



UNIVERSIDADE FEDERAL DO CEARÁ

FACULDADE DE MEDICINA

DEPARTAMENTO DE FISIOLOGIA E FARMACOLOGIA

PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM FARMACOLOGIA

JOSÉ DELANO BARRETO MARINHO FILHO

**PARTICIPAÇÃO DAS VIAS ATM/ATR E C-MYC/GSH NOS EFEITOS
ANTITUMORAIS DA CORDIAQUINONA J INDUZIDOS PELO ESTRESSE
OXIDATIVO**

**FORTALEZA
2012**

JOSÉ DELANO BARRETO MARINHO FILHO

**PARTICIPAÇÃO DAS VIAS ATM/ATR E C-MYC/GSH NOS EFEITOS
ANTITUMORAIS DA CORDIAQUINONA J INDUZIDOS PELO ESTRESSE
OXIDATIVO**

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 grau de Doutor em Farmacologia. Área de concentração: Farmacologia.

Orientadora: Prof^ª. Dr^ª. Letícia Veras Costa Lotufo

FORTALEZA
2012

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação

Universidade Federal do Ceará

Biblioteca de Ciências da Saúde

M29p Marinho Filho, José Delano Barreto.

Participação das vias atm/atr e c-myc/gsh nos efeitos antitumorais da cordiaquinona j induzidos pelo estresse oxidativo. / José Delano Barreto Marinho Filho. – 2012.

174 f.: il., color., enc.; 30 cm.

Tese (doutorado) – Universidade Federal do Ceará, Centro de Ciências da Saúde, Faculdade de Medicina, Departamento de Farmacologia, Programa de Pós-Graduação em Farmacologia, Doutorado em Farmacologia, Fortaleza, 2012.

Área de concentração: Farmacologia.

Orientação: Profa. Dra. Letícia Veras Costa Lotufo.

1. Ensaios de Seleção de Medicamentos Antitumorais. 2. Estresse Oxidativo. 3. Genes myc. 4. Glutathiona. I. Título.

JOSÉ DELANO BARRETO MARINHO FILHO

PARTICIPAÇÃO DAS VIAS ATM/ATR E C-MYC/GSH NOS EFEITOS ANTITUMORAIS DA CORDIAQUINONA J INDUZIDOS PELO ESTRESSE OXIDATIVO

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

Aprovada em: 29/10/ 2012

BANCA EXAMINADORA

Profª. Dra. Letícia Veras Costa Lotufo (Orientadora)
Universidade Federal do Ceará

Prof. Dr. Marcellus Henrique Loiola Ponte de Souza
Universidade Federal do Ceará

Profª. Dra. Geanne Matos de Andrade
Universidade Federal do Ceará

Prof. Dr. João Ernesto de Carvalho
Universidade Estadual de Campinas

Profª. Dra. Gardênia Carmen Gadelha Militão
Universidade Federal de Pernambuco

*O que mais preocupa não é o grito dos violentos,
nem dos corruptos, nem dos desonestos,
nem dos sem-caráter, nem dos sem-ética.
O que mais preocupa é o silêncio dos bons.*

Martin Luther King

Dedico esta Tese a todos da minha família que sempre
apoiaram todas as minhas decisões,
muito obrigado!

AGRADECIMENTOS

Agradeço a Prof. Dra. **Leticia Lotufo**, orientadora deste trabalho, pelo exemplo de ser humano, pesquisadora e chefe, pelo imenso apoio, confiança e amizade depositada em mim, pelos constantes momentos desafiadores e a procura por novos conhecimentos. Além da paciência empregada aos constantes períodos de inquietude e ansiedade. Enfim por todas as horas empregadas a ensinar e nunca desistir em ajudar. Muito obrigado.

A colega de graduação, depois namorada e agora esposa **Ana Jérsia Araújo**, muito obrigado pelo companheirismo dentro e fora do laboratório, por todas as ajudas dadas, por nunca me deixar pensar em desistir, pelos ótimos momentos que passamos juntos e por muitos outros ainda melhores que iremos passar e por sempre me incentivar em fazer o melhor. Sem você nada disso teria sido possível. Te amo muito.

Ao Prof. Dr. **Manoel Odorico de Moraes** por nos mostrar todos os dias o empenho e o prazer de se fazer o que gosta. Pelo constante bom humor e auxílio no financiamento e na viabilidade da pesquisa.

À Prof. Dra. **Cláudia Pessoa** pelo incentivo diário no desenvolvimento da pesquisa no laboratório, mostrando maneiras diferentes de encarar a pesquisa.

Ao Prof. Dr. **Marcellus Loiola** por aceitar participar desta banca de doutorado e por está sempre disposto a colaborar e a ajudar.

À Prof. Dra. **Geanne Matos** por sempre demonstrar confiança em meu trabalho e por aceitar participar desta banca.

Ao Prof. Dr. **João Ernesto de Carvalho** por não ter medido esforços para está presente nesta banca, muito obrigado.

À Prof. Dra. **Gardênia Militão** pela amizade nos tempos que trabalhamos juntos e por ter aceitado participar desta banca.

À Prof. Dra. **Otília Loiola** pelo apoio na pesquisa, pela paciência nos ensinamentos em química, pela empolgação diária com os resultados e pela pessoa simples e dedicada ao trabalho.

À Prof. Dra. **Ana Paula Negreiros** pela convivência sempre harmoniosa, pela ajuda com todos os estudos histopatológicos não apenas deste trabalho, mas de todos que fizemos juntos, além de uma enorme paciência em ensinar e por sempre estarmos juntos nas nossas caranguejadas.

Ao Laboratório de Análise Fitoquímica de Plantas Medicinais (LAFIPLAM), em especial a **Hozana Patrícia, Ana Isabel, Maria Conceição** (Ceixa) pela constante ajuda e por diversas moléculas cedidas.

À Prof. Dra. **Nylane Maria Nunes de Alencar** por toda a ajuda oferecida durante todo o desenvolvimento desse trabalho e pelo exemplo humildade e solidariedade. E aos alunos do Laboratório de Farmacologia Bioquímica **Ítalo Cavalcante** e **Ingrid Figueiredo** pela ajuda nos ensaios bioquímicos.

À Prof. **Marília Goulart** e a **Fabiane Caxico** por todas as ajudas neste trabalho e pelos estudos de eletroquímica executados.

Ao Prof. **Said Fonseca** por todas as ajudas relacionadas à solubilização da molécula de estudo, sem qual o estudo não seria possível.

Ao grande amigo **Diego Veras** por está sempre disposto a ajudar e de compartilhar idéias e conhecimentos adquiridos gratuitamente. Por nos fazer entender que a vida já nos oferece tudo...basta apenas correr atrás.

Aos amigos **Arinice Costa, Danilo Rocha, Evelyne Alves, Paula Abreu e Paula Jimenez**, por todas as conversas e brincadeiras, pela ajuda nos experimentos e pelos momentos de descontração dentro e fora do laboratório, principalmente nas nossas viagens, muito obrigado.

À **Marcília Costa** por todas as ajudas empregadas neste trabalho e pelo exemplo de uma pessoa séria, compromissada e dedicada ao trabalho, à vida e principalmente às pessoas.

Aos amigos feitos no **LOE**: Adriana, Aline Sbardeloto, André, Anderson, Assuero, Bruno Soares, Carla, Cecília, Daniel Pascoalino, Daniel Pereira, Deisy, Evelyne Simões, Fábio, Felipe Rocha, Gabriela, Hemerson, Hidemburgo, Igor “Baiano”, Igor “boy do LOE”, Kézia, Kristiana, Márcio Roberto, Marcos Angelim, Marne Vasconcelos, Michel, Miller, Patrícia, Rafael, Raquel Montenegro, Sarah, Sérgio, Stefânio, Treissy, Vanessa, Venúcia, Washington e Zé Roberto que ajudaram direta ou indiretamente na execução deste trabalho.

A todo o pessoal do **Ecotox** que ajudou muito no desenvolvimento deste trabalho e por ótimos momentos, principalmente na casa do Diego

Ao apoio técnico da **Erivanda França** e **Rogéria Montenegro** em especial a **Silvana França** pelo enorme suporte dado a execução deste trabalho.

As amigas e secretárias **Adelânia Marinho**, **Sheyla Prado** e **Dona Graça** por estarem sempre disponível em nos escutar e ajudar sempre que preciso.

Aos funcionários do Departamento de Fisiologia e Farmacologia: **Alana**, **Ana Paula**, **Fernando**, **Flávia**, e **Haroldo**. Em especial a **Aura Rhanes** e **Márcia Hermínia**, pelo apoio indispensável em questões relacionadas à coordenação do programa de pós-graduação.

Agradeço a todos os professores que participaram da minha formação intelectual, principalmente os do curso de ciências biológicas da UFC e especialmente a todos do Departamento de Fisiologia e Farmacologia.

A todos que diretamente ou indiretamente contribuíram para a execução deste trabalho.

Este trabalho foi realizado graças ao auxílio das seguintes instituições:

Universidade Federal do Ceará

Banco do Nordeste do Brasil - BNB

Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico - CNPq

Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior - CAPES

Financiadora de Estudos e Projetos - FINEP

Fundação Cearense de Amparo a Pesquisa - FUNCAP

Instituto Claude Bernard - InCb

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	20
1.1 Câncer	20
1.2 Produtos Naturais	26
1.3 Quinonas.....	30
1.4 Estresse Oxidativo.....	33
1.5 Gênero <i>Cordia</i> e as cordiaquinonas.....	36
2 OBJETIVOS	42
2.1 Geral	42
2.2 Específicos	42
3 MATERIAIS E MÉTODOS	43
3.1 Materiais Utilizados	43
3.2 Metodologia Experimental	43
3.2.1 Isolamento e identificação das cordiaquinonas	43
3.2.2 Avaliação da atividade citotóxica <i>in vitro</i>	44
3.2.2.1 Linhagens e modelos celulares	44
3.2.2.2 Manutenção das linhagens celulares	44
3.2.2.3 Obtenção das células mononucleadas do sangue periférico (CMSP).....	46
3.2.2.4 Teste do MTT	46
3.2.3 Estudo do mecanismo de ação	49
3.2.3.1 Citometria de fluxo	49
3.2.3.1.1 Determinação da integridade da membrana, densidade e morfologia celular	50
3.2.3.1.2 Análise de conteúdo e fragmentação de DNA	50
3.2.3.1.3 Determinação do potencial transmembrânico mitocondrial	51
3.2.3.1.4 Determinação da ativação de caspases iniciadoras 8 e 9	51
3.2.3.2 Teste do cometa	52
3.2.3.3 Determinação do conteúdo intracelular de glutathiona reduzida (GSH)	55
3.2.3.4 Estudos eletroquímicos	56
3.2.3.4.1 Meio aprótico	56
3.2.3.4.2 Meio prótico	57

3.2.3.4.3 Biossensor de dsDNA	57
3.2.3.5 Western blot	58
3.2.4 Estudo da atividade antitumoral <i>in vivo</i>	62
3.2.4.1 Obtenção e manutenção dos animais	62
3.2.4.2 Ensaio antitumoral em camundongos transplantados com sarcoma-180.....	62
3.2.4.3 Análise morfológica e histopatológica	64
3.2.4.4 Determinação da sobrevida de camundongos transplantados com sarcoma-180	65
3.2.5 Desenho experimental.....	66
4 RESULTADOS	68
4.1 Avaliação do mecanismo de ação citotóxico da cordiaquinona <i>J in vitro</i>	68
4.2 Estudos eletroquímicos	78
4.2.1 Análises em meio aprótico e prótico em voltametria cíclica	78
4.2.2 Estudo com biossensor de DNA	79
4.3 Dano ao DNA	80
4.4 Avaliação proto-oncogenes e o estresse oxidativo	83
4.5 Avaliação do mecanismo antitumoral da cordiaquinona <i>J in vivo</i> , utilizando o tumor sarcoma-180 como modelo	86
4.5.1 Análise histopatológica	90
4.5.2 Análise dos parâmetros bioquímicos	102
4.5.3 Análise dos parâmetros hematológicos	102
4.5.4 Avaliação da sobrevida	104
5 DISCUSSÃO	106
6 CONCLUSÃO	131
REFERÊNCIAS	133
ANEXO A	163
ANEXO B	169
ANEXO C	171
ANEXO D	172

LISTA DE TABELAS

- Tabela 1** Linhagens celulares utilizadas no ensaio de MTT
p. 45
- Tabela 2** Inibidores utilizados no teste do MTT
p. 48
- Tabela 3** Atividade citotóxica *in vitro* da cordiaquinona J em linhagens de células tumorais. N-acetil-L-cisteína (NAC) foi adicionado 1 h antes do início do tratamento
p. 69
- Tabela 4** Atividade citotóxica *in vitro* da cordiaquinona J em linhagens de células tumorais
p. 71
- Tabela 5** Níveis intracelular da glutathione reduzida mensurada em células HL-60 após 15 minutos, 1 e 3 horas de exposição a cordiaquinona J
p. 73
- Tabela 6** Atividade citotóxica *in vitro* da cordiaquinona J em linhagens de células tumorais. A ciclosporina A (10 μ M) e o BAPTA-AM (5 μ M) foram incubados 1 hora antes do início do tratamento e o dicumarol (50 μ M) 24 horas antes do início do tratamento.
p. 75
- Tabela 7** Efeito da cordiaquinona J nas doses de 25 e 50 mg/kg/dia v.o. sobre a massa dos órgãos de camundongos (g/100g de massa corpórea) e tumores sarcoma-180, após 7 dias de tratamento
p. 89
- Tabela 8** Dosagem de alanina transaminase (ALT), aspartato transaminase (AST) e uréia em sangue de camundongos *M. musculus Swiss* saudáveis e com sarcoma-180 tratados com veículo, com cordiaquinona J, com NAC e associado com NAC e 5-FU
p. 103
- Tabela 9** Avaliação dos parâmetros hematológicos em sangue de camundongos *M. musculus Swiss* saudáveis e com sarcoma-180 tratados com veículo, com cordiaquinona J, com NAC e associado com NAC e 5-FU
p. 104

LISTA DE FIGURAS

- Figura 1** Distribuição proporcional dos 10 tipos de câncer mais incidentes estimados para 2012 por sexo, exceto pele não melanoma (Brasil)
p. 21
- Figura 2** Características essenciais das células tumorais
p. 22
- Figura 3** Esquema das vias extrínseca e intrínseca da apoptose
p. 25
- Figura 4** Comparação dos tipos de organismos como fontes de novos compostos nos anos de 2001 e 2010
p. 27
- Figura 5** Produtos naturais e o ciclo celular
p. 29
- Figura 6** Estruturas das naftoquinonas β -Lapachol e β -Lapachona
p. 30
- Figura 7** Estrutura esquemática de benzoquinona, naftoquinona e antraquinona
p. 31
- Figura 8** Sumário dos potenciais mecanismos moleculares citotóxicos para quinonas
p. 32
- Figura 9** Esquema da via de dano ao DNA ATM/ATR
p. 34
- Figura 10** Mecanismo indutor de nova síntese de glutatona dependente de espécies reativas de oxigênio e do c-Myc
p. 35
- Figura 11** Fotos de *C. leucocephala*. Planta inteira - A; folhas e inflorescência - B; fruto - C.
p. 37
- Figura 12** Estruturas das naftoquinonas isoladas de plantas do gênero *Cordia* (cordiaquinonas)
p. 39
- Figura 13** Mecanismo de ação proposto para os efeitos relacionados à cordiaquinona J sobre as células leucêmicas (HL-60)
p. 40
- Figura 14** Estrutura da cordiaquinona J isolada de *Cordia leucocephala*
p. 44

- Figura 15** Tipos de cometa e classificação por categoria de dano
p. 54
- Figura 16** Desenho experimental
p. 67
- Figura 17** Expressão de glutathiona, c-myc e β -actina em HL-60
p. 72
- Figura 18** Efeitos da cordiaquinona J sobre a apoptose
p. 76
- Figura 19** Efeitos da cordiaquinona J dependente de caspases em células HL-60
p. 77
- Figura 20** Voltamograma cíclico da cordiaquinona J em meio aprótico
p. 79
- Figura 21** Estudo com biossensor de DNA realizado em tampão acetato aquoso 0,2M
p. 80
- Figura 22** Indução da quebra de fita dupla de DNA após 1 e 3 horas de exposição a cordiaquinona J em células HL-60
p. 81
- Figura 23** Expressão de p-ATM (Ser1981), p-ATR (Ser428) p-Chk1 (Ser296), p-Chk2 (Thr68), p-H2A.X (Ser139), p-BRCA1 (Ser1524), p53 (Ser15) em células CMSP e em HL-60
p. 83
- Figura 24** Expressão de c-myc, NF- κ B, NQO1 e β -actina em células HL-60 tratadas com cordiaquinona J
p. 85
- Figura 25** Expressão de c-myc, NF- κ B, NQO1, Parp e β -actina em células HL-60 controle e tratadas com cordiaquinona J na presença de N-acetil-L-Cisteína (NAC)
p. 86
- Figura 26** Efeito da cordiaquinona J sobre a proliferação tumoral de camundongos (*Mus musculus*) Swiss transplantados com sarcoma-180
p. 88
- Figura 27** Fotomicrografia do fígado de camundongos (*Mus musculus*) Swiss transplantados com sarcoma-180 e sacrificados após 7 dias de tratamento. O controle negativo (A) foi tratado com veículo de diluição da substância. A cordiaquinona J foi administrada na dose de 25 mg/kg/dia v.o. (B)
p. 92
- Figura 28** Fotomicrografia do fígado de camundongos (*Mus musculus*) Swiss transplantados com sarcoma-180 e sacrificados após 7 dias de tratamento. Animal tratado com cordiaquinona J 50 mg/kg/dia v.o. (A). Animal tratado com NAC (150 mg/kg/dia) i.p. 1 hora antes do início do tratamento com
p. 93

cordiaquinona J 50 mg/kg/dia v.o. (B)

- Figura 29** p. 94 Fotomicrografia do baço de camundongos (*Mus musculus*) Swiss transplantados com sarcoma-180 e sacrificados após 7 dias de tratamento. O controle negativo (A) foi tratado com veículo de diluição da substância. A cordiaquinona J foi administrada na dose de 25 mg/kg/dia v.o. (B)
- Figura 30** p. 95 Fotomicrografia do baço de camundongos (*Mus musculus*) Swiss transplantados com sarcoma-180 e sacrificados após 7 dias de tratamento. Animal tratado com cordiaquinona J 50 mg/kg/dia v.o. (A). Animal tratado com NAC (150 mg/kg/dia) i.p. 1 hora antes do início do tratamento com cordiaquinona J 50 mg/kg/dia v.o. (B)
- Figura 31** p. 96 Fotomicrografia dos rins de camundongos (*Mus musculus*) Swiss transplantados com sarcoma-180 e sacrificados após 7 dias de tratamento. O controle negativo (A) foi tratado com veículo de diluição da substância. A cordiaquinona J foi administrada na dose de 25 mg/kg/dia v.o. (B)
- Figura 32** p. 97 Fotomicrografia dos rins de camundongos (*Mus musculus*) Swiss transplantados com sarcoma-180 e sacrificados após 7 dias de tratamento. Animal tratado com cordiaquinona J 50 mg/kg/dia v.o. (A). Animal tratado com NAC (150 mg/kg/dia) i.p. 1 hora antes do início do tratamento com cordiaquinona J 50 mg/kg/dia v.o. (B)
- Figura 33** p. 98 Fotomicrografia do estômago de camundongos (*Mus musculus*) Swiss transplantados com sarcoma-180 e sacrificados após 7 dias de tratamento. O controle negativo (A) foi tratado com veículo de diluição da substância. A cordiaquinona J foi administrada na dose de 25 mg/kg/dia v.o. (B)
- Figura 34** p. 99 Fotomicrografia do estômago de camundongos (*Mus musculus*) Swiss transplantados com sarcoma-180 e sacrificados após 7 dias de tratamento. Animal tratado com cordiaquinona J 50 mg/kg/dia v.o. (A). Animal tratado com NAC (150 mg/kg/dia) i.p. 1 hora antes do início do tratamento com cordiaquinona J 50 mg/kg/dia v.o. (B)
- Figura 35** p. 100 Fotomicrografia do tumor de camundongos (*Mus musculus*) Swiss transplantados com sarcoma-180 e sacrificados após 7 dias de tratamento. O controle negativo (A) foi tratado com veículo de diluição da substância. A cordiaquinona J foi administrada na dose de 25 mg/kg/dia v.o. (B)
- Figura 36** p. 101 Fotomicrografia do tumor de camundongos (*Mus musculus*) Swiss transplantados com sarcoma-180 e sacrificados após 7 dias de tratamento. Animal tratado com cordiaquinona J 50 mg/kg/dia v.o. (A). Animal tratado com NAC (150 mg/kg/dia) i.p. 1 hora antes do início do tratamento com cordiaquinona J 50 mg/kg/dia v.o. (B)
- Figura 37** p. 102 Curva de sobrevivência de animais transplantados com o tumor sarcoma-180 e tratados com cordiaquinona J (50 mg/kg/dia) e 5-fluorouracil (5-FU) (25 mg/kg/dia) (A). Efeito sobre o volume tumoral dos grupos controle e tratados com cordiaquinona J (50 mg/kg/dia) e 5-fluorouracil (5-FU) (25 mg/kg/dia) no

6º, 8º e 10º dia de tratamento (B)

Figura 38 Mecanismo de ação proposto para a cordiaquinona J
p. 132

LISTA DE SÍMBOLOS E ABREVIATURAS

5-FU	5-fluorouracil
ALT	Alanina transaminase
ANOVA	Analisis of Variance (Análise de variância)
AST	Aspartato transaminase
ATM	<i>Ataxia Telangectasia Mutated</i>
ATR	<i>Ataxia Telangectasia Mutated and Rad3-related</i>
BAPTA-AM	1,2-bis(o-aminophenoxy)ethane-N,N,N',N'-tetraacetic acid
BAX	<i>Bcl-2-associated X protein</i>
Bcl-2	<i>B-cell lymphoma 2</i>
Bid	<i>BH3 interacting-domain death agonist</i>
BRCA1	<i>Breast Cancer Associated Gene 1</i>
BSA	Albumina dosoro bovino
BSO	L-butionina-sulfoximina
CASPASE	<i>Cysteine-dependent aspartate-directed proteases</i>
Chk 1	<i>Checkpoint Kinase 1</i>
Chk 2	<i>Checkpoint Kinase 2</i>
CI₅₀	Concentração inibitória média
CMSP	Células Mononucleares de Sangue Periférico
c-myc	<i>Myelocytomatosis oncogene</i>
DMSO	Dimetilsulfóxido
DOX	Doxorrubicina
dsDNA	DNA de dupla fita
DTNB	Ácido 5,5'-ditio-bis-(2-nitrobenzóico)
E.P.M.	Erro Padrão da Média
EDTA	Ácido etilenodiamino tetra-acético
ErbB2	Receptor do fator de crescimento epidérmico
EROs	Espécies reativas de oxigênio
EtOAc	Acetato de etila
FLICA	<i>Fluorescent Labeled Inhibitor of Caspases</i>
GSH	Glutationa reduzida
GSSG	Glutationa oxidada

H/E	Hematoxilina/Eosina
HPLC	Cromatografia líquida de alta pressão
i.p.	Intraperitoneal
MeOH	Álcool metílico
MTT	<i>3-(4,5-dimetil-2-tiazol)-2,5-difenil-brometo de tetrazolium</i>
NAC	N-acetil-L-cisteína
NBT/BCIP	<i>Nitro-blue tetrazolium chloride/5-bromo-4-chloro-3'-indolyphosphate p-toluidine salt</i>
NF-κB	<i>Nuclear factor kappa-light-chain-enhancer of activated B cells</i>
NQO1	NAD(P)H:quinona oxidorreductase
p53	Proteína tumoral 53
PARP	Poli ADP-Ribose Polimerase
PBS	<i>Phosphate Buffer Solution</i> (Tampão Fosfato)
PI	Iodeto de propídeo
PMSF	<i>Phenylmethylsulfonyl fluoride</i>
PVDF	Fluoreto de polivinilideno
RIPA	<i>Radio Immunoprecipitation Assay</i> (ensaio de radioimunoprecipitação)
RMN	Ressonância Magnética Nuclear
RPMI	Roswell Parrk Memorial Institute Medium
SCGE	<i>Single cell gel electrophoresis</i>
ssDNA	DNA de fita simples
TBABF₄	Tetrafluoroborato de tetrabutílamônio
TBS	<i>Tris-buffered saline</i> (Solução Tris salina tamponada)
TBS-T	<i>Tris-Buffered Saline Tween-20</i> (Tampão salina Tris, Tween 20)
TNB	Ácido 2-nitro-5-mercapto-benzóico
U	Unidade
v.o.	Via oral
VC	Voltametria cíclica
VPD	Voltametria de pulso diferencial
β	β -Lapachona
$\Delta\Psi_m$	Potencial transmembrana mitocondrial

RESUMO

As cordiaquinonas são naftoquinonas meroterpenóides isolados de plantas pertencentes ao gênero *Cordia* com várias atividades biológicas descritas, incluindo atividades antifúngica, larvicida e citotóxica. O objetivo deste trabalho foi avaliar o potencial anticâncer de uma cordiaquinona isolada das raízes da planta *Cordia leucocephala*. O presente estudo avaliou o potencial citotóxico da cordiaquinona J em várias linhagens de células tumorais e normais pelo teste do MTT e seu possível mecanismo de ação. A cordiaquinona J mostrou valores de CI_{50} variando de 4,6 a 6,8 μ M em células leucêmicas e 33,6 a 37 μ M em células normais, após 24 horas de incubação. Nas células HL-60 foi observado indução de apoptose preferencialmente pela via extrínseca. A indução do dano ao DNA observado pelo tratamento com a cordiaquinona J através do ensaio do cometa foi associado com a ativação de proteínas quinases da via ATM/ATR. O dano ao DNA, assim como a ativação das proteínas quinases da via ATM/ATR foi visualizado em células HL-60, mas não em células normais. Estes efeitos em HL-60 podem estar relacionados com a depleção da expressão proteica de glutathiona e de c-myc observados. O potencial anticâncer foi confirmado *in vivo* através da inibição do tumor sarcoma-180 em 72,5% após o tratamento com 50 mg/kg de cordiaquinona J. O pré-tratamento tanto das células quanto dos animais com N-acetil-L-cisteína inibiu todos os efeitos observados *in vitro* e *in vivo* reforçando o papel da geração das espécies reativas de oxigênio na atividade antitumoral da cordiaquinona J.

Palavras-Chaves: Estresse Oxidativo. Cordiaquinona. Anticâncer. C-Myc. Glutathiona.

ABSTRACT

Cordiaquinones are meroterpenoid naphthoquinones from plants belonging to the genus *Cordia* with several described biological activities, including antifungal, larvicidal and cytotoxic effects. The aim of this study was to evaluate the anticancer potential of a cordiaquinone isolated from the roots of *Cordia leucocephala* plant. The present study evaluated the cytotoxic potential of cordiaquinone J in several tumor and normal cell lines by MTT assay and its possible mechanism of action. The study of the mechanism of action of cordiaquinones L and M, in human leukemia cells (HL-60) showed induction of cell death by apoptosis, and these effects were related to the induction of oxidative stress. Then the study was continued only with the cordiaquinone J. The cordiaquinone J showed IC₅₀ values ranging from 4.6 to 6.8 μM in leukemia cells and 33.6 to 37 μM in normal cells, after 24 hours of incubation. In HL-60 cells was observed apoptosis induction preferentially by extrinsic pathway. The induction of DNA damage by cordiaquinone J observed by comet assay was associated with activation of protein kinases of ATM/ATR pathway. The DNA damage, as well as activation of protein kinases via the ATM / ATR was observed in HL-60 cells but not in normal cells. These effects in HL-60 cells may be related to the depletion of protein expression of glutathione and c-myc observed. The anticancer potential was confirmed *in vivo* through inhibition of sarcoma-180 tumor by 72.5% after the treatment with 50 mg/kg of cordiaquinone J. The pre-treatment of cells or animals with N-acetyl-L-cysteine abolished most of the *in vitro* and *in vivo* observed effects, reinforcing the role of reactive oxygen species generation in cordiaquinone J activity.

Key Words: Oxidative Stress. Cordiaquinone. Anticancer. C-Myc. Glutathione.

1 INTRODUÇÃO

1.1 Câncer

A problemática e o histórico do câncer no Brasil ganham a cada ano um maior interesse devido ao perfil epidemiológico que essa doença vem apresentando. Com isso, o câncer tem conquistado relevância nas agendas políticas e técnicas de todas as esferas do governo. O conhecimento sobre o comportamento dessa doença permite estabelecer prioridades e direcionar recursos para a modificação positiva desse cenário na população brasileira (INCA, 2012).

Atualmente, o câncer é a principal causa de morte nos países desenvolvidos e a segunda principal causa de morte nos países em desenvolvimento (NCI, 2012a). Estudos epidemiológicos sobre a incidência de câncer demonstram que o risco de desenvolver a doença varia entre os grupos populacionais, e este risco poderia até ser reduzido em torno de 40% se houvessem alterações bruscas no estilo de vida e hábitos individuais (LEE et al., 2011). No entanto, as estatísticas revelam que os índices dessa doença vêm aumentando com o passar dos anos (INCA, 2012).

Com isso, nas últimas décadas, o câncer tem tomado uma dimensão maior, tornando-se um evidente problema de saúde pública mundial. A Organização Mundial da Saúde (OMS) estimou que as mortes por câncer em todo o mundo continuará aumentando com uma estimativa de 13,1 milhões de mortes e 27 milhões de novos casos em 2030. Sendo que o maior efeito desse aumento deve incidir em países de baixa e média renda (WHO, 2012).

No Brasil, as estimativas para o ano de 2012, também válidas para 2013, apontam a ocorrência de aproximadamente 518 mil novos casos de câncer, incluindo os casos de pele não melanoma, reforçando a magnitude desse problema no país. Excluindo os casos de câncer de pele não melanoma, estima-se um total de 385 mil novos casos. Os tipos mais incidentes serão os cânceres de pele não melanoma, próstata, pulmão, cólon e reto e estômago para o sexo masculino; e os cânceres de pele não melanoma, mama, colo do útero, cólon e reto e glândula tireoide para o sexo feminino (**Figura 1**). Desse modo, é esperado um total de 257.870 novos casos para o sexo masculino e 260.640 para o sexo feminino em 2012 (INCA, 2012).

Figura 1. Distribuição proporcional dos 10 tipos de câncer mais incidentes estimados para 2012 por sexo, exceto pele não melanoma (Brasil).

Localização primária	casos novos	percentual			Localização primária	casos novos	percentual
Próstata	80.180	30,8%	Homens	Mulheres	Mama Feminina	52.680	27,0%
Traqueia, Brônquio e Pulmão	17.210	8,8%			Colo do Útero	17.540	9,3%
Côlon e Reto	14.180	7,3%			Côlon e Reto	15.900	8,4%
Estômago	12.670	6,5%			Glândula Tireoide	10.500	5,6%
Cavidade Oral	8.990	5,1%			Traqueia, Brônquio e Pulmão	10.110	5,3%
Esôfago	7.770	4,0%			Estômago	7.420	3,0%
Bexiga	6.210	3,2%			Ovário	6.190	3,3%
Laringe	6.110	3,1%			Corpo do Útero	4.520	2,4%
Linfoma não Hodgkin	5.100	2,7%			Linfoma não Hodgkin	4.450	2,4%
Sistema Nervoso Central	4.820	2,5%			Sistema Nervoso Central	4.450	2,4%

Fonte: INCA, 2012.

Inicialmente, acreditava-se que o câncer se originava devido ao descontrole entre as taxas de proliferação e morte das células, ou seja, o crescimento celular (proliferação celular) ultrapassava a taxa com que as células morriam. Desse modo, poderíamos concluir que as células estavam se dividindo em uma taxa descontrolada induzindo a formação de tumores (BERGMAN; HARRIS, 1997). Estudos posteriores mostraram que o câncer seria o produto de um mau funcionamento do ciclo celular, de tal forma que, células danificadas e/ou mutadas, que normalmente seriam eliminadas, conseguiriam permanecer no ciclo celular e dar origem a novas células doentes (acumulando mutações) (FOSTER, 2008; STORY; KODYM, 1998). Em células saudáveis, os proto-oncogenes e os genes supressores de tumor agem modulando diferentes níveis de proliferação celular, no entanto, quando sofrem mutações podem facilitar o crescimento anormal das células (VERMEULEN; VAN BOCKSTAELE; BERNEMAN, 2003).

Em 2000, os pesquisadores Hanahan & Weinberg publicaram um artigo de revisão esclarecendo um pouco melhor sobre como as células tumorais se comportam. Nesse trabalho eles mostraram que as células cancerosas diferem das células normais por continuarem crescendo e se dividindo, não obedecendo ao controle biológico natural do organismo. Dividindo-se rapidamente, estas células adquirem novas características genéticas que as tornam mais agressivas, determinando a formação do câncer. Algumas alterações na fisiologia das células que caracterizam o câncer são: auto-suficiência na sinalização de fatores de crescimento, insensibilidade aos inibidores de crescimento, evasão da morte celular programada (apoptose), potencial replicativo ilimitado, angiogênese e invasão tecidual e metástase (HANAHAAN; WEINBERG, 2000).

Após 11 anos, estas características foram revisadas (**Figura 2**) e foi constatado que além de ocorrer as alterações fisiológicas das células descritas acima também era necessário ocorrer instabilidades genômicas, que geram a diversidade genética acelerando o processo de transformação celular, e inflamação, o que promove danos em suas funções estimulando doenças com características múltiplas como câncer (HANAHAN; WEINBERG, 2011). Nesse mesmo artigo dois novos conceitos foram incluídos na lista de características do tumor que são a reprogramação do metabolismo energético e a evasão do sistema imune. Além disso, a complexidade do microambiente tumoral é imensa não devendo ser ignorada, pois garante a manutenção do meio adequado para a implantação, manutenção e desenvolvimento das células tumorais (HANAHAN; WEINBERG, 2011). Portanto, o conhecimento aprofundado sobre as características tumorais e principalmente do microambiente tumoral ajuda no desenvolvimento de novos fármacos e em novos métodos de tratamento para esta doença.

Figura 2. Características essenciais das células tumorais.



Fonte: Adaptado de (HANAHAN; WEINBERG, 2011).

Em condições normais, o organismo procura mecanismos para manter sua homeostase. A homeostase dentro da célula é regulada por um equilíbrio entre a proliferação, parada do crescimento e apoptose. Perturbações nesse equilíbrio podem resultar em hiperplasia ou

neoplasia (BERGMAN; HARRIS, 1997; FOSTER, 2008; HANAHAN; WEINBERG, 2011; STORY; KODYM, 1998).

A cirurgia, quimioterapia e radioterapia são as estratégias terapêuticas clássicas para o tratamento de pacientes com diferentes tipos de câncer. Há muitos anos se relata diversos casos de sucesso no tratamento em diversos tipos de tumor, mas ainda não foi desenvolvido um fármaco ideal e as terapias existentes nem sempre alcançam resultados esperados, pois muitas vezes ocorre a recidiva dos tumores e o surgimento de metástase, além de induzir muitos efeitos colaterais (NEILAN et al., 2007; SALGALLER; LODGE, 1998).

A quimioterapia do câncer consiste em um tratamento a base de fármacos que interferem em diferentes processos tais como desenvolvimento, crescimento, disseminação e invasão de células cancerígenas (SOUZA et al., 2007). O câncer pode ser tratado através de monoquimioterapia ou por medicamentos combinados (poliquimioterapia), método mais utilizado porque apresenta resultados mais eficientes, alcançando uma resposta satisfatória a cada aplicação, diminuindo o risco de resistência do paciente aos fármacos e atingindo as células em diferentes fases do seu ciclo (CARVALHO; TIRNAUER; PELLMAN, 2003).

A maior parte dos quimioterápicos antineoplásicos possui em comum a atividade citotóxica, resultando, na maioria das vezes, em indução de apoptose nas células tumorais. Fármacos já utilizados na clínica médica e novos fármacos em estudos pré-clínicos possuem alvos que são capazes de induzir a célula tumoral a entrar em apoptose. Estes alvos podem ser o DNA, microtúbulos, tubulina, topoisomerasas, proteassomo, tirosinas quinase, telomerase, proteínas de checagem do ciclo celular, ceramidases entre outros. (BAILLY, 2000; CHASE; CROSS, 2006; HUWILER; ZANGEMEISTER-WITTKER, 2007; JORDAN, 2002; KAWABE, 2004; LOS et al., 2003; ROSA et al., 2008).

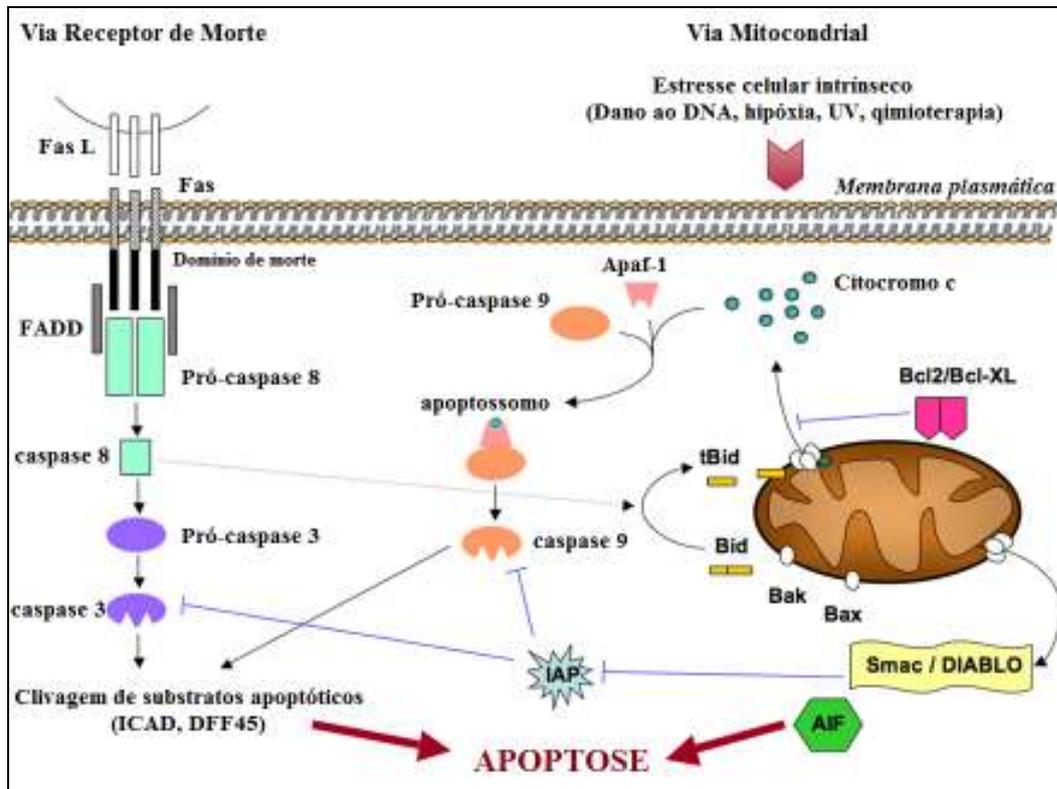
Quando a célula é ativada para a morte por via intrínseca (**Figura-3**) o primeiro passo é a permeabilização da membrana mitocondrial resultando na liberação de proteínas que normalmente estavam localizadas no espaço intermembranar, (citocromo c, o fator de indução da apoptose (AIF), entre outros). Em seguida, o potencial transmembrânico da mitocôndria é reduzido (CHANG; YANG, 2000; GREEN; KROEMER, 1998; GREEN; REED, 1998). A liberação do citocromo c leva a formação de um complexo, denominado apoptossomo. O apoptossomo é formado quando o citocromo c se liga a Apaf-1 e a procaspase-9. Este complexo irá ativar a caspase-9 (CHANG; YANG, 2000; ACEHAN et al., 2002; ZOU et al.,

1999). A caspase-9 (caspase iniciadora) cliva as caspases efetoras 3, 6 e 7 ativando-as e estas irão fragmentar o DNA causando a morte da célula (HENGARTNER, 2000; ELMORE, 2007).

A via de receptor de morte ou via extrínica (**Figura-3**) envolve a ativação de receptores de membrana. Eles são membros da superfamília de receptores de fatores de necrose tumoral (TNFR). Estão inclusos nessa família os receptores de membrana TNFR1, FAS (CD95), TRAIL entre outros. Esses receptores possuem um domínio distinto dentro do citoplasma denominado de domínio de morte (DD) (ASHKENAZI; DIXIT, 1998). Após a associação dos receptores de membrana ao seu correspondente domínio DD, ocorre uma mudança conformacional nos receptores o que promove o recrutamento de uma molécula adaptadora FAS que irá associar-se com o domínio de morte (DD) formando o FADD (GARG; AGGARWAL, 2002; MIRKES, 2002). Este complexo formado é o responsável por iniciar a cascata de caspases, pois o FADD se liga a procaspase-8, que ativa a caspase-8. A caspase-8 ativa caspases efetoras como a caspase-3, promovendo o início da cascata de caspases da apoptose, levando a célula a morte (CHANG; YANG, 2000).

Como pode ser observado na discussão acima a via mitocondrial e a via dos receptores de morte estão interligadas, pois ambas as vias no final convergem para a caspase-3 (Figura 2). A caspase-3 tem como função clivar uma série de proteínas, tais como, PARP (poli (ADP-ribose) polimerase), enzimas de reparo do DNA, lamina nuclear (CHANG; YANG, 2000). Além da caspase-3, as duas vias podem estar interligadas através do Bid, uma proteína proapoptótica (YIN, 2000). O Bid é uma proteína encontrada no citosol das células e que normalmente é clivada pela caspase-8, formando uma proteína truncada, tBid, a qual é translocada para a mitocôndria (LI et al., 1998; LUO et al., 1998). Na mitocôndria o tBid ativa o Bax, iniciando a liberação do citocromo c e conseqüentemente a disfunção mitocondrial (HAIMOVITZ-FRIEDMAN, 1998; HENGARTNER, 2000; ELMORE, 2007). Portanto pode ser facilmente visualizado que o processo de apoptose está totalmente interligado e que isto é necessário para a amplificação do sinal apoptótico e ativação das caspases (**Figura 3**).

Figura 3. Esquema das vias extrínseca e intrínseca da apoptose.



Fonte: Adaptado de (NATEGE et al., 2009).

A terapia imuno-específica (imunoterapia) há anos vem sendo estudada com o objetivo de diminuir a toxicidade causada pelos quimioterápicos associando com o aumento da eficácia terapêutica (ZITVOGEL et al., 2008). A imunoterapia pode ser dividida em três categorias principais: anticorpos monoclonais, vacinas e modificadores da resposta imune (KULCSÁR, 1997).

Dentre as drogas que agem em alvos específicos que estão em uso clínico podemos destacar o flavopiridol, o primeiro potente inibidor de quinases dependentes de ciclina (cdks) (TAN, 2002). Este fármaco induz parada no ciclo celular e inibe o crescimento tumoral em várias linhagens de células tumorais e xenografts (SENDEROWICZ; SAUSVILLE, 2000). Além do mesilato de imatinibe (Gleevec[®]), um inibidor de tirosina quinase (Bcr-Abl) que se destacou no tratamento de leucemia mieloide crônica (LMC) (DRUKER et al, 2001), e do Trastuzumabe (Herceptin[®]), um anticorpo monoclonal humanizado utilizado em pacientes com câncer de mama positivo para HER2 (JOENSUU et al., 2006; PICCART-GEBHART et al., 2005; SLAMON et al., 2001; SLAMON; PEGRAM, 2001). O pertuzumabe (Perjeta[™]), é

um antagonista do receptor HER2/neu, aprovado pelo FDA em 2012, para o uso no tratamento de determinados pacientes com câncer metastático positivo para HER2 em combinação com Trastuzumabe e Docetaxel (NCI, 2012b). Dessa maneira, o uso de quimioterápicos no tratamento antineoplásico tem como finalidade induzir a morte das células tumorais (FULDA; DEBATIN, 2004) sem, no entanto, atingir as células normais, ou que, se houver algum efeito tóxico, que este seja reduzido nas células normais.

