoisomerase II. **Proc. Natl. Acad. Sci. USA**, v. 85, p. 6272-6276, 1988.

YAMASHITA, M.; KANEKO, M.; TOKUDA, H.; KUMEDA, Y. IIDA, A. Synthesis and evaluation of bioactive naphthoquinones from the Brazilian medicinal plant, *Tabebuia avellaneda*. **Bioorg. Med. Chem.**, v. 17, p. 6286-6291, 2009.

YANG, J.; LIU, X.; BHALLA, K.; KIM, C.N.; IBRADO, A.M.; CAI, J.; PENG, T.I.; JONES, D.P.; WANG, X. Prevention of apoptosis by Bcl-2: release of cytochrome *c* from mitochondria blocked. **Science**, v. 275, p. 1129-1132, 1997.

YANG, R.Y.; KIZER, D.K.; WU, H.; VOLCKOVA, E.; MIAO, X.S.; ALI, S.M. Synthetic methods for the preparation of ARQ 501 (β -LLpachone) human blood metabolites. **Bioorg. Med. Chem.**, v. 16, p. 5635-5643, 2008.

YU, Y.N.; DING, C.; LI, Q.G.; CHEN, X.R. A modified method of UDS detection in vitro suitable for screening the DNA-damaging effects of chemicals. **Mutat. Res.**, v. 122, p. 377-384, 1983.

ZAROGOULIDIS, K.; MYLONAKI, E.; KAKAVELAS, P.; ZAROGOULIDIS, P.; TSIODA, T.; RAPTI, E.; LITHOXOPOULOUE, H.; ZAROGOULIDOUE, V.; KONTAKIOTIS, T. Topotecan-carboplatin-etoposide combination as 1st line treatment in patients with small cell lung cancer. **Lung Cancer**, v. 66, p. 226-230, 2009.

ZHANG, G.; FANG, L.; ZHU, L.; ZHONG, Y.; WANG, P.G.; SUN, D. Synthesis and biological activities of 3'-azido disaccharide analogues of daunorubicin against drug-resistant leukemia. **J. Med. Chem.**, v. 9, p. 1792-1799, 2006.

ZHI-JUN, Y.; SRIRANGANATHAN, N.; VAUGHT, T.; ARASTU, S.K.; ANSAR, A.S. A dye-based lymphocyte proliferation assay that permits multiple immunological analyses: mRNA, cytogenetic, apoptosis, and immunophenotyping studies. **J. Immunol. Methods**, v. 210, p. 25-39, 1997.

ZHOU, Q.; ZHAO, J.; STOUT, J.G.; LUHM, R.A.; WIEDMER, T.; SIMS, P.J. Molecular cloning of human plasma membrane phospholipid scramblase. **J. Biol. Chem.**, v. 272, p. 18240-18244, 1997.

ZHOU, B.B.; BARTEK, J. Targeting the checkpoint kinases: chemosensitization versus chemoprotection. **Nat. Rev. Cancer**, v. 4, p. 216-225, 2004.

ZHU, Y.; HUB, J.; HU, Y.; LIU, W. Targeting DNA repair pathways: A novel approach to reduce cancer therapeutic resistance. **Cancer Treat. Rev.**, v. 35, p. 590-596, 2009.

ZIEGLER, U.; GROSCURTH, P. Morphological features of cell death. **News Physiol. Sci.**, v. 19, p. 124-128, 2004.

ZONG, W.X.; THOMPSON, C.B. Necrotic death as a cell fate. **Genes Dev.**, v. 20, p. 1-15, 2006.

ZORATTI, M., SZABO, I. The mitochondrial permeability transition. **Biochim. Biophys. Acta**, v. 1241, p. 139-176, 1995.

ZORNIG, M., HUEBER, A., BAUM, W., EVAN, G. Apoptosis regulators and their role in tumorigenesis. **Biochim. Biophys. Acta.**, v. 1551, p. 1-37, 2001.