1.2 PRODUTOS NATURAIS

Os produtos naturais compreendem todos os produtos derivados de plantas, animais, micróbios e organismos marinhos, sendo uma fonte rica para a descoberta de novos fármacos. Historicamente, a mais importante fonte natural tem sido as plantas. A pesquisa utilizando plantas medicinais tem avançado em duas linhas principais: etnofarmacologia e toxicologia. Estas estratégias têm produzido muitas substâncias valiosas e provavelmente produzirão muitas outras (TULP; BOHLIN, 2004).

Há muitos anos, a natureza representa uma fonte de novas drogas e especialmente no século passado, muitos medicamentos úteis foram desenvolvidos a partir de fontes naturais, em especial de plantas (CRAGG; GROTHAUS; NEWMAN, 2009).

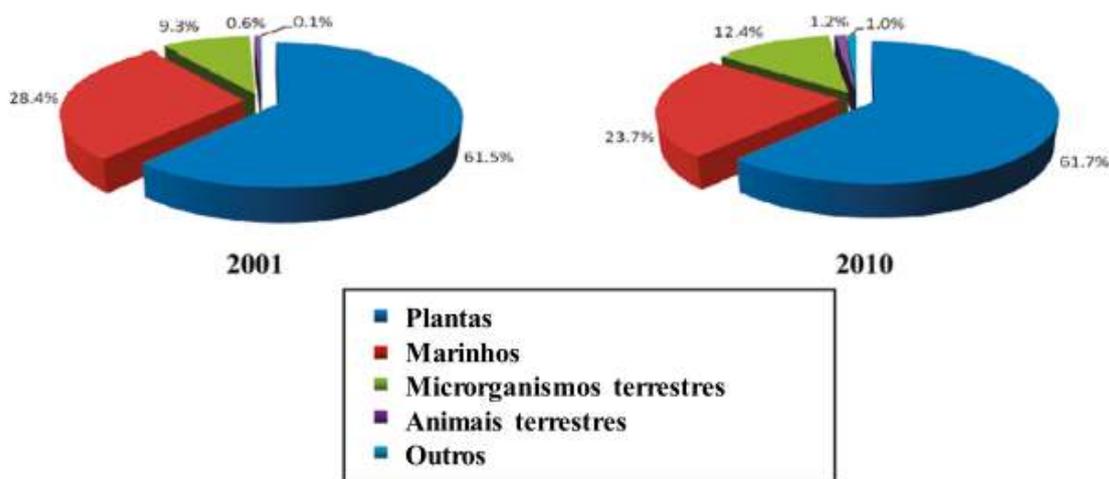
Segundo Organização Mundial de Saúde (OMS) estima-se que aproximadamente 65% da população mundial depende principalmente de medicamentos obtidos de origem vegetal para o tratamento de suas enfermidades. Os produtos vegetais, portanto, desempenham um papel importante no sistema de saúde da população de grande parte do mundo, principalmente em países em desenvolvimento (CRAGG; GROTHAUS; NEWMAN, 2009; FARNSWORTH et al., 1985).

Entre o período de 1981 a 2007, cerca de 63% dos novos medicamentos foram desenvolvidos a partir de produtos naturais, ou dando origem a fitoterápicos ou inspirando o desenvolvimento de moléculas sintéticas com estruturas semelhantes aos dos produtos naturais (NEWMAN; CRAGG, 2007).

Um levantamento feito por Kinghorn e colaboradores (2011) mostrou que o perfil das drogas obtidas a partir de produtos naturais entre os anos de 2001 a 2010 não foi alterado

significativamente, afirmando que as plantas continuam sendo a principal fonte de novas moléculas representando em torno de 60% de todas as moléculas descobertas e promissoras do mundo (**Figura 4**) (KINGHORN et al., 2011).

Figura 4. Comparação dos tipos de organismos como fontes de novos compostos nos anos de 2001 (Total de 1142 novos compostos) e 2010 (Total de 1369 novos compostos).



Fonte: Adaptado de (KINGHORN et al., 2011).

Nos anos de 2001 e 2002, aproximadamente 25% dos medicamentos mais vendidos no mundo eram produtos naturais ou derivados destes (BUTLER, 2004). Além disso, um estudo realizado analisando as prescrições médicas mostrou que o uso desses medicamentos é realizado no tratamento de aproximadamente 87% de todas as doenças humanas, como agentes antimicrobianos, anticâncer, anticoagulantes, antiparasitários, dentre outros (NEWMAN; CRAGG; SNADER, 2003).

No Brasil, a indústria de medicamentos tenta concentrar uma parcela significativa na produção de fitoterápicos, no entanto, vários problemas são encontrados nestes produtos. Os mais frequentes são: identificação botânica errada, composição química não uniforme, presença de contaminantes, bula irregular e prazo de validade determinado empiricamente. Todas estas questões demonstram a deficiência e precariedade desde a matéria prima até o produto final. A legislação brasileira mais atual submete a indústria ao desenvolvimento de tecnologias que assegurem e confirmem a eficácia do futuro fármaco. Portanto, é dentro deste contexto que os trabalhos científicos gerados por universidades e/ou centros de pesquisas,

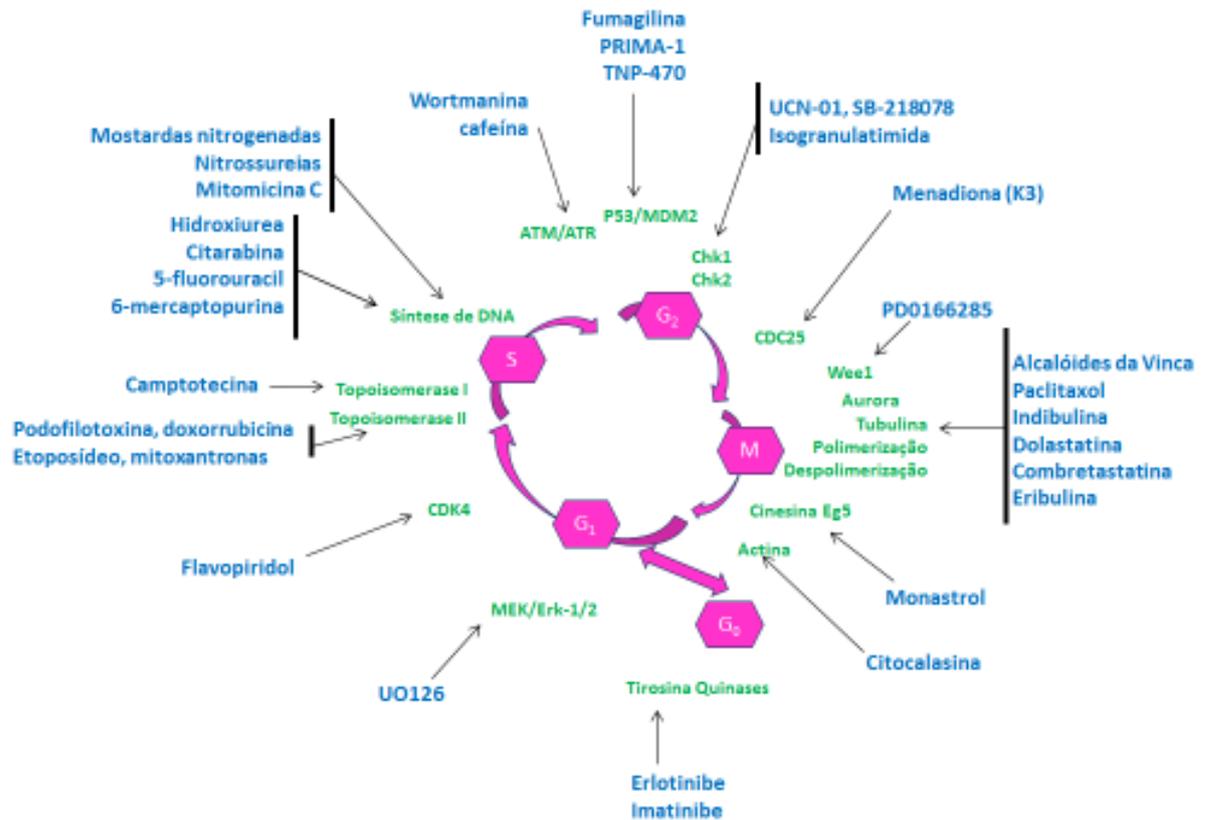
além de monografias, dissertações e teses, ajudam a responder as necessidades da indústria de fitoterápicos fornecendo dados importantes na produção destas formulações (OLIVEIRA et al., 2007; TOLEDO et al., 2003).

Em relação ao tratamento do câncer, as plantas possuem uma longa história. Em 1971 Hartwell publicou uma revisão intitulada “*Plants used against cancer. A survey*” onde descreveu a utilização de mais de 3000 espécies de plantas que apresentavam efeitos benéficos para o tratamento do câncer (GRAHAM et al., 2000; HARTWELL, 1971; NEWMAN; CRAGG, 2012).

Newman & Cragg (2012), publicaram um artigo mostrando que de 1130 fármacos aprovados para utilização médica, entre os anos de 1981 a 2010, 128 foram aprovados para o tratamento do câncer (NEWMAN; CRAGG, 2012).

Como podemos perceber, na área do câncer, os compostos obtidos de fontes naturais tem apresentado fundamental importância (KINGHORN et al., 2011). Estas moléculas possuem um vasto mecanismo de ação promovendo efeitos principalmente citotóxicos, antiproliferativos e antiangiogênicos. Podendo também inibir a progressão do ciclo celular por diversas maneiras tais como: as nitrosuréias, mitomicina C e o 5-fluorouracil que inibem a síntese de DNA, os alcaloides da *Vinca* que agem na polimerização da tubulina, a camptotecina, etoposídeo, e a doxorubicina inibidores de da topoisomerase I e II, o monastrol que inibe a fase mitótica do ciclo celular inibindo a cinesina Eg5 além dos inibidores de tirosinas quinases, citados anteriormente como o mesilato de imatinibe (Gleevec[®]), cloridrato de erlotinibe (Tarceva[®]), flavopiridol, entre outros (**Figura 5**). (COCHRAN et al., 2005; CRAGG; GROTHAUS; NEWMAN, 2009; DRUKER et al., 2001; GORDALIZA et al., 2000; MEIJER, 2003; ORMROD; SPENCER, 1999; SRIVASTAVA et al., 2005; TAN, 2002).

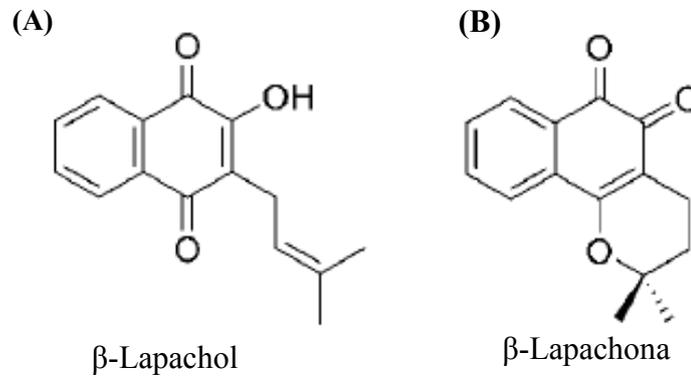
Figura 5. Produtos naturais e o ciclo celular.



Fonte: Adaptado de (CRAGG; GROTHAUS; NEWMAN, 2009; MEIJER, 2003).

Outros compostos podem ativar caspases e/ou causar apoptose. Uma molécula bem conhecida e relativamente simples é o β -lapachol, uma naftoquinona isolada inicialmente da casca da *Tabebuia avellaneda* sendo posteriormente isolada de outras espécies do mesmo gênero. Esta molécula foi bastante estudada nos anos 70 chegando a estudos clínicos pelo *National Cancer Institute* (NCI). Mais tarde, o β -lapachol foi retirado devido a níveis inaceitáveis de toxicidade sendo substituído pela β -lapachona, que mostrou ter um mecanismo de ação interessante, apresentando uma menor toxicidade (**Figura 6**) (CRAGG; GROTHAUS; NEWMAN, 2009).

Figura 6. Estruturas das naftoquinonas β -Lapachol (A) e β -Lapachona (B).

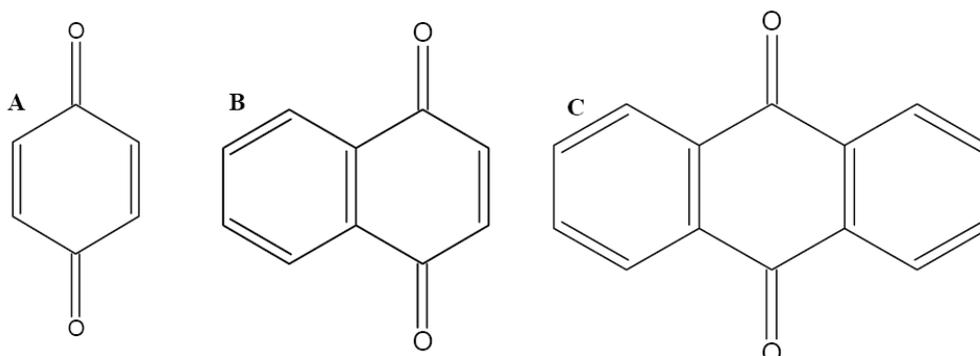


Muitos outros compostos interessantes são conhecidos e estudados tanto em fase pré-clínica quanto em fase clínica mostrando que ainda não encontramos um fármaco ideal, mas que a procura deste não deve ser cessada e que os produtos naturais sejam eles de plantas, bactérias ou organismos marinho são uma fonte inestimável de novas moléculas e que devem ser muito bem exploradas.

1.3 QUINONAS

As quinonas estão envolvidas na cadeia biológica de transferência de elétrons, localizadas nas membranas das mitocôndrias, tanto em bactérias aeróbias (COLLINS, 1994) quanto em cloroplastos, e nos processos de respiração celular e fotossíntese das plantas. Com base na sua estrutura molecular, as quinonas são divididas em diferentes grupos, utilizando-se como critério o tipo de sistema aromático que sustenta o anel quinônico: benzoquinonas - um anel benzênico; naftoquinonas - um anel naftalênico; antraquinonas - um anel antracênico linear ou angular (**Figura 7**) (SILVA; FERREIRA; SOUZA, 2003).

Figura 7. Estrutura esquemática de (A)- benzoquinona, (B) naftoquinona e (C) antraquinona



São compostos largamente distribuídos na natureza, estando associadas a atividades biológicas diversas, dentre elas, a atividade anticâncer. Embora, haja muitos agentes clinicamente importantes contendo núcleo quinônico com atividade anticâncer (antraciclina, mitoxantrona, entre outras), há necessidade de novos testes para novas descobertas. A literatura relata, em artigos sucessivos, atividades biológicas para quinonas, como a plumbagina, juglona e β -lapachona (BEY et al., 2007; CHEN et al., 2004; DA SILVA et al., 2010; DE ANDRADE-NETO et al., 2004; MOLFETTA et al., 2005; MONTENEGRO et al., 2010; OUGH et al., 2005; SINHA et al., 2012).

O mecanismo altamente citotóxico das quinonas está relacionado intrinsecamente ao seu comportamento químico. Do ponto de vista toxicológico, as quinonas podem ser tanto oxidantes quanto eletrofílicas, conferindo uma alta reatividade às mesmas. Do ponto de vista biológico, o DNA representa o principal alvo destes compostos, uma vez que muitas delas pertencem aos grupos de intercaladores e/ou agentes alquilantes, e/ou inibidores de topoisomerasas (ASCHE, 2005). Assim vários mecanismos de ação já foram propostos para explicar sua atividade citotóxica. Estudos demonstram que as quinonas podem sofrer redução eletrofílica por enzimas como NADPH: citocromo P450 redutase ou a NADH ubiquinona oxidoreductase, produzindo radicais semiquinonas. Em presença de oxigênio estes radicais semiquinonas participam do ciclo redox para gerar espécies reativas de oxigênio (EROs), como ânions superóxidos e peróxido de hidrogênio. Além disso, as quinonas podem reagir com grupos tióis de proteínas e glutathiona (GSH), levando em consideração que quinonas são compostos altamente eletrofílicos. Assim, ao reagirem com a glutathiona, espontaneamente ou catalizadas pela glutathiona-S-transferase, formam conjugados denominados hidroquinonas-glutathionil. Uma vez que o GSH diminui a sua concentração, proteínas dependentes de grupos

tióis (SH) celulares podem ser alquiladas, ocasionando mudanças irreversíveis e levando a célula à morte (ARAÚJO et al., 2012; CHUNG et al., 1999; MARINHO-FILHO et al., 2010; MONKS; JONES, 2002; MONKS; LAU, 1998; RODRIGUEZ et al., 2004). Apesar dos intensos estudos, o exato mecanismo de ação das quinonas ainda não está bem esclarecido (ASCHE, 2005) (**Figura 8**).

Figura 8. Sumário dos potenciais mecanismos moleculares citotóxicos para quinonas, com destaque para a formação de espécies reativas de oxigênio (ERO) importante na via de oxidação do DNA, e o papel da glutatona (GSH) e de NAD(P)H:quinona oxidorredutase (NQO1) nas vias de destoxificação celular por meio de eliminação de derivados quinônicos tóxicos (hidroquinonas)



Fonte: adaptado de (BOLTON et al., 2000).

1.4 ESTRESSE OXIDATIVO

O termo radical livre é frequentemente usado para designar qualquer átomo ou molécula com existência independente, contendo um ou mais elétrons não pareados, nos orbitais externos. Isto determina uma atração para um campo magnético, o que pode torná-lo altamente reativo, capaz de reagir com qualquer composto situado próximo à sua órbita externa, passando a ter uma função oxidante ou redutora de elétrons (HALLIWELL, 2001).

A geração de espécies reativas de oxigênio (EROs) intracelular é um processo inevitável e muitas vezes fisiologicamente importante (SKULACHEV, 1996). As EROs podem ser produzidas durante a respiração celular, na mitocôndria, e por sistemas enzimáticos distintos (KAMATA; HIRATA, 1999). À medida que o oxigênio é reduzido à água, uma variedade de intermediários é gerada na mitocôndria. Alguns desses intermediários, conhecido como EROs, podem ser liberados da mitocôndria e alcançar o citosol e, posteriormente o restante da célula. Dentre as EROs liberadas da mitocôndria estão o íon superóxido ($O_2^{\cdot-}$), o oxigênio singlet, o peróxido de hidrogênio (H_2O_2) e radicais hidroxilas ($\cdot OH$) como mostrado na reação abaixo (WEINBERG, 2008).

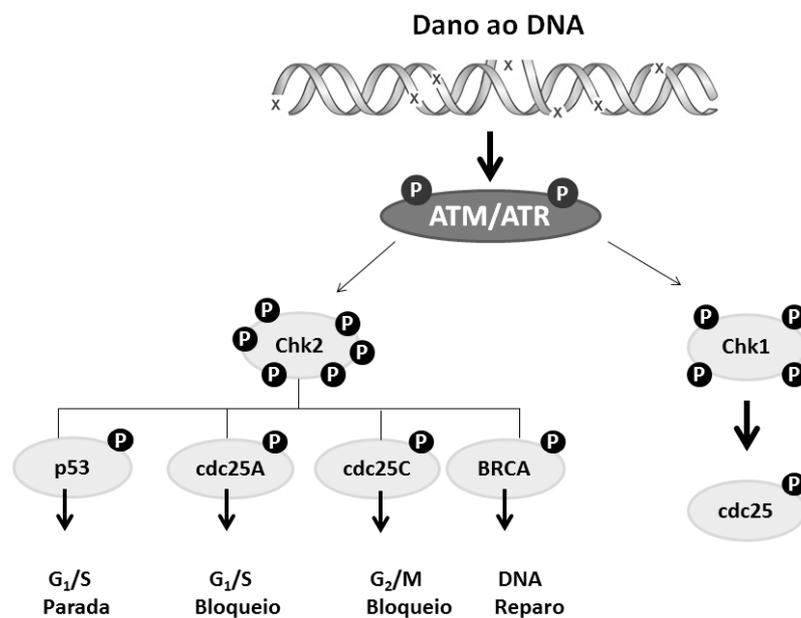


Em indivíduos saudáveis, essas espécies reativas estão envolvidas na produção de energia, fagocitose, regulação do crescimento celular, sinalização intercelular e síntese de substâncias biológicas importantes (BURDON, 1995; KAMATA; HIRATA, 1999). No entanto, o desequilíbrio entre a formação e a remoção dos radicais livres no organismo, decorrente da diminuição dos antioxidantes endógenos ou do aumento da geração de espécies oxidantes, leva a um estado pró-oxidante, que favorece a ocorrência de lesões oxidativas em macromoléculas, tais como DNA, lipídios, carboidratos e proteínas, além de estruturas celulares. Essas lesões podem provocar a morte celular, caracterizando assim o estresse oxidativo (COSTANTINI et al., 2000).

As EROs, especialmente o H_2O_2 , são moléculas importantes em vias de sinalização tanto de animais quanto de plantas (HANCOCK; DESIKAN; NEILL, 2001). Em animais, as EROs podem influenciar na proliferação celular, alterando as vias de morte celular, influenciando no processo de apoptose (ativando ou inibindo) e quando presentes em altas concentrações pode desencadear o processo de necrose (MATÉS; SÁNCHEZ-JIMÉNEZ,

2000). Além disso, podem estar envolvidas na expressão de genes e na ativação de várias vias de sinalização celular. O estresse oxidativo gerado pelo H_2O_2 aumenta a expressão da glutationa-S-transferase e da fenilalanina (DESIKAN et al., 1998), além de proteínas quinases e proteínas de reparo do DNA. O H_2O_2 também é descrito por promover dano oxidativo gerado pela ativação das vias ATM/Chk2 e ATR/Chk1 provocando a morte de células tumorais (CAMPANER; AMATI, 2012; DESIKAN et al., 2001; HANCOCK; DESIKAN; NEILL, 2001). O dano genotóxico, em células eucarióticas, normalmente é percebido por quinases ATM/ATR que acionam a via de reparo. Quando o dano é na dupla fita do DNA (DSB), normalmente a célula não consegue repará-lo, provocando uma instabilidade genética levando as células à morte, frequentemente por apoptose. A ATM consiste no principal sensor de dano ao DNA de dupla fita. Quando esta é fosforilada inicia a ativação de diversas outras quinases da via dando ao processo de reparo ou de morte celular (BROWN; BALTIMORE, 2003; CANMAN, 1998). A ATR, diferentemente da ATM, é ativada após dano de fita simples do DNA, ativando proteínas executoras do processo de parada do ciclo celular e/ou morte celular (**Figura 9**) (BROWN; BALTIMORE, 2003; ROOS; KAINA, 2012).

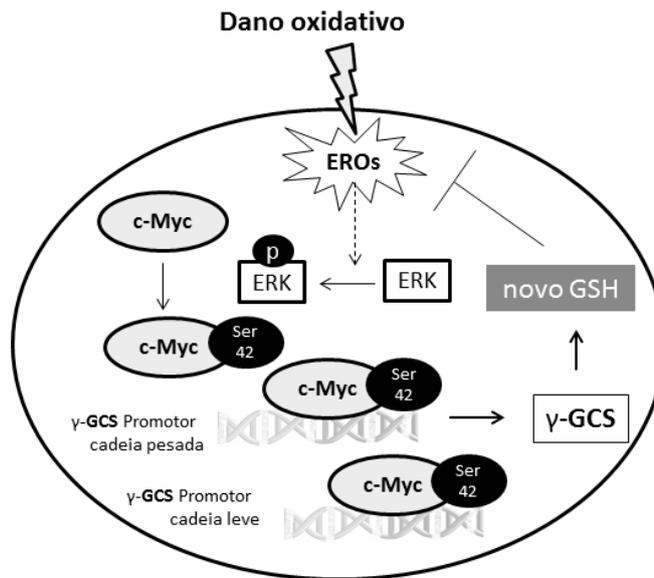
Figura 9. Esquema da via de dano ao DNA ATM/ATR.



Mais recentemente foi descoberto que o c-myc regula a síntese de glutationa, através da inibição da glutaminase mitocondrial, enzima esta que cataliza o processo de síntese da glutationa. Neste mesmo artigo é sugerido que as espécies reativas de oxigênio possam

regular este processo alterando a homeostase da célula (**Figura 10**) (BENASSI et al., 2006; GAO et al., 2009).

Figura 10. Mecanismo indutor de nova síntese de glutathiona dependente de espécies reativas de oxigênio e do c-Myc.



Fonte: Adaptado de (BENASSI et al 2006)

Um dos campos de pesquisa bastante explorado atualmente para o tratamento de diversos tipos de câncer, consiste no desenvolvimento de novas drogas que sejam capazes de promover a geração de EROS (RIDNOUR et al., 2006; VERMA, 2006), tais como quinonas (KOVACIC; POZOS, 2006), nitroaromáticos (KOVACIC; SOMANATHAN, 2011a) e sais imino (KOVACIC; COOKSY, 2005; KOVACIC; SOMANATHAN, 2011a). Vários pesquisadores sugerem que em níveis mais elevados de EROS, as células tumorais sofrem danos irreversíveis que podem levá-las à morte, enquanto que células normais não são afetadas, pois células normais possuem um aparato antioxidativo bem regulado, balanceando, assim, a geração e eliminação de EROS (GUPTE; MUMPER, 2007; PELICANO; CARNEY; HUANG, 2004; RAJ et al., 2011). Desse modo, alguns compostos exercem seus efeitos tóxicos através da superprodução de EROS, induzindo a morte principalmente em células tumorais e não em células normais (DINKOVA-KOSTOVA et al., 2010; RAJ et al., 2011; TRACHOOTHAM et al., 2006). Esses compostos geradores de EROS podem mostrar

seletividade para alguns tipos de células tumorais (GUPTE; MUMPER, 2007; PELICANO; CARNEY; HUANG, 2004; RAJ et al., 2011).

Portanto, substâncias que promovam o estresse oxidativo produzindo EROs diretamente nas células ou inibindo o aparato antioxidativo (KONG; LILLEHEI, 1998), causando desequilíbrio no estado redox intracelular ou atuando como catalisadores na toxicidade das EROs (FRY; JACOB, 2006) são bons candidatos para o tratamento do câncer (HILLARD et al., 2008).

1.5 GÊNERO *CORDIA* E AS CORDIAQUINONAS

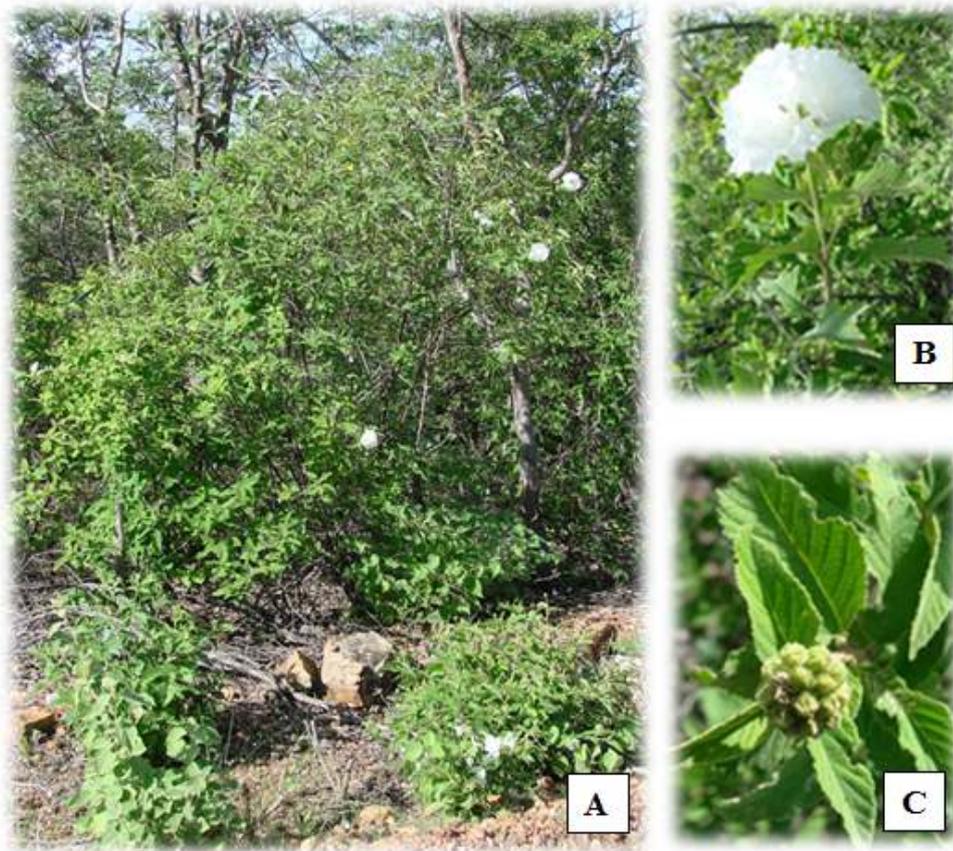
O gênero *Cordia* é constituído por aproximadamente 300 espécies com distribuição pantropical (ABRANTES; AGRA, 2004). É composto por três subgêneros: *Varronia* (L), *Cordia* (L) e *Myxa* Taroda, sendo este último subdividido em três seções: *Myxa* (Endl.) D.C., *Gerascanthus* (Brousne) Don. e *Superbiflorae* Taroda. No Brasil, o subgênero *Varronia* é representado por trinta espécies e o subgênero *Myxa* é representado por trinta e cinco espécies (TARODA; GIBBS, 1987).

O gênero *Cordia* L. foi descrito em 1753 por Linnaeus (TARODA, 1984) e pertence à família Boraginaceae. Esta família possui cerca de 130 gêneros e 2300 espécies com ampla distribuição nas regiões temperadas, subtropical e tropicais do mundo (ANGELY, 1970; BARROSO, 1986; FICARRA et al., 1995), sendo o gênero *Cordia* um dos principais e mais importantes da família Boraginaceae. Quimicamente, esse gênero é conhecido como uma fonte produtiva de metabólitos secundários estruturalmente diversos destacando-se as quinonas, hidroquinonas, triterpenos, álcoois terpênicos, compostos fenólicos, flavonoides, saponinas, taninos, compostos cianogênicos, mucilagens, esteroides, compostos nitrogenados e ácidos graxos (BARROSO, 1986; DINIZ et al., 2009; FREITAS et al., 2012; PAULINO et al., 2011; TARODA; GIBBS, 1986; TARODA, 1984)

A *C. leucocephala* Moric. (**Figura 11**) é uma planta endêmica da região Nordeste brasileira, popularmente conhecida como maria-preta, moleque duro, negro-duro, bamburral, entre outros (AGRA, 1996; TARODA, 1984). Suas folhas e raízes são bastante utilizadas na medicina popular na forma de infusão e decocto, sobretudo das folhas. É indicado no combate ao reumatismo, indigestão e como tônico em geral. O xarope de suas folhas é usado no

tratamento do raquitismo infantil e artrites (AGRA, 1996). Segundo Chiappeta, Mello e Maciel (1983) a planta possui atividade bactericida e fungicida contra os seguintes microrganismos: *Bacillus subtilis*, *Escherichia coli*, *Streptococcus faecalis*, *Staphylococcus aureus*, *Mycobacterium smegmatis* e *Candida albicans* (CHIAPPETA; MELLO; MACIEL, 1983).

Figura 11. Fotos de *C. leucocephala*. Planta inteira - A; folhas e inflorescência - B; fruto - C.



Fonte: Prof. Edilberto Rocha Silveira.

As quinonas isoladas do gênero *Cordia* recebem o nome de cordiaquinonas e pertencem ao grupo das naftoquinonas, sendo consideradas marcadores quimiotaxonômicos para este gênero. No entanto, a ocorrência nas plantas é limitada às raízes e, raramente, são encontradas no tronco (ARKOUDIS; STRATAKIS, 2008; FREITAS et al., 2012; YAJIMA et al., 2003).

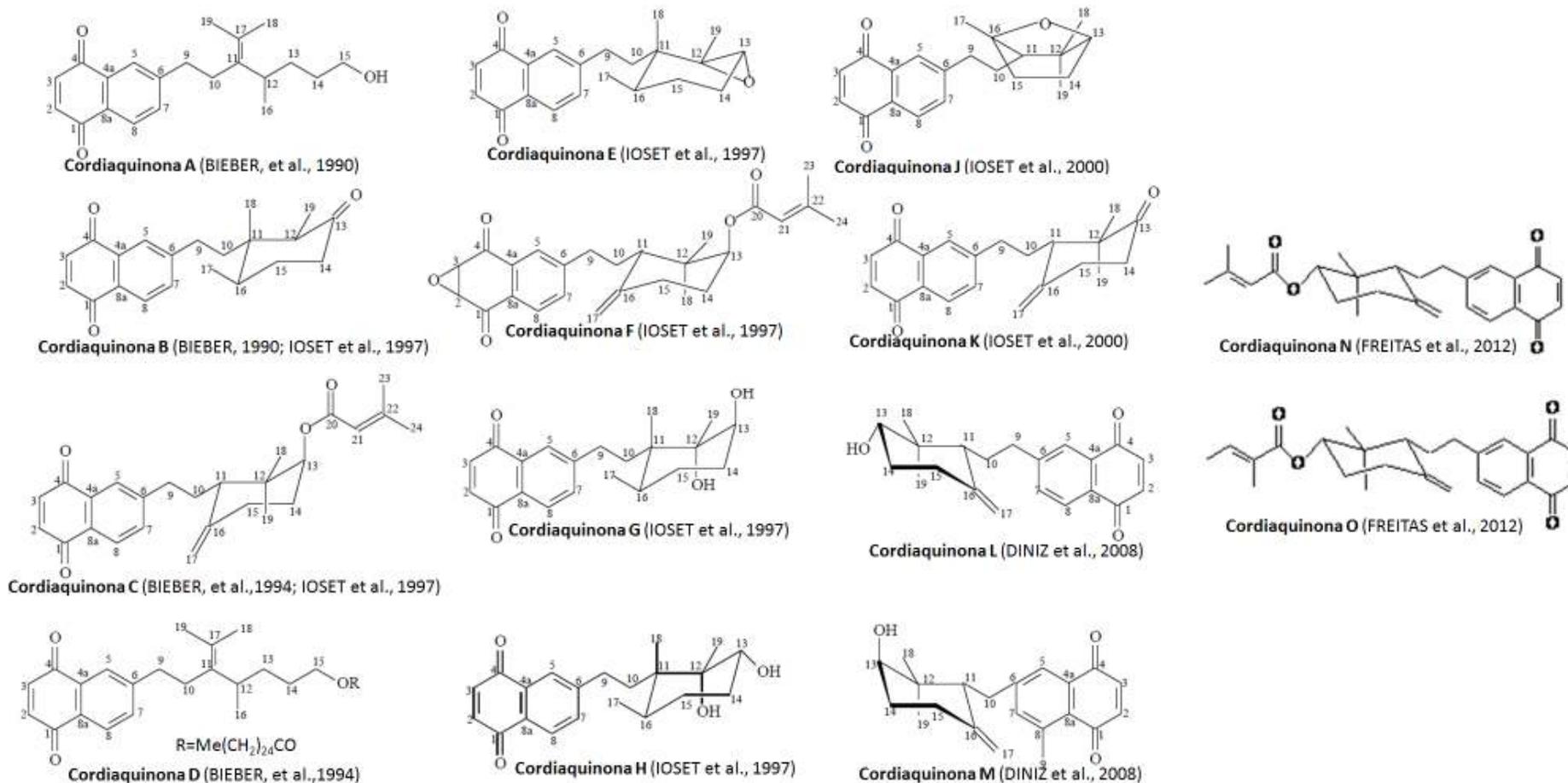
Bieber e colaboradores (1990) foram os primeiros pesquisadores a identificar duas quinonas merosesquiterpenóides em plantas do gênero *Cordia* denominadas por eles de

cordiaquinonas A e B. Posteriormente em 1994, Bieber, Krebs e Schafer isolaram as cordiaquinonas denominadas C e D (**Figura 12**) (BIEBER et al., 1990).

A cordiaquinona B foi também encontrada em raízes de *Cordia linnaei* (IOSET et al., 1998). As cordiaquinonas E, F e H foram primeiramente isoladas das raízes de *Cordia linnaei* (IOSET et al., 1998), enquanto as cordiaquinonas J e K foram posteriormente isoladas das raízes de *Cordia curassavica* (**Figura 12**) (IOSET et al., 2000a).

Diniz e colaboradores (2009) isolaram mais duas novas cordiaquinonas (L e M) extraídas das raízes de *C. leucocephala* (**Figura 12**), contudo, ainda não foi descrita nenhuma atividade biológica para estas 2 novas cordiaquinonas. Em 2012, nosso grupo em colaboração com o Departamento de Química Orgânica da Universidade Federal do Ceará isolou e identificou das raízes de *C. polycephala* mais duas novas cordiaquinonas N e O (**Figura 9**) com potente atividade citotóxica em células tumorais (FREITAS et al., 2012) apresentando citotoxicidade semelhante à cordiaquinona J observado anteriormente também pelo nosso grupo (MARINHO-FILHO et al., 2010).

Figura 12. Estruturas das naftoquinonas isoladas de plantas do gênero *Cordia* (cordiaquinonas)

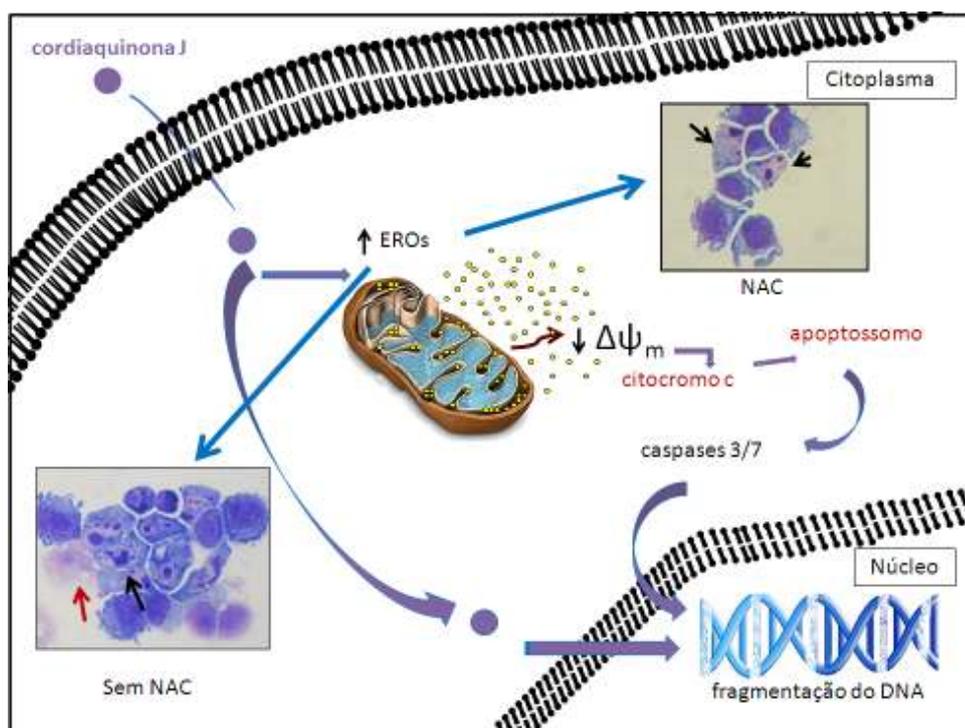


Muitas cordiaquinonas isoladas já foram descritas quanto a sua variedade de atividades biológicas. Dentre seu potencial podemos citar principalmente as atividades inseticida, antifúngica e citotóxica (ARKOUDIS; STRATAKIS, 2008; FREITAS et al., 2012; IOSET et al., 2000a, 2000b, 1998; MARINHO-FILHO et al., 2010).

Estudos citotóxicos com a cordiaquinona J já foram realizados pelo nosso grupo, onde foi observado um potente efeito citotóxico em células tumorais, principalmente em células leucêmicas (HL-60) com valor de CI50 de 2,7 μM após 72h de incubação. (MARINHO-FILHO et al., 2010).

Neste mesmo trabalho foi descrito pela primeira vez o mecanismo citotóxico da cordiaquinona J, isolada de *C. leucocephala*. A molécula demonstrou uma rápida indução de apoptose e necrose, ativando caspases 3 e 7, em apenas 3 horas de incubação por um mecanismo parcialmente dependente de EROs *in vitro* (MARINHO-FILHO et al., 2010) (**Figura 13**). Apesar da grande quantidade de trabalhos com atividade citotóxica em células neoplásicas utilizando naftoquinonas, nosso grupo é o único a estudar a atividade antitumoral de cordiaquinonas (FREITAS et al., 2012; MARINHO-FILHO et al., 2010).

Figura 13. Mecanismo de ação proposto para os efeitos relacionados a cordiaquinona J sobre as células leucêmicas (HL-60).



Fonte: (MARINHO-FILHO, 2009).

RELEVÂNCIA E JUSTIFICATIVA

O câncer é um conjunto de doenças de origem multifatorial com fundo genético e de difícil tratamento, sendo o principal causador de mortes em países em desenvolvimento. Vários estudos são realizados com o objetivo de encontrar um fármaco que demonstre atividade mais efetiva em células tumorais e com menor toxicidade em células não tumorais do organismo. Dentre as moléculas já estudadas para o tratamento do câncer as quinonas representam uma classe química com características estruturais favoráveis para serem utilizadas no tratamento desta enfermidade, pois apresenta uma potente atividade antitumoral contra diversas linhagens de células cancerígenas apresentando mecanismos de morte celular dependente de estresse oxidativo.

As células tumorais normalmente apresentam o aparato antioxidante intracelular deficiente quando comparado ao de células saudáveis, portanto compostos que ativem a via do estresse oxidativo são bons candidatos para o tratamento do câncer, pois podem induzir morte seletivamente de células tumorais.

Estudos realizados pelo nosso grupo mostram que as cordiaquinonas, naftoquinonas isoladas de plantas do gênero *Cordia*, apresentam potente atividade citotóxica em células tumorais e que induzem morte de células através da geração de espécies reativas de oxigênio provocando estresse oxidativo.

Então o objetivo deste trabalho é aprofundar o mecanismo antitumoral da cordiaquinona J e relacionar os seus efeitos tóxicos em células tumorais e não tumorais.

2 OBJETIVOS

2.1 Objetivo geral:

- ✓ Aprofundar o estudo do mecanismo de ação e avaliar a eficácia antitumoral da cordiaquinona J isolada de *Cordia leucocephala* em modelos *in vitro* e *in vivo*.

2.2 Objetivos específicos:

- ✓ Avaliar o mecanismo molecular de indução de apoptose pela cordiaquinona J em células leucêmicas humanas (HL-60);
- ✓ Avaliar o perfil eletroquímico da cordiaquinona J em meio prótico a aprótico e a interação da cordiaquinona J com o DNA utilizando biossensores de DNA;
- ✓ Avaliar o mecanismo molecular de indução de dano ao DNA pela cordiaquinona J em células leucêmicas humanas (HL-60) e em células mononucleares de sangue periférico (CMSP);
- ✓ Avaliar a participação do c-myc no controle das vias de ativação de morte induzida pela cordiaquinona J;
- ✓ Avaliar o potencial antitumoral da cordiaquinona J *in vivo* utilizando o tumor sarcoma-180 como modelo;
- ✓ Avaliar a sobrevivência dos animais transplantados com o tumor sarcoma-180 tratados com a cordiaquinona J;
- ✓ Avaliar os parâmetros toxicológicos dos animais tratados com a cordiaquinona J através de testes bioquímicos, hematológicos e histopatológicos.

3 MATERIAIS E MÉTODOS

3.1 Materiais utilizados

A especificação dos equipamentos, dos softwares de aquisição e análise dos dados, bem como o fabricante dos reagentes utilizados está detalhada junto à descrição das metodologias. As soluções preparadas e a descrição dos componentes dos kits utilizados estão detalhadas no Anexo I – Soluções e Kits.

3.2 Metodologia Experimental

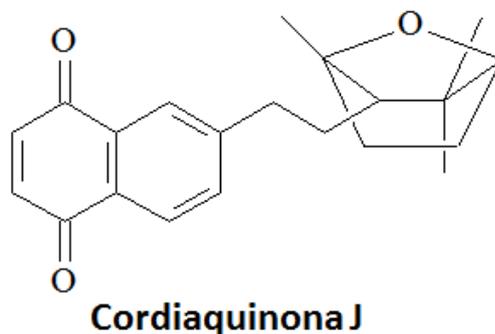
3.2.1 Isolamento e identificação da Cordiaquinona J

A planta *Cordia leucocephala* foi coletada na cidade de Mossoró – Rio grande do Norte – Brasil, em maio de 2006. A espécie tipo (Moss 8827) foi depositada no Herbário Dárdano de Andrade Lima, na Universidade federal Rural do Semi Árido – UFERSA, Rio Grande do Norte, Brasil. A coleta da planta, bem como o isolamento e identificação da substância foi realizada pelo grupo da Professora Dr^a Otilia Deusdênia Loiola Pessoa, do Departamento de Química Orgânica e Inorgânica da UFC, sendo que estas análises estão descritas no presente trabalho para facilitar a apreciação e entendimento do mesmo.

As raízes de *C. leucocephala* secas e em forma de pó (650g) foram extraídas em temperatura ambiente com hexano seguido por 70% de solução hidroalcoólica. Os solventes posteriormente foram removidos sobre pressão reduzida obtendo como rendimento 9,3 e 59,7g de extrato bruto, respectivamente. Uma alíquota do extrato hexano (6,3g) foi fracionada sobre sílica gel obtendo como rendimento quatro frações: hexano (0,84 g), CH₂Cl₂ (4,7 g), EtOAc (0,89 g) e MeOH (0,04 g). Uma alíquota da fração CH₂Cl₂ (650 mg) foi separada por cromatografia em sílica gel em aproximadamente 90 frações com 10mL, utilizando como eluente uma mistura binária de hexano/EtOAc (2:8). Essas frações foram combinadas com base no perfil em cromatografia de camada delgada em sete frações.

A cordiaquinona J (68,9 mg) foi isolado da fração 22/23 (**Figura 14**). O rendimento e o percentual de pureza foram observados por Cromatografia Líquida de alta pressão (HPLC). A estrutura cordiaquinona J foi determinada por ressonância magnética nuclear (RMN) 1D e 2D.

Figura 14: Estrutura da cordiaquinona J isolada de *Cordia leucocephala*.



3.2.2 Avaliação da Atividade Citotóxica *in vitro*

3.2.2.1 Linhagens e modelos celulares

As linhagens celulares utilizadas para avaliação da atividade antiproliferativa foram obtidas a partir de doação pelo Instituto Nacional do Câncer dos Estados Unidos (US-NCI) e estão listadas na **tabela 1**.

Além das células tumorais, foram utilizadas as linhagens celulares HB4a e HB4a/C3.6, que apresenta expressão moderada do receptor ErbB-2 (receptor do fator de crescimento epidérmico) obtidas pela transfecção de uma linhagem de célula epitelial luminal mamária humana imortalizada (HB4a) (STAMPS et al., 1994) com o plasmídeo contendo o cDNA de ErbB-2 (HARRIS et al., 1999). Essas células foram gentilmente doadas pela Dra. Anamaria Camargo Aranha do Instituto Ludwig (São Paulo, Brasil).

As células mononucleadas de sangue periférico (CMSP) obtidas de voluntários sadios foram utilizadas como modelo para avaliação da citotoxicidade sobre células normais não transformadas.

3.2.2.2 Manutenção das linhagens celulares

As linhagens celulares foram manuseadas em ambiente estéril de câmara de fluxo laminar vertical (VECO, modelo Biosafe 12, classe II) e mantidas em incubadora de CO₂ a 37 °C com atmosfera de 5% de CO₂ (NUAIRE, modelo TS Autoflow).

As linhagens celulares foram cultivadas em frascos plásticos para cultura (25 cm², volume de 50 mL ou 75 cm², volume de 250 mL, Corning), utilizando o meio de cultura RPMI 1640 (Gibco) complementando com 10% de soro fetal bovino e 1% de antibióticos (para uma concentração final de 100 U/mL penicillina e 100 µg/mL estreptomicina). Para as linhagens de células HB4a e HB4a/C3.6, o meio RPMI-1640 foi acrescido de hidrocortisona 1 µg/mL e insulina 5 µg/mL.

As culturas tiveram seu crescimento acompanhado sob microscópio óptico de inversão (ZEISS, modelo Axiovert 40C) a cada 24 horas. Quando necessário, as células foram repicadas em meio de cultura novo, numa concentração de 0,5-1,0 x 10⁶ células/mL. Para o desprendimento das células aderidas foi utilizado solução de tripsina-EDTA 0,5% (Gibco) diluída 10X em PBS.

Tabela 1. Linhagens celulares utilizadas no ensaio de MTT

Linhagem celular	Tipagem Histológica	Origem	Concentração de plaqueamento
HL-60	Leucemia promielocítica	Humana	0,3 x 10 ⁶
K562	Leucemia mielóide crônica	Humana	0,3 x 10 ⁶
SF 268	Sistema Nervoso Central	Humana	0,1 x 10 ⁶
SF 295	Glioblastoma	Humana	0,1 x 10 ⁶
PC-3	Próstata	Humana	0,1 x 10 ⁶
PC3-M	Próstata Metastática	Humana	0,1 x 10 ⁶
DU 145	Próstata	Humana	0,1 x 10 ⁶
Ovcar-8	Ovário	Humana	0,1 x 10 ⁶
HCT-116	Próstata	Humana	0,7 x 10 ⁵
MDA MB 435	Melanoma	Humana	0,1 x 10 ⁶

MALME-3M	Melanoma	Humana	0,1 x 10 ⁶
HB4.a	Epitelial normal	Humana	0,1 x 10 ⁶
C3.6	Epitelial normal transfectada	Humana	0,1 x 10 ⁵
CMSP	Linfócito	Humana	0,3 x 10 ⁶

3.2.2.3 Obtenção das células mononucleadas do sangue periférico (CMSP)

As células mononucleadas foram obtidas do sangue periférico de voluntários sadios coletado em tubos tipo *Vacutainer* contendo solução de EDTA K₂ (BD Vacutainer®) como anticoagulante. Após a coleta, 8mL de sangue total foram vagarosamente depositados sobre 2 mL de Ficoll®-Hypaque (Sigma) e centrifugados para separação das fase da solução por velocidade de sedimentação. As células mononucleadas concentram-se na camada localizada na interface entre o plasma (fase clara) e os eritrócitos (fase escura). As CMSP foram retiradas, lavadas 2 vezes com PBS e ressuspensas em meio RPMI 1640 suplementado com 20% de soro fetal bovino e antibióticos (para uma concentração final de 100 U/mL penicillina, 100 µg/mL estreptomicina). Para estimular a proliferação dos linfócitos, foi adicionado ao meio 2% do agente mitogênico fito-hemaglutinina (Sigma).

3.2.2.4 Teste do MTT

Princípio do Teste

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

Procedimento Experimental

As células em suspensão ou monocamadas foram distribuídas em multiplacas de 96 cavidades em densidade entre 0,7 x 10⁵ e 0,3 x 10⁶ células/mL (ajustado para cada linhagem,

como mostrado na **tabela 1**). As células foram incubadas durante 21 horas juntamente com a amostra testada. Após o período de incubação, as placas foram centrifugadas (1500 rpm/15 min), e o sobrenadante foi descartado. Cada cavidade recebeu 150 µL da solução de MTT (10% em meio RPMI 1640) e foi reincubada durante 3 horas em estufa a 37°C e a 5% CO₂. Após esse período, as placas foram novamente centrifugadas (3000 rpm/10 min), o sobrenadante foi desprezado, e o precipitado foi ressuspensionado em 150µL de DMSO para a quantificação do sal reduzido (formazan) nas células vivas. As absorbâncias foram obtidas com o auxílio do espectrofotômetro de placa (Beckman Coulter Inc., modelo DTX-880) utilizando o programa Multimode Detection Software (Beckman Coulter Inc.) no comprimento de onda de 595 nm.

Para investigar o possível mecanismo de ação da cordiaquinona J foram utilizados alguns inibidores de vias envolvidas no estresse oxidativo, apoptose e metabolização de quinonas (**Tabela 2**). Todas as substâncias utilizadas foram pré-incubadas na concentração e no tempo indicado na **tabela 2**. Posteriormente as placas foram centrifugadas (2000 rpm por 5 minutos) o meio foi retirado e um novo meio de cultura foi adicionado com concentrações seriadas de cordiaquinona J por mais 24 horas de incubação.

Tabela 2: Inibidores utilizados no teste do MTT

Inibidores	Mecanismo de ação	Concentrações utilizadas	Pré-tratamento
N-acetil-L-cisteína (NAC)	Sequestrador de espécies reativas de oxigênio	5mM	1h
Dicumarol	Inibidor de NAD(P)H Desidrogenase (Quinona) 1 (NQO1)	50µM	24h
Ciclosporina A	Inibidor da transição da permeabilidade mitocondrial	10µM	1h
BAPTA-AM	Quelante seletivo de estoques de Ca ²⁺ intracelular	5µM	1h
L-butionina-sulfoximina (BSO)	Inibidor da γ -glutamilcisteína sintetase (depressor de glutatona)	10, 30, 100 e 300µM	24 e 48h
Tocoferol (Vitamina E)	Antioxidante que protege a membrana celular do dano oxidativo	50 e 100µM	1h
Ácido L-ascórbico (Vitamina C)	Antioxidante (pode atuar regenerando outros compostos de caráter antioxidante presentes na célula, como vitamina E e GSH)	5, 10, 20 e 40mM	24h
Ácido α -lipóico	Antioxidante e aumenta a expressão de NQO1	0,5 e 1µM	24h

Análise dos Dados

Os experimentos foram analisados segundo suas médias e respectivos erros-padrão. O gráfico absorbância x concentração foi registrado e determinado a sua concentração inibitória média capaz de provocar 50 % do efeito máximo (CI₅₀) e seus respectivos intervalos de confiança de 95 % (IC 95 %) realizado a partir de regressão não-linear no programa GraphPad Prism Software versão 5.0.

3.2.3 Estudo do Mecanismo de Ação

Para os experimentos de determinação do mecanismo de ação de cordiaquinona J, foram utilizadas as células leucêmicas da linhagem HL-60 plaqueadas na concentração de $0,3 \times 10^6$ células/mL e avaliadas quanto a diversos efeitos celulares. Os protocolos aplicados neste estudo examinaram os efeitos concentração e tempo dependentes. As concentrações das amostras testadas foram estimadas a partir do valor da CI_{50} da cordiaquinona J encontrada no método do MTT para esta mesma linhagem celular após incubação por 72 horas (MARINHO-FILHO et al., 2010). Assim as concentrações escolhidas foram de 1,5 e 3,0 μ M para todas as amostras. Os grupos do controle negativo receberam a mesma quantidade de DMSO enquanto a doxorubicina (0,5 μ M) e/ou a β -lapachona (2 e 5 μ M) foram utilizadas como controle positivo.

3.2.3.1 Citometria de Fluxo

A citometria de fluxo é uma técnica utilizada para se determinar diferentes características das partículas biológicas. Os citômetros analisam as células ou partículas em meio líquido que passam através de uma fonte de luz. O desvio da luz, que está relacionado diretamente com a estrutura e morfologia das células, e a fluorescência são determinados para cada partícula que passa pela fonte de excitação. Após a aquisição do desvio da luz e fluorescência de cada partícula, a informação resultante pode ser analisada utilizando-se um computador com programa específico acoplado ao citômetro (SHAPIRO, 1995).

Para todos os compostos testados, cinco mil eventos foram avaliados por experimento e os debris celulares foram omitidos da análise. A fluorescência de células de HL-60 foram então determinadas por citômetro de fluxo Guava EasyCyte Mine usando o software Guava Express Plus após 3 horas de incubação. Cinco mil eventos foram analisados para cada replicata em três experimentos independentes. A avaliação da integridade de membrana, densidade, despolarização mitocondrial e fragmentação do DNA celular foram realizados na presença e na ausência de inibidores específicos de caspases adicionados 1 hora antes do início do tratamento na concentração de 40 μ M. Os inibidores utilizados foram: Z-Asp(OMe)-Gln-Met-Asp(OMe) fluorometil cetona (Z-Asp-OMe-Gln-Met-Asp-OMe-FMK) inibidor de caspases 3 e 6, também foi utilizado o Z-Ile-Glu(O-ME)-Thr-Asp(O-Me) fluorometil cetona (Z-IETD-FMK) inibidor da caspase 8, além do Z-L-E(OMe)-H-D(OMe)- fluorometil cetona

(Z-LEHD-FMK) inibidor de caspase 9 para avaliar a participação de caspases no efeito da cordiaquinona J.

3.2.3.1.1 Determinação da integridade da membrana, densidade e morfologia celular

Princípio do Teste

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

Procedimento Experimental

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

3.2.3.1.2 Análise de conteúdo e fragmentação de DNA

Princípio do Teste

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

Procedimento Experimental

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

3.2.3.1.3 Determinação do potencial transmembrânico mitocondrial

Princípio do Teste

Esse teste baseia-se na capacidade da mitocôndria seqüestrar um corante fluorescente, rodamina 123. Quando esta organela apresenta potencial transmembrânico inalterado, as células que seqüestraram a rodamina emitem alta fluorescência quando atingidas pelo laser. Alterações no potencial mitocondrial transmembrânico levam ao efluxo da rodamina de dentro da mitocôndria, gerando eventos que emitirão menor fluorescência quando comparado com as células que possuem mitocôndrias normais.

Procedimento Experimental

Uma alíquota de 100µL de suspensão de células tratadas e não tratadas foi incubada com 200µL de uma solução de solução de rodamina 1 µg/mL. Após 15 minutos de incubação no escuro, as amostras foram centrifugadas a 2000rpm/5min. O sobrenadante foi então descartado e 100 µL de PBS foi adicionado em cada amostra. Após um período de 30 minutos incubadas no escuro, as amostras foram analisadas no citômetro de fluxo (CURY-BOAVENTURA; POMPÉIA; CURI, 2004).

3.2.3.1.4 Determinação da ativação de caspases iniciadoras 8 e 9

Princípio do Teste

As caspases pertencem a família de proteases cisteínas. A ativação das caspases 8 e 9 possui papel fundamental no mecanismo de apoptose, sendo responsável pela iniciação das vias intrínsecas e extrínsecas da apoptose e pela clivagem de vários componentes celulares relacionados ao reparo e ao controle do DNA. Assim, a quantificação dos níveis de caspase iniciadoras 8 e 9 permite avaliar os mecanismos de indução apoptótica (MEHMET, 2000).

Procedimento Experimental

A detecção das caspases 8 e 9 foi analisada por citometria de fluxo utilizando o Kit FAM de caspases 8 e 9 após 3 horas de incubação com a cordiaquinona J nas concentrações de 1,5 e 3,0 μM e comparadas ao controle negativo (grupo não-tratado). A doxorubicina (0,5 μM) e a β -lapachona (5 μM) foram utilizados como controle positivo. As células ($0,3 \times 10^6$) foram incubadas com o Inibidor de caspases com marcador fluorescente (FLICA™) e mantida por uma 1 hora a 37°C em incubadora de CO₂. Após a incubação, 80 μL de tampão de lavagem foram adicionados e então, as células centrifugadas a 2000 rpm por 5 minutos. O precipitado resultante foi resuspendido em 200 μL de tampão de lavagem e centrifugado novamente. Em seguida as células foram resuspendidas em uma solução contendo iodeto de propídeo e tampão de lavagem e analisadas imediatamente utilizando citometria de fluxo.

Análise dos dados

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

3.2.3.2 Teste do cometa

Princípio do Teste

O teste do cometa, também conhecido como *single-cell gel electrophoresis* (SCGE), é um ensaio utilizado para detecção de dano genotóxico que também encontrou ampla aplicação no monitoramento de efeitos induzidos por radiação ou substâncias químicas (HARTMANN et al., 2003).

Existem dois protocolos principais para a execução deste teste (OLIVE, 1989; OSTLING; JOHANSON, 1984; SINGH et al., 1988). A versão alcalina, mais empregada por ser mais abrangente, utiliza pH maior que 13 afim de induzir a desnaturação da molécula de DNA e detectar lesões de diversas natureza, como quebras de fita simples e duplas, sítios álcali-lábeis, sítios de reparo por excisão incompletos e ligações cruzadas. A versão neutra, por sua vez, vale-se de eletroforese em tampão de pH entre 7,0 e 8,5 para detectar apenas

quebras de fita-dupla em DNA ou ligações cruzadas entre DNA e DNA, DNA e proteína ou DNA e xenobiótico.

Procedimento Experimental

O presente estudo utilizou-se do teste do cometa alcalino para avaliar a indução de danos em DNA de dupla-fita de células HL-60 e CMSP expostas a 1,5 e 3,0 μM de cordiaquinona J por 1 e 3 horas de tratamento.

Preparo das lâminas

As lâminas foram previamente cobertas com agarose de ponto de fusão normal (Gibco) diluída a 0,5% em solução de PBS livre de Ca^{2+} e Mg^{+2} à temperatura de 60°C e mantidas em temperatura ambiente até completa solidificação. As células HL-60 controle ou tratadas com a cordiaquinona J foram embebidas em uma solução de agarose de baixo ponto de fusão (1,5%; Gibco) a 37°C e adicionadas às lâminas pré-cobertas com agarose, sobrepostas com lamínulas para uniformizar a distribuição do material na lâmina e mantidas a 4°C para solidificação da agarose.

Lise celular

Após a solidificação da agarose, as lamínulas foram delicadamente removidas e as lâminas foram imersas em solução de lise (descrita no Anexo I) a 4°C e mantidas por, no mínimo 1 hora, abrigadas da luz.

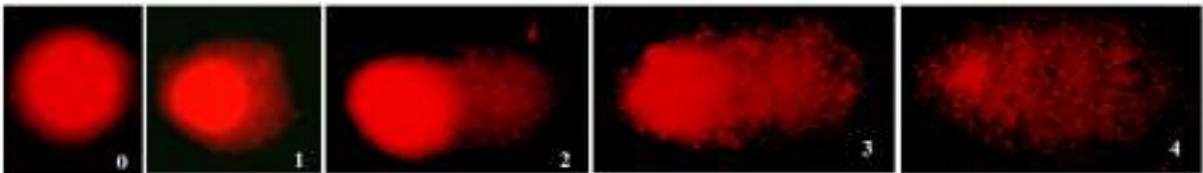
Neutralização e eletroforese

Ainda ao abrigo da luz, as lâminas foram imersas em uma solução de neutralização (0,4 M Tris, pH 7,5) por 15 minutos. Em seguida, as lâminas foram dispostas horizontalmente na cuba de eletroforese que, por sua vez, foi preenchida com o tampão de corrida alcalino (descrito no Anexo I) a 4°C. As lâminas repousaram por 60 minutos para permitir o relaxamento do DNA. A eletroforese (cuba Bio Rad, modelo DNA Sub Cell Gel) foi conduzida a 14 V e 12 mA ou 0,5 V/cm (fonte Life Technologies, modelo 250) por 60 minutos a 4°C. Após a eletroforese, as lâminas foram novamente neutralizadas por 5 minutos e fixadas em etanol a 100%.

Coloração e análise das lâminas

A coloração das lâminas foi realizada com solução de brometo de etídio (Sigma) a 20 µg/mL. As lâminas foram analisadas em microscópio de fluorescência e classificadas de acordo com os escores previamente determinados pelo tamanho e intensidade da cauda do cometa (**Figura 15**). Foram contados 100 cometas por lâmina e atribuídos, por análise visual, a uma das cinco categorias - sem dano, baixo nível de dano, médio nível de dano, alto nível de dano e dano máximo - que relacionam a percentagem de DNA na cauda do cometa ao grau da lesão sofrida pela célula (LOVELL; THOMAS; DUBOW, 1999).

Figura 15. Tipos de cometa e classificação por categoria de dano: 0 - sem dano (cauda < 5%); 1 - baixo nível de dano (5 - 20%); 2 - médio nível de dano (20 - 40%); 3 - alto nível de dano (40 - 95%) e 4 - dano máximo (> 95%).



O índice de dano (ID) 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). A frequência de dano (FD) representa a porcentagem de células que sofreram danos no DNA.

Análise dos dados

Os dados foram analisados a partir da média e erro padrão da média 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 por teste de

Dunnett, com nível de significância de 5% ($p < 0,05$), usando o programa Graph Pad Prism 5.0.

3.2.3.3 Determinação do conteúdo intracelular de glutathiona reduzida (GSH).

Princípio do teste

Glutathiona, um tripeptídeo (g-L-glutamil-L-cisteinil-glicina), existe no organismo em suas formas reduzida (GSH) e oxidada (GSSG), atuando direta ou indiretamente em muitos processos biológicos importantes, incluindo metabolismo e proteção celular. O ácido 5,5'-ditio-bis-(2-nitrobenzóico) mais conhecido como DTNB, é utilizado para monitorar quantidade GSH, avaliada pela absorvância (412 nm). O DTNB reage com GSH formando o ácido 2-nitro-5-mercapto-benzóico (TNB) de cor amarela que pode ser detectado por espectrofotômetro.

Procedimento experimental

Ao final do tratamento de (15 minutos, 1 e 3 horas) as células (7×10^6) foram centrifugadas a 400 x g por 5 minutos, o precipitado foi ressuscitado em 400 μ L de tampão de lise contendo 0,2% de Triton X-100. As proteínas foram precipitadas pela adição de 100 μ L de ácido perclórico (0,5 M), posteriormente o ácido perclórico foi retirado por centrifugação a 500 x g por 5 minutos. Os níveis de GSH no sobrenadante foram mensurados. A reação foi realizada através da adição de 200 μ L do lisado celular (sobrenadante) com 200 μ L tampão fosfato EDTA pH 8 e 100 μ L de 5,5'-ditio-bis-(2-nitrobenzóico), DTNB. A concentração de GSH reduzida foi quantificada por espectrofotômetro a 412nm sendo comparado com uma curva padrão de BSA. A β -lapachona (2 μ M) e a doxorubicina (0,5 μ M) foram utilizadas como controle positivo. A concentração proteica foi determinada pelo método de Bradford e os resultados foram expressos como μ moles/mg de proteína (BRADFORD, 1976; SILBER et al., 1992).

Análise dos dados

Os dados foram analisados a partir da média e erro padrão da média 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 por teste de

Student Newman Keuls, com nível de significância de 5% ($p < 0,05$), usando o programa Graph Pad Prism 5.0.

3.2.3.4 Estudos eletroquímicos

Todos os estudos realizados de eletroquímica foram realizados na Universidade Federal de Alagoas (UFAL) sob a supervisão da Professora Marília Oliveira Fonseca Goulart.

Princípio do Teste

O comportamento eletroquímico de determinadas classes de substâncias, pode ser completamente distinto, pelo fato de que mudanças estruturais afetam curvas voltamétricas de diferentes maneiras, podendo causar deslocamentos nos potenciais redox, provocar mudanças no mecanismo eletródico, na reversibilidade química e eletroquímica e na cinética reacional. O efeito de grupos substituintes numa série de substâncias derivadas de um mesmo núcleo pode ser na maioria das vezes, relacionado com parâmetros eletroquímicos. Essa correlação permite estender o limite das medidas experimentais e, portanto, predizer propriedades redox de um grupo bem mais amplo de compostos.

Enquanto que a eletroquímica de biossensores de DNA permite a avaliação e predição de interações com DNA e de danos causados ao mesmo por compostos perigosos a saúde, por meio do uso de técnicas voltamétricas para a geração *in situ* de intermediários reativos, que interagem com o DNA. A ocorrência de danos oxidativos ao dsDNA leva à quebra das ligações de hidrogênio e a abertura da dupla-hélice, provocando o contato das bases com a superfície do eletrodo, permitindo a detecção eletroquímica dos danos oxidativos, por meio do monitoramento da oxidação das bases.

Procedimento experimental

Todos os estudos eletroquímicos foram realizados utilizando-se um sistema de três eletrodos. O eletrodo de trabalho foi o carbono vítreo (BAS, 7.065mm²), fio de platina como eletrodo auxiliar e Ag/AgCl/Cl⁻ (0,1M) como eletrodo de referência.

3.2.3.4.1 Meio aprótico

Em meio aprótico utilizou-se o dimetilsulfoxido (DMSO) um solvente polar e muito usado para compostos orgânicos. Em eletroquímica é um dos solventes mais usados em meio

aprótico devido ao amplo domínio eletroquímico em que pode ser utilizado. Além disso, para estudos biológicos *in vitro* é o solvente empregado para solubilizar os compostos orgânicos a serem analisados. O TBABF₄ usado como eletrólito de suporte foi obtido comercialmente e foi secado sob pressão reduzida antes do seu uso.

3.2.3.4.2 Meio prótico

Para análises em meio prótico, foi utilizado como eletrólito de suporte um meio aquoso (tampão fosfato) pH 7.0. Para alguns casos foi necessário utilizar uma certa quantidade de etanol P.A. para melhorar a solubilidade da cordiaquinona J nesse meio. Utilizou-se nesses estudos a técnica de voltametria cíclica (VC).

3.2.3.4.3 Biossensor de dsDNA

Em eletrodos de carbono vítreo, a eletrooxidação do DNA, em meio ácido (pH 4,5), relaciona-se à oxidação das bases púricas (guanina, adenina). O dsDNA (DNA nativo, “double-strand” ou fita dupla) sempre apresenta menores correntes de eletrooxidação quando comparado ao ssDNA (single-atrاند ou fita única). Já quando ocorre interação de substâncias com o dsDNA ocorre exposição das bases à superfície do eletrodo e com isso estas tornam-se passíveis de oxidação.

Em geral, para o experimento eletroquímico com o biossensor de dsDNA, foi utilizado como eletrólito de suporte um meio aquoso (tampão acetato) de pH 4,5, devido ao fato deste ser, de acordo com literatura e estudos anteriores do grupo, o meio mais adequado para estudos em biossensor de DNA. O tampão acetato foi preparado utilizando água deionizada previamente fervida.

Preparação do gel de dsDNA

O DNA utilizado foi do tipo I, altamente polimerizado de calf Thymus (timo de bezerro), contendo 6,2 % de Na⁺ e 13 % de H₂O, dessecado e armazenado a 8°C. Usou-se uma pinça para sua fragmentação e pesagem. Para preparação do gel de dsDNA, 12 mg de dsDNA foram colocados em um eppendorf juntamente com 1,0 mL de tampão acetato (pH 4,5). O gel foi armazenado sob refrigeração por 24 horas para a completa dissolução do dsDNA e formação do gel (o dsDNA não pode ser submetido a ultrasson para não comprometer a integridade da dupla hélice).

Condicionamento do eletrodo

Antes da preparação do biossensor deve ser feito um polimento e condicionamento do eletrodo de carbono vítreo

Após o polimento com pasta de diamante (1 micrômetro) e alumina (3 micrômetros), o eletrodo foi condicionado em técnica de voltametria de pulso diferencial (VPD) (Potencial aplicado de 0 a +1,4V) a uma velocidade de 5 mVs⁻¹ em vários ciclos até completa estabilização da superfície do eletrodo (organização da dupla camada).

Após o eletrodo estar limpo e condicionado, adiciona-se 10 uL no gel de dsDNA sobre a superfície do eletrodo. Espera-se secar naturalmente sob refrigeração ou usando fluxo de N₂. A partir daí o Biossensor está pronto para ser usado.

Estudo da interação das substâncias teste com dsDNA

Imediatamente após secagem do gel de DNA, o biossensor é imerso na solução contendo o tampão (branco) e em seguida em presença da cordiaquinona J por 15 minutos e por 1 hora na concentração de 0,1 mM. Então se fez a varredura na região de 0 a + 1,4V usando a técnica de voltametria de pulso diferencial.

Análise dos dados

As medidas eletroquímicas foram realizadas através do equipamento AUTOLAB PGSTAT20 interfaceado a um microcomputador. Após os experimentos e aquisição dos dados utilizou-se programa origin 7.0 para construir os gráficos.

3.2.3.5 *Western blot*

Princípio do Teste

Western blot ou, alternativamente, imunoblot, é uma técnica amplamente empregada para detectar uma determinada proteína numa dada amostra, por exemplo, de homogenato celular total. Neste estudo, esta metodologia foi utilizada para verificar a expressão

aumentada ou diminuída de proteínas-chave associadas ao estresse oxidativo e a vias de sinalização celular relacionadas ao dano e reparo de DNA e à apoptose.

Procedimento Experimental

O protocolo de Western blot é realizado em diversas etapas onde constam: a extração e posterior quantificação de proteínas totais das células submetidas a cada tratamento, a separação das proteínas desnaturadas de acordo com o peso molecular em eletroforese vertical de poliacrilamida, a eletrotransferência das proteínas na disposição em que separaram no gel para uma membrana com capacidade de ligar proteínas e a detecção da proteína específica através de sondas do anticorpo respectivo, que será posteriormente revelado, nesse caso, de modo colorimétrico, baseado na reação da enzima fosfatase alcalina sobre o substrato NBT/BCIP produzindo um precipitado púrpura que marca a membrana (TOWBIN; STAEHELIN; GORDON, 1979).

Os experimentos de western blot empregaram os seguintes anticorpos primários: Bax, Bcl₂, NFκB e c-myc (Santa Cruz Biotechnology, Inc.). p-ATR (Ser428), p-BRCA1 (Ser1524), p-Chk2 (Thr68), p-p53 (Ser15), p-ATM (Ser1981), p-Chk1 (Ser296), p-Histona H2A.X (Ser139), pro-caspase-8, pro-caspase-9, PARP, PARP clivado (Asp214) e NQO1 (Cell Signaling Technology®) e o anticorpo anti-glutationa (Abcam® discover more). A marcação com β-actina (Santa Cruz Biotechnology, Inc.) foi usada como referência experimental. Os anticorpos secundários anti-mouse IGg (Cell Signaling Technology®) e anti-rabbit IGg (Cell Signaling Technology®) ligados à enzima fosfatase alcalina foram utilizados na etapa de detecção. Todos os anticorpos utilizados foram solubilizados em uma solução de BSA 5% na concentração de 1:1000 com exceção da β-actina e dos anticorpos secundários que foram diluídos na concentração de 1:2000.

Extração de proteínas

Células HL-60 foram tratadas com cordiaquinona J por 1 e 3 horas (1,5 e 3,0 μM) e com BSO 24 e 48 horas (10, 30, 100 e 300 μM) antes da extração de proteínas totais. Inicialmente, as células foram centrifugadas e o *pellet* foi lavado 2 vezes com PBS. O sobrenadante foi descartado e, às células, foi adicionado o tampão RIPA *Lysis Buffer* (Santa Cruz Biotechnology Inc.) 1X acrescido de um coquetel de inibidores de proteases (1:100 v/v), ortovanadato de sódio (1:100 v/v) e PMSF (1:100 v/v), e deixadas em gelo por 1h30,

sonicando as amostras a cada 20 minutos. Foi utilizada a proporção aproximada de 1mL de tampão RIPA completo para cada 10^7 células. Ao final da incubação, as amostras foram centrifugadas (Hettich, modelo Rotina 380) a 13000 rpm por 10 minutos a 4°C. O sobrenadante foi coletado, aliquotado e armazenado a -20°C.

Quantificação de proteínas

A quantificação do extrato total de proteínas foi realizada por método colorimétrico similar à dosagem proposto por (LOWRY et al., 1951), valendo-se do kit *DC Protein Assay* (BioRad Laboratories) e executado como descrito pelo fabricante em microplacas de 96 cavidades. Uma curva padrão com BSA (1 – 10 µg; Sigma) diluído em tampão RIPA completo foi preparada para a calibração do método. O tampão RIPA completo foi utilizado para marcar o branco experimental. Em seguida, 5 µL de cada amostra foi plaqueado em duplicatas e adicionado 25µL do reagente A' (preparado a partir da adição de 20 µL do reagente S a cada 1mL do reagente A) seguido por 200µL do reagente B. As amostras foram incubadas por 10 minutos, sob agitação leve e lidas em espectrofotômetro no comprimento de onda de 620nm.

A concentração de proteínas em cada amostra foi determinada frente à curva gerada pelo BSA, tendo sido plotado o gráfico da absorbância vs. quantidade de proteínas. A curva foi gerada a partir de regressão linear no programa GraphPad Prism 5.0 e os valores de absorbância obtidos para cada amostra foram substituídas na equação da curva para determinar as respectivas concentrações de proteína.

Eletroforese em gel de poliacrilamida

Para a separação das proteínas do extrato total baseado no peso molecular, as amostras foram submetidas à eletroforese vertical em gel de poliacrilamida descontínuo (LAEMMLI, 1970). Após a montagem do sistema vertical (Amershan Biosciences, modelo miniVE completo) o gel de resolução foi confeccionado para uma concentração final de 12,5% de poliacrilamida em tampão Tris-HCl 1,5M, pH 8,8. O gel de concentração foi montado sobre este, com 5% de poliacrilamida em tampão Tris-HCl 0,5M, pH 6,8. O detalhamento das soluções utilizadas e o preparo dos géis estão apresentados no Anexo I.

De cada amostra, 30µg de proteína total carregada com o tampão *Blue Juice 5X* (5:1 v/v; Invitrogen) foi aplicado nos poços do gel de concentração. O marcador de peso molecular

Full-Range Rainbow Marker (12 – 225 kDa; GE Healthcare) foi usado sempre no primeiro poço à esquerda para monitorar a separação das proteínas. A corrida eletroforética foi realizada a uma voltagem constante de 100 V e amperagem livre (para duas placas; fonte elétrica Amershan Biosciences, modelo ES301) à temperatura ambiente, utilizando o tampão de corrida para eletroforese (detalhado no Anexo I). O tempo de corrida variou entre 1h e 30 minutos à 2h.

Eletrotransferência

As proteínas separadas foram transferidas para membrana de PVDF Hybond-P (GE Healthcare). Para tanto, o gel foi colocado em contato com a membrana previamente lavada em MeOH entre esponjas e papéis de filtro banhados na solução de transferência (detalhado no Anexo I). A eletrotransferência foi realizada pelo modo de imersão (Amershan Bioscience, blot module para miniVE) à voltagem livre e a 400 mA por 1h e 20 minutos a 4 °C (fonte elétrica Amershan Biosciences, modelo ES301).

Imunodeteccção

Após a transferência, as membranas foram bloqueadas por 1h em solução de leite desnatado a 3% em TBS. Em seguida, foram lavadas (3 vezes, 10 minutos cada lavagem) com TBS-Tween 0,05% (TBS-T) e uma vez em TBS e incubadas sob agitação *overnight* a 4 °C com o anticorpo primário diluído em solução de BSA 5% em TBS. Após lavagem com TBS-T (3 vezes, 10 minutos cada lavagem) e uma vez em TBS, as membranas foram incubadas com o anticorpo secundário acoplado à enzima fosfatase alcalina diluído em solução de leite desnatado 5% em TBS por 2h, sob agitação. Após lavagem com TBS-T (3 vezes, 10 minutos cada lavagem) seguida de lavagem no tampão de revelação (detalhado no Anexo I), as membranas foram reveladas com NBT (0,33mg/mL; Sigma) e BCIP (0,168mg/mL; Usb Corporation), diluídos em 15mL de solução de revelação até a indicação colorimétrica desejada. A reação foi suprimida com banho da membrana em água destilada.

Análise dos dados

A documentação das membranas reveladas foi realizada em captador de imagens (GE Healthcare, modelo ImageQuant® 300) utilizando, para aquisição e edição, o programa ImageQuant® 300 (GE Healthcare).

3.2.4 Estudo da atividade antitumoral *in vivo*

3.2.4.1 Obtenção e manutenção dos animais

Os testes para avaliação da atividade antitumoral *in vivo* foram realizados utilizando camundongos (*Mus musculus* Swiss) fêmeas pesando entre 25-30g oriundos do biotério central da Universidade Federal do Ceará, mantidos com água e alimento *ad libitum*. O manejo dos animais foi realizado procurando seguir todos os princípios éticos, de forma a amenizar ao máximo o sofrimento dos animais.

O tumor sólido do tipo sarcoma-180, com 10 dias de implante na forma ascítica, foi utilizado para determinar a atividade antitumoral da cordiaquinona J. O animal de manutenção ou doador foi anestesiado com éter etílico e sacrificado por meio de deslocamento cervical. Fez-se o procedimento asséptico com álcool iodado e, em seguida, coletou-se o líquido ascítico da cavidade abdominal, tendo sido preparada uma suspensão de células com 5,0 mL de Ringer lactato, 0,2 mL de gentamicina (5 mg/mL) e 0,5 mL do líquido ascítico, para posterior contagem das células. Os animais receptores foram inoculados com 2×10^6 células/0,5 mL na região intraperitoneal dos camundongos (*Mus musculus* Swiss). Este método está de acordo com os princípios éticos na experimentação animal adotados pelo Colégio Brasileiro de Experimentação Animal (COBEA) sendo aprovado pela Comissão de Ética em Pesquisa Animal (CEPA) com protocolo 35/10 (Anexo IV).

3.2.4.2 Ensaio antitumoral em camundongos transplantados com sarcoma-180

Princípio do Teste

A avaliação da atividade antitumoral está relacionada à regressão total de tumores nos animais, à redução no crescimento dos tumores sensíveis ao composto ou ao aumento da expectativa de vida durante o tratamento, quando comparado com os animais não tratados. Schabel e colaboradores (1977) demonstraram que o melhor resultado desses fatores depende do procedimento do tratamento, que deverá ser começado até 48 horas após o transplante. Neste período, as células tumorais já teriam iniciado a formação do nódulo tumoral (SCHABEL, 1977).

Procedimento Experimental

Para o teste de atividade antitumoral, foi utilizado o tumor sólido do tipo sarcoma-180 com 8 dias de implantação subcutânea na região axilar esquerda. O animal doador, ou da manutenção, foi sacrificado por deslocamento cervical, sendo realizada assepsia com álcool iodado. Em seguida, foi retirado o líquido ascítico da cavidade abdominal para a preparação de uma suspensão de células com 5,0 mL de Ringer lactato, 0,2 mL de gentamicina (5 mg/mL) e 5 mL do líquido ascítico, para posterior contagem de células. Nos animais receptores, foram injetadas 2×10^6 céls/0,5 mL na região axilar esquerda dos camundongos (*Mus musculus* Swiss). Nesse experimento, foram utilizados 8 animais por grupo, num total de 9 grupos, sendo todas fêmeas, apresentando massa corpórea variando entre 25-30 g, os quais foram inoculados com tumor sarcoma-180 como anteriormente descrito. Em seguida, 24 horas após a inoculação do tumor, foi iniciado o tratamento durante 7 dias consecutivos. Os grupos 1 e 2 receberam a cordiaquinona J nas doses de 25 e 50 mg/kg/dia, respectivamente. Os grupos 3 e 4, controles positivos, foram tratados com o quimioterápico 5-Fluorouracil (5-FU, Sigma) nas doses de 10 e 25 mg/kg/dia, respectivamente. O grupo 5 recebeu 25 mg/kg/dia de Cordiaquinona J associada a 10 mg/kg/dia de 5-FU, sendo administrados simultaneamente. Já o grupo 6 a associação da Cordiaquinona J (50 mg/kg/dia) foi feita com 150 mg/kg/dia de N-acetil-L-cisteína (NAC, Sigma), sendo que o NAC foi administrado 1 hora antes do início do tratamento com a cordiaquinona J. Os grupos 7 e 8 foram administrados 150 e 300 mg/kg/dia de NAC, respectivamente. Finalmente, para o tratamento dos animais do grupo 9, controle negativo, foi administrado o veículo utilizado para formular a cordiaquinona J.

Como a cordiaquinona J é uma molécula muito apolar, e bastante insolúvel em soluções aquosas, para os testes *in vivo* foi feita uma suspensão com a cordiaquinona J. Inicialmente a molécula foi solubilizada em diclorometano (CH_2Cl_2) e em seguida por gotejamento a solução foi introduzida em um veículo estruturado contendo: 0,5% carmelose sódica, 5% glicerol, 0,135% metilparabeno, 0,015% propilparabeno, 1% polissorbato 80 em um volume final de 20mL de água destilada.

Todos os grupos foram tratados por via oral, exceto o 5-FU e o NAC que foram administrados por via intraperitoneal. Vinte quatro horas após o término do tratamento os animais foram sacrificados, sendo em seguida retirados tumor, rins, fígado, baço e estômago

para pesagem e análise histológica. Uma alíquota de sangue também foi coletada para análises bioquímica e hematológica.

O percentual de inibição do crescimento tumoral (IT) foi calculado pela fórmula:

$$\text{IT (\%)} = [(A-B)/A] \times 100$$

Onde: A = média dos pesos dos tumores no grupo controle.

B = média dos pesos dos tumores nos animais tratados.

Análise dos dados

Os dados foram analisados a partir da média e do erro padrão da média dos experimentos. 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 ($p < 0,05$).

3.2.4.3 Análise morfológica e histopatológica

Princípio do Teste

A técnica de coloração hematoxilina e eosina (H/E) permite diferenciar o citoplasma do núcleo, possibilitando, assim, a análise de algumas estruturas celulares. A análise morfológica e histopatológica de tecidos dos animais tratadas permitem identificar alterações que possam estar ocorrendo e fornecer subsídios para sugerir os efeitos tóxicos causados pela droga.

Procedimento Experimental

Após o sacrifício dos animais, os tumores e os órgãos de interesse foram retirados e pesados e armazenados em formol a 10%. As peças foram retiradas do formol e seccionadas em pequenas fatias para posterior preparação das lâminas. O material foi fixado em formol a 10% por 24 horas, desparafinado em xilol por 15 minutos, e desidratado em concentrações crescentes de álcool etílico até 70% (mergulhando-se rapidamente as lâminas), sendo posteriormente lavado em água destilada até ter sido removido todo o álcool. Posteriormente as lâminas foram coradas com hematoxilina e eosina.

Análise dos dados

As lâminas contendo as células coradas foram levadas ao microscópio para avaliação das suas características morfológicas e comparadas ao controle (administrado com o veículo). O registro das alterações celulares foi feito por fotografia.

2.4.4. Determinação da sobrevida de camundongos transplantados com sarcoma-180

A inoculação do tumor foi feita como descrito anteriormente. Para este experimento, foram utilizados 8 animais por grupo, num total de 3 grupos, sendo todas fêmeas, apresentando massa corpórea variando entre 25-30 g. Vinte e quatro horas após a inoculação do tumor foi iniciado o tratamento por 15 dias alternados utilizando as doses de 50 mg/kg/dia de cordiaquinona J, 25 mg/kg/dia do quimioterápico 5-FU e o veículo utilizado para a formular a cordiaquinona J (anteriormente descrito). Ao término do tratamento, os animais foram mantidos com água e alimento *ad libidum* e observados diariamente para monitoramento dos animais e registro dos óbitos, até o último animal, vindo a morrer ao 16º dia após a inoculação do tumor. Outros parâmetros avaliados, além da sobrevida, foram o volume do tumor e a variação de peso do animal durante o período de tratamento. Para calcular o volume tumoral (cm³) foi utilizada a seguinte fórmula:

$$\text{Volume do tumor (cm}^3\text{)} = (D \times d^2)/2$$

Onde, D = diâmetro maior (cm)

d = diâmetro menor (cm)

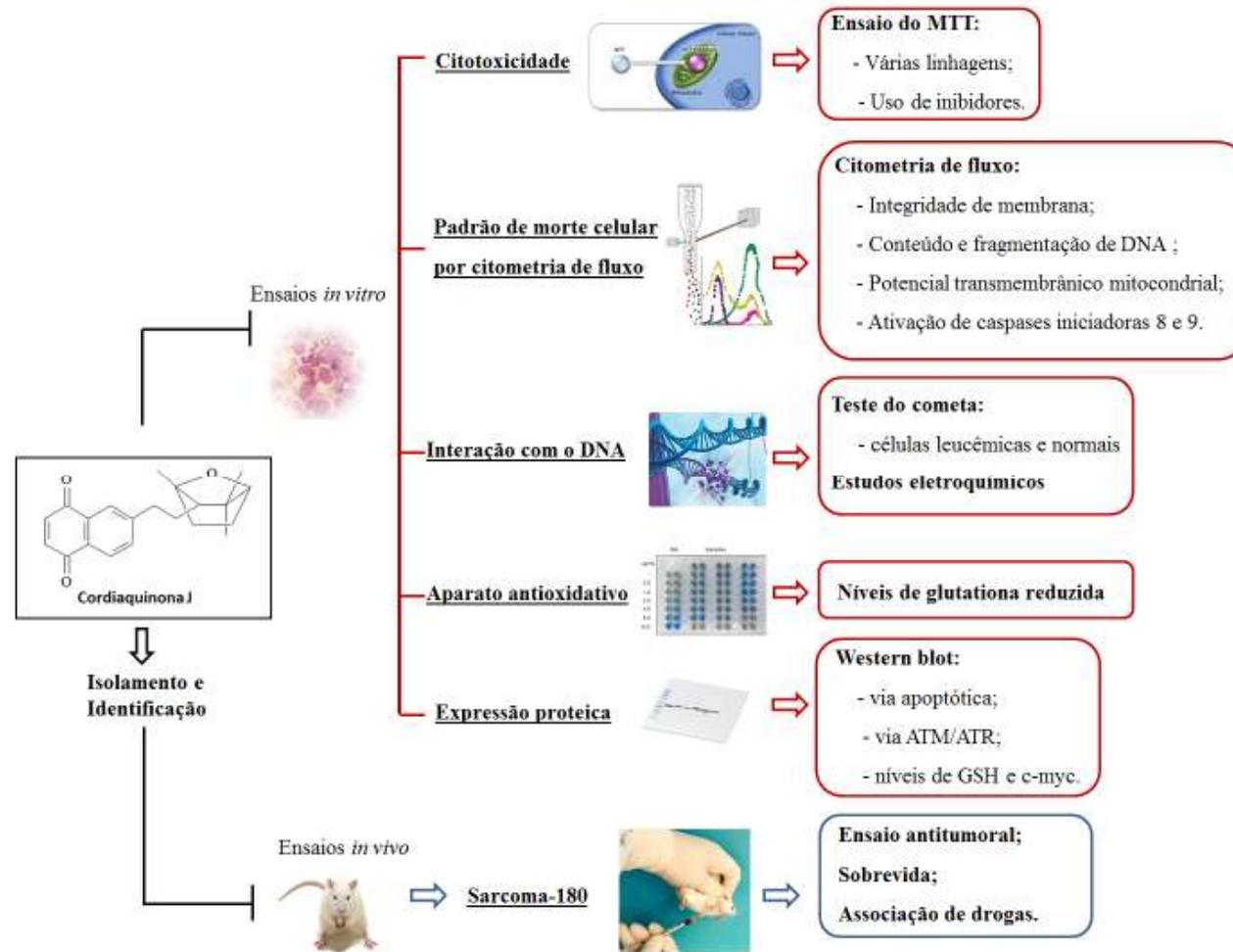
Análise dos dados

Os dados foram analisados a partir da média e do erro padrão da média dos experimentos. 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, com nível de significância de 5% ($p < 0,05$). Para análise de sobrevida foi realizada a análise de Kaplan-Meyer, e a ocorrência de diferenças significativas foi verificada através do teste do X^2 (qui-quadrado).

3.2.5 Desenho experimental

A figura 16 apresenta o desenho experimental onde está descrito resumidamente todas as etapas deste trabalho assim como a metodologia empregada.

Figura 16: Desenho experimental



4 RESULTADOS

4.1 Avaliação do mecanismo de ação citotóxico da cordiaquinona J *in vitro*

Inicialmente foi avaliado o potencial antiproliferativo da cordiaquinona J pelo método colorimétrico do MTT. Foi avaliado o perfil citotóxico da cordiaquinona J em 14 linhagens celulares das quais 11 são linhagens tumorais humanas e 3 são linhagens não tumorais. Os testes foram realizados no período de 24 horas de incubação, pois já sabíamos que os efeitos dessa substância ocorriam em um curto tempo (**Tabela 3**).

Além disso, utilizamos novamente o NAC, como um antioxidante de escolha, em todas as linhagens avaliadas por MTT. O NAC (5mM) foi adicionado 1 hora antes do tratamento de 24 horas com a cordiaquinona J.

Após o período de incubação foi observada que, mesmo em um painel amplo de células, a cordiaquinona J permaneceu mais ativa na linhagem tumoral HL-60, porém também se mostrou bastante ativa para outra linhagem leucêmica K-562 e para uma linhagem de próstata PC-3 com valores de CI_{50} variando de 4,6 a 11,4 μ M para as células HL-60 e PC-3, respectivamente. Para as demais células tumorais avaliadas houve uma variação muito grande nos valores de CI_{50} que foram de 21,9 a 75,5 μ M em C3.6 e SF-295, respectivamente. Com isso podemos sugerir que o composto estudado apresenta uma especificidade citotóxica para determinadas células, mas não necessariamente para células tumorais, pois observamos que a cordiaquinona J apresentou em algumas células tumorais, por exemplo, SF-295, (CI_{50} de 75,5 μ M) valores de CI_{50} maiores do que em células normais (CMSP) (CI_{50} de 37 μ M). Porém, em todas as células avaliadas foi observada uma diminuição do efeito quando estas foram pré-tratadas com o NAC, mostrando que a citotoxicidade da cordiaquinona J, independente da célula estudada, é dependente de espécies reativas de oxigênio (**Tabela 3**).

Então foi avaliado se outros inibidores de espécies reativas de oxigênio também conseguiriam inibir o efeito da cordiaquinona J após 24 horas de incubação em HL-60. Utilizamos inibidores clássicos como o tocoferol (vitamina E) 1 hora antes do início do tratamento e o ácido ascórbico (vitamina C) 24 horas antes do início do tratamento. Observamos que a vitamina C, a partir da concentração mais baixa testada (5 mM), conseguiu diminuir a toxicidade apresentada pela cordiaquinona J, tendo seu efeito inibitório

potencializado com aumento da concentração da vitamina C se tornando cada vez mais intenso.

Tabela 3. Atividade citotóxica *in vitro* da cordiaquinona J em linhagens de células tumorais. N-acetil-L-Cisteína (NAC) (5mM) foi adicionado 1 h antes do início do tratamento.

MTT (CI ₅₀ μM) 24h			
Linhagens	Tipagem histológica	Cordiaquinona J (μM)	Cordiaquinona J + NAC 5mM
HL-60	Leucemia promielocítica	4,6 (4,3 – 4,9)	55,5 (39,7 -77,7)
K-562	Leucemia mielóide crônica	6,8 (5,8 – 7,7)	22,2 (14,4 – 34,2)
PC3	Próstata	11,4 (10,5 – 12,3)	137,5 (110 – 171,7)
C3.6	HB4a transfectada com ErbB-2	21,9 (18,2 – 26,5)	NA
SF-268	Glioblastoma	27,4 (22,2-33,6)	>300
Ovcar-8	Ovário	29,6 (28,0 – 31,4)	209 (190,5 – 229,3)
HB4a	Célula epitelial de mama	33,6 (31,7 – 35,4)	NA
DU-145	Próstata	34,2 (31,7 – 34,5)	>300
MDA-MB-435	Melanoma	35,7 (35,1 – 36,7)	128,8 (115,6 – 143,6)
HCT-116	Colon	36,1 (35,1 - 38,5)	176,3 (135,9 – 228,4)
CMSP	Linfócitos	37,0 (35,1 – 45,3)	>300
MALME-3M	Melanoma	40,1 (34,5 – 46,2)	>300
PC3-M	Próstata	53,0 (44,7 – 62,6)	>300
SF-295	Glioblastoma	75,5 (73,6 - 76,4)	>300

Os dados são apresentados em valores de CI₅₀ μM e o intervalo de confiança de 95% de dois experimentos independentes realizado em duplicata pelo método do MTT após 24 horas de incubação.

Quando as células foram tratadas com 40 mM de vitamina C foi observado um aumento de mais de 14 vezes no valor da CI₅₀. No entanto, quando as células foram pré-

tratadas com o tocoferol o efeito inibitório da molécula foi bem menor, apenas dobrando os valores de CI_{50} , estes sendo alterados de 4,6 μM (cordiaquinona J) para 10,2 μM (cordiaquinona J + tocoferol 100 μM), mostrando novamente que a cordiaquinona J age por uma via de estresse oxidativo específica, pois os inibidores testados apresentam mecanismos distintos de inibição. Outro antioxidante utilizado foi o ácido alfa lipóico, porém este não alterou os efeitos da cordiaquinona J (**Tabela 4**).

Devido aos resultados obtidos com NAC, decidimos avaliar se a glutathione estaria participando do processo de geração de espécies reativas de oxigênio, promovendo o estresse oxidativo levando as células à morte. Para isso, foi avaliado se os valores de CI_{50} poderiam ser alterados na presença de butionina sulfoximina (BSO) (inibidor da γ -glutamyl cysteine sintase, uma enzima que participa da via biosintética da glutathione). Através deste inibidor pode-se avaliar indiretamente se os níveis de glutathione modulam os efeitos da cordiaquinona J. O BSO foi testado em várias concentrações (10, 30, 100, 300 μM) em células HL-60 por 24 ou 48 horas antes do início do tratamento com a cordiaquinona J. O BSO foi capaz de aumentar a atividade da molécula de estudo a partir da menor concentração testada (10 μM), alcançando melhores resultados quando o pré-tratamento foi de 300 μM , após 48 horas de pré-tratamento. Os valores de CI_{50} foram alterados de 4,6 para 1,7 μM na ausência e na presença de BSO, respectivamente (**Tabela 4**). No entanto, a pré-incubação de 24 horas nas mesmas concentrações de BSO não alterou os valores de CI_{50} (dados não mostrados).

Sabendo que o BSO inibe a síntese de glutathione e aumenta a atividade da cordiaquinona J, os níveis de glutathione assim como a expressão de c-myc foram avaliados por western blot após o tratamento 24 e 48 horas com BSO.

Como esperado, o BSO inibiu a expressão proteica de glutathione em todas as concentrações e tempos avaliados, de maneira concentração e tempo dependente, sendo a inibição mais efetiva no tratamento de 300 μM em 48 horas de incubação (**Figura 17**). Em relação aos níveis de c-myc, o BSO aumentou a expressão proteica em 24 horas de tratamento e diminuiu em 48 horas (**Figura 17**). Mostrando que o BSO não altera apenas a expressão de glutathione, mas altera, embora levemente, a expressão do c-myc (**Figura 17**). Os resultados do efeito da cordiaquinona J na expressão de c-myc serão discutidos posteriormente na seção 4 dos resultados.

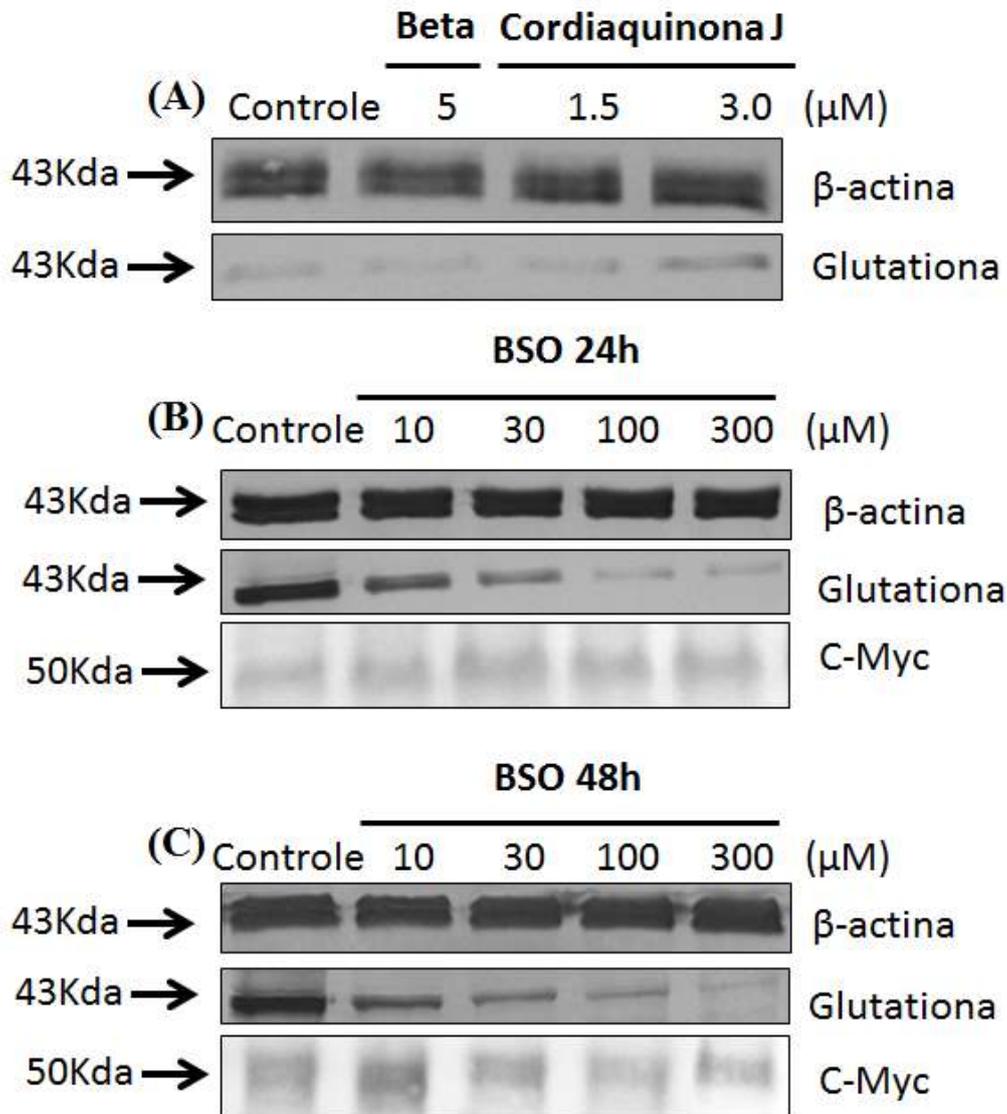
A expressão proteica de glutathiona também foi avaliada, por western blot, na presença de cordiaquinona J (1,5 e 3,0 μM) após 3 horas de incubação. Foi observado que a cordiaquinona J aumentou a expressão de glutathiona apenas na maior concentração testada (3,0 μM) (Figura 17).

Tabela 4. Atividade citotóxica *in vitro* da cordiaquinona J em linhagens de células tumorais.

MTT 24h HL-60	PRÉ-TRATAMENTO	CONCENTRAÇÃO	CI ₅₀ (μM)
CORDIAQUINONA J	-	-	4,6 (4,3 - 4,9)
	BSO	10 μM	3,2 (3,0 - 3,4)
		30 μM	2,9 (2,8 - 3,0)
		100 μM	2,9 (2,8 - 3,2)
		300 μM	1,7 (1,4 - 2,5)
	TOCOFEROL	50 μM	9,2 (8,4 - 10,0)
		100 μM	10,2 (8,5 - 12,3)
	VITAMINAC	5mM	16,7 (12,2 - 23,0)
		10mM	23,4 (18,5 - 29,6)
		20mM	25,4 (17,4 - 37,2)
		40mM	66,5 (49,6 - 89,2)
	ÁCIDO LIPÓICO	0,5 μM	4,7 (4,2-5,0)
		1 μM	4,1 (3,7 - 4,6)

Os dados são apresentados em valores de CI₅₀ μM e o intervalo de confiança de 95% de dois experimentos independentes realizado em duplicata pelo método do MTT após 24 horas de incubação. BSO foi adicionado 48h antes do tratamento. Tocoferol foi adicionado 1h antes do tratamento. A vitamina C e o ácido lipóico foram adicionados 24h antes do tratamento.

Figura 17. Expressão de glutatona, c-myc e β -actina em HL-60.



(A) Células controle e tratadas com cordiaquinona J (1,5 e 3,0 μ M) por 3 horas. (B) Células controle e tratadas com BSO (10, 30, 100 e 300 μ M) por 24 horas. (C) Células controle e tratadas com BSO (10, 30, 100 e 300 μ M) por 48 horas. β -lapachona (Beta, 5 μ M) foi utilizada como controle positivo. Os testes foram realizados por western blot após 3, 24 e 48 horas de incubação com as amostras.

Os níveis intracelular da glutatona reduzida foi mensurado em células HL-60 após 15 minutos, 1 e 3 horas de exposição à cordiaquinona J para confirmar se os níveis de EROs estão relacionados a depleção de glutatona nas células tratadas. A **tabela 5** mostra que os níveis de glutatona foram depletados após o tratamento de apenas 15 minutos com a cordiaquinona J, β -lapachona e com a doxorubicina. Após 1 hora de tratamento foi observado uma leve aumento nos níveis de glutatona voltando aos níveis basais após 3 horas

mostrando apenas um leve aumento na maior concentração testada (3,0 μM) no tempo de 3 horas, confirmando os dados observados por western blot (**Tabela 5**).

Tabela 5. Níveis intracelular da glutathiona reduzida mensurada em células HL-60 após 15 minutos, 1 e 3 horas de exposição a cordiaquinona J. β -lapachona e a doxorubicina foram utilizados como controle positivo.

Compostos	Concentrações (μM)	Conteúdo intracelular de GSH		
		GSH (μg)/proteína (mg)		
		15 min	1 h	3h
Controle	-	0,81 \pm 0,05	0,77 \pm 0,03	0,89 \pm 0,03
β -lapachona	2	0,59 \pm 0,03 _{a,c}	0,86 \pm 0,02	1,02 \pm 0,10
Doxorubicina	0,5	0,66 \pm 0,02 _{a,c}	0,80 \pm 0,03	0,88 \pm 0,09
Cordiaquinona J	1,5	0,66 \pm 0,03 _{a,c}	0,91 \pm 0,02 _{a,b}	0,91 \pm 0,04
	3,0	0,62 \pm 0,05 _{a,c}	0,93 \pm 0,02 _{a,b}	1,08 \pm 0,02

Os níveis intracelular da glutathiona reduzida foi mensurada como descrito nos métodos.^a $p < 0.05$, one-way ANOVA seguido por Student Newman Keuls comparados ao controle negativo no mesmo período de incubação. ^b $p < 0.05$, one-way ANOVA seguido por Student Newman Keuls comparados a doxorubicina no mesmo período de incubação. ^c $p < 0.05$, one-way ANOVA seguido por Student Newman Keuls comparados a cada grupo experimental nos diferentes períodos de incubação.

Em seguida, foi avaliado por qual via de ativação de caspases ocorria o processo de apoptose desencadeado pela cordiaquinona J em células tumorais HL-60. Para determinar se os efeitos apoptóticos dependentes de caspases ocorriam por via intrínseca (mitocondrial) ou extrínseca (receptor de morte). Para isso, a ativação das caspases 8 e 9 foram determinadas por citometria de fluxo e foi observado que ambas as caspases foram ativadas, de maneira semelhante, após o tratamento de apenas 3 horas de incubação com a cordiaquinona J (**Figura 18 (A) e (B)**). O perfil da via da apoptose foi averiguado por western blot, onde proteínas específicas da via da apoptose foram analisadas. Os resultados obtidos confirmaram a presença de caspases 8 e 9 ativadas, além da ativação do Parp formando o Parp clivado, após o tratamento com a cordiaquinona J em apenas 3 horas (**Figura 18 (C)**).

Além disso, foi avaliado se proteínas controladoras da abertura do poro mitocondrial da via intrínseca da apoptose (fosfo-Bcl-2, Bcl-2 e Bax) também estavam ativadas. Para nossa surpresa não foi observado efeitos nestas proteínas, mas conseguimos visualizar, claramente,

a formação de Bid truncado. Esta molécula está diretamente envolvida na transmissão e amplificação de sinais entre as vias extrínseca e intrínseca da apoptose, mostrando que existe um link entre estas vias e que elas estão sendo ativadas quase momentaneamente pela molécula de estudo (**Figura 18 (C)**).

Novamente foi realizado o teste do MTT em três linhagens de células tumorais, HL-60 (leucemia promielocítica), DU-145 (câncer de próstata) e PC3-M (câncer de próstata metastático) com a cordiaquinona J, após 24 horas de tratamento, na presença de inibidores. Os inibidores utilizados foram a ciclosporina A (10 μM) e o BAPTA-AM (5 μM) 1 hora antes do início do tratamento e o dicumarol (50 μM) 24 horas antes do início do tratamento.

A ciclosporina A é um inibidor da transição da permeabilidade mitocondrial, o que pode inibir a liberação do citocromo c da mitocôndria, processo este que desencadeia a via intrínseca da apoptose. O BAPTA-AM é um quelante seletivo de estoques de cálcio intracelular. O cálcio é um mensageiro intracelular importante para o processo da apoptose, principalmente da via mitocondrial, pois este é liberado do retículo endoplasmático para a mitocôndria ativando a apoptose. O dicumarol é geralmente utilizado como um inibidor farmacológico para estudar a função da enzima NQO1 em células. Esta enzima é conhecida por agir na ativação de drogas biorredutoras, principalmente quinonas.

Nos resultados obtidos em células HL-60 pré-tratadas com ambos os inibidores da via mitocondrial da apoptose (ciclosporina A (CI_{50} 2,8 μM) e o BAPTA-AM (CI_{50} 3,7 μM)) não tiveram capacidade de diminuir os efeitos da cordiaquinona J (CI_{50} 4,6 μM) apresentando valores de CI_{50} semelhante aos observados anteriormente sem inibidores. Entretanto, quando estas células foram pré-tratadas com dicumarol foi observado uma diminuição no efeito da molécula (CI_{50} 24,6 μM) (**Tabela 6**). Todavia, quando estes mesmos inibidores foram avaliados em células diferentes, observamos que, dependendo da célula, a cordiaquinona J se comporta de maneira distinta na presença dos inibidores. Por exemplo: nas células DU-145 o pré-tratamento com ciclosporina A ou BAPTA-AM dobraram os valores de CI_{50} , porém não foi observado diferenças quando as células foram tratadas com dicumarol (**Tabela 6**). E quando avaliamos as células PC3-M observamos resultados controversos, pois apenas a ciclosporina A foi capaz de aumentar os efeitos da cordiaquinona J pela metade (**Tabela 6**). Estes resultados sugerem mecanismos diferentes dependente da origem celular estudada, mas mostra que os efeitos da substância em HL-60 parece ser inicialmente independente da via mitocondrial da apoptose.

Tabela 6. Atividade citotóxica *in vitro* da cordiaquinona J em linhagens de células tumorais. A ciclosporina A (10 μ M) e o BAPTA-AM (5 μ M) foram incubados 1 hora antes do início do tratamento e o dicumarol (50 μ M) 24 horas antes do início do tratamento.

		MTT CI ₅₀ (μ M)			
		TRATAMENTO (24h)			
Linhagens	Tipagem histológica	Cordiaquinona J			
		Cordiaquinona J	+ Dicumarol 50 μ M	+ Ciclosporina 10 μ M	+ BAPTA 5 μ M
HL-60	Leucemia promielocítica	4,6 (4,3 – 4,9)	24,6 (22,2 – 27,4)	2,8 (2,5 – 3,4)	3,7 (3,4 – 4,3)
DU-145	Próstata	34,2 (31,7 – 34,5)	37,3 (30,5 – 45,3)	71,8 (36,1 – 142,4)	61,6 (37,9 – 100,5)
PC3-M	Próstata	53 (44,7 – 62,6)	50,5 (41,9 – 61)	26 (23,4 – 29,3)	49,3 (43,1 – 56,4)

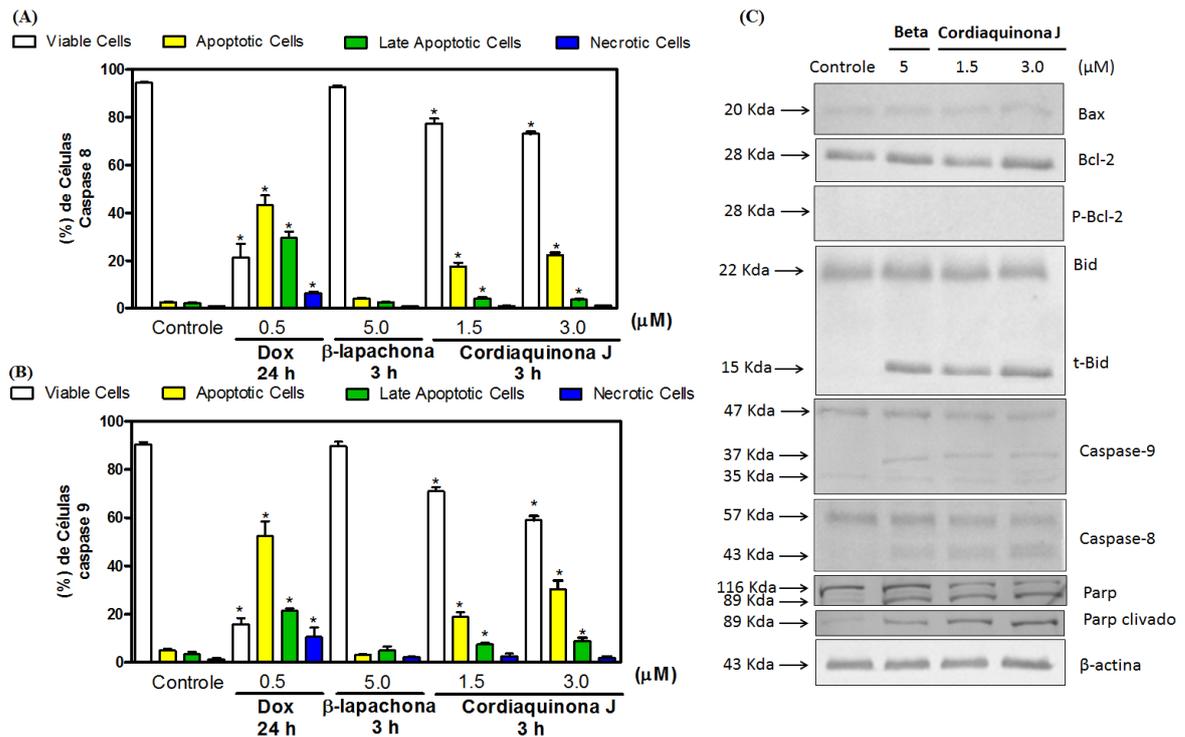
Os dados são apresentados em valores de CI₅₀ μ M e o intervalo de confiança de 95% de dois experimentos independentes realizado em duplicata pelo método do MTT após 24 horas de incubação.

Para confirmar qual via da apoptose está envolvido nos efeitos da cordiaquinona J. Avaliamos o número de células, integridade da membrana celular, despolarização mitocondrial, e a fragmentação do DNA na presença de inibidores específicos de caspases 3 e 6, de caspase 8 e de caspase 9. Foi observado que apenas os inibidores das caspases 3 e 6 e o inibidor da caspase 8 foram capazes de inibir parcialmente os efeitos da cordiaquinona J (**Figura 19**).

Nenhum dos inibidores de caspases testados foi capaz de inibir a diminuição do número de células, a perda na integridade da membrana celular e a despolarização mitocondrial, porém os inibidores específicos das caspases 3 e 6 e o inibidor da caspase 8 conseguiram inibir a fragmentação de DNA (**Figura 19**). A fragmentação do DNA é uma das principais características da apoptose e com esse resultado, aliado com os outros citados anteriormente podemos afirmar que a cordiaquinona J ativa o processo da apoptose por via intrínseca e por via extrínseca. Contudo, podemos sugerir que o processo de apoptose é iniciado pela via extrínseca e que esta via ativa e amplifica o sinal da apoptose através da formação de Bid truncado.

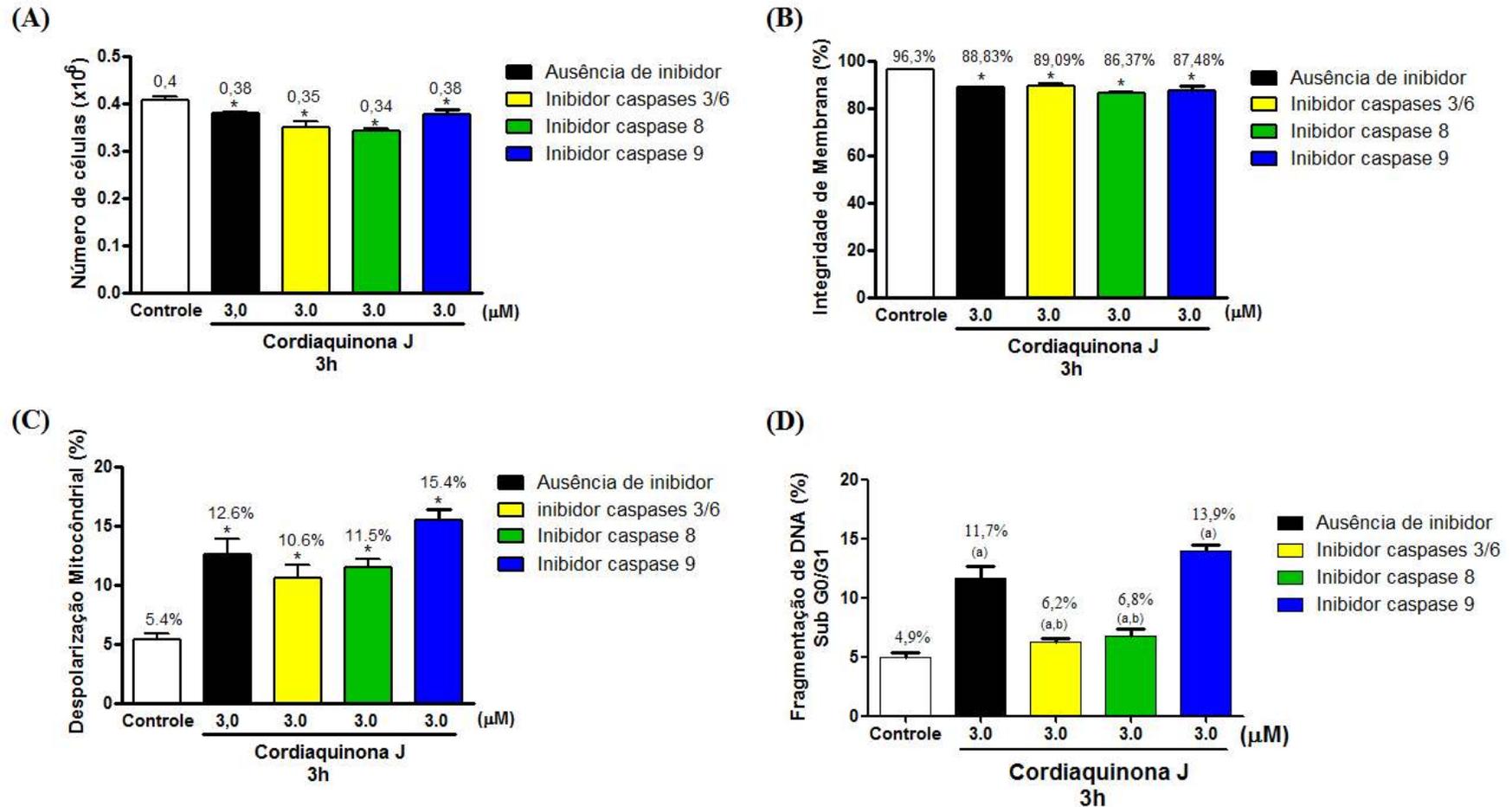
Porém podemos ainda sugerir que o mecanismo de morte das células tratadas (HL-60) com cordiaquinona J não seja apenas por apoptose, e que outro processo de morte independente de caspase 3, 7, 8 e 9 ocorra para desencadear o processo.

Figura 18. Efeitos da cordiaquinona J (1,5 e 3,0 μM) sobre a apoptose.



A atividade das caspases 8 (A) e 9 (B) em células HL-60 determinada por citometria de fluxo utilizando iodeto de propídeo e FLICA, após 3 horas de incubação. Efeitos da cordiaquinona J em proteínas de controle da via da apoptose, proteínas da família de Bcl-2 (Bcl-2, fosfo Bcl-2, Bax, e Bid), caspases 8 e 9 e Parp íntegro e clivado avaliado por western blot realizados em dois experimentos independentes através da extração de proteínas totais incubadas por 3 horas com a cordiaquinona J (C). Em todos os experimentos o controle negativo foi tratado com o veículo utilizado para diluir as amostras testadas. Doxorubicina, Dox (0.5 μM) e/ou β -lapachona (5 μM) (Beta) foram utilizados como controle positivo. Os dados de citometria de fluxo estão apresentados como os valores da média \pm erro E.P.M. obtidos de dois experimentos independentes feitos em triplicata. * $p < 0.05$, comparado como controle por ANOVA seguido pelo teste de Dunnett. Cinco mil eventos foram adquiridos em cada experimento.

Figura 19. Efeitos da cordiaquinona J (3,0 μM) na presença de inibidores seletivos de caspases (3 e 6), (8) e (9) em células HL-60. Os Inibidores específicos de caspases foram adicionados 1 hora antes do tratamento de 3 horas com a cordiaquinona J.



Os efeitos da cordiaquinona J foram avaliados sobre **(A)** densidade celular utilizando iodeto de propídeo **(B)** integridade de membrana, utilizando iodeto de propídeo; **(C)** despolarização da membrana mitocondrial, utilizando rodamina 123 e **(D)** fragmentação internucleossomal do DNA, utilizando iodeto de propídeo, Triton X-100 e citrato. O controle negativo foi tratado com o veículo utilizado para diluir as amostras testadas. Os dados estão apresentados como os valores da média \pm erro E.P.M. obtidos de dois experimentos independentes feitos em triplicata. * $p < 0,05$, comparado com o controle por ANOVA seguido pelo teste de Dunnett; ^a $p < 0,05$, comparado com o controle por ANOVA seguido pelo teste de Student Newman Keuls; ^b $p < 0,05$, comparado com o controle positivo por ANOVA seguido pelo teste de Student Newman Keuls.

4.2 Estudos eletroquímicos

Dentre as diversas técnicas eletroquímicas existentes, a técnica mais comumente utilizada para adquirir informações qualitativas sobre os processos eletroquímicos é a voltametria cíclica. A eficiência desta técnica está na sua habilidade em fornecer, rapidamente, informações sobre as reações de transferência de elétrons, sobre a termodinâmica de processos redox, sobre a cinética de reações heterogêneas de transferência de elétrons, a possibilidade de investigar a reatividade química das espécies eletrogeradas e reações químicas acopladas a processos adsorptivos, além de auxiliar na elucidação do mecanismo eletródico analisado.

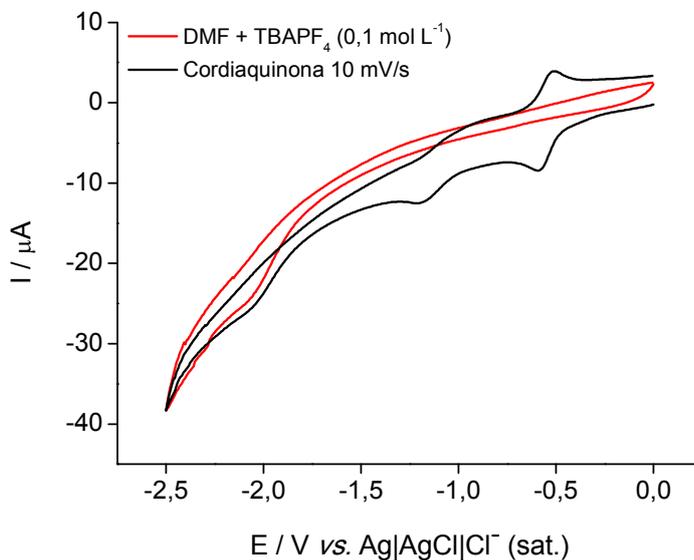
As técnicas eletroanalíticas têm sido usadas para esclarecer os mecanismos de ação de fármacos, com grande contribuição na análise de radicais livres. O grande valor da eletroquímica no estudo destes sistemas redox é devido ao uso de sistemas químicos relativamente limpos, além de ser relativamente fácil de controlar, podendo ser estudados em soluções apróticas e aquosas, em que se permite avaliar o comportamento de radicais livres gerados em sistemas biológicos, além de conseguir evidenciar a presença de interações de novas substâncias com moléculas de DNA isoladas o que pode esclarecer o mecanismo de ação de novos fármacos.

4.2.1 Análises em meio aprótico e prótico em voltametria cíclica

A cordiaquinona J apresentou comportamento típico de quinonas em meio aprótico, com duas ondas de redução. Abaixo está representado os voltamogramas cíclicos do eletrólito de suporte e da cordiaquinona J na faixa de 0 à -2.5 V.

Foi observada a formação de duas ondas. A primeira onda em -0,589V (0,100 Vs⁻¹) controlada por difusão apresentou natureza reversível, ou seja, uma onda catódica acompanhada de outra onda anódica correspondente além de um potencial de redução catódico (E_{pc}) independente da velocidade de varredura). Entretanto, a segunda onda ($E_{pc} = -1,150$ V) apresenta um processo de transferência de elétrons acompanhada de reação química. A presença da primeira e segunda onda está relacionada à formação de um radical ânion e outro diânion, respectivamente, o que configura a formação de semi- e hidroquinonas (**Figura 20**).

Figura 20. Voltamograma cíclico da cordiaquinona J, na concentração de 0,1mM, a 10 mV s⁻¹, em meio aprótico, DMF/TBAPF₄ (0,1 mol L⁻¹) vs. Ag|AgCl|Cl⁻ (0,1 mol L⁻¹). Eletrodo de trabalho: carbono vítreo.

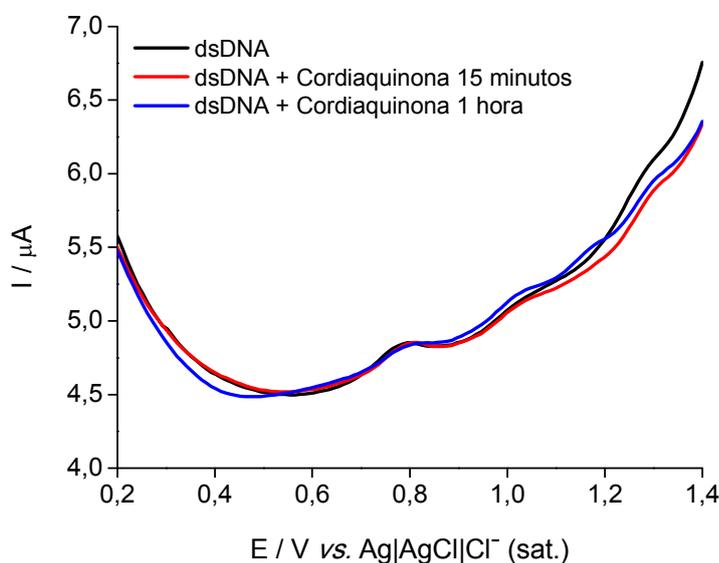


O estudo da cordiaquinona J em meio prótico foi realizado em tampão fosfato pH 7,0 com 30% de etanol. Neste meio, o voltamograma apresentou uma única onda de redução em -0,306V. Comparando com o valor de potencial em meio aprótico foi observado um deslocamento de potencial de aproximadamente 283mV para a primeira onda e 844mV para a segunda onda. Isto se deve à facilidade de redução das espécies quando protonadas (neutras e reduzidas) (dados não mostrados).

4.2.2 Estudo com biossensor de DNA

O estudo eletroquímico com biossensor de DNA de dupla fita (dsDNA), da cordiaquinona J (0,1 mM) foi realizado em tampão acetato pH 4,5 com 20% de etanol. O estudo mostrou, devido a ausência de mudança de comportamento voltamétrico do biossensor de dsDNA, que apesar do dsDNA está ligeiramente degradado, a substância não mostrou interação após 1hora de contato. Desse modo, podemos sugerir que os efeitos da cordiaquinona J não estão relacionados a uma interação direta da molécula com o DNA (**Figura 21**).

Figura 21. Estudo com biossensor de DNA realizado em tampão acetato aquoso 0,2M. Dados adquiridos após 15 minutos e 1 hora de exposição do dsDNA (DNA de dupla fita) a cordiaquinona J 0,1 mM.

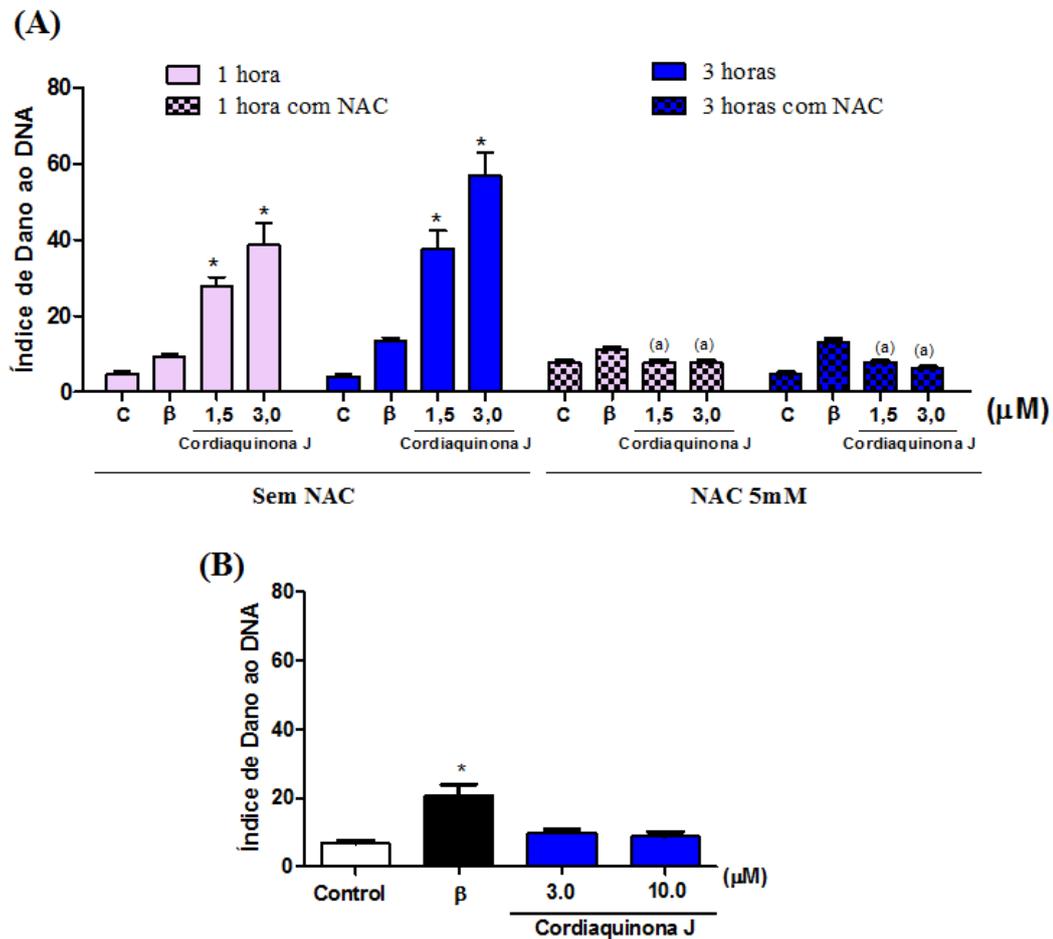


4.3 Dano ao DNA

Na literatura existem muitos estudos citando o envolvimento do estresse oxidativo com dano ao DNA. Sabendo que a cordiaquinona J não interage diretamente com o DNA, foi avaliado se esta quinona promove dano ao DNA, indiretamente, através da formação de EROs.

Para verificar a ocorrência de quebra de fita dupla de DNA, o teste do cometa foi realizado em células mononucleares de sangue periférico (CMSP) e em células HL-60 em condições alcalinas, após 1 e 3 horas de tratamento com a cordiaquinona J. Foi observado que a cordiaquinona J (1,5 e 3,0 μM) gerou dano ao DNA das células HL-60 em apenas 1 hora de tratamento, sendo o efeito mantido até às 3 horas de tratamento. Este efeito observado foi totalmente revertido após o pré-tratamento com o NAC, podemos sugerir então, que o dano ao DNA ocorre possivelmente através de um dano oxidativo dependente de EROs. Porém o dano ao DNA não foi observado em CMSP na presença de 3 e 10 μM da molécula após 3 horas de incubação (**Figura 22**), sugerindo novamente que o mecanismo de ação é diferente dependendo da célula estudada.

Figura 22. Indução da quebra de fita dupla de DNA após 1 e 3 horas de exposição



Em (A) cordiaquinona J exposta após 1 e 3 horas em células HL-60. Em (B) exposição a cordiaquinona J (3,0 e 10 μM) em células CMSP, analisadas em versão alcalina do teste do cometa. NAC (5 mM) foi adicionado 1 hora antes do tratamento de 3 horas com a cordiaquinona J em HL-60. β-lapachona 5 μM (β) foi utilizada como controle positivo. Os dados estão apresentados como os valores da média ± erro (E.P.M). obtidos de dois experimentos independentes feitos em quadruplicata. *p < 0,05, comparado como controle por ANOVA seguido pelo teste de Dunnett. ^ap < 0,05, comparado entre os grupos por ANOVA seguido pelo teste de Dunnett.

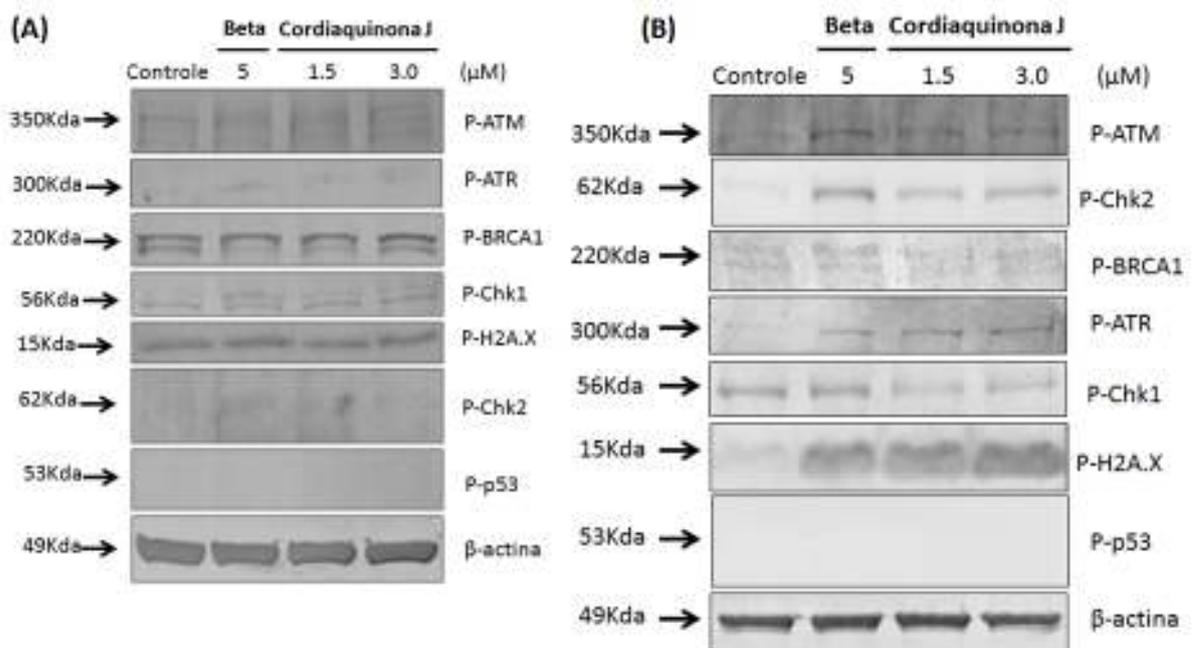
O DNA é o alvo de diversas drogas utilizadas no tratamento do câncer e a lesão da dupla fita de DNA pode levar estas células à apoptose. O reconhecimento dessas lesões é iniciado por diversas proteínas que finalmente resulta em parada do ciclo celular, reparo do DNA ou apoptose. Importantes sensores para estas lesões ao DNA são as quinases da família inositol-3 fosfato (PI3K), ATM e ATR. A ativação de ATM (ataxia-telangiectasia mutada) se dá em resposta a danos de DNA de fita dupla. ATM é ativada por autofosforilação em Ser1981 e, por sua vez, regula uma série de proteínas envolvidas nos pontos de checagem do ciclo celular, na indução ou inibição de apoptose e no reparo de DNA. Dentre estas estão a H₂A.X que é fosforilada pela ATM na Ser139 que por sua vez ativa o efector Chk2 e o gene

supressor de tumor p53. A ATR (Proteína quinase Serine/threonine) também conhecida como “*ataxia telangiectasia and Rad3-related protein*” é ativada após dano de DNA em fita simples e depois de ativado fosforila a proteína executora Chk1 que regula o processo de parada do ciclo celular e/ou morte celular.

Foram avaliadas diversas proteínas quinases da via ATM/ATR em células tumorais HL-60 e em células normais CMSP após 3 horas de tratamento com a cordiaquinona J. Foi observado que o composto estudado fosforilou fracamente a ATM, mas marcou fortemente os efetores fosforilados da via da ATM como a Chk2 e a H₂A.X. Esta ativação ocorreu de forma independente da fosforilação da proteína supressora de tumor p53 que é nula em HL-60. Entretanto não foi possível detectar, nas células tumorais (HL-60), a proteína de reparo de dano ao DNA, BRCA1, sendo visualizada apenas nas células normais (CMSP). Em relação ao ATR, foi observada uma fosforilação, porém a fosforilação do Chk1 foi menor nas células tratadas com a cordiaquinona J quando comparadas ao controle negativo (**Figura 23**).

A análise feita em CMSP mostrou que nenhuma das proteínas quinases ativadas em células HL-60 foi ativa em células normais (**Figura 23**). Estes resultados sugerem que ambas as vias ATM/ATR foram ativadas desencadeando o processo de controle celular induzindo à morte das células e o mais interessante é que este processo não ocorreu em células sanguíneas de voluntários saudáveis o que corrobora com os dados anteriores do ensaio do cometa (**Figura 22**). Mostrando que a cordiaquinona J age de modo seletivo para a linhagem tumoral HL-60 e que estes efeitos não são visualizados em células normais CMSP. O que sugere que o mecanismo gerado pela cordiaquinona J é alvo específico e que provavelmente isto ocorra devido ao aparato antioxidativo deficiente que algumas células não tumorais. Evidenciando que o mecanismo da cordiaquinona J é distinto para as diferentes células testadas.

Figura 23. Expressão de p-ATM (Ser1981), p-ATR (Ser428) p-Chk1 (Ser296), p-Chk2 (Thr68), p-H2A.X (Ser139), p-BRCA1 (Ser1524), p53 (Ser15) em células CMSP (A) e em HL-60 (B) controle e tratadas com cordiaquinona J (1,5 e 3,0 μ M). β -lapachona (5 μ M) foi utilizada como controle positivo. Os testes foram realizados por western blot após 3 horas de incubação com as amostras.



4.4 Avaliação de proto-oncogenes e o estresse oxidativo

Sabendo que a cordiaquinona J ativa apoptose, provavelmente por via extrínseca, dano ao DNA, através da via ATM/ATR, além de gerar estresse oxidativo por depleção dos níveis de glutatona intracelular reduzida foi avaliado o perfil de expressão proteica de NQO1, c-myc e o NF- κ B.

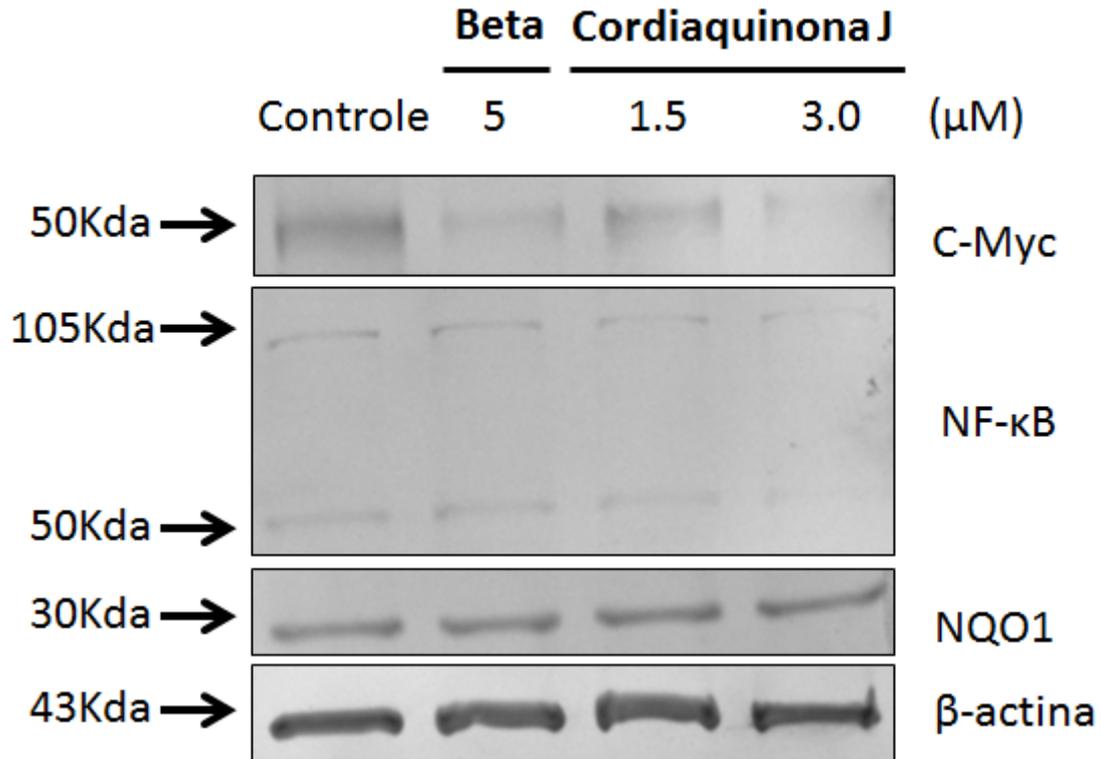
O NQO1 é um gene pertencente a família da NAD(P)H desidrogenase quinona 1. A atividade enzimática desta enzima (NQO1) catalisa a redução de 2 elétrons de moléculas que possuem o grupo farmacofórico quinona. A redução destes elétrons forma o radical hidroquinona. Geralmente esta reação de redução está associada a uma reação de desintoxicação, no entanto algumas hidroquinonas formadas a partir desta redução apresentam forte efeito tóxico. Então a habilidade de NQO1 gerar hidroquinonas tóxicas tem sido utilizada como estratégia para combater doenças proliferativas como o câncer.

O c-myc é um gene regulador que codifica fatores de transcrição e está altamente expresso em células tumorais. Ele é ativado por vários fatores mitogênicos sendo a sua ativação responsável por diversas respostas biológicas, dentre elas: aumento da proliferação celular, inibição da apoptose, controle ao dano de DNA pela ativação da via ATM/ATR e mais recentemente foi descoberto que a sua fosforilação está envolvida na síntese de glutathiona.

O NF- κ B (*nuclear factor kappa-light-chain-enhancer of activated B cells*), é um complexo proteico que controla a transcrição do DNA de maneira rápida e eficaz. Promove respostas celulares a diversos estímulos, dentre estes estão as EROs.

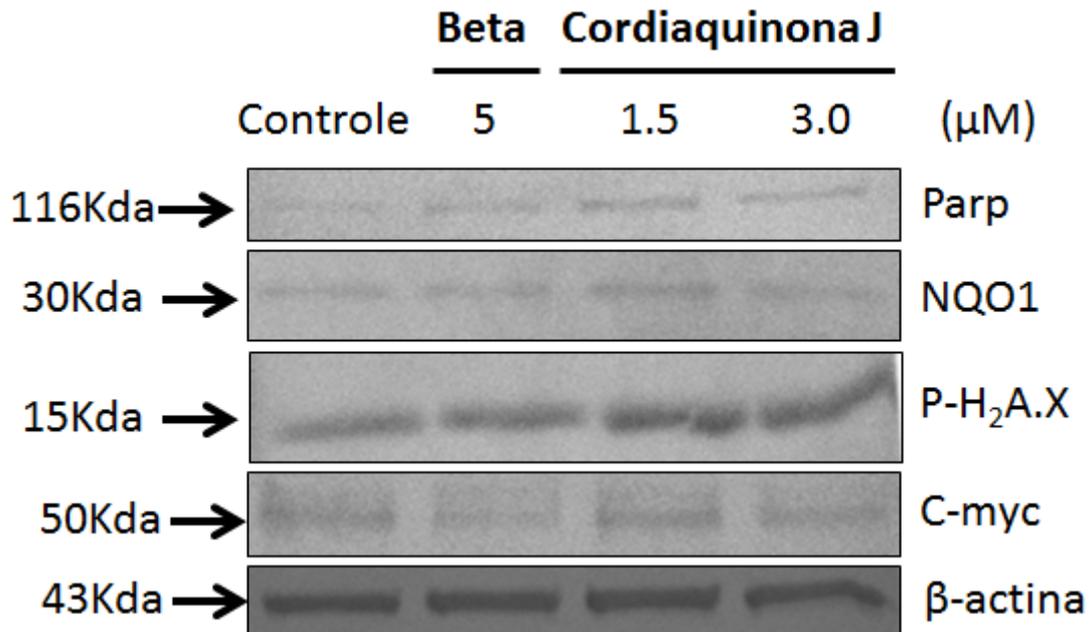
A fim de desvendar se os efeitos observados até agora ocorria devido à fosforilação de algum protooncogene, foi avaliado se o c-myc e o NF- κ B poderiam regular algum dos processos observados. Então, as células HL-60 foram tratadas com a cordiaquinona J por 3 horas e avaliado, pelo teste de western blot, se a expressão proteica do c-myc, NF- κ B e de NQO1 estavam alteradas. Não observamos diferenças em relação à expressão proteica de NF- κ B e do NQO1 nas concentrações e no tempo testado (**Figura 24**), no entanto a expressão do c-myc foi consideravelmente diminuída quando comparado ao controle negativo (**Figura 24**), porém não vimos diferenças na expressão de NF- κ B e c-myc após 1 hora de exposição à droga (dados não mostrados).

Figura 24. Expressão de c-myc, NF- κ B, NQO1 e β -actina em células HL-60 controle e tratadas com cordiaquinona J (1,5 e 3,0 μ M). β -lapachona (5 μ M) foi utilizada como controle positivo. Os testes foram realizados por western blot após 3 horas de incubação com as amostras.



Foi observado que todos os efeitos mostrados pela cordiaquinona J foram abolidos pelo NAC, pois não foi possível visualizar a clivagem do Parp, a fosforilação do H₂A.X, nem a diminuição da expressão do c-myc (**Figura 25**). Com isso podemos sugerir que todos os efeitos *in vitro* observados pelo tratamento das células HL-60 com a cordiaquinona J ocorrem devido à geração de EROs.

Figura 25. Expressão de c-myc, NF- κ B, NQO1, Parp e β -actina em células HL-60 controle e tratadas com cordiaquinona J (1,5 e 3,0 μ M) na presença de N-acetil-L-Cisteína (NAC) (5mM) 1 h antes do início do tratamento. β -lapachona (5,0 μ M) foi utilizada como controle positivo. Os testes foram realizados por western blot após 3 horas de incubação com as amostras.



4.5 Avaliação do mecanismo antitumoral da cordiaquinona J *in vivo*, utilizando o tumor sarcoma-180 como modelo

A avaliação da atividade antitumoral da cordiaquinona J foi realizada em camundongos *Mus musculus* Swiss utilizando o modelo experimental do sarcoma-180. A cordiaquinona J foi administrada nos animais por via oral (25 e 50 mg/kg/dia) durante 7 dias consecutivos. No 9^o dia, os animais foram sacrificados por deslocamento cervical e dissecados para a retirada do tumor, fígado, estômago, baço e rins para a avaliação histopatológica, e de sangue pelo plexo-retroorbital para os ensaios bioquímicos e hematológicos.

A cordiaquinona J foi capaz de diminuir significativamente o crescimento da massa tumoral em relação ao controle negativo (veículo) na maior dose testada (50mg/kg/dia). O peso médio dos tumores dos animais tratados apenas com o veículo foi de $2,93 \pm 0,14$ g, enquanto nos animais tratados com 25 e 50 mg/kg/dia de cordiaquinona J foi de $2,25 \pm 0,23$ g e $0,85 \pm 0,22$ g, respectivamente. Mostrando um percentual de inibição do peso tumoral de

72,9% na maior dose (50mg/kg/dia). Já os animais tratados com o controle positivo (5-FU) houve 73,9% de inibição do crescimento tumoral (**Figura 26**).

Também foi avaliado se a cordiaquinona J juntamente com o 5-FU causava efeito inibitório sinérgico. Então ambos os compostos foram administrados em sub-doses de 10 e 25 mg/kg/dia de 5-FU e cordiaquinona J, respectivamente.

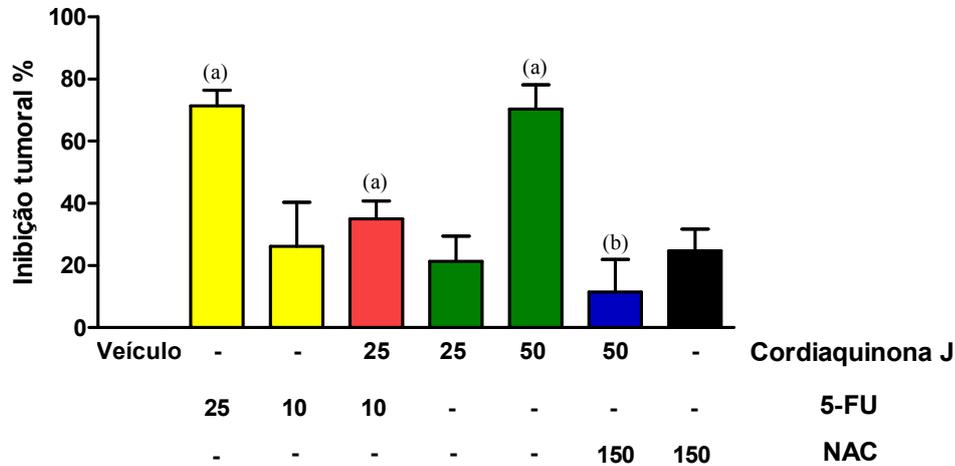
O tratamento foi realizado da mesma maneira, durante 7 dias consecutivos. No 9º dia, os animais foram sacrificados por deslocamento cervical e dissecados para a retirada do tumor, fígado, estômago, baço e rins para a avaliação histopatológica, e sangue pelo plexo-retroorbital para os ensaios bioquímicos e hematológicos.

Quando os animais foram tratados separadamente com cordiaquinona J (25 mg/kg/dia) e 5-FU (10 mg/kg/dia) a massa tumoral observada foi de $2,25 \pm 0,23$ g e $2,11 \pm 0,41$ g, respectivamente, não apresentando diferenças estatísticas comparados com o controle negativo. Porém quando foi feito o co-tratamento (cordiaquinona J + 5-FU) foi observado redução do peso tumoral de $2,93 \pm 0,14$ g no grupo controle, para $1,86 \pm 0,16$ g no grupo associado. Estes resultados foram estatisticamente diferentes do controle negativo com percentual de inibição de 37,5%, porém este efeito é irrelevante, não podendo sugerir que ocorra sinergismo entre as amostras testadas (**Figura 26**).

Para comparar os efeitos observados *in vitro* com os efeitos *in vivo* em relação a participação de EROs, inicialmente foi avaliado o efeito do NAC, *in vivo*, nas doses de 150 e 300 mg/kg/dia por via intraperitoneal, durante 7 dias consecutivos. O NAC não mostrou efeitos antitumorais na dose testada apresentando baixa toxicidade nos animais.

Em uma segunda etapa de experimentos o NAC (150 mg/kg/dia) foi administrado por via intraperitoneal, diariamente, durante 7 dias consecutivos, 1 hora antes do início do tratamento dos animais com a cordiaquinona J (50 mg/kg/dia) por via oral. Foi observado que o pré-tratamento com o NAC aboliu os efeitos observados previamente com a cordiaquinona J, apresentando apenas 14% de inibição do peso do tumor quando comparado ao grupo tratado apenas com o veículo (**Figura 26**). Com isso, podemos sugerir que os efeitos antitumorais *in vivo*, assim como os *in vitro* são dependentes de EROs.

Figura 26. Efeito da cordiaquinona J nas doses de 25 e 50 mg/kg/dia v.o. sobre a proliferação tumoral de camundongos (*Mus musculus*) Swiss transplantados com sarcoma-180, após 7 dias de tratamento. N-acetil-L-cisteína (NAC) (150 mg/kg/dia) foi utilizado como antioxidante. 5-Fluorouracil (5-FU) (10 e 25 mg/kg/dia) foi utilizado como controle positivo.



Os valores correspondem à média \pm E.P.M. de 8 animais. ^a, $p < 0,05$ comparado com o controle negativo por ANOVA seguido pelo teste Student Newman Keuls; ^b $p < 0,05$ comparado com a cordiaquinona J (50 mg/kg/dia) por ANOVA seguido pelo teste Student Newman Keuls.

O peso relativo úmido de alguns órgãos mostrou diferença estatística ($p < 0,05$) quando comparados com os órgãos do grupo controle negativo. Na dose de 300 mg/kg/dia (i.p.) de NAC foi observado alteração drásticas quanto ao peso relativo dos órgãos dos animais tratados, inclusive os próprios animais apresentaram caquexia, por esse motivo, essa dose de NAC não foi utilizada em nenhum outro experimento. Já na dose de 150mg/kg/dia (i.p.) de NAC não foi observada alterações em relação ao peso dos órgãos e animais. Motivo pelo qual, essa dose foi escolhida para o co-tratamento com a cordiaquinona J. Foi observado que a cordiaquinona J também não apresentou alterações nos pesos dos órgãos em todos os grupos avaliados, com exceção do estômago no grupo de 50 mg/kg/dia que apresentou um aumento de peso, provavelmente devido a alguma toxicidade direta apresentado pela droga, porém o pré-tratamento com o NAC preveniu até os efeitos tóxicos observados pela cordiaquinona J (**Tabela 7**).

Tabela 7. Efeito da cordiaquinona J nas doses de 25 e 50 mg/kg/dia v.o. sobre a massa dos órgãos de camundongos (g/100g de massa corpóreo) e tumores sarcoma-180, após 7 dias de tratamento.

Substâncias	Dose (mg/kg/dia)	Animal (g)	Fígado	Baço	Rins	Estômago	Tumor (g)	Inibição (%)
Controle	-	41 ± 0,3	4,6 ± 0,09	0,57 ± 0,04	1,1 ± 0,02	0,84 ± 0,02	2,93 ± 0,14	-
NAC	150	40,9 ± 0,3	4,7 ± 0,13	0,68 ± 0,04	1,2 ± 0,04	-	2,19 ± 0,14	26,05
	300	24,5 ± 1,2 ^a	3,9 ± 0,13 ^a	0,3 ± 0,05 ^a	1,2 ± 0,08	-	0,99 ± 0,16 ^a	67,9 ^a
5-FU	10	41,6 ± 0,5	4,65 ± 0,17	0,74 ± 0,04	1,03 ± 0,03	-	2,11 ± 0,41	28,7
	25	41,1 ± 0,3	4,8 ± 0,11	0,27 ± 0,02 ^a	1,09 ± 0,08	-	0,84 ± 0,24 ^a	73,9 ^a
Cordiaquinona J	25	40,6 ± 0,6	4,8 ± 0,11 ^a	0,6 ± 0,04	1,11 ± 0,03	0,88 ± 0,14	2,25 ± 0,23	23,9
	50	41 ± 0,3	4,4 ± 0,15	0,49 ± 0,18	1,16 ± 0,18	1,29 ± 0,1 ^a	0,85 ± 0,22 ^a	72,9 ^a
Cordiaquinona J + 5-FU	25 + 10	40,7 ± 0,3	4,7 ± 0,11	0,65 ± 0,03	1,1 ± 0,03	0,88 ± 0,05	1,86 ± 0,16 ^a	37,5 ^a
Cordiaquinona J + NAC	50 + 150	41 ± 0,3	4,7 ± 0,15	0,74 ± 0,04	1,2 ± 0,1	0,87 ± 0,07	2,5 ± 0,3	14,0

N-acetil-L-cisteína (NAC) (150 e 300 mg/kg/dia) foi utilizado como antioxidante. 5-Fluorouracil (5-FU) (10 e 25 mg/kg/dia) foi utilizado como controle positivo. Os valores correspondem à média ± E.P.M. de 8 animais. *, $p < 0,05$ comparado com o controle negativo por ANOVA seguido pelo teste Student Newman Keuls

4.5.1 Análise Histopatológica.

Histologicamente, os órgãos dos animais do grupo controle negativo (veículo) não apresentaram sinais graves de toxicidade, com o fígado apresentando degeneração hidrópica e balonizante, os rins com estrutura glomerular preservada, o baço apresentando vários megacariócitos e o estômago sem alterações histológicas (**Figura 27-34**).

Na análise histopatológica dos órgãos dos animais tratados com a cordiaquinona J (50 mg/kg/dia) o fígado mostrou-se mais hemorrágico (**Figura 28 (A)**), pois foi visualizado congestão portal da veia centrolobular associada a hemorragia sinusoidal, assim como os rins que apresentaram numerosos trechos de hemorragia glomerular e intersticial (**Figura 32 (A)**) e o baço que também apresentava pequenos focos de hemorragia apresentando congestão da polpa vermelha (**Figura 30 (A)**), no entanto não foi observado alterações histológicas no estômago (**Figura 34 (A)**).

Nos animais tratados com 5-FU também foram encontrados sinais de toxicidade no fígado e nos rins, como: focos inflamatórios e intensa tumefação celular no fígado e presença de cilindros hialinos nos rins. Porém vale ressaltar que em nenhum dos grupos foi encontrado fibrose intersticial no fígado, e nos rins. Todos os grupos apresentavam glomérulos preservados, o que indica que esses efeitos podem ser passíveis de regeneração. No baço não foi encontrada nenhuma alteração em relação ao controle negativo (dados não mostrados).

Em todos os grupos o tumor era constituído por neoplasia maligna composta por células redondas, com binucleação, freqüentes figuras mitóticas e diferentes graus de pleomorfismo celular e nuclear. Além disso, nos grupos tratados com a cordiaquinona J (50 mg/kg/dia) e no 5-FU (25 mg/kg/dia) foram encontradas diversas áreas de necrose. Em relação aos grupos associados (cordiaquinona J (50 mg/kg/dia) + NAC (150 mg/kg/dia)) e (cordiaquinona J (25 mg/kg/dia) + 5-FU (10 mg/kg/dia)), do ponto de vista microscópico, não foram observadas modificações do padrão morfológico das células tumorais (**Figura 35 (A e B)** e **36 (A e B)**).

Os fígados do grupo cordiaquinona J (25 mg/kg/dia) + 5-FU (10 mg/kg/dia) apresentaram um melhor desempenho quando comparado aos grupos tratados isoladamente com 5-FU (10 mg/kg/dia) (dados não mostrados). Entre os grupos tratados com NAC 150 mg/kg/dia, houve alterações metabólicas de leve impacto e passíveis de reversão,

provavelmente associadas à degradação da substância, não apresentando dose-dependência. Em relação ao baço, rins e estômago deste grupo, os efeitos apresentados foram discretos e semelhantes ao grupo controle negativo, mostrando um pouco mais intensos nos rins (dados não mostrados).

Estes resultados sugerem que a cordiaquinona J apresenta apenas um leve efeito tóxico nos órgãos avaliados, principalmente pequenos pontos hemorrágicos, porém estes efeitos foram revertidos quando pré-tratados com o NAC.

Figura 27. Fotomicrografia do fígado de camundongos (*Mus musculus*) Swiss transplantados com sarcoma-180 e sacrificados após 7 dias de tratamento. O controle negativo (A) foi tratado com veículo de diluição da substância. A cordiaquinona J foi administrada na dose de 25 mg/kg/dia v.o. (B). Coloração por hematoxilina/eosina e visualização por microscopia óptica. Aumento = 400x.

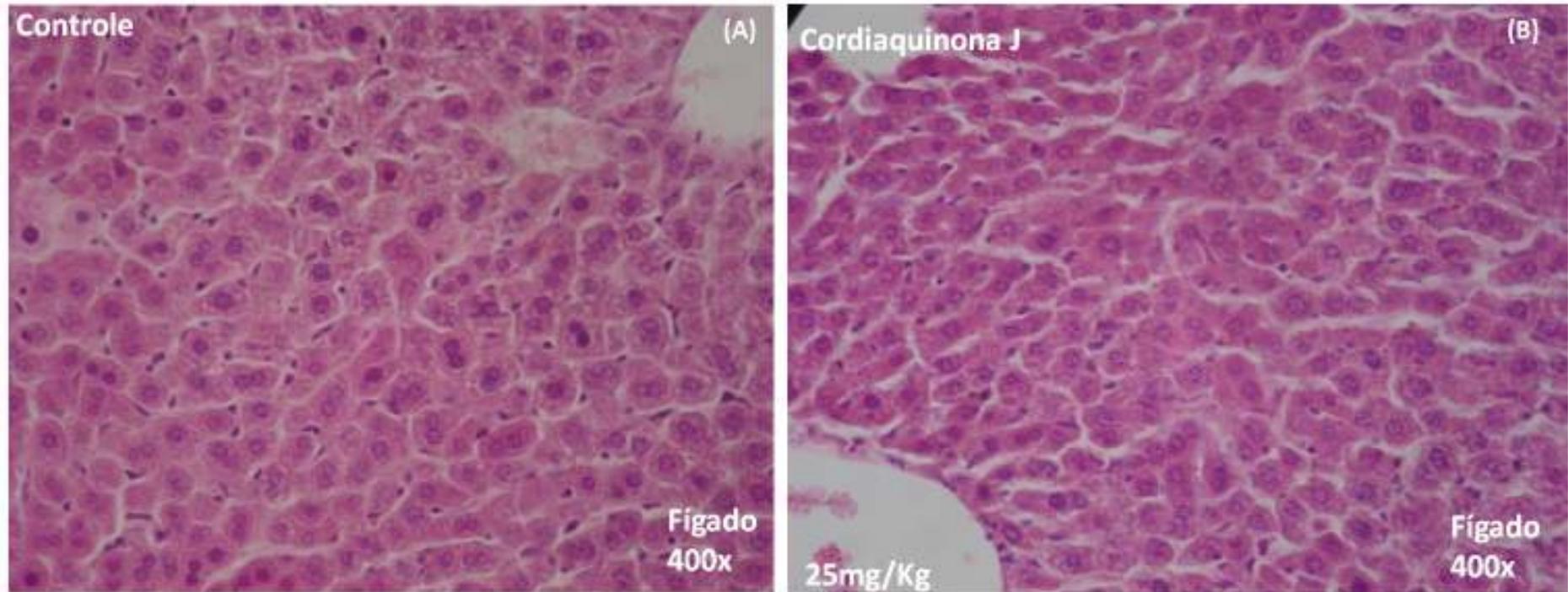


Figura 28. Fotomicrografia do fígado de camundongos (*Mus musculus*) Swiss transplantados com sarcoma-180 e sacrificados após 7 dias de tratamento. Animal tratado com cordiaquinona J 50 mg/kg/dia v.o. (A). Animal tratado com NAC (150 mg/kg/dia) i.p. 1 hora antes do início do tratamento com cordiaquinona J 50 mg/kg/dia v.o. (B). Coloração por hematoxilina/eosina e visualização por microscopia óptica. Aumento = 400x

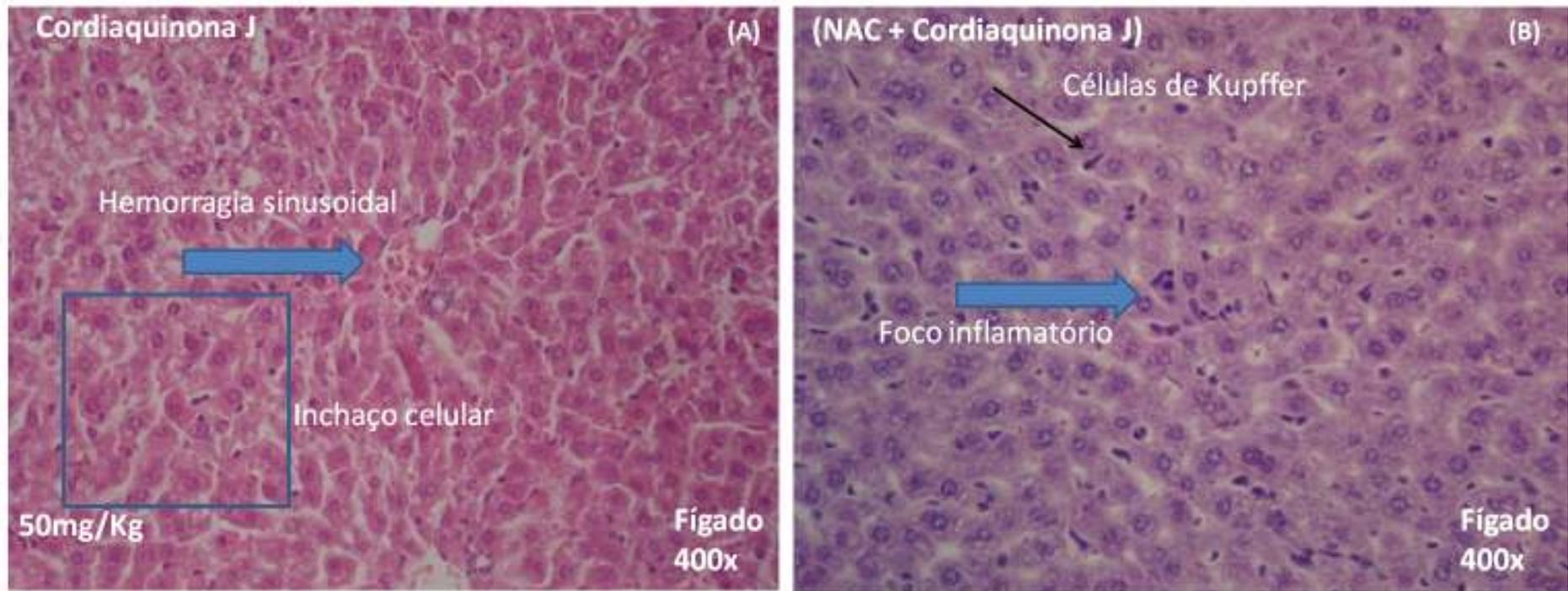


Figura 29. Fotomicrografia do baço de camundongos (*Mus musculus*) Swiss transplantados com sarcoma-180 e sacrificados após 7 dias de tratamento. O controle negativo (A) foi tratado com veículo de diluição da substância. A cordiaquinona J foi administrada na dose de 25 mg/kg/dia v.o. (B). Coloração por hematoxilina/eosina e visualização por microscopia óptica. Aumento = 400x.

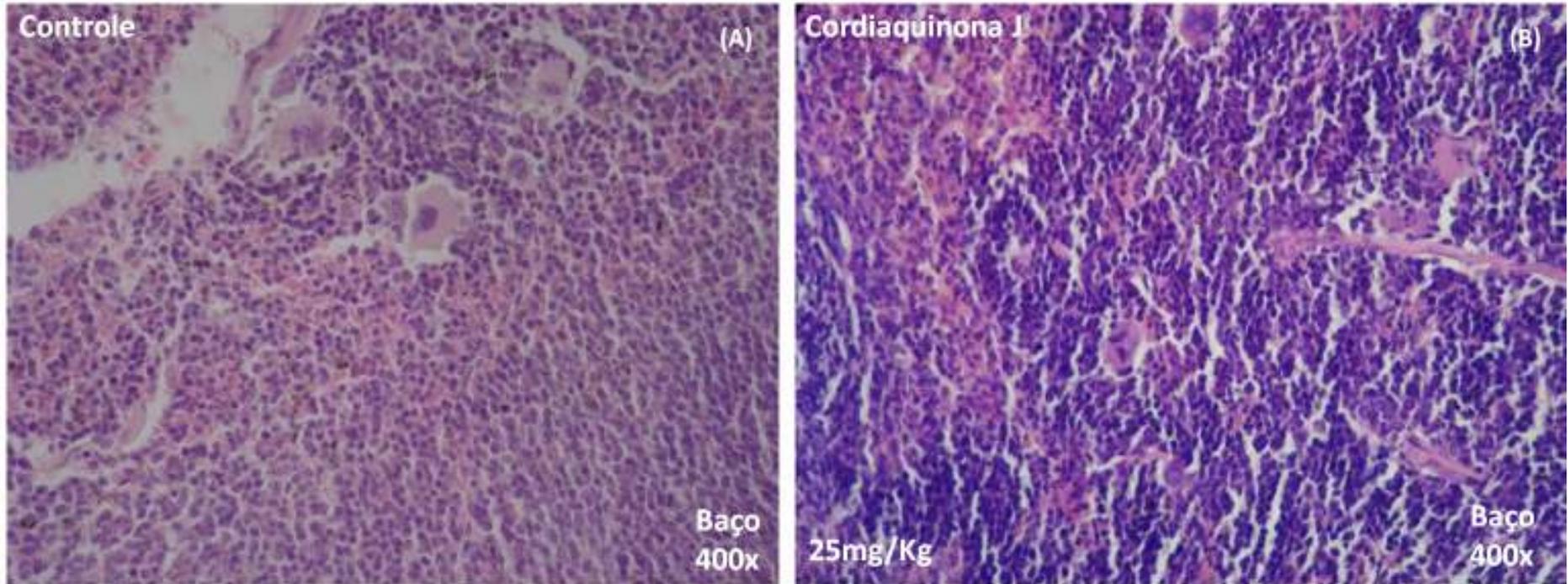


Figura 30. Fotomicrografia do baço de camundongos (*Mus musculus*) Swiss transplantados com sarcoma-180 e sacrificados após 7 dias de tratamento. Animal tratado com cordiaquinona J 50 mg/kg/dia v.o. (A). Animal tratado com NAC (150 mg/kg/dia) i.p. 1 hora antes do início do tratamento com cordiaquinona J 50 mg/kg/dia v.o. (B). Coloração por hematoxilina/eosina e visualização por microscopia óptica. Aumento = 400x

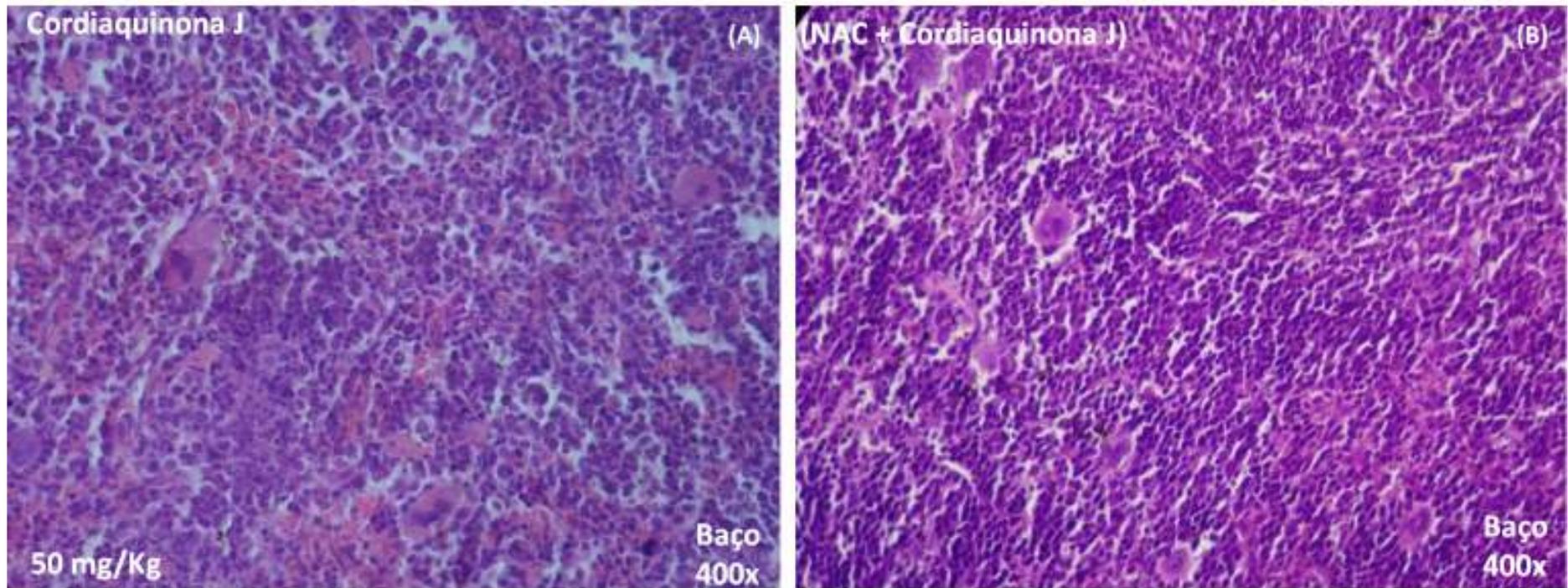


Figura 31. Fotomicrografia dos rins de camundongos (*Mus musculus*) Swiss transplantados com sarcoma-180 e sacrificados após 7 dias de tratamento. O controle negativo (A) foi tratado com veículo de diluição da substância. A cordiaquinona J foi administrada na dose de 25 mg/kg/dia v.o. (B). Coloração por hematoxilina/eosina e visualização por microscopia óptica. Aumento = 400x.

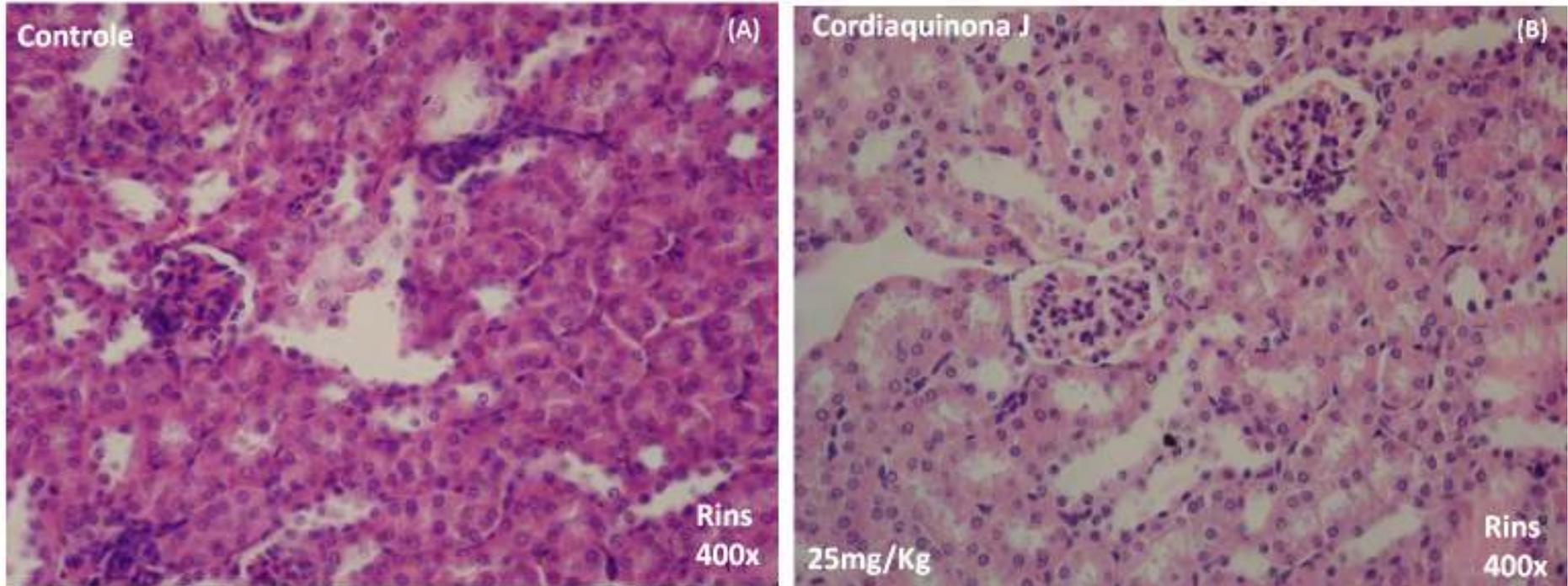


Figura 32. Fotomicrografia dos rins de camundongos (*Mus musculus*) Swiss transplantados com sarcoma-180 e sacrificados após 7 dias de tratamento. Animal tratado com cordiaquinona J 50 mg/kg/dia v.o. (A). Animal tratado com NAC (150 mg/kg/dia) i.p. 1 hora antes do início do tratamento com cordiaquinona J 50 mg/kg/dia v.o. (B). Coloração por hematoxilina/eosina e visualização por microscopia óptica. Aumento = 400x

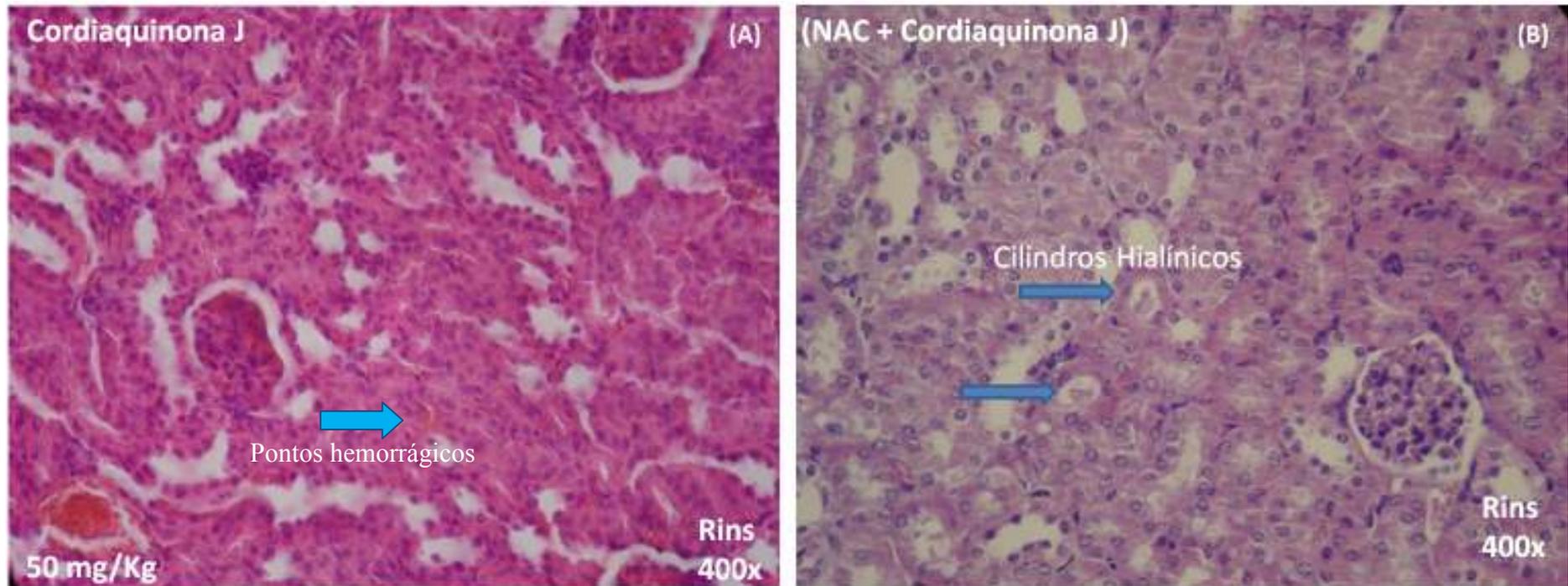


Figura 33. Fotomicrografia do estômago de camundongos (*Mus musculus*) Swiss transplantados com sarcoma-180 e sacrificados após 7 dias de tratamento. O controle negativo (A) foi tratado com veículo de diluição da substância. A cordiaquina J foi administrada na dose de 25 mg/kg/dia v.o. (B). Coloração por hematoxilina/eosina e visualização por microscopia óptica.

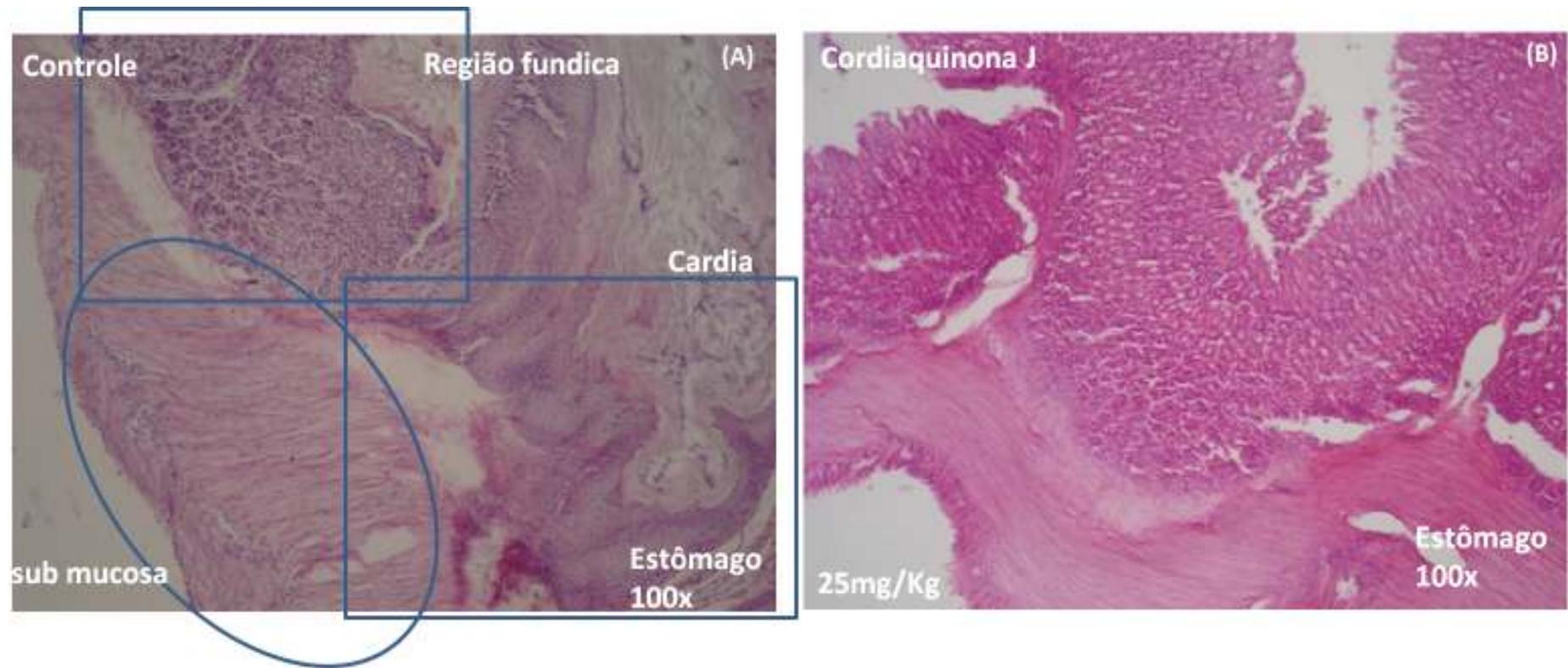


Figura 34. Fotomicrografia do estômago de camundongos (*Mus musculus*) Swiss transplantados com sarcoma-180 e sacrificados após 7 dias de tratamento. Animal tratado com cordiaquinona J 50 mg/kg/dia v.o. (A). Animal tratado com NAC (150 mg/kg/dia) i.p. 1 hora antes do início do tratamento com cordiaquinona J 50 mg/kg/dia v.o. (B). Coloração por hematoxilina/eosina e visualização por microscopia óptica.

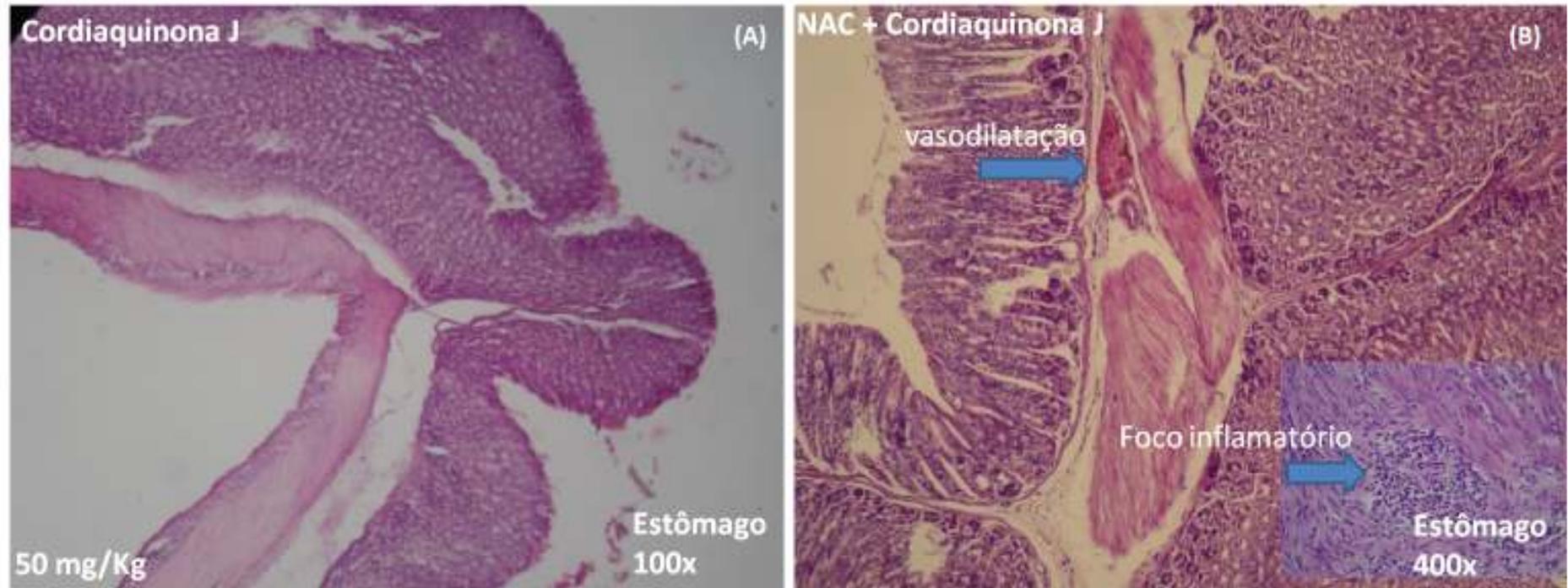


Figura 35. Fotomicrografia do tumor de camundongos (*Mus musculus*) Swiss transplantados com sarcoma-180 e sacrificados após 7 dias de tratamento. O controle negativo (A) foi tratado com veículo de diluição da substância. A cordiaquina J foi administrada na dose de 25 mg/kg/dia v.o. (B). Coloração por hematoxilina/eosina e visualização por microscopia óptica. Aumento = 400x

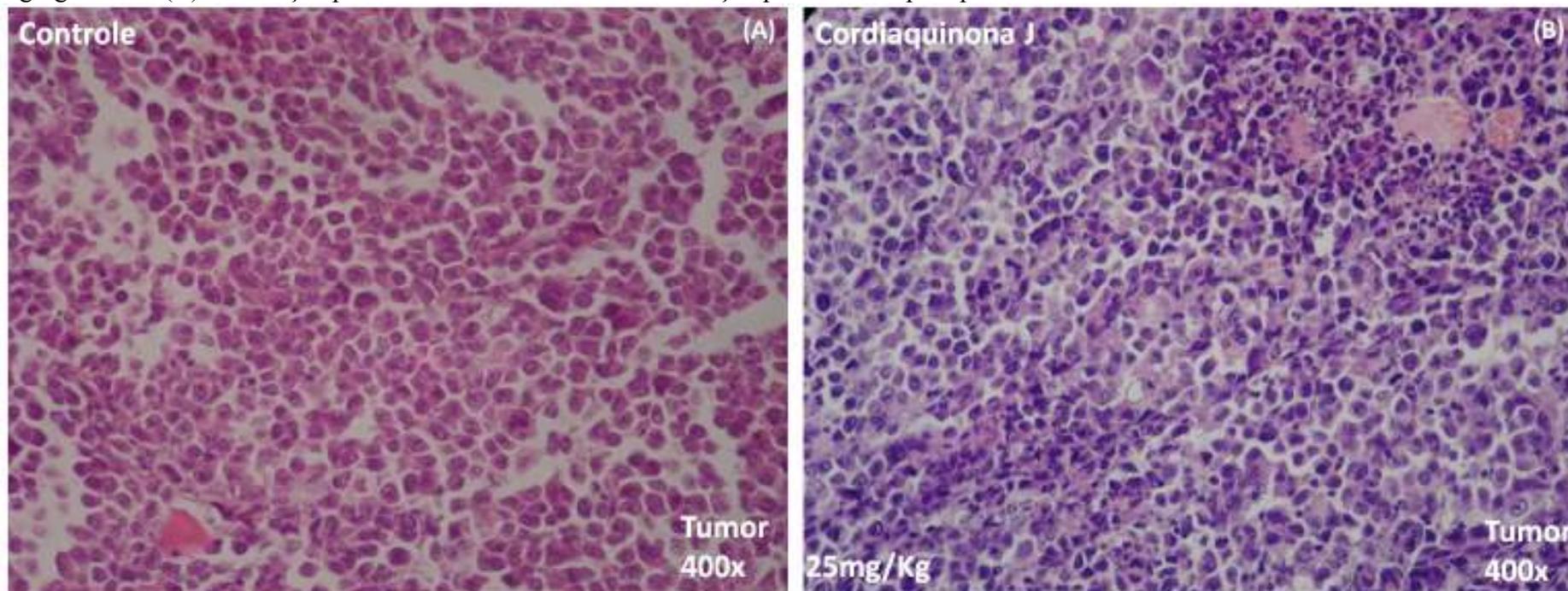
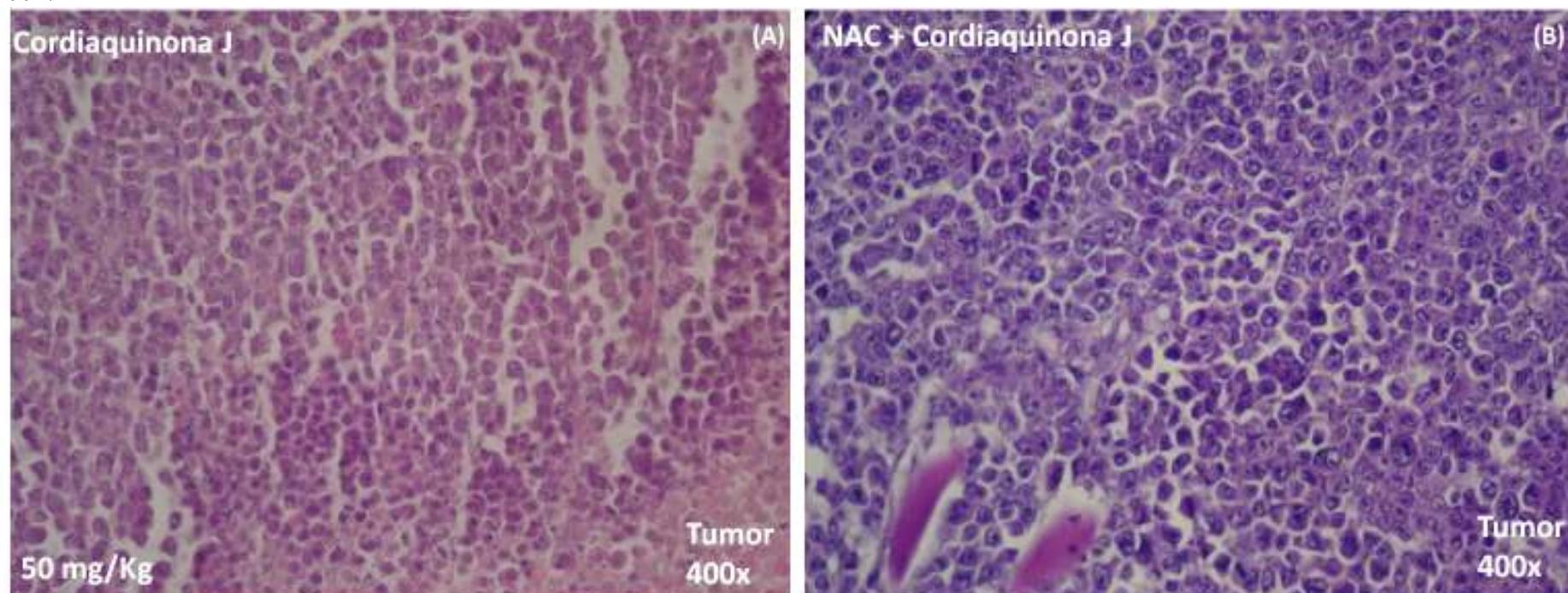


Figura 36. Fotomicrografia do tumor de camundongos (*Mus musculus*) Swiss transplantados com sarcoma-180 e sacrificados após 7 dias de tratamento. Animal tratado com cordiaquinona J 50 mg/kg/dia v.o. (A). Animal tratado com NAC (150 mg/kg/dia) i.p. 1 hora antes do início do tratamento com cordiaquinona J 50 mg/kg/dia v.o. (B). Coloração por hematoxilina/eosina e visualização por microscopia óptica. Aumento = 400x.



4.5.2 Análise dos parâmetros Bioquímicos

O sangue dos animais utilizados no experimento antitumoral, inclusive, aqueles saudáveis foi coletado imediatamente antes do sacrifício para análise bioquímica e hematológica. Os parâmetros bioquímicos avaliados demonstraram que o tratamento com cordiaquinona J (50 mg/kg/dia) causou efeitos tóxicos no fígado através da dosagem sérica de ALT e AST, mas não causou alterações na função renal através da dosagem de uréia. Os níveis de AST aumentaram de 78,16 UI/mL no grupo de animais saudáveis para 128,3 UI/mL nos animais transplantados com o tumor sarcoma-180, estes efeitos tóxicos ficaram ainda mais intensos quando os animais foram tratados com cordiaquinona J (50 mg/kg/dia) com valores de 200,3 UI/mL (**Tabela 8**). O tratamento com cordiaquinona J (25 mg/kg/dia) não apresentou diferenças quando comparados ao controle negativo, somente os níveis de AST foram diferentes quando comparados ao grupo controle não transplantado com tumor.

Em relação aos tratamentos associados ou com 5-FU (10mg/kg/dia) ou com NAC (150 mg/kg/dia) não foram observados efeitos tóxicos. O grupo pré-tratado com NAC aboliu novamente todos os efeitos tóxicos associados à cordiaquinona J mostrando, mais uma vez, que os efeitos observados nesta molécula se dão através de geração de EROs.

4.5.3 Análise dos parâmetros hematológicos.

Não houve diferenças significativas ($p > 0,05$) na contagem de plaquetas entre os grupos avaliados (**Tabela 9**). Entretanto foram observadas alterações na contagem de leucócitos totais e diferenciais (**Tabela 9**). O número de leucócitos totais foi alterado de $3,4 \times 10^3$ (controle negativo) para $1,6 \times 10^3$ no grupo tratado com cordiaquinona J (50 mg/kg/dia). No grupo associado cordiaquinona J (25 mg/kg/dia) e 5-FU (10 mg/kg/dia) a contagem observado foi de $1,6 \times 10^3$. Porém quando os animais são pré-tratados com NAC o número de leucócitos retornam aos seus valores padrões. No entanto, para nossa surpresa, a contagem diferencial (eosinófilos, neutrófilo, linfócitos e monócitos) não apresentou dados que indiquem qual célula sanguínea é responsável pela leucopenia observada pela cordiaquinona J (**Tabela 9**).

Tabela 8. Dosagem de alanina transaminase (ALT), aspartato transaminase (AST) e uréia em sangue de camundongos *M. musculus Swiss* saudáveis e com sarcoma-180 tratados com veículo (v.o.), com cordiaquinona J (CKJ, 25 e 50mg/kg/dia) (v.o.), com NAC (150mg/kg/dia) (i.p.) e associado com NAC (150mg/kg/dia) e 5-FU (10 mg/kg/dia).

Compostos	Dose (mg kg ⁻¹)	Urea (mg dl ⁻¹)	ALT (UI l ⁻¹)	AST (UI l ⁻¹)
<i>Camundongo saudável</i>				
0,9% NaCl	-	38,1 ± 1,7	22,9 ± 3,9	78,16 ± 8,5
<i>Camundongos transplantados com S180</i>				
Veículo	-	30,1 ± 2,1	40,3 ± 4,6	128,3 ± 9,5
5-FU	10	35,3 ± 2,7	38,3 ± 3,6	111,2 ± 8,8
CKJ	25	28,8 ± 1,1	48,0 ± 2,6	153,5 ± 15,8 ^a
CKJ	50	32,5 ± 3,8	54,0 ± 5,6 ^{a,d}	200,3 ± 30,2 ^{a,b,c,d}
CKJ + 5-FU	25	29,8 ± 4,1	32,7 ± 3,8	142,5 ± 18,8
NAC		41,3 ± 0,5	23,5 ± 1,4	99,7 ± 12,06
CKJ + NAC	25	37,5 ± 4,2	33,4 ± 6,8	147,5 ± 27,4

Os dados (n= 8) foram analisados por ANOVA seguida do teste de Bonferroni. ^a $p < 0,05$ comparados com camundongos saudáveis; ^b $p < 0,05$ comparados com camundongos transplantados com o tumor S180; ^c $p < 0,05$ comparados com camundongos transplantados com o tumor S180 e tratados com 5-FU; ^d $p < 0,05$ comparados com camundongos transplantados com o tumor S180 e tratados com NAC.

Tabela 9. Avaliação dos parâmetros hematológicos em sangue de camundongos *M. musculus Swiss* saudáveis e com sarcoma-180 tratados com veículo (v.o.), com cordiaquinona J (CKJ, 25 e 50mg/kg/dia) (v.o.), com NAC (150mg/kg/dia) (i.p.) e associado com NAC (150mg/kg/dia) e 5-FU (10 mg/kg/dia).

Compostos	Dose (mg kg ⁻¹)	Plaquetas (10 ⁵ céls/mL)	Leucócitos totais (10 ³ céls/mL)	Contagem diferencial de leucócitos (%)			
				Eosinófilos	Linfócitos	Neutrófilos	Monócitos
<i>Camundongo saudável</i>							
0,9% NaCl	-	8,7 ± 0,6	2,4 ± 0,2	0,2	90,5	8,3	1,0
<i>Camundongos transplantados com S180</i>							
Veículo	-	8,4 ± 0,3	3,4 ± 0,2	0,5	63,6 ^a	29,7 ^a	6,1 ^a
5-FU	25	6,3 ± 0,5	1,1 ± 0,1 ^{a,b}	0,4	82,0 ^b	6,3 ^b	5,2 ^a
CKJ	25	8,9 ± 0,4	2,9 ± 0,1 ^c	1,0	62,8 ^{a,c}	30,0 ^{a,c,d}	3,4
CKJ	50	8,3 ± 1,4	1,6 ± 0,3 ^b	0,6	62,0 ^{a,c}	31,2 ^{a,c,d}	5,6 ^a
CKJ + 5-FU	25 + 10	7,7 ± 0,9	1,6 ± 0,1 ^b	0,4	77,8	14,3 ^b	6,7 ^a
NAC	-	7,3 ± 0,7	2,3 ± 0,3	0,0	85,3 ^b	11,0 ^b	4,4
CKJ + NAC	50 + 150	6,5 ± 0,7	2,7 ± 0,1 ^c	0,0	72,8	21,0 ^c	6,2 ^a

Os dados (n= 8) foram analisados por ANOVA seguida do teste de Bonferroni. ^a $p < 0,05$ comparados com camundongos saudáveis; ^b $p < 0,05$ comparados com camundongos transplantados com o tumor S180; ^c $p < 0,05$ comparados com camundongos transplantados com o tumor S180 e tratados com 5-FU; ^d $p < 0,05$ comparados com camundongos transplantados com o tumor S180 e tratados com NAC.

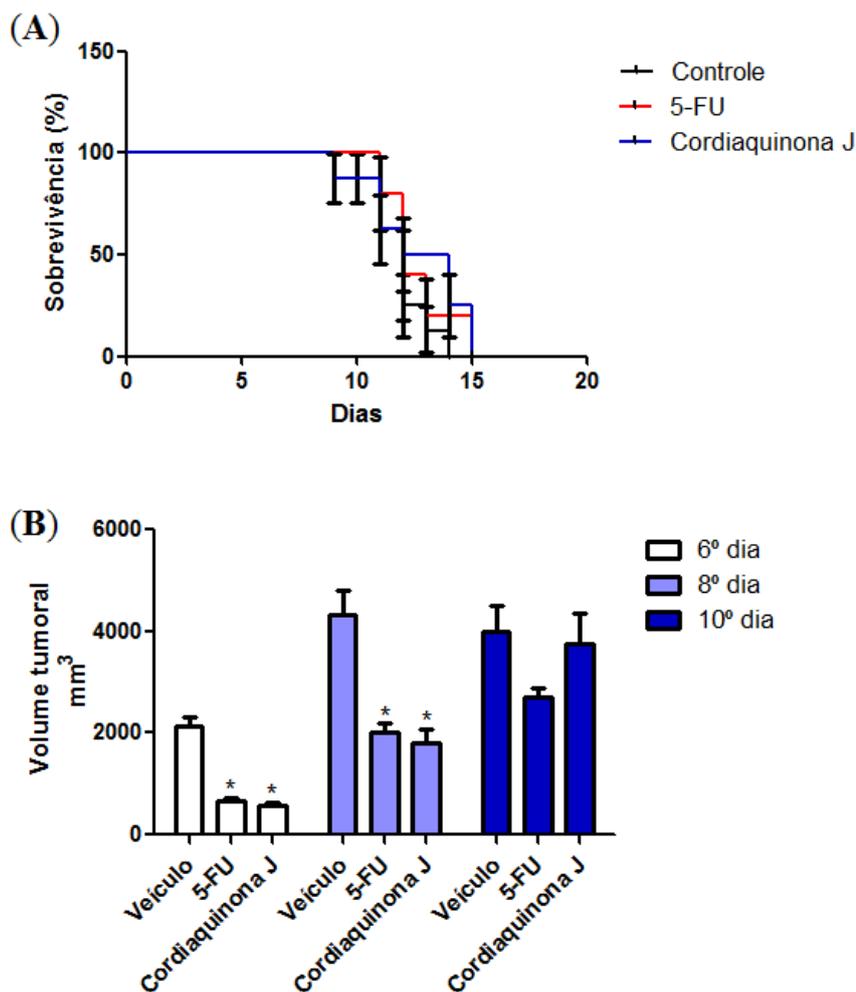
4.5.4 Avaliação da sobrevida.

Em seguida foi avaliado se a cordiaquinona J aumentava a sobrevida de animais transplantados com o tumor sarcoma-180. Foi observado que os camundongos tratados com a cordiaquinona J tiveram a média de sobrevivência de 13 dias, enquanto que os animais do controle negativo e os animais tratados com 5-FU apresentaram média de sobrevivência de 12 dias. Portanto a cordiaquinona J, assim como o 5-FU, não foram capazes de aumentar a sobrevida dos camundongos (**Figura 37 (A)**).

Neste mesmo experimento avaliamos o desenvolvimento do volume tumoral, medindo os diâmetros do tumor com paquímetro, ao longo do tempo. A fim de determinar se o efeito antitumoral da molécula estava presente. As medidas do tumor foram realizadas no 6º, 8º e

10º dia de tratamento (**Figura 37 (B)**). A partir deste momento a medição se tornou inviável, pois os animais começaram a morrer.

Figura 37. Curva de sobrevivência de animais transplantados com o tumor sarcoma-180 e tratados com cordiaquinona J (50 mg/kg/dia) e 5-fluorouracil (5-FU) (25 mg/kg/dia) (**A**). Efeito sobre o volume tumoral dos grupos controle e tratados com cordiaquinona J (50 mg/kg/dia) e 5-fluorouracil (5-FU) (25 mg/kg/dia) no 6º, 8º e 10º dia de tratamento (**B**). *p < 0,05 comparado com o controle negativo por ANOVA seguido pelo teste Dunnett.



Foi observado que, mesmo sem alterações na sobrevivência dos animais, os efeitos da cordiaquinona J e do 5-FU foram evidentes. O percentual de inibição tumoral da cordiaquinona J no 6º e 8º dia de tratamento foi em torno de 70 % resultados semelhantes aos observados previamente, contudo no 10º dia de tratamento o potencial inibitório da cordiaquinona J não foi mais observado sugerindo um possível mecanismo de resistência das células tumorais.

5 DISCUSSÃO

Os produtos naturais têm um papel de grande valor na descoberta de novas drogas, principalmente quando relacionado ao estudo de drogas anticâncer, pois a maioria dos fármacos em uso é de origem natural ou derivada de um protótipo natural (NEWMAN; CRAGG; SNADER, 2003; NEWMAN; CRAGG, 2012). Dentre estes, as quinonas representam uma classe vastamente estudada para o tratamento de diversas enfermidades, possuindo um amplo espectro de atividade biológica (ARAÚJO et al., 2012; ASCHE, 2005; MARINHO-FILHO et al., 2010; MONTENEGRO 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 (GALM et al., 2005; GEWIRTZ, 1999; JOHNSON et al., 2012; ZHANG et al., 2006).

O grupo farmacofórico quinonoídico está presente em diversas classes de drogas, porém é particularmente comum entre as drogas anticâncer. Algumas quinonas são utilizadas como pró-drogas e exercem sua atividade após redução química. A redução dessas moléculas pode gerar semiquinonas ou hidroquinonas com subsequente geração de espécies reativas de oxigênio, induzindo o estresse oxidativo, como a β -lapachona ou a estreptonigrina, mas também podem promover a alquilação de biomoléculas como a mitomicina C (SIEGEL; YAN; ROSS, 2012).

Dentre o grupo das quinonas, as antraquinonas e as naftoquinonas são as classes de moléculas mais estudadas para o tratamento do câncer. As antraquinonas representam a principal classe de antibióticos antitumorais. A doxorubicina é a molécula mais utilizada dessa classe para o tratamento de tumores, devido ao seu amplo espectro de atividade antitumoral (BERETTA; ZUNINO, 2008).

Os mecanismos moleculares das antraquinonas e das naftoquinonas são muito semelhantes e se confundem quando são listados. Um dos alvos das quinonas é a enzima topoisomerase, além da formação de radicais livres. Particularmente, o radical semiquinona pode intercalar com o DNA resultando em dano ao mesmo, assim como as espécies reativas de oxigênio podem induzir dano ao DNA. A interação com o DNA promove a parada do crescimento celular levando a célula à morte. Já a formação de espécies reativas de oxigênio contribui para os efeitos citotóxicos diretos (BERETTA; ZUNINO, 2008; GEWIRTZ, 1999;

XU; PERSSON; RICHARDSON, 2005). No entanto, o exato mecanismo de ação das quinonas ainda não está bem esclarecido (ASCHE, 2005).

O presente estudo teve como objetivo avaliar o potencial antitumoral da cordiaquinona J em diversas linhagens tumorais e normais, assim como avaliar o seu perfil toxicológico e antitumoral *in vivo* utilizando o modelo de sarcoma-180.

Inicialmente a citotoxicidade da cordiaquinona J foi avaliada em um painel de 11 linhagens de células tumorais e 3 linhagens de células não tumorais, após 24 horas de incubação. Os resultados mostraram que a cordiaquinona J foi ativa em todas as linhagens testadas, inclusive nas linhagens não tumorais, apresentando uma variação de CI_{50} de 4,6 a 75,5 μM em HL-60 e SF-295, respectivamente. Marinho-Filho e colaboradores (2010) já haviam mostrado o potencial citotóxico da cordiaquinona J após o tratamento de 72 horas, onde foi observado que esta molécula apresentava maior citotoxicidade para as células HL-60. Os resultados após 24 horas de tratamento mostraram que mesmo em um painel maior de células, a cordiaquinona J continua apresentando maior toxicidade em células leucêmicas (HL-60).

Diferente do que era esperado, foi observado que a cordiaquinona J apresentou menor atividade em SF-295 (CI_{50} 75,5 μM), após 24 horas de tratamento, porém quando tratadas por 72 horas este valor diminuiu para 6,6 μM (MARINHO-FILHO et al., 2010). Estes resultados sugerem que dependendo da célula estudada, a cordiaquinona J pode agir de maneira diferente.

Em células de HL-60, a CI_{50} em 24 horas (4,6 μM) é muito semelhante à observada em 72 horas (2,7 μM) (MARINHO-FILHO et al., 2010). Neste mesmo artigo foi mostrado que os efeitos da cordiaquinona J são independentes de fases do ciclo celular e do tempo, pois os efeitos são semelhantes em 3, 6 e 24 horas (MARINHO-FILHO et al., 2010). Entretanto, ao compararmos a CI_{50} da cordiaquinona J em SF-295, a diferença entre os valores de CI_{50} após o tratamento de 24 e 72 horas é de 11 vezes. Podemos sugerir, que nestas células o efeito da molécula é tempo dependente e que provavelmente sua ação está envolvida em fases específicas do ciclo celular.

Várias naftoquinonas como a menadiona, β -lapachona e a plumbagina agem de maneiras diversas dependendo da linhagem celular estudada. Vários estudos mostraram que o efeito da β -lapachona é dependente da enzima NQO1, então uma célula que apresenta maiores níveis de NQO1, como as células de próstata (DU-145), são mais sensíveis a β -lapachona.

(BEY et al., 2007; LI; BEY; et al., 2011; SIEGEL; YAN; ROSS, 2012; TAN; BERRIDGE, 2010). Enquanto que a menadiona dependendo da célula e do tempo avaliado pode causar morte por apoptose, por necrose ou independente de apoptose e necrose (KAMIŃSKI et al., 2002; LOOR et al., 2010; TAN; BERRIDGE, 2010). A plumbagina pode agir no ciclo celular causando parada na fase G2/M e levando as células para autofagia em células de mama, já em células de próstata a plumbagina causa morte celular através da geração de EROs, enquanto que em células de melanoma promove a apoptose através do receptor de morte TRAIL (KUO; HSU; CHO, 2006; LI et al., 2010; POWOLNY; SINGH, 2008).

Várias moléculas que possuem o grupo quinona em sua estrutura apresentam efeitos anti-proliferativos (ASCHE, 2005), desacoplamento da fosforilação oxidativa (TERADA, 1990), formação de aductos com proteína, especialmente com grupos SH, dano ao DNA (DEAVALL et al., 2012; ESTRELA; ORTEGA; OBRADOR, 2006; FRANCO; CIDLOWSKI, 2009) e geração de EROs (AGUILÓ et al., 2012; BOLTON et al., 2000; MASSAOKA et al., 2012; WANG; THOMAS; et al., 2006).

A fim de investigar o mecanismo de ação da cordiaquinona J, três linhagens tumorais diferentes (HL-60, PC3-M e DU-145) foram tratadas com a cordiaquinona J na presença de alguns inibidores da via apoptótica e de metabolização de quinonas. Estes inibidores foram adicionados à cultura em tempo adequado antes do tratamento com a cordiaquinona J. Os efeitos foram avaliados pelo teste do MTT após 24 horas de incubação.

Foi observado que nas células HL-60 o BAPTA-AM e a ciclosporina A não apresentaram efeitos inibitórios, porém em células DU-145, tanto o BAPTA-AM quanto a ciclosporina A inibiram significativamente os efeitos da cordiaquinona J, sugerindo que os efeitos desta naftoquinona estudada dependem da linhagem tumoral avaliada.

O cálcio é um mensageiro intracelular responsável por ativação de diversas vias intracelulares, inclusive na apoptose, principalmente na via mitocondrial, pois o cálcio pode ser liberado de estoques do retículo endoplasmático ou até da mitocôndria para gerar EROs e ajudar na liberação do citocromo c ativando o processo de apoptose (FANG; ZHANG; XUE, 1998; HAJNÓCZKY, 2003; MASON, 1999; ROY; HAJNÓCZKY, 2008; ZHU; LOH, 1995). O BAPTA-AM é um quelante de cálcio intracelular, sendo um potencial inibidor da apoptose desencadeada pela via intrínseca (ZHANG et al., 2001). Já a ciclosporina A é um peptídeo não ribossomal cíclico utilizado como imunossupressor, porém este vem sendo largamente empregado em estudos celulares para avaliar o efeito de drogas indutoras de apoptose, preferencialmente por via intrínseca, pois se sabe que a ciclosporina A inibe a abertura do

poro mitocondrial que inicia o processo de apoptose (FAULDS; GOA; BENFIELD, 1993; NAUJOKAT et al., 2003; SEATON; COOPER; SCHAPIRA, 1998; TRAN et al., 2012). Desse modo, podemos sugerir que o mecanismo da cordiaquinona J é dependente da linhagem celular testada, sendo provável que a apoptose gerada por esta molécula seja iniciada de modo distinto dependendo do tempo e da célula estudada.

Na presença do dicumarol os valores de CI_{50} da cordiaquinona J foram alterados de 4,6 para 24,6 μ M, em células HL-60. Este resultado é bastante interessante, pois as células HL-60 possuem a atividade da enzima NQO1 muito reduzida, devido a um polimorfismo para o gene que regula o NQO1 o que reduz significativamente a atividade desta enzima. A relevância desses polimorfismos na clínica resulta na falta da resposta terapêutica adequada aos agentes antitumorais bio-redutíveis (ROSS et al., 2000; TAN; BERRIDGE, 2010). No entanto, nas células de próstata (PC3M e DU-145) que possuem uma elevada atividade enzimática da NQO1 (FITZSIMMONS et al., 1996), o dicumarol não mostrou efeitos inibitórios da atividade da cordiaquinona J. Estudos mostram que o dicumarol é um inibidor competitivo para a NQO1, não agindo de modo seletivo para sua inibição. O dicumarol pode inibir a glutatona transferase a glutatona peroxidase II, ou afetar a estabilidade de microtúbulos, também pode agir como um desacoplador mitocondrial, além de inibir o transporte de elétrons mitocondriais (COLLIER; PRITSOS, 2003; GONZÁLEZ-ARAGÓN; ARIZA; VILLALBA, 2007; MADARI; PANDA; WILSON, 2003; MAYS; BENSON, 1992; WILSON; MERZ, 1969). Então não podemos concluir que a cordiaquinona J apresenta seus efeitos dependentes da enzima NQO1, mas podemos sugerir que o dicumarol regula algum evento intracelular que participa fortemente dos efeitos da cordiaquinona J em células leucêmicas HL-60.

A β -lapachona e a plumbagina são as naftoquinonas com atividade anticâncer mais estudadas atualmente. A β -lapachona tem mostrado muito interesse de pesquisadores e até da clínica por apresentar diversas atividades descritas em várias células tumorais, *in vitro* e *in vivo*, e também por mostrar baixa citotoxicidade em células não tumorais (DA SILVA et al., 2010; DONG et al., 2009; MIAO et al., 2009; WU et al., 2005). Nos últimos anos foi mostrado que grande parte deste efeito observado pela β -lapachona ocorre devido a metabolização desta naftoquinona pela enzima NAD(P)H:quinona oxirredutase-1 (NQO1) formando uma semiquinona mais ativa. Portanto, a β -lapachona possui efeitos mais intensos em células com altos níveis de NQO1 (BEY et al., 2007; LI; BEY; et al., 2011).

A plumbagina também é uma naftoquinona de estrutura simples, assim como, a β -lapachona, mas com diversos efeitos interessantes em células neoplásicas. Foi observado que a plumbagina possui efeitos antitumorais *in vitro* e *in vivo*, além de causar autofagia, gerar estresse oxidativo, possuir efeitos genotóxicos, promover alterações em fases específicas do ciclo celular gerando apoptose dependente de TRAIL, além de modificar vias como da AKT e da c-Jun (HSU et al., 2006; KAWIAK; ZAWACKA-PANKAU; LOJKOWSKA, 2012; KUO; HSU; CHO, 2006; LI et al., 2010; POWOLNY; SINGH, 2008; WANG et al., 2008).

Em seguida foi avaliado se a cordiaquinona J era capaz de ativar as caspases 9 e 8 que são caspases iniciadoras da via intrínseca e extrínseca da apoptose, respectivamente (ELMORE, 2007; MCDONNELL; MEYN; ROBERTSON, 1995). Também foram avaliadas proteínas estruturais e reguladoras dos poros mitocondrias que estão envolvidas no processo de apoptose gerado pela cordiaquinona J em células HL-60. As proteínas da família Bcl-2 controlam a permeabilidade da membrana mitocondrial e podem estar classificadas como proteínas pró- ou anti-apoptóticas. As principais proteínas anti-apoptóticas são bcl-2 e bcl-X_L, já as proteínas pró-apoptóticas mais estudadas são o bax, bak, bid e bad (ELMORE, 2007).

Além disso, há anos vem sendo mostrado que o bid pode ser o responsável por conexões de sinais entre a via extrínseca e intrínseca da apoptose. Normalmente, o bid é truncado pela caspase 8 após a ativação do receptor FAS e o bid truncado (tbid) ativa a via intrínseca da apoptose amplificando o sinal de morte celular (ELMORE, 2007; ESPOSTI, 2002; LI et al., 1998).

Em células HL-60 tratadas com cordiaquinona J foi observada ativação das caspases 8 e 9, além da clivagem do parp, comprovando que ambas as vias da apoptose foram estimuladas pelo tratamento, porém nenhum efeito foi observado na expressão das proteínas pró-apoptóticas (bax) e anti-apoptóticas (bcl-2) sugerindo que os efeitos apoptóticos observados pela cordiaquinona J não é iniciado pela via mitocondrial. Ao avaliar a expressão do bid foi claramente percebido que havia a formação de tbid, o que sugere que a caspase 8, previamente ativada, cliva o bid e este, ativa a via intrínseca da apoptose, com o objetivo de amplificar o sinal.

Para confirmar os efeitos citados acima foram realizados testes, por citometria de fluxo, na presença de inibidores específicos de caspases. Três inibidores distintos foram utilizados: um inibidor seletivo para caspases 8; inibidor seletivo para caspases 9 e inibidor seletivo para as caspases efetoras 3 e 6.

Na presença dos inibidores foi avaliado o número de células, integridade de membrana celular, despolarização mitocondrial e a fragmentação do DNA por citometria de fluxo em células HL-60. Foi observado que apenas os inibidores das caspases efetoras 3 e 6 e o inibidor da caspase 8 diminuíram os efeitos da fragmentação do DNA induzidos pela cordiaquinona J, não alterando nenhum dos outros parâmetros avaliados. Novamente sugerindo que os efeitos da cordiaquinona J são parcialmente dependentes de caspases e que a caspase 8 é a principal responsável por gerar estes efeitos.

A citometria de fluxo é um método eficiente para acessar a potência e a especificidade de drogas anticâncer. Este equipamento possui uma grande variedade de métodos capazes de identificar células apoptóticas. Isso é feito pela análise de mudanças morfológicas, bioquímicas e moleculares que ocorrem durante a apoptose. Normalmente a utilização de agentes que emitem alta fluorescência ao intercalar com o DNA, como o iodeto de propídeo, é necessário para mensurar a viabilidade celular e a fragmentação do DNA. Também podem ser avaliadas mudanças na morfologia da célula como a redução do volume celular e condensação da cromatina detectada pela dispersão da luz incidida sobre a célula, para frente e/ou para o lado (RAMANATHAN, 1997).

A apoptose pode ser caracterizada pela condensação e fragmentação do DNA, denominada de fase sub-G1 detectada no ciclo celular por citometria de fluxo (RAFFRAY; COHEN, 1997). A mitocôndria age regulando a sinalização da apoptose (GREEN AND JOHN C. REED, 1998; ORRENIUS, 2004). Mudanças no potencial da membrana mitocondrial ($\Delta\psi_m$) são os primeiros eventos que ocorrem após a indução da apoptose, principalmente a via intrínseca ou via mitocondrial (HAN et al., 2007; ORRENIUS, 2004). Portanto, quando proteínas pró-apoptóticas são liberadas do espaço intramembranar da mitocôndria através de um poro formado na membrana externa ocorre também um efluxo de prótons (H^+) ocasionando a despolarização mitocondrial (HENGARTNER, 2000). A mudança no potencial transmembrânico mitocondrial é um modo indireto de avaliar a ativação da via intrínseca (ORRENIUS, 2004).

Marinho-Filho e colaboradores em 2010 também avaliaram o número de células, integridade de membrana celular, despolarização mitocondrial e a fragmentação do DNA por citometria de fluxo em células HL-60 com a cordiaquinona J e mostraram que na presença de NAC (5 mM) os efeitos da molécula também eram parcialmente revertidos, com exceção da fragmentação do DNA. Com estes resultados podemos supor que alguns efeitos da cordiaquinona J são dependentes de EROs, pois os efeitos foram parcialmente revertidos com

NAC, e outros efeitos são dependentes de caspase 8, pois foram inibidos com um inibidor específico de caspase 8.

Muitas drogas utilizadas na terapia do câncer como a daunorrubicina, doxorubicina, mitoxantrona, bleomicina e cisplatina promovem seus efeitos antineoplásicos devido a formação de EROs (BAEK et al., 2003; MAS et al., 1999; NEILAN et al., 2007; NOVAK; KHARASCH, 1985; RUSSO et al., 1984). O estresse oxidativo é conhecido por afetar várias funções celulares incluindo a integridade da membrana celular ocasionando instabilidade genômica e por induzir dano ao DNA (HIGUCHI, 2003).

A partir dos resultados citados acima foi proposto que os efeitos da cordiaquinona J era parcialmente devido a formação de EROs e que outro mecanismo poderia está presente. Sabendo que as quinonas são moléculas com estrutura química muito reativa foi avaliado se estas quinonas poderiam interagir diretamente com o DNA.

Através de estudos de eletroquímica foi observado que a cordiaquinona J não interage diretamente com o DNA, não sendo observadas mudanças no comportamento eletroquímico no DNA isolado, após este permanecer em contato com a molécula. Foi observado apenas que a cordiaquinona J apresenta um comportamento típico de quinonas em meio aprótico, com duas ondas de redução.

Em termos de métodos eletroquímicos, o uso de meios específicos permite a obtenção de semiquinonas ou hidroquinonas. Em meio aprótico, ocorrem duas etapas de transferência monoelétrica enquanto em meio aquoso, há transferência bieletrônica, em uma única etapa (CRAWFORD et al., 1996; HILLARD et al., 2008).

Em meio biológico, a redução monoelétrica de quinonas resulta na formação de semiquinonas. Estas podem reagir com o oxigênio molecular para formar o ânion-radical superóxido ($O_2^{\bullet-}$), que por sua vez sofre subsequente auto-oxidação (desproporcionamento) e protonação para formar peróxido de hidrogênio (H_2O_2). A redução com transferência de dois elétrons catalisada por enzimas é geralmente considerada como um caminho desintoxicante, desde que a hidroquinona resultante seja conjugada e excretada. No entanto, a hidroquinona resultante pode se desproporcionar e gerar espécies oxigenadas ativas ou levar a reações de rearranjo para formar espécies alquilantes reativas (alquilação biorredutiva). Ambos os caminhos podem provocar danos celulares e consequente toxicidade (CRAWFORD et al., 1996; GERSCH; KREUZER; SIEBER, 2012; HILLARD et al., 2008).

Foi observado por ensaios de eletroquímica em meio aprótico que a cordiaquinona J apresentou 2 ondas redução. Este perfil ocorre quando quinonas sofrem redução monoelétrica formando radicais semiquinonas e dieletrônica gerando radicais hidroquinonas. Portanto o perfil eletroquímico da cordiaquinona J consiste na redução de 2 dois elétrons formando radicais semi e/ou hidroquinonas. Além disso, foi observado pelo ensaio de biossensor de dsDNA que a cordiaquinona J não interage diretamente com o DNA. Sendo assim, pode-se sugerir que os efeitos da cordiaquinona J ocorram devido à formação de radicais semiquinonas e/ou hidroquinonas promovendo o estresse oxidativo e que os efeitos observados são independentes de interação direta com o DNA.

Células tumorais possuem um estado redox alterado, geralmente, associado com o aumento dos níveis basais de EROs e anormalidades no sistema antioxidante. Portanto, a utilização de compostos que modulam o estado redox destas células surgem como um interessante alvo terapêutico que pode agir seletivamente em células neoplásicas. Na verdade, células normais mantêm uma homeostase redox, com níveis basais baixos de EROs, pois possuem o aparato intracelular antioxidativo bem regulado, controlando a geração e a eliminação de EROs. Conseqüentemente, células normais podem tolerar maiores níveis de EROs exógenos, enquanto as células tumorais não conseguem (TRACHOOTHAM; ALEXANDRE; HUANG, 2009). Então duas estratégias podem ser empregadas para alterar o equilíbrio redox intracelular como: a utilização de agentes geradores de EROs exógenos ou a utilização de compostos que inibam o sistema antioxidante intracelular (VERRAX et al., 2011).

O anel quinônico está presente em muitos fármacos utilizados na clínica na terapia de tumores sólidos, tais como daunorrubicina, doxorrubicina, mitomicina, mitoxantrona e saintopina (VERMA, 2006). Os efeitos citotóxicos destas quinonas são devido a dois fatores principais que são a inibição da topoisomerase II e a formação de radicais semiquinonas, que podem transferir um elétron para o oxigênio produzindo radicais superóxidos ($O_2^{\cdot-}$). Tanto a semiquinona quanto o radical superóxido podem gerar o radical hidroxila, que causa danos ao DNA através da quebra de suas fitas (KOVACIC; SOMANATHAN, 2011b). O dano ao DNA é o alvo de diversas drogas utilizadas no tratamento do câncer e a lesão da dupla fita de DNA pode levar estas células para apoptose. O reconhecimento dessas lesões é iniciado por diversas proteínas o que finalmente resulta em parada do ciclo celular, reparo do DNA ou apoptose (ROOS; KAINA, 2012).

Dano ao DNA é um termo genérico para diversas modificações que ocorrem no DNA que podem ativar o processo de apoptose. O mecanismo pelo qual estas modificações iniciam a apoptose pode diferir dependendo do tipo de lesão e a maneira que a célula processa ou detecta a modificação no DNA (ROOS; KAINA, 2012).

Portanto, danos ao DNA podem ser induzidos por agentes que promovam direta ou indiretamente lesões no 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 necessários para uma replicação adequada do DNA. Os antineoplásicos 5-fluorouracil, citarabina, gemcitabina, metotrexato e fludarabina, têm seus mecanismos de ação baseados na habilidade de bloquear o metabolismo normal dos nucleotídeos e, conseqüentemente, promovem lesões no DNA como quebras de dupla fita do DNA (KINSELLA; SMITH, 1998).

Vários agentes antitumorais atuam induzindo, direta ou indiretamente, quebras nas fitas da molécula de DNA por diversas vias (ZHU et al., 2009). Sabe-se que as espécies reativas de oxigênio podem causar danos indiretos ao DNA (danos oxidativo) e que radicais livres possuem a capacidade de interagir com o DNA, induzindo quebras nas fitas do material genético (HALLIWELL, 2001; ROWE; DEGTYAREVA; DOETSCH, 2008; TAN; GROLLMAN; SHIBUTANI, 1999). Então foi avaliado se a cordiaquinona J provocava danos ao DNA de células tumorais (HL-60) e não tumorais (CMSP) pelo teste do cometa após 1 e 3 horas de incubação. Foi percebido que o dano ao DNA nas células tumorais foi significativo desde a primeira hora de tratamento, tornando-se ainda mais intenso após 3 horas de incubação com a cordiaquinona J. Não foram observados danos no DNA das células não tumorais tratadas com 10 μ M de cordiaquinona J. Nesta concentração já era observado uma rarefação celular com difícil contagem de 300 eventos, devido ao grande número de células mortas. Além disso, todo o dano gerado pela cordiaquinona J nas células HL-60 foram revertidos quando as células foram pré-tratadas com o NAC.

O ensaio do cometa, em sua versão alcalina, é capaz de detectar tanto quebras de fitas simples quanto de dupla fita já o ensaio neutro do cometa detecta apenas quebras 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 (PODHORECKA; SKLADANOWSKI; BOZKO, 2011; ROOS; KAINA, 2012; ROWE; DEGTYAREVA; DOETSCH, 2008)

Algumas quinonas, como a menadiona, também induzem dano ao DNA, porém, diferentemente do que foi observado pela cordiaquinona J, a menadiona causa danos em linfócitos humanos em concentrações de 1 μ M. O dano causado pela menadiona também é dependente de EROs e se torna mais intenso quando as células são tratadas com o dicumarol, um inibidor de NQO1 (WOODS et al., 1997). Já a plumbagina possui efeitos distintos dependentes de concentração. Caso seja testada em concentrações de 0,25 ng/mL a plumbagina induz dano ao DNA em linfoma de camundongos, dependente de EROs, no entanto, quando testada em concentrações ainda menores apresenta efeitos antígenotóxicos, uma vez que esta naftoquinona é capaz de inibir danos ao DNA causados por catecol (DEMMA; HALLBERG; HELLMAN, 2009). Isto sugere que a cordiaquinona J assim como outras naftoquinonas apresenta efeitos distintos que dependem da concentração, do tempo e da célula testada.

O dano ao DNA geralmente ocorre por indução de estresse genotóxico causado por agentes exógenos como radiação e exposição à toxinas (DEMMA; HALLBERG; HELLMAN, 2009; FAIRBAIRN; OLIVE; O'NEILL, 1995; GREINERT et al., 2012). Quando o aparato celular detecta o dano em seu DNA, duas estratégias podem ser tomadas: ou o dano é reparado ou a célula é encaminhada aos processos de morte (ROOS; KAINA, 2012).

O dano genotóxico, em células eucarióticas, normalmente é percebido por quinases ATM/ATR que acionam a via de reparo. Quando o dano é na dupla fita do DNA (DSB), normalmente a célula não consegue repará-lo, provocando uma instabilidade genética levando as células à morte, frequentemente por apoptose. A ATM consiste no principal sensor de dano ao DNA de dupla fita. Quando esta é fosforilada inicia a ativação de diversas outras quinases da via dando ao processo de reparo ou de morte celular (BROWN; BALTIMORE, 2003; CANMAN, 1998). A ATR, diferentemente da ATM, é ativada após dano de fita simples do DNA, ativando proteínas executoras do processo de parada do ciclo celular e/ou morte celular (BROWN; BALTIMORE, 2003; ROOS; KAINA, 2012).

Foi observado que a cordiaquinona J fosforilou ATM e ATR mostrando que o dano gerado foi tanto em fita simples como em fita dupla do DNA. Todavia conseguimos observar muito mais claramente a fosforilação da ATR, porém a fosforilação esperada pela ATR em Chk-1 não ocorreu, sendo a expressão proteica de Chk-1 menor nas células tratadas com a cordiaquinona J do que no controle negativo.

Pabla e colaboradores em 2008 mostraram que a cisplatina também causava dano ao DNA por ativação das quinases ATM/ATR. Após a fosforilação da ATR ambas as quinases Chk-1 e Chk-2 eram ativadas de modo dependente de ATR. No entanto, a fosforilação de Chk-1 era degradada por via proteossomal quando a Chk-2 era ativada. Após a utilização de um inibidor proteossomal (LLnV), a degradação de Chk-1 era abolida (PABLA et al., 2008). Estudos anteriores também mostraram que a camptotecina apresenta a degradação proteossomal de Chk-1 (ZHANG et al., 2005). Com isso podemos sugerir, que a diminuição da expressão de Chk-1 se deve a uma degradação proteossomal, no entanto estudos devem ser realizados para confirmar esta hipótese.

Em relação à ATM foi observada uma leve fosforilação, e uma forte ativação da proteína Chk-2, além do aumento a expressão de H2A.X fosforilado. O H2A.X fosforilado é rapidamente concentrado ao redor dos domínios de cromatina de fitas duplas de DNA clivadas, após a ação de radiação ionizante ou agentes químicos que impedem o prosseguimento correto da forquilha de replicação (FIRSANOV; SOLOVJEVA; SVETLOVA, 2011).

O H2A.X é o substrato para diversas PI3K tais como ATM/ATR, sendo fosforilada na Ser139 em resposta ao dano da dupla fita de DNA. A ATM é considerada a principal mediadora fisiológica para fosforilação de H₂A.X após o dano da dupla fita de DNA. Além do H2A.X, a ATM também fosforila o BRCA1, 53BP1, MDC1, assim como as proteínas do checkpoint do ciclo celular, Chk-1 e Chk-2. Estes processos têm como objetivo interromper a progressão do ciclo celular e levar as células à morte ou ativar proteínas de reparo do DNA (PODHORECKA; SKLADANOWSKI; BOZKO, 2011). A BRCA1 é uma proteína de reparo ativada pela ATM, mas não foi observado nenhuma alteração de BRCA1 quando as células foram tratadas com cordiaquinona J.

O H2A.X também pode ser fosforilado pela ATR ou por proteínas quinases dependentes de DNA (DNA-PK). A ATR fosforila H2A.X em resposta a quebra da fita simples de DNA e durante o estresse de replicação, tais como a parada da forquilha de replicação (PODHORECKA; SKLADANOWSKI; BOZKO, 2011; WARD; CHEN, 2001; WARD; MINN; CHEN, 2004). Já a DNA-PK fosforila o H2A.X em resposta a fragmentação do DNA quando as células sofrem o processo de apoptose (MUKHERJEE et al., 2006). No entanto, quando as células sofrem estresse oxidativo, gerado por radiação ionizante, a fosforilação de H2A.X é estimulada por todas as PI3K, ATM, ATR e pela DNA-PK (WANG et al., 2005).

Podemos observar então que a fosforilação de H2A.X pela cordiaquinona J é clara, no entanto não podemos afirmar qual PI3K iniciou o processo, apesar de que os estudos mostram que a ATM geralmente é a principal quinase utilizada na ativação do processo.

Como descrito anteriormente, a ATM é a principal quinase ativadora dos checkpoints do ciclo celular após dano ao DNA. Além do H2A.X e do Chk-2 a ATM fosforila o p53. O p53 é um gene supressor de tumor que está mutado em diversas linhagens tumorais. Em HL-60 este gene é nulo, portanto o controle celular da HL-60 é independente de p53 (BERGLIND et al., 2008). O dano de DNA controlado pela via da ATM/ATR geralmente necessita do p53, porque este é fosforilado pela ATM para regular a expressão de p21 que bloqueia a passagem da fase G1 para a fase de síntese (S) do ciclo celular, inibindo a progressão do ciclo celular (ROOS; KAINA, 2012).

Corroborando com os dados da literatura a expressão da proteína p53 não foi detectado nas células HL-60. A proteína p21 também não foi expressa em células HL-60. Indicando que todo o processo de controle e morte celular induzido pela cordiaquinona J é de maneira independente de p53 e p21.

No entanto, a apoptose pode também ser induzida pela via de dano de DNA de modo independente de p53. Várias estratégias podem ser empregadas. A primeira envolve os homólogos de p53 que são a p63 e a p73 (MELINO; DE LAURENZI; VOUSDEN, 2002). A mutação no p73 não predispõe a formação de tumor, mas possui um papel chave no controle do dano ao DNA. O principal controlador é o E2F1. Estudos mostram que quando o dano de DNA é induzido por camptotecina ou etoposídeo as proteínas ATM e/ou ATR são ativadas. Estas ativam Chk-1 e Chk-2 que por sua vez estimulam o E2F1. O E2F1 então estimula o gene do p73 que aumenta a expressão da proteína p73 (URIST et al., 2004). O p53 normalmente necessita do p63 e do p73 para ativar o processo de apoptose (FLORES; TSAI; CROWLEY, 2002), no entanto, o p73 pode ativar a apoptose de modo independente de p53, ativando vias mitocondriais da apoptose, através do aumento da expressão de PUMA e NOXA, que provoca a translocação de Bax e liberação do citocromo c (MELINO et al., 2004; ROCCO et al., 2006). Um dado bastante interessante é que diferentemente do p53, a p73 raramente é mutada em linhagens tumorais (MELINO; DE LAURENZI; VOUSDEN, 2002). Provavelmente esta é a razão pela qual vários quimioterápicos conseguem induzir dano ao DNA mesmo na ausência de p53 (ROOS; KAINA, 2012).

Outro fator que pode controlar a apoptose independente de p53 é o fator nuclear κ B (NF- κ B). O NF- κ B é um fator de transcrição que transcreve genes anti-apoptóticos. No

entanto, sob algumas circunstâncias, o NF- κ B exibe funções apoptóticas. Esta exceção ocorre geralmente através de EROs. As EROs podem induzir a transcrição de ligante de FAS via NF- κ B, estimulando apoptose independente de p53 (BAUER et al., 1998; ROOS; KAINA, 2012), no entanto, a cordiaquinona J não alterou a expressão de NF- κ B o que sugere que os efeitos da cordiaquinona J ocorrem de maneira independente de p53 e de NF- κ B.

A terceira maneira de ocorrer dano de DNA independente de p53 é através da degradação da proteína anti-apoptótica Bcl-2 por quinases. Ocorre então a inibição do efeito anti-apoptótico do Bcl-2 juntamente com a desfosforilação de BAD (antagonista de Bcl-2) o que promove o sequestro de Bcl-2 e Bcl-X_L para a membrana mitocondrial promovendo a apoptose (BREITSCHOPF et al., 2000; KLUMPP; KRIEGLSTEIN, 2002). Entretanto também não conseguimos visualizar alterações na expressão proteica de Bcl-2 e BAX após o tratamento com a cordiaquinona J.

Resumindo, a cordiaquinona J induziu fosforilações em ATM e ATR que promoveram a fosforilação de Chk-2 e H2A.X. No entanto, foi observada uma provável degradação proteossomal de Chk-1. Além disso, não foi observado aumento na fosforilação de BRCA1, o que indicaria ativação de vias de reparo do DNA, portanto as células que não conseguiram corrigir o dano foram levadas à morte. Todos os efeitos observados ocorreram de modo independente de p21 e p53.

Adicionalmente, a via da ATM/ATR só foi ativada em células tumorais. Nenhum destes efeitos citados foi visualizado em células normais de sangue periférico. Indicando mais uma vez que os efeitos da cordiaquinona J são seletivos atuando de modo distinto quando avaliados em células diferentes.

Posteriormente foi observado que os efeitos na fosforilação de H2A.X gerado pela cordiaquinona J era abolido quando as células eram pré-tratadas com NAC. Fortalecendo a hipótese que o dano celular ocorra devido a geração de EROs.

Vários estudos recentes mostram que os antineoplásicos exercem seus efeitos citotóxicos através de estresse oxidativo por gerar espécies reativas de oxigênio ou por depletar o aparato antioxidante das células tumorais (AGUILÓ et al., 2012; ASCHE, 2005; MASSAOKA et al., 2012; ROOS; KAINA, 2012; VERRAX et al., 2009). Nossos resultados indicam que a cordiaquinona J também exercem seus efeitos através da geração de espécies reativas de oxigênio e então foi avaliado se esta quinona pode também depletar o aparato antioxidativo intracelular.

Primeiramente foi observado que os efeitos citotóxicos da cordiaquinona J eram significativamente diminuídos quando as células HL-60 eram tratadas com antioxidantes como o α -tocoferol (vitamina E) e o ácido ascórbico (vitamina C). No entanto, os efeitos inibitórios da vitamina C foram mais intensos do que os do tocoferol. A vitamina C apresentou uma inibição concentração dependente dos efeitos da cordiaquinona J, enquanto que as duas concentrações de tocoferol testadas não apresentaram diferenças entre si. O valor de CI_{50} da cordiaquinona J em HL-60 sem inibidores é de 4,6 μ M, quando as células foram pré-tratadas com o tocoferol nas concentrações de 50 e 100 μ M a CI_{50} foi alterada para 9,2 e 10,2 μ M, respectivamente. Mostrando uma diminuição dos valores de CI_{50} . Enquanto que as células pré-tratadas com vitamina C a CI_{50} foi alterada para 66,5 μ M, portanto uma elevada inibição da atividade da cordiaquinona J pode ser observada.

Vera e colaboradores em 1994 mostraram que as células HL-60 possuem uma alta capacidade de transportar vitamina C oxidada para o interior da célula e acumular ácido ascórbico (VERA et al., 1994). Sabendo que a vitamina C é um potente antioxidante, nos últimos anos ela tem mostrado exercer efeitos inibitórios de drogas antineoplásicas geradoras de espécies reativas de oxigênio como a cisplatina e a doxorubicina (COSSARIZZA et al., 1995; GOLDE, 2003; LUTZKY; ASTOR; TAUB, 1989). Assim como observado com a cordiaquinona J, estudos mostram que a vitamina C inibiu a citotoxicidade da doxorubicina de maneira dose dependente *in vitro* e *in vivo*, no entanto a vitamina C não foi capaz de abolir todos os efeitos da doxorubicina, indicando que a formação de EROs não é o único mecanismo da doxorubicina (HEANEY et al., 2008). Porém a vitamina C não é apenas um antioxidante, pois dependendo da célula e da concentração utilizada ela pode se tornar um agente pró-oxidante e citotóxico (KIM et al., 2012). Portanto o mecanismo exato como esta vitamina atua ainda não está determinado, mas é de comum acordo que este composto seja um potente antioxidante.

O α -tocoferol é considerado um potente antioxidante, por prevenir danos celulares através do sequestro de radicais livres formados pela a reação do oxigênio com ácidos graxos poli-insaturados das membranas lipídicas das células, sendo bastante utilizado para prevenir a peroxidação lipídica. O tocoferol também inibe a formação de compostos nitrosos, aumenta a resposta imune, regula na expressão gênica e inibi a angiogênese (STOLZENBERG-SOLOMON et al., 2009; TRABER; ATKINSON, 2007). A cordiaquinona J não foi capaz de aumentar a peroxidação lipídica das células HL-60 (dados não mostrados) o que vai de acordo com resultados com obtivemos no teste do MTT, pois o tocoferol inibe parcialmente os

efeitos da cordiaquinona J, mas provavelmente este efeito inibitório do tocoferol ocorra por outra via inibitória, independente de peroxidação lipídica.

O ácido α -lipóico é um composto natural utilizado no tratamento de doenças neurodegenerativas, diabetes e hepatite. Existem trabalhos relacionados a utilização deste composto como agente quimioprotetor, especialmente pela sua habilidade de modular a homeostase em parâmetros oxirredutores. Também possui atividade sequestradora de EROs, além de reparar dano oxidativo (BAST; HAENEN, 2003; PACKER; KRAEMER; RIMBACH, 2001; PACKER; TRITSCHLER; WESSEL, 1997; PACKER; WITT; TRITSCHLER, 1995). Mais recentemente foi proposto que o ácido α -lipóico aumenta a expressão de NQO1 acompanhado pelo acúmulo do fator de transcrição nuclear (Nfr2) em células HL-60. (ELANGOVAN; HSIEH, 2008). Foi hipotetizado que as células HL-60 pré-tratadas com o ácido α -lipoico teria a expressão de NQO1 e Nrf2 aumentado e que estas enzimas poderiam metabolizar a cordiaquinona J e os produtos formados poderiam alterar o mecanismo da cordiaquinona J, mas isto não foi observado.

A glutationa (GSH, γ -glutamil-cisteinil-glicina), é um tripeptídeo com grupamento tiol mais abundante em células eucarióticas. A sua síntese é catalisada por duas enzimas citosólicas: a γ -glutamato-cisteina ligase (primeira etapa) e a GSH sintetase (segunda etapa que combina γ -glutamil-cisteinil com a glicina para gerar o GSH) (MEISTER, 1991).

A desregulação bioquímica de GSH em tumores tem sido observada em muitos tipos de cânceres diferentes. No entanto, este peptídeo é muito importante na proteção do microambiente tumoral controlando a agressividade do tumor, além de regular a apoptose, a capacidade de colonização tumoral e a resistência à radiação e drogas (FRANCO; CIDLOWSKI, 2009; OBRADOR et al., 2002; ORTEGA; MENA; ESTRELA, 2011, 2010; ORTEGA et al., 2008; YAO et al., 1995). Aumento nos níveis de GSH e resistência aos quimioterápicos têm sido observados para agentes alquilantes (melfalan), compostos de platina (cisplatina) e antraciclina (doxorubicina) (CALVERT et al., 1998; GOTTESMAN; FOJO; BATES, 2002; LAI et al., 1991; ORTEGA; MENA; ESTRELA, 2011).

Vários estudos mostram que a apoptose pode modular o estado redox da célula, no entanto o exato mecanismo ainda não está claro (DU et al., 2009; FRANCO; CIDLOWSKI, 2009; ORTEGA; MENA; ESTRELA, 2011; SESHADRI; RAJARAM; RAJARAM, 2011). A diminuição intracelular de GSH é um dos primeiros eventos para a progressão da morte celular em resposta a diferentes estímulos apoptóticos. Estes estão associados com a ativação de um mecanismo de transporte de membrana plasmática em vez de sua oxidação. Além

disso, vários estudos têm demonstrado uma correlação entre a depleção de GSH intracelular e a progressão da apoptose (FRANCO; CIDLOWSKI, 2006; FRANCO; PANAYIOTIDIS; CIDLOWSKI, 2007; GHIBELLI et al., 1998; GOLLADAY; PARK; AUST, 1997; HAMMOND; MADEJCZYK; BALLATORI, 2004; HE; HUANG; CHIGNELL, 2004).

O BSO é um potente inibidor específico da γ -glutamilcisteína sintetase. Este tem sido utilizado como uma ferramenta para depletar o GSH intracelular e reverter à resistência observada por células a alguns fármacos antitumorais, pois o GSH por muitos anos foi citado como um fator relacionado à quimioresistência das células tumorais (DU et al., 2009; FOJO; BATES, 2003; GRIFFITH; BIOL, 1979).

Como já determinado anteriormente a cordiaquinona J têm seus efeitos relacionados à geração de EROs. Portanto foi avaliado se, além de formar EROs a cordiaquinona J tinha seus efeitos dependentes de níveis intracelulares de glutatona. Inicialmente foi determinado se a CI_{50} da cordiaquinona J sofria alterações após o pré-tratamento das células HL-60 com diferentes concentrações de BSO por 24 e 48 horas. Foi observado que o pré-tratamento com BSO aumentou o efeito da cordiaquinona J desde a menor concentração testada se tornando mais intenso com o aumento da concentração de BSO. Os melhores efeitos observados foram quando as células HL-60 foram tratadas com BSO 300 μ M após 48h. A CI_{50} das células tratadas apenas com a cordiaquinona J e das células tratadas com cordiaquinona J juntamente com BSO (300 μ M) foi alterada de 4,6 para 1,7 μ M, respectivamente. O pré-tratamento com o BSO por 24 horas não apresentou diferenças nos valores de CI_{50} da cordiaquinona J nas células HL-60 (dados não mostrados). Apesar de parecer discreto o aumento de atividade foi sugerido que os efeitos da cordiaquinona J também estejam relacionados com a depleção do aparato antioxidante intracelular das células HL-60, como a glutatona.

A cisplatina é um dos quimioterápicos mais utilizados na clínica para o tratamento do câncer, no entanto pacientes tratados com este fármaco apresentam resistência no decorrer do tratamento (DEAVALL et al., 2012). Esta resistência foi associada à elevação dos níveis de glutatona através da regulação da proteína anti-apoptótica Bcl-2. O tratamento prévio de células MCF-7 com BSO aumentava três vezes o potencial citotóxico da cisplatina (RUDIN et al., 2003). Além disso, efeitos por terapia fotodinâmica também foram intensificados em 1,67 vezes após o pré-tratamento com o BSO em células MCF-7 (KIMANI et al., 2012). Considerando estes dados, podemos sugerir que realmente existe uma participação da glutatona no efeito da cordiaquinona J, uma vez que o pré-tratamento com BSO potencializou em 2,7 vezes a atividade desta cordiaquinona.

Também foi avaliada a expressão de glutathiona em células HL-60 após 24 e 48 horas de incubação com o BSO. Foi observado que a partir da menor concentração de BSO os níveis de glutathiona já estavam alterados, no entanto os melhores efeitos observados pelo tratamento com BSO foram em 48 horas na concentração de 300 μ M. Este tratamento também foi o mais efetivo no sinergismo entre BSO e cordiaquinona J. O fato de o BSO alterar os níveis de glutathiona em ambos os tempos testados e a intensificação dos efeitos citotóxicos da cordiaquinona J ser observado apenas em 48 horas de tratamento pode indicar que o mecanismo de ação do BSO vai além da depleção de glutathiona, agindo em outras vias regulando os efeitos da cordiaquinona J.

Assim a expressão do c-myc foi avaliada após o tratamento com BSO pelos períodos de 24 e 48 horas. Foi observado que o BSO aumenta a expressão de c-myc após 24 horas de tratamento, mas diminui após 48 horas. Isso sugere que os efeitos observados pela cordiaquinona J podem estar sendo influenciados pelo BSO de maneira dependente de glutathiona e c-myc, pois o sinergismo de BSO e cordiaquinona J foi observado apenas em 48 horas de tratamento, período em que a expressão de c-myc foi depletada pelo BSO.

Em seguida avaliamos os níveis enzimáticos de glutathiona após o tratamento das células HL-60 com a cordiaquinona J. Sabendo que a depleção de GSH é um dos primeiros eventos que ocorrem na indução de morte celular dependente de estresse oxidativo (ESTRELA; ORTEGA; OBRADOR, 2006), os níveis enzimáticos foram avaliados a partir de 15 minutos de incubação das células HL-60 com a cordiaquinona J. Foi claramente demonstrado que a glutathiona foi depletada nos primeiros 15 minutos de tratamento, no entanto após 1 e 3 horas, estes níveis tornaram-se maiores do que os mensurados no controle negativo. Também foi avaliado, por western blot, a expressão proteica de glutathiona após 3 horas de tratamento com a cordiaquinona J, sendo visualizado um leve aumento, assim como observado pela dosagem enzimática.

Vários trabalhos recentes sugerem que existe um controle entre o oncogene c-myc e a expressão de glutathiona, o que pode interferir no metabolismo e controle da formação de espécies reativas de oxigênio (BENASSI; ZUPI; BIROCCIO, 2007; BENASSI et al., 2006; BURDO; SCHUBERT; MAHER, 2009; GAO et al., 2009; LEVY; FORMAN, 2011). O fator de transcrição c-myc é bastante conhecido por regular a proliferação, mas também regula a apoptose, senescência, diferenciação celular além de participar no processo de tumorigênese (URIBESALGO; BENITAH; CROCE, 2012). Também é sabido que o c-myc é altamente expresso em células tumorais, mas especialmente em células leucêmicas, inclusive HL-60, e

em células de próstata, sendo relativamente pouco expressos em células de sistema nervoso central (ZOPPOLI et al., 2011).

A partir destes dados citados acima foi observado que a expressão proteica de c-myc foi severamente diminuída quando as células HL-60 foram tratadas com cordiaquinona J por apenas 3 horas e, além disso, a expressão deste fator de transcrição retornava aos níveis normais quando essas células foram pré-tratadas com NAC.

Benassi e colaboradores em 2006 mostraram que o c-myc pode também está envolvido no controle do estresse oxidativo, identificando a glutathione como a molécula mediadora deste processo. Além disso, foi mostrado que o elo entre o c-myc e a glutathione é a enzima γ -glutamylcysteine sintetase. Na verdade, foi observado que a exposição de H_2O_2 aumenta o recrutamento de γ -glutamylcysteine sintetase para regiões regulatórias através da fosforilação dependente de ERK. A fosforilação de ERK promove a fosforilação de c-myc na Ser62 recrutando γ -glutamylcysteine sintetase para determinar qual resposta é adequada para aquela célula a um determinado estímulo induzido por estresse oxidativo (BENASSI et al., 2006). Posteriormente, foi mostrado pelo mesmo grupo que a inibição de c-myc depleta a γ -glutamylcysteine sintetase e promove o aumento da atividade de alguns antineoplásicos de mecanismo distintos como a cisplatina e a estaurosporina, mas não causa efeito no tratamento com 5-fluorouracil, pois até o momento o 5-fluorouracil não tem efeitos relacionados a estresse oxidativo (BENASSI; ZUPI; BIROCCIO, 2007). No entanto, esta via GSH-ERK-c-myc também apresentou efeitos controversos, pois foi observado que a ativação dela por flavonoides promove aumento na concentração de GSH e aumento da viabilidade celular. Foi discutido que estes efeitos contrários ocorrem provavelmente devido ao tipo de célula estudada (BURDO; SCHUBERT; MAHER, 2009). Também o c-myc pode reprimir a transcrição de miR-23a e miR-23b que vão aumentar a expressão de glutaminase (GLS) mitocondrial. Este aumento de expressão de GLS leva ao catabolismo de glutamina convertendo glutamina em glutamato que serve como substrato para síntese de glutathione (GAO et al., 2009).

Além do mais, a ativação de oncogenes como o c-myc é geralmente associada à indução de sinalização de resposta de dano ao DNA agindo como uma barreira para a progressão tumoral. Recentemente foi revisado e proposto que o c-myc pode atuar no controle de dano de DNA, preferencialmente pelas vias ATM/Chk-2 via p53 ou pela via ATR/Chk-1 atuando através do estresse replicativo inibindo a forquilha de replicação (CAMPANER;

AMATI, 2012). Deste modo, pode-se sugerir que os efeitos da cordiaquinona J apresentados aqui sejam de alguma maneira dependentes de c-myc.

Então, novos estudos estão surgindo, e alguns focados em antigos alvos para o tratamento do câncer. Portanto, é importante ressaltar que alvos conhecidos podem e devem ser explorados, no entanto com um novo enfoque. Nesse momento a cordiaquinona J pode ser útil no tratamento como um novo fármaco antitumoral, provavelmente com um mecanismo pouco explorado, utilizando como ferramentas a glutathione o c-myc e a via ATM/ATR.

Em seguida, foi avaliado se os efeitos citotóxicos *in vitro* observados pela cordiaquinona J também eram visualizados em camundongos transplantados com o tumor sarcoma-180 *in vivo*. Uma vez que os efeitos observados de muitas drogas em modelos *in vitro* (sistemas celulares) não são reproduzidos em modelos animais, pois estes fármacos dependem de absorção, distribuição e metabolização do composto (INABA et al., 1996; OUGH et al., 2005; POONDRU et al., 2002).

O camundongo de laboratório (*Mus musculus*) é um dos melhores modelos para investigações abordando o câncer devido a seu tamanho pequeno e propensão a reproduzir em cativeiro, tempo de vida de três anos, semelhanças fisiológicas e moleculares com os seres humanos, e genoma inteiramente sequenciado. Modelos de câncer utilizando o *M. musculus* evoluíram em complexidade, incluindo tumores xenográficos derivados de linhagens celulares tumorais ou explantes e diversas variações de camundongos geneticamente modificados (GEMs). Cada abordagem tem suas próprias vantagens e desvantagens, e é importante escolher o sistema mais adequado de acordo com questionamentos particulares (FRESE; TUVESON, 2007).

Para qualquer estudo biológico há uma grande variedade de tumores experimentais já catalogados (HOSSNE, 2002). O sarcoma-180 (tumor de Crocker) foi descoberto em 1914 por Dr. W. H. Woglom no “Crocker Laboratory (Columbia University, New York)” nos Estados Unidos. É um tumor de natureza sólida, que foi inicialmente classificado como carcinoma mamário, por surgir espontaneamente na região axilar de camundongos. Porém, após ser mantido por sucessivos transplantes subcutâneos, assumiu a forma sarcomatosa por volta de 1919 (HAROLD et al., 1959; SCHABEL, 1977; SUGIURA; STOCK, 1952).

A forma sólida caracteriza-se por ter um rápido crescimento, atingindo 18x14x10 mm por volta de sete dias de transplante. Pode causar metástase para os pulmões o que pode

ocorrer quando os tumores estão com mais de quatro semanas de evolução (SCHABEL, 1977).

O tumor cresce rapidamente na maioria dos animais inoculados (~90%), porém regride em cerca de 8-10% dos casos. Essa razão de regressão pode ser aumentada significativamente por tratamentos com certos produtos químicos ou biológicos (HAROLD et al., 1959).

O Instituto Nacional do Câncer dos Estados Unidos (NCI-USA) tem sido um dos grandes responsáveis pela criação e o estabelecimento de diversos modelos os quais tem impulsionado a pesquisa, o que permite avaliar melhor a eficácia de novas drogas antes do uso em humanos. De fato, a predição dos modelos desenvolvidos pelo NCI-USA tem sido relativamente satisfatória no que se refere ao desenvolvimento de uma droga com potencial anticâncer *in vitro*. Isto, além de outros fatores, tem sustentado, ainda, o uso de animais nesses estudos. Assim, o modelo sarcoma-180 tem feito parte do desenho metodológico de muitos grupos de pesquisa no mundo (BEZERRA et al., 2009; GURGEL et al., 2009; LI; NIE; et al., 2011; LIU et al., 2011; OLIVEIRA et al., 2010; WANG; GUO; et al., 2006).

Nesse estudo foi observado que a cordiaquinona J além dos efeitos *in vitro* também apresentou potentes efeitos *in vivo* no modelo sarcoma-180. A regressão do peso tumoral dos animais tratados com a cordiaquinona J foi mais de 70% quando comparados ao controle negativo, resultados similares ao grupo tratado com o controle positivo, 5-FU. No entanto, não foi observado diferenças em relação a sobrevida dos animais tratados tanto com a cordiaquinona J quanto com o 5-FU, porém o volume tumoral, mensurado com paquímetro no 6º e no 8º dia tratamento, foi reduzido de modo semelhante ao observado anteriormente, sugerindo que os efeitos antitumorais foram mantidos, mas a sobrevida não foi alterada.

Estudos prévios mostram que a sobrevida é um parâmetro difícil de sofrer alterações. O 5-FU foi avaliado em tumor murino ascítico TLT e apresentou um aumento de apenas 15% na sobrevida dos animais, efeito semelhante em outro trabalho quando o tumor sarcoma-180 foi tratado com 5-FU. Os animais tratados com 5-FU apresentaram média de 19 dias de vida, enquanto os animais do grupo controle viveram em média 15 dias (OLIVEIRA et al., 2010; TAPER, 2008).

O 5-FU é um quimioterápico antimetabólico, descoberto na década de 50, bastante utilizado na clínica médica no tratamento de vários tipos de cânceres, incluindo colo retal, câncer de mama, cabeça e pescoço entre outros (LONGLEY; HARKIN; JOHNSTON, 2003).

Neste trabalho o 5-FU foi utilizado como controle positivo apresentando potente efeito antitumoral, mas não foram observados efeitos benéficos na sobrevida dos camundongos.

Várias outras quinonas como a β -lapachona, plumbagina e a menadiona já tiveram seus efeitos antitumorais avaliados *in vivo* em diversas linhagens de células. A β -lapachona é a naftoquinona com maior número de estudos *in vivo*, no entanto, esta molécula possui uma alta dificuldade de solubilização o que dificulta bastante a sua avaliação *in vivo* (DONG et al., 2009). Uma das primeiras naftoquinonas a ter a atividade anticâncer avaliada foi o lapachol, que apresentou potentes efeitos tumorais, no entanto apresentou fortes efeitos adversos e teve que seus estudos interrompidos (CRAGG; GROTHAUS; NEWMAN, 2009). Apesar de apresentar efeitos antitumorais interessantes o lapachol não apresenta atividade antitumoral para sarcoma-180 sendo ativo principalmente para os tumores como o sarcoma Yoshida e o carcinosarcoma Walker 256 apresentando 82 e 50% de inibição, respectivamente (ALMEIDA, 2009; RAO; MCBRIDE; OLESON, 1968). Efeitos estes semelhantes ao observado pela cordiaquinona J.

Estudos realizados com a β -lapachona complexada com β -ciclodextrina mostrou que este complexo alterou o volume do tumor de 551mm³ no grupo controle para 204 mm³ no grupo tratado após 3 dias de tratamento, neste mesmo estudo pôde ser observado que a β -lapachona aumentou consideravelmente a sobrevida dos animais tratados (DONG et al., 2009). Outros estudos mostraram que a β -lapachona, quando dissolvida em DMSO (50 μ M), apresenta efeitos antitumorais em camundongos inoculados com tumor de pâncreas. No entanto a sobrevida desses camundongos não foi alterada. Em seguida foi avaliado se a β -lapachona complexada com ciclodextrina aumentava a eficácia do tratamento. Os efeitos observados foram contrários, pois a toxicidade do composto complexado foi bem mais intensa, provocando alta mortalidade. Este efeito foi atribuído a uma maior biodisponibilidade da β -lapachona (OUGH et al., 2005).

Estudos *in vivo* realizados com outra naftoquinona mostrou que os animais inoculados com células de câncer de pulmão, A549, tratados com plumbagina, 2 mg/kg/dia, reduziu o volume tumoral em torno de 80%, quando comparado com o controle, não apresentando sinais de toxicidade sistêmica nos animais (HSU et al., 2006). Estudos posteriores corroboram com estes resultados mostrando que a plumbagina apresentou atividade antitumoral em células de melanoma diminuindo cerca de 40% do volume tumoral, novamente sem apresentar sinais de toxicidade. Estes resultados foram associados a geração de EROs e ao processo de apoptose induzido pela molécula (WANG et al., 2008).

Estudos recentes sugerem que a associação de drogas podem melhorar os resultados almejados no tratamento do câncer. A associação de menadiona com ácido ascórbico (1 g/kg e 10 mg/kg, respectivamente) inibiu em torno de 70% do crescimento tumoral em animais transplantados com células tumorais K-562, porém estes efeitos não foram observados em células normais BaF3 transfectadas com Bcr-Abl e leucócitos sanguíneos de doadores saudáveis. Isto se deve ao fato de que a associação da menadiona com o ácido ascórbico gera altos níveis de EROs e as células normais apresentam um poderoso aparato antioxidativo o que justifica a resistência a este tratamento (BECK et al., 2011). Da mesma forma que a associação entre 5-FU e menadiona aumentou a sobrevivência dos animais em 70% quando comparados ao controle (TAPER, 2008).

Também foi avaliado se baixas doses de cordiaquinona J associada a baixas doses de 5-FU provocava efeitos antitumorais sinérgicos, no entanto, a inibição visualizada neste co-tratamento foi irrelevante, não podendo ser correlacionada a efeitos sinérgicos.

O 5-FU, como descrito anteriormente, é um quimioterápico antimetabólico, portanto seus efeitos anticâncer são devidos à inibição da enzima timidilato sintase e a incorporação de seus metabólitos no RNA e DNA das células (DIASIO; HARRIS, 1989; LONGLEY; HARKIN; JOHNSTON, 2003). Foi mostrado que o mecanismo do 5-FU não contribui para os efeitos da cordiaquinona J, no entanto, é possível que a utilização de outros quimioterápicos como a cisplatina e/ou a doxorubicina possam apresentar resultados animadores. O mecanismo de resistência de células tumorais a cisplatina se deve ao aumento nos níveis de glutatona intracelular (EASTMAN, 1987; ISHIKAWAS, 1993; RUDIN et al., 2003), o aumento da enzima glutatona S transferase, também é um dos mecanismos empregados pelas células para induzir resistência a doxorubicina e a cisplatina (GOTO et al., 2001).

É possível que a cordiaquinona J possa ser uma droga que auxilie na intensificação dos efeitos antineoplásicos em células resistentes a alguns quimioterápicos, principalmente se esta resistência estiver envolvida com o aparato antioxidativo celular, como os níveis de glutatona. Neste trabalho, estamos sugerindo que um dos mecanismos da cordiaquinona J seja a depleção de glutatona.

Outros estudos estão correlacionando o melhora dos efeitos antitumorais quando associados a outros quimioterápicos. A associação de doxorubicina com witaferina A mantém a atividade antitumoral da doxorubicina utilizando doses muito inferiores, consequentemente reduzindo os efeitos tóxicos *in vivo* (FONG et al., 2012). A β -lapachona também apresentou melhoras em seus efeitos quando administrada juntamente com o

paclitaxel (LI et al., 1999) o que sugere que novos estudos podem ser realizados com o objetivo de encontrar protocolos eficazes para o tratamento do câncer.

Vários estudos mostram que o NAC, além de agir como um potente antioxidante *in vitro* e *in vivo*, apresenta diversos efeitos inibitórios da progressão tumoral como: inibição do processo de carcinogênese *in vivo*, da invasão e da metástase em células endoteliais, e da proliferação de pólipos colônicos em humanos, entre outros (CAI et al., 1999; ESTENSEN et al., 1999; RUH; SCHMIDT; VOGEL, 2003; ZAFARULLAH et al., 2003).

Para correlacionar os efeitos citotóxicos da cordiaquinona J *in vitro* com os efeitos antitumorais *in vivo*, os animais transplantados com o sarcoma-180 foram pré-tratados com o NAC para averiguar se os efeitos da cordiaquinona J seriam revertidos.

Primeiramente, o NAC foi administrado nas doses de 150 e 300 mg/kg/dia em camundongos transplantados com o tumor sarcoma-180, a fim de avaliar o seu potencial antitumoral. Na dose de 300 mg/kg/dia, de NAC foi observada uma inibição de 67,9% do tumor acompanhada por uma intensa perda de massa corpórea. Este tratamento debilitou consideravelmente os animais e devido a estes efeitos tóxicos esta dose não foi mais utilizada. Já a dose de 150 mg/kg/dia de NAC não ocasionou nenhum dos efeitos tóxicos citados acima e também não apresentou efeitos antitumorais. Então, o NAC (150 mg/kg/dia) foi administrado nos animais, por via intraperitoneal, 1 hora antes do início do tratamento com a cordiaquinona J. Todos os efeitos antitumorais previamente observados pelo tratamento dos animais com a cordiaquinona J foram revertidos pelo pré-tratamento com o NAC (150 mg/kg/dia) indicando que os efeitos da cordiaquinona J também são dependentes de EROs em modelos *in vivo*.

Muitos estudos mostram que o NAC é administrado por via oral, normalmente, junto com a água (ACHARYA; LAU-CAM, 2010; ESTENSEN et al., 1999; MODI et al., 2006; MOURA ROCHA et al., 2010), no entanto o nosso estudo foi realizado por via intraperitoneal a fim de minimizar possíveis interações diretas entre a molécula de NAC e a cordiaquinona J. Com isso foi almejado avaliar efeitos sistêmicos entre o NAC e a cordiaquinona J.

Estudos prévios mostram que o NAC juntamente com zinco foi capaz de inibir o estresse oxidativo gerado por arsênico em ratos (MODI et al., 2006), também foi capaz de inibir parcialmente danos gástricos oxidativos induzidos por indometacina e etanol (MOURA ROCHA et al., 2010), além de reduzir o potencial mutagênico de danos oxidativos em camundongos BALB/c (MALINS et al., 2002).

A toxicidade da cordiaquinona J também foi avaliada através de testes bioquímicos e hematológicos e pela histopatologia dos órgãos dos animais tratados.

O tratamento com a cordiaquinona J não alterou o peso dos animais e dos órgãos avaliados, com exceção do estômago que apresentou aumento de peso quando comparado ao grupo controle. O peso dos animais é um principal parâmetro de toxicidade avaliado quando estudos antitumorais estão sendo realizados (BECK et al., 2011; DONG et al., 2009; HSU et al., 2006; LI et al., 1999; OUGH et al., 2005; WANG et al., 2008). Assim como a cordiaquinona J, outras naftoquinonas como a β -lapachona e a plumbagina também não apresentaram toxicidade quando avaliadas macroscopicamente (HSU et al., 2006; OUGH et al., 2005), no entanto a avaliação histopatológica dos órgãos dos animais tratados com a cordiaquinona J apresentou uma leve toxicidade, porém passível de reversão mostrando pequenos pontos hemorrágicos e focos inflamatórios com migração de leucócitos para a região afetada, principalmente no fígado e nos rins. Os parâmetros bioquímicos do plasma sanguíneo dos camundongos tratados com a cordiaquinona J também foram alterados. Foi observado um aumento da concentração de AST e ALT, na dose de 50 mg/kg/dia, que corrobora com os dados do histopatológico. A AST e ALT são marcadores de danos no fígado, geralmente associados à presença de inflamação e necrose hepática (JESUS et al., 2012; RIHOVA, 2009). Porém, não foi encontrada diferenças nas concentrações de ureia, que avalia a função renal. O que sugere que os danos causados pela cordiaquinona J ocorrem principalmente no fígado.

Recentes estudos realizados em tumor de Ehrlich mostrou que a associação de acetil-L-carnitina com a naftoquinona mitoxantrona apresentou efeitos antitumorais, mas com diversos efeitos adversos como perda de peso e aumento na concentração plasmática de AST (NIANG et al., 2011).

Estudos realizados com a β -lapachona mostraram que este composto não apresentou nenhum efeito tóxico sistêmico nos animais com ausência de toxicidade no fígado e nos rins. Focos inflamatórios e necrose foram observados apenas no tumor, no entanto este estudo foi realizado com a administração da droga intratumoral o que realmente dificulta a avaliação sistêmica (DONG et al., 2009). Todavia em estudos prévios com a administração intraperitoneal de β -lapachona foi observada uma grave toxicidade sistêmica da molécula gerando óbito dos animais (OUGH et al., 2005). O que sugere que a via de administração aplicada nos animais pode influenciar bastante o resultado do teste, principalmente em relação à eficácia e toxicidade do tratamento. Vale ressaltar que a cordiaquinona J foi administrada

oralmente por gavagem apresentando alta inibição tumoral e baixa toxicidade. Considerando que a cordiaquinona J seja um futuro medicamento, a administração oral é uma via menos invasiva, de absorção sistêmica e bastante aceita pelos pacientes.

Muitas drogas utilizadas atualmente na terapia do câncer apresentam diversos efeitos adversos hematológicos. As drogas utilizadas na terapia do câncer que apresentam mielossupressão são classificadas de acordo com a potência de seu efeito mielossupressor. A doxorubicina, a ciclofosfamida e a vimblastina são os quimioterápicos que geram níveis acentuados de mielossupressão. Já o 5-FU é considerado como antineoplásico que apresenta moderados efeitos mielossupressores, enquanto que a bleomicina apresenta baixos efeitos (WEISS, 2012).

A cordiaquinona J apresentou uma redução no número de leucócitos totais (leucopenia) de modo semelhante à observada pelo tratamento com o 5-FU, porém o tratamento com o 5-FU apresentou uma leucopenia ainda mais intensa que a cordiaquinona J sendo associado com uma neutropenia. No entanto, a neutropenia não foi observada no tratamento com a cordiaquinona J. Estes resultados sugerem que a leucopenia causada pela cordiaquinona J é moderada, assim como o 5-FU, porém estes efeitos não são associados com a diminuição de neutrófilos indicando uma menor toxicidade da cordiaquinona J quando comparada com o 5-FU. Além disso, foi observado que o tratamento associado da cordiaquinona J na dose de 25mg/kg/dia com 5-FU na dose de 10 mg/kg/dia também apresentou leucopenia associada a neutropenia. Estas amostras foram previamente analisadas nestas mesmas doses e quando avaliadas separadamente não foi observado nenhum efeito hematológico. Podemos então propor que o 5-FU intensifica os efeitos tóxicos (mielossupressores) da cordiaquinona J apesar de não alterar os efeitos terapêuticos. No entanto, o pré-tratamento dos animais com NAC aboliu todos os efeitos tóxicos e antitumorais apresentado pela cordiaquinona J.

Estes resultados sugerem que os efeitos antitumorais observados pela cordiaquinona J *in vitro* e *in vivo* são ambos dependentes de espécies reativas de oxigênio.

6 CONCLUSÃO

As cordiaquinonas são naftoquinonas naturais isoladas de plantas do gênero *Cordia*. Neste presente trabalho o mecanismo antitumoral da cordiaquinona J isolada de *Cordia leucocephala* foi proposto.

A cordiaquinona J promove estresse oxidativo ativando a apoptose, inicialmente pela via extrínseca, além disso, causa dano ao DNA ativando as PI3K ATM/ATR apenas em células leucêmicas HL-60, não provocando dano em células normais. Este mecanismo parece está intimamente relacionado com a diminuição da expressão de c-myc e dos níveis enzimáticos de glutatona (**Figura 38**).

Os efeitos antitumorais da cordiaquinona J foram confirmados *in vivo* através da inibição do tumor sarcoma-180, mecanismo também associado à geração de espécies reativas de oxigênio.

Podemos concluir, diante dos resultados apresentados, que a cordiaquinona J mostrou potente atividade antitumoral *in vitro* e *in vivo* de maneira seletiva e dependente da geração de espécies reativas de oxigênio.

REFERÊNCIAS

ABRANTES, H. F. L.; AGRA, M. F. Estudo etnomedicinal das Boraginaceae na caatinga paraibana, Brasil. **Revista Brasileira de Farmácia**, v.85, n.1, p. 7-12, 2004.

ACHARYA, M.; LAU-CAM, C. A. Comparison of the protective actions of N-acetylcysteine, hypotaurine and taurine against acetaminophen-induced hepatotoxicity in the rat. **Journal of biomedical science**, v.17, p. S35, 2010.

AGRA, M. F. **Plantas da medicina popular dos Cariris Velhos, Paraíba, Brasil**. João Pessoa: Ed. União, 1996.

AGUILÓ, J. I. et al. Cytotoxicity of quinone drugs on highly proliferative human leukemia T cells: reactive oxygen species generation and inactive shortened SOD1 isoform implications. **Chemico-biological interactions**, v.198, n.1-3, p.18-28, 2012.

ALMEIDA, E. R. D. Preclinical and Clinical Studies of Lapachol and Beta-Lapachone. **The Open Natural Products Journal**, v.2, n.1, p. 42-47, 2009.

ANDREYEV, A. Y.; KUSHNAREVA, Y. E.; STARKOV, A. A. Mitochondrial Metabolism of Reactive Oxygen Species. **Biochemistry Moscow**, v. 70, n.2, p.200-214, 2005.

ANGELY, J. **Flora analítica e fitogeográfica do Estado de São Paulo**. São Paulo: Ed. Phytton, 1970. v. 6.

ARAÚJO, A J. et al. Growth inhibitory effects of 3'-nitro-3-phenylamino nor-beta-lapachone against HL-60: a redox-dependent mechanism. **Toxicology in vitro**, v. 26, n.4, p.585-594, 2012.

ARKOUDIS, E.; STRATAKIS, M. Synthesis of cordiaquinones B, C, J, and K on the basis of a bioinspired approach and the revision of the relative stereochemistry of cordiaquinone C. **The Journal of organic chemistry**, v.73, n.12, p. 4484-90, 2008.

ASCHE, C. Antitumour Quinones. **Mini-reviews in medicinal chemistry**, v.5, p.449-467, 2005.

BAEK, S. U. M. I. et al. Differential roles of hydrogen peroxide and hydroxyl radical in cisplatin-induced cell death in renal proximal tubular epithelial cells. **Journal of Laboratory and Clinical Medicine**, v.2143, n.3, p.178-186, 2003.

BAILLY, C. Topoisomerase I poisons and suppressors as anticancer drugs. **Current medicinal chemistry**, v.7, n.1, p.39-58, 2000.

BARROSO, G. M. **Sistemática de angiospermas do Brasil**. Viçosa: Imprensa Universitária UFV, 1984.

BAST, A.; HAENEN, G. R. M. M. Lipoic acid: a multifunctional antioxidant. **BioFactors** (Oxford, England), v.17, n.(1-4), p.207-13, 2003.

BAUER, M. K. et al. Role of reactive oxygen intermediates in activation-induced CD95 (APO-1/Fas) ligand expression. **The Journal of biological chemistry**, v.273, n.14, p. 8048-55, 1998.

BECK, R. et al. Ascorbate / menadione-induced oxidative stress kills cancer cells that express normal or mutated forms of the oncogenic protein Bcr-Abl . An in vitro and in vivo mechanistic study. **Investigational new drugs**, v.29, p. 891-900, 2011.

BENASSI, B. et al. c-Myc phosphorylation is required for cellular response to oxidative stress. **Molecular cell**, v.21, n.4, p.509-19, 2006.

BENASSI, B.; ZUPI, G.; BIROCCIO, A. γ -Glutamylcysteine Synthetase Mediates the c-Myc-Dependent Response to Antineoplastic Agents in Melanoma Cells. **Molecular pharmacology**, v.72, p. 1015-1023, 2007.

BERETTA, G.; ZUNINO, F. Molecular mechanisms of anthracycline activity. **Topics in Current Chemistry**, v.283, p.1-19, 2008.

BERGLIND, H. et al. Analysis of p53 mutation status in human cancer cell lines. **Cancer Biology & Therapy**, v.7, n.5, p.699-708, 2008.

BERGMAN, P. J.; HARRIS, D. Radioresistance, chemoresistance, and apoptosis resistance. The past, present, and future. The Veterinary clinics of North America. **Journal of Small animal practice**, v.27, n.1, p.47-57, 1997.

BEY, E. A. et al. An NQO1- and PARP-1-mediated cell death pathway induced in non-small-cell lung cancer cells by β -lapachone. **PNAS**, v. 104, n.28, p.11832-11837, 2007.

BEZERRA, D. P. et al. Antitumor activity of the essential oil from the leaves of *Croton regelianus* and its component ascaridole. **Chemistry & biodiversity**, v.6, n.8, p.1224-1231, 2009.

BIEBER, L. W. et al. Meroterpenoid naphthoquinones from *Cordia Corymbosa*. **Phytochemistry**, v.29, n.6, p.1955-1959, 1990.

BIOLOGY, C.; LIU, W.; CHANG, L. The International Journal of Biochemistry Fas / FasL-dependent and -independent activation of caspase-8 in doxorubicin-treated human breast cancer MCF-7 cells : ADAM10 down-regulation activates Fas / FasL signaling pathway. **International Journal of Biochemistry and Cell Biology**, v. 43, n.12, p.1708-1719, 2011.

BOLTON, J. L. et al. Role of quinones in toxicology. **Chemical research in toxicology**, v. 13, n.3, p.135-160, 2000.

BRADFORD, M. M. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. **Analytical biochemistry**, v.72, p. 248-254, 1976.

BREITSCHOPF, K. et al. Posttranslational modification of Bcl-2 facilitates its proteasome-dependent degradation: molecular characterization of the involved signaling pathway. **Molecular and Cellular Biology**, v.20, n.5, p.1886-96, 2000.

BROWN, E. J.; BALTIMORE, D. Essential and dispensable roles of ATR in cell cycle arrest and genome maintenance. **Genes & Development**, v.17, n.5, p.615-28, 2003.

BURDO, J.; SCHUBERT, D.; MAHER, P. Glutathione production is regulated via distinct pathways in stressed and non-stressed cortical. **Brain Research**, v.16, n.1189, p.12-22, 2009.

BURDON, R. H. Superoxide and hydrogen peroxide in relation to mammalian cell proliferation. **Free Radical Biology & Medicine**, v.18, n.4, p.775-794, 1995.

BUTLER, M. S. The role of natural product chemistry in drug discovery. **Journal of Natural Products**, v.67, n.12, p.2141-53, 2004.

CAI, T. et al. N-acetylcysteine inhibits endothelial cell invasion and angiogenesis. **Laboratory Investigation**, v.79, n.9, p.1151-9, 1999.

CALVERT, P. et al. Clinical studies of reversal of drug resistance based on glutathione. **Chemico-Biological Interactions**, v.111-112, p. 213-224, 1998.

CAMPANER, S.; AMATI, B. Two sides of the Myc-induced DNA damage response: from tumor suppression to tumor maintenance. **Cell Division**, v.7, n.6, p.1-10, 2012.

CANMAN, C. E. Activation of the ATM Kinase by Ionizing Radiation and Phosphorylation of p53. **Science**, v.281, n.5383, p.1677-1679, 1998.

CARVALHO, P.; TIRNAUER, J. S.; PELLMAN, D. Surfing on microtubule ends. **Trends in Cell Biology**, v.13, n.5, p.229-237, 2003.

CAVALCANTI, B. C. et al. Genotoxicity evaluation of kaurenoic acid, a bioactive diterpenoid present in Copaiba oil. **Food and Chemical Toxicology**, v.44, n.3, p.388-392, 2006.

CHASE, A.; CROSS, N. C. P. Signal transduction therapy in haematological malignancies: identification and targeting of tyrosine kinases. **Clinical Science**, v.111, n.4, p.233-249, 2006.

CHEN, J. et al. The cytotoxicity and mechanisms of 1,2-naphthoquinone thiosemicarbazone and its metal derivatives against MCF-7 human breast cancer cells. **Toxicology and Applied Pharmacology**, v.197, n.1, p.40-48, 2004.

CHIAPPETA, A.; MELLO, J. F.; MACIEL, G. M. Higher plants with biological activity - plants of Pernambuco I. **Revista do Instituto de Antibióticos**, v.21, p.43-50, 1983.

CHUNG, S. et al. The biological significance of non-enzymatic reaction of menadione with plasma thiols : enhancement of menadione-induced cytotoxicity to platelets by the presence of blood plasma. **FEBS Letters**, v.449, p.235-240, 1999.

COCHRAN, J. C. et al. Monastrol inhibition of the mitotic kinesin Eg5. **The Journal of Biological Chemistry**, v.280, n.13, p.12658-12667, 2005.

COLLIER, A. C.; PRITSOS, C. A. The mitochondrial uncoupler dicumarol disrupts the MTT assay. **Biochemical Pharmacology**, v.66, n.2, p.281-287, 2003.

COLLINS, M. D. Isoprenoid quinones. In.: GOODFELLOW, M.; O'DONNELL, A. G. **Chemical Methods in Prokaryotic Systematics**. Chichester: Wiley, 1994. p. 265-310.

COSSARIZZA, A et al. Protective effect of N-acetylcysteine in tumor necrosis factor- α -induced apoptosis in U937 cells: the role of mitochondria. **Experimental Cell Research**, v.220, p.232-240, 1995.

COSTANTINI, P. et al. Mitochondrion as a Novel Target of Anticancer. **Journal of the National Cancer Institute**, v.92, n.13, p.1042-1053, 2000.

CRAGG, G. M.; GROTHAUS, P. G.; NEWMAN, D. J. Impact of natural products on developing new anti-cancer agents. **Chemical Reviews**, v.109, n.7, p.3012-3043, 2009.

CRAWFORD, P. W. et al. The electrochemistry of antineoplastic furanquinones: electrochemical properties of benzo[b] naphtho[2,3-d] furan-6,11-dione derivatives. **Electrochimica Acta**, v.41, n.15, p.2399-2403, 1996.

CURY-BOAVENTURA, M. F.; POMPÉIA, C.; CURI, R. Comparative toxicity of oleic acid and linoleic acid on Jurkat cells. **Clinical nutrition**, v.23, n.4, p.721-732, 2004.

DA SILVA, E. N. et al. 3-Arylamino and 3-Alkoxy-Nor-Beta-Lapachone Derivatives: Synthesis and Cytotoxicity Against Cancer Cell Lines. **Journal of Medicinal Chemistry**, v. 53, n.1, p.504-508, 2010.

DARZYNKIEWICZ, Z. et al. Features of apoptotic cells measured by flow cytometry. **Cytometry**, v.13, n.8, p.795-808, 1992.

DE ANDRADE-NETO, V. F. et al. Antimalarial activity of phenazines from lapachol, beta-lapachone and its derivatives against *Plasmodium falciparum* in vitro and *Plasmodium berghei* in vivo. **Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters**, v.14, n.5, p.1145-1149, 2004.

DEAVALL, D. G. et al. Drug-induced oxidative stress and toxicity. **Journal of Toxicology**, p. 1-13, 2012.

DEMMA, J.; HALLBERG, K.; HELLMAN, B. Genotoxicity of plumbagin and its effects on catechol and NQNO-induced DNA damage in mouse lymphoma cells. **Toxicology in vitro**, v.23, n.2, p.266-271, 2009.

DESIKAN, R. et al. Harpin and hydrogen peroxide both initiate programmed cell death but have differential effects on defence gene expression in Arabidopsis suspension cultures. **Biochemical Journal**, v.330, p. 115-120, 1998.

DESIKAN, R. et al. Regulation of the Arabidopsis transcriptome by oxidative stress. **Plant Physiology**, v.127, n.1, p.159-172, 2001.

DIASIO, R. B.; HARRIS, B. E. Clinical pharmacology of 5-fluorouracil. **Clinical Pharmacokinetics**, v.16, n.4, p.215-237, 1989.

DINIZ, J. C. et al. ¹H and ¹³C NMR assignments for two new cordiaquinones from roots of *Cordia leucocephala*. **Magnetic Resonance in Chemistry**, v.47, n.2, p.190-193, 2009.

DINKOVA-KOSTOVA, A. T. et al. An exceptionally potent inducer of cytoprotective enzymes: elucidation of the structural features that determine inducer potency and reactivity with Keap1. **The Journal of Biological Chemistry**, v.285, n.44, p. 33747-33755, 2010.

DONG, Y. et al. Intratumoral delivery of beta-lapachone via polymer implants for prostate cancer therapy. **Clinical Cancer Research**, v.15, n.1, p.131-139, 2009.

DRUKER, B. J. et al. Efficacy and Safety of a Specific Inhibitor of the Bcr-Abl Tyrosine Kinase in Chronic Myeloid Leukemia. **The New England journal of medicine**, v.344, n.14, p. 1031-1037, 2001.

DU, Z.-X. et al. Role of oxidative stress and intracellular glutathione in the sensitivity to apoptosis induced by proteasome inhibitor in thyroid cancer cells. **BMC Cancer**, v.9, n.56, p. 1-11, 2009.

EASTMAN, A. Cross-linking of glutathione to DNA by cancer chemotherapeutic platinum coordination complexes. **Chemico-Biological Interactions**, v.61, n.3, p. 241-248, 1987.

ELANGOVAN, S.; HSIEH, T.C. Control of cellular redox status and upregulation of quinone reductase NQO1 via Nrf2 activation by alpha-lipoic acid in human leukemia HL-60 cells. **International Journal of Oncology**, v.33, p. 833-838, 2008.

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

ESPOSTI, M. D. The roles of Bid. **Apoptosis**, v.7, n.5, p.433-440, 2002.

ESTENSEN, R. D. et al. N-acetylcysteine suppression of the proliferative index in the colon of patients with previous adenomatous colonic polyps. **Cancer Letters**, v. 147, n.1-2, p.109-114, 1999.

ESTRELA, J. M.; ORTEGA, A.; OBRADOR, E. Glutathione in cancer biology and therapy. **Critical Reviews in Clinical Laboratory Science**, v.43, n.2, p.1-39, 2006.

EVANS, M. D.; DIZDAROGLU, M.; COOKE, M. S. Oxidative DNA damage and disease: induction, repair and significance. **Mutation Research**, v.567, p.1-61, 2004.

FABRICANT, D. S.; FARNSWORTH, N. R. The value of plants used in traditional medicine for drug discovery. **Environmental Health Perspectives**, v.109, n.1, p.69-75, 2001.

FAIRBAIRN, D. W.; OLIVE, P. L.; O'NEILL, K. L. The comet assay: a comprehensive review. **Mutation Research/Reviews in Genetic Toxicology**, v.339, n.1, p. 37-59, 1995.

FANG, M.; ZHANG, H.; XUE, S. Role of calcium in apoptosis of HL-60 cells induced by harringtonine. **Science in China**, v.41, n.6, p.600-607, 1998.

FARNSWORTH, N. R. et al. Medicinal plants in therapy. **Bulletin of the World Health Organization**, v.63, n.6, p.965-981, 1985.

FAULDS, D.; GOA, K. L.; BENFIELD, P. Cyclosporin. A review of its pharmacodynamic and pharmacokinetic properties, and therapeutic use in immunoregulatory disorders. **Drugs**, v.45, n.6, p.953-1040, 1993.

FICARRA, R. et al. Leaf extracts of some *Cordia* species: analgesic and anti-inflammatory activities as well as their chromatographic analysis. **Farmaco** (Società chimica italiana), v.50, n.4, p.245-256, 1995.

FIRSANOV, D. V.; SOLOVJEVA, L. V.; SVETLOVA, M. P. H2AX phosphorylation at the sites of DNA double-strand breaks in cultivated mammalian cells and tissues. **Clinical epigenetics**, v.2, n.2, p.283-297, 2011.

FITZSIMMONS, S. A et al. Reductase enzyme expression across the National Cancer Institute Tumor cell line panel: correlation with sensitivity to mitomycin C and EO9. **Journal of the National Cancer Institute**, v.88, n.5, p.259-269, 1996.

FLORES, E. R.; TSAI, K. Y.; CROWLEY, D. p63 and p73 are required for p53- dependent apoptosis in response to DNA damage. **Letters to Nature**, v.416, n.4, p.560-564, 2002.

FOJO, T.; BATES, S. Strategies for reversing drug resistance. **Oncogene**, v.22, n.47, p.7512-7523, 2003.

FONG, M. Y. et al. Withaferin A Synergizes the Therapeutic Effect of Doxorubicin through ROS-Mediated Autophagy in Ovarian Cancer. **PLoS ONE**, v.7, n.7, p.e42265, 2012.

FOSTER, I. Cancer: A cell cycle defect. **Radiography**, v.14, n.2, p.144-149, 2008.

FRANCO, R.; CIDLOWSKI, J. A. SLCO/OATP-like transport of glutathione in FasL-induced apoptosis: glutathione efflux is coupled to an organic anion exchange and is necessary for the progression of the execution phase of apoptosis. **The Journal of Biological Chemistry**, v.281, n.40, p.29542-29557, 2006.

FRANCO, R.; CIDLOWSKI, J. A. Apoptosis and glutathione: beyond an antioxidant. **Cell Death and Differentiation**, v.16, n.10, p.1303-13014, 2009.

FRANCO, R.; PANAYIOTIDIS, M. I.; CIDLOWSKI, J. A. Glutathione depletion is necessary for apoptosis in lymphoid cells independent of reactive oxygen species formation. **The Journal of Biological Chemistry**, v.282, n.42, p.30452-30465, 2007.

FREITAS, H. P. S. et al. Cytotoxic Cordiaquinones from the Roots of *Cordia polycephala*. **Journal of the Brazilian Chemical Society**, v.7, n.8, p.1558-1562, 2012.

FRESE, K. K.; TUVESON, D. A. Maximizing mouse cancer models. **Nature reviews/ Cancer**, v.7, n.9, p. 645-658, 2007.

FRY, F. H.; JACOB, C. Sensor/effector drug design with potential relevance to cancer. **Current Pharmaceutical Design**, v.12, n.34, p. 4479-4499, 2006.

FULDA, S.; DEBATIN, K.M. Exploiting death receptor signaling pathways for tumor therapy. **Biochimica et Biophysica Acta**, v.1705, n.1, p.27-41, 2004.

GALM, U. et al. Antitumor antibiotics: bleomycin, enediynes, and mitomycin. **Chemical Reviews**, v.105, n.2, p.739-758, 2005.

GAO, P. et al. c-Myc suppression of miR-23 enhances mitochondrial glutaminase and glutamine metabolism. **Nature**, v.458, n.7239, p.762-765, 2009.

GERSCH, M.; KREUZER, J.; SIEBER, S. A. Electrophilic natural products and their biological targets. **Natural Product Reports**, v.29, n.6, p.659-682, 2012.

GEWIRTZ, D. A. A Critical Evaluation of the Mechanisms of Action Proposed for the Antitumor Effects of the Anthracycline Antibiotics Adriamycin and Daunorubicin. **Biochemical Pharmacology**, v.57, n.98, p.727-741, 1999.

GHIBELLI, L. et al. Rescue of cells from apoptosis by inhibition of active GSH extrusion. **FASEB Journal**, v.12, n.6, p.479-486, 1998.

GOLDE, D. W. Vitamin C in cancer. **Integrative Cancer Therapies**, v.2, n.2, p.158-160, 2003.

GOLLADAY, S. A; PARK, S. H.; AUST, A. E. Efflux of reduced glutathione after exposure of human lung epithelial cells to crocidolite asbestos. **Environmental Health Perspectives**, v.105, n.5, p.1273-1277, 1997.

GONZÁLEZ-ARAGÓN, D.; ARIZA, J.; VILLALBA, J. M. Dicoumarol impairs mitochondrial electron transport and pyrimidine biosynthesis in human myeloid leukemia HL-60 cells. **Biochemical Pharmacology**, v.73, n.3, p.427-439, 2007.

GORDALIZA, M. et al. Antitumor properties of podophyllotoxin and related compounds. **Current Pharmaceutical Design**, v.6, n.18, p.1811-1839, 2000.

GOTO, S. et al. Doxorubicin-induced DNA intercalation and scavenging by nuclear glutathione S-transferase pi. **FASEB Journal**, v.15, n.14, p.2702-2714, 2001.

GOTTESMAN, M. M.; FOJO, T.; BATES, S. E. Multidrug resistance in cancer: role of ATP-dependent transporters. **Nature reviews/Cancer**, v.2, n.1, p.48-58, 2002.

GRAHAM, J. G. et al. Plants used against cancer - an extension of the work of Jonathan Hartwell. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 73, n. 3, p. 347-377, 2000.

GREEN, D. R.; REED, J. C. Mitochondria and Apoptosis. **Science**, v.281, n.5381, p.1309-1312, 1998.

GREINERT, R. et al. UVA-induced DNA double-strand breaks result from the repair of clustered oxidative DNA damages. **Nucleic Acids Research**, p.1-11, 2012.

GRIFFITH, W.; BIOL, A. J. Potent and Specific Inhibition of Glutathione Synthesis Sulfoximine Homocysteine Sulfoximine. **The Journal of Biological Chemistry**, v.254, n.16, p.7558-7560, 1979.

GUPTE, A.; MUMPER, R. J. Copper chelation by D-penicillamine generates reactive oxygen species that are cytotoxic to human leukemia and breast cancer cells. **Free Radical Biology & Medicine**, v.43, n.9, p.1271-1278, 2007.

GURGEL, A. P. A D. et al. In vivo study of the anti-inflammatory and antitumor activities of leaves from *Plectranthus amboinicus* (Lour.) Spreng (Lamiaceae). **Journal of Ethnopharmacology**, v.125, n.2, p.361-363, 2009.

HAJNÓCZKY, G. Calcium signaling and apoptosis. **Biochemical and Biophysical Research Communications**, v.304, n.3, p.445-454, 2003.

HALLIWELL, B. Free Radicals and other reactive species in Disease. **Encyclopedia of Life Sciences**, p.1-7, 2001.

HAMMOND, C. L.; MADEJCZYK, M. S.; BALLATORI, N. Activation of plasma membrane reduced glutathione transport in death receptor apoptosis of HepG2 cells. **Toxicology and Applied Pharmacology**, v.195, n.1, p.12-22, 2004.

HAN, H. et al. 4-NQO induces apoptosis via p53-dependent mitochondrial signaling pathway. **Toxicology**, v.230, n.2-3, p.151-163, 2007.

HANAHAH, D.; WEINBERG, R. A. Hallmarks of cancer: the next generation. **Cell**, v.144, n.5, p. 646-674, 2011.

HANAHAH, D.; WEINBERG, R. A. The Hallmarks of Cancer. **Hormone Research**, v.100, p.57-70, 2000.

HANCOCK, J. T.; DESIKAN, R.; NEILL, S. J. Role of reactive oxygen species in cell signalling pathways. **Biochemical and Biomedical Aspects of Oxidative Modification**, p.345-350, 2001.

HAROLD, L. et al. Transplantable and transmissible tumors of animals. **British Journal of Surgery**, v.46, n.200, p.658-658, 1959.

HARRIS, R. A. et al. New model of ErbB-2 over-expression in human mammary luminal epithelial cells. **International Journal of Cancer**, v. 80, n.3, p.477-484, 1999.

HARTMANN, A. et al. Recommendations for conducting the in vivo alkaline Comet assay. **Mutagenesis**, v.18, n.1, p.45-51, 2003.

HARTWELL, J. L. Plants used against cancer. A survey. **Lloydia**, v.34, n.4, p.386-425, 1971.

HE, Y.Y.; HUANG, J.-L.; CHIGNELL, C. F. Delayed and sustained activation of extracellular signal-regulated kinase in human keratinocytes by UVA: implications in carcinogenesis. **The Journal of Biological Chemistry**, v.279, n.51, p.53867-53874, 2004.

HEANEY, M. L. et al. Vitamin C antagonizes the cytotoxic effects of antineoplastic drugs. **Cancer Research**, v.68, n.19, p.8031-8038, 2008.

HENGARTNER, M. O. The biochemistry of apoptosis. **Nature**, v.407, p.810-816, 2000.

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

HILLARD, E. A. et al. Electrochemical parameters and techniques in drug development , with an emphasis on quinones and related compounds. **Chemical Communications**, p.2612-2628, 2008.

HOSSNE, R. S. Tumor hepático experimental (VX-2) em coelho: implantação do modelo no Brasil. **Acta Cirurgica Brasileira**, v.17, n.4, p.208-210, 2002.

HSU, Y. et al. Plumbagin (5-Hydroxy-2-methyl-1 , 4-naphthoquinone) induces apoptosis and cell cycle arrest in A549 cells through p53 accumulation via c-Jun NH2-terminal kinase-mediated phosphorylation at serine 15 in vitro and in vivo. **The Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics**, v.318, n.2, p.484-494, 2006.

HUWILER, A.; ZANGEMEISTER-WITTKE, U. Targeting the conversion of ceramide to sphingosine 1-phosphate as a novel strategy for cancer therapy. **Critical reviews in oncology/hematology**, v.63, n.2, p.150-159, 2007.

INABA, M. et al. In vitro-in vivo correlation in anticancer drug sensitivity test using AUC-based concentrations and collagen gel droplet-embedded culture. **Oncology**, v.53, n.3, p.250-257, 1996.

INSTITUTO NACIONAL DE CÂNCER. **ESTIMATIVAS/2012**: Incidência de Câncer no Brasil. Disponível em: <<http://www.inca.gov.br/estimativa/2012/estimativa20122111.pdf>>. Acesso em: 21 set. 2012.

IOSET, J. R. et al. Antifungal and larvicidal compounds from the root bark of *Cordia alliodora*. **Journal of Natural Products**, v.63, n.3, p. 424-426, 2000a.

IOSET, J. R. et al. Antifungal and larvicidal cordiaquinones from the roots of *Cordia curassavica*. **Phytochemistry**, v.53, n.5, p.613-617, 2000b.

IOSET, J. R. et al. Antifungal and larvicidal meroterpenoid naphthoquinones and a naphthoxirene from the roots of *Cordia linnael*. **Phytochemistry**, v.47, n.5, p.2-7, 1998.

ISHIKAWAS, T. Glutathione-associated cis-Diamminedichloroplatinum(II) Metabolism and ATP-dependent Efflux from Leukemia Cells. **The Journal of Biological Chemistry**, v.268, n.27, p.20116-20125, 1993.

JESUS, N. Z. T. et al. Hippocratic screening and subchronic oral toxicity assessments of the methanol extract of *Vatairea macrocarpa* heartwood in rodents. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, p.1-7, 2012.

JOENSUU, H. et al. Adjuvant docetaxel or vinorelbine with or without trastuzumab for breast cancer. **The New England Journal of Medicine**, v.354, n.8, p.809-820, 2006.

JOHNSON, N. A. et al. Concurrent Expression of MYC and BCL2 in Diffuse Large B-Cell Lymphoma Treated With Rituximab Plus Cyclophosphamide, Doxorubicin, Vincristine, and Prednisone. **Journal of Clinical Oncology**, v.30, n.28, p.3452-3459, 2012.

JORDAN, M. A. Mechanism of action of antitumor drugs that interact with microtubules and tubulin. **Current Medicinal Chemistry Anticancer Agents**, v.2, n.1, p.1-17, 2002.

KAMATA, H.; HIRATA, H. Redox regulation of cellular signalling. **Cellular Signalling**, v.11,n.1, p.1-14, 1999.

KAMIŃSKI, M. et al. Co-existence of apoptotic and necrotic features within one single cell as a result of menadione treatment. **Folia Morphologica**,v.61, n.4, p.217-220, 2002.

KAWABE, T. G2 checkpoint abrogators as anticancer drugs. **Molecular Cancer Therapeutics**, v.3, p.513-519, 2004.

KAWIAK, A.; ZAWACKA-PANKAU, J.; LOJKOWSKA, E. Plumbagin induces apoptosis in Her2-overexpressing breast cancer cells through the mitochondrial-mediated pathway. **Journal of Natural Products**, v.75, n.4, p.747-751, 2012.

KIM, J. et al. Enhanced antitumor activity of vitamin C via p53 in Cancer cells. **Free radical Biology & Medicine**, v.53,n.8, p.1607-1615, 2012.

KIM, T. H.; OH, S.; KIM, S. S. Recombinant human prothrombin kringle-2 induces bovine capillary endothelial cell cycle arrest at G0/G 1 phase through inhibition of cyclin D1 / CDK4

complex : Modulation of reactive oxygen species generation and up-regulation of cyclin-dependent kinase inhibitors. **Angiogenesis**, v.8, n.4, p.307-314, 2005.

KIMANI, S. G. et al. Antioxidant inhibitors potentiate the cytotoxicity of photodynamic therapy. **Photochemistry and Photobiology**, v.88, n.1, p.175-187, 2012.

KINGHORN, A. D. et al. The relevance of higher plants in lead compound discovery programs. **Journal of Natural Products**, v.74, n.6, p.1539-1555, 2011.

KINSELLA, A. R.; SMITH, D. Tumor resistance to antimetabolites. **General Pharmacology**, v.30, n.5, p.623-626, 1998.

KLUMPP, S.; KRIEGLSTEIN, J. Serine/threonine protein phosphatases in apoptosis. **Current Opinion in Pharmacology**, v.2, n.4, p.458-462, 2002.

KONG, Q.; LILLEHEI, K. O. Antioxidant inhibitors for cancer therapy. **Medical Hypotheses**, v.51, n.5, p.405-409, 1998.

KOVACIC, P.; COOKSY, A. L. Unifying mechanism for toxicity and addiction by abused drugs: electron transfer and reactive oxygen species. **Medical Hypotheses**, v.64, n.2, p.357-366, 2005.

KOVACIC, P.; POZOS, R. S. Cell signaling (mechanism and reproductive toxicity): redox chains, radicals, electrons, relays, conduit, electrochemistry, and other medical implications. Birth defects research. Part C, **Embryo Today : reviews**, v.78, n.4, p.333-344, 2006.

KOVACIC, P.; SOMANATHAN, R. Novel, unifying mechanism for aromatic primary-amines (therapeutics, carcinogens and toxins): electron transfer, reactive oxygen species, oxidative stress and metabolites. **Med. Chem. Comm.**, v.2, n.2, p.106, 2011a.

KOVACIC, P.; SOMANATHAN, R. Recent developments in the mechanism of anticancer agents based on electron transfer, reactive oxygen species and oxidative stress. **Anti-cancer Agents in Medicinal Chemistry**, v.11, n.7, p. 658-668, 2011b.

KULCSÁR, G. Theoretical and literary evidence for the existence of the passive antitumor defence system. **Cancer Biotherapy & Radiopharmaceuticals**, v.12, n.4, p.281-286, 1997.

KUO, P.; HSU, Y.; CHO, C. Plumbagin induces G₂-M arrest and autophagy by inhibiting the AKT/mammalian target of rapamycin pathway in breast cancer cells Plumbagin induces G₂-M arrest and autophagy by inhibiting the AKT/mammalian target of rapamycin pathway in breast cancer. **Molecular Cancer Therapeutics**, v.5, p. 3209-3221, 2006.

LAEMMLI, U. K. Cleavage of Structural Proteins during the Assembly of the Head of Bacteriophage T4. **Nature**, v.227, n.5259, p.680-685, 1970.

LAI, G. M. et al. Contribution of glutathione and glutathione-dependent enzymes in the reversal of adriamycin resistance in colon carcinoma cell lines. **International Journal of cancer**, v.49, n.5, p.688-695, 1991.

LEE, C.-D. et al. Combined impact of lifestyle factors on cancer mortality in men. **Annals of Epidemiology**, v.21, n.10, p.749-754, out. 2011.

LEVY, S.; FORMAN, H. J. c-Myc is a Nrf2-interacting protein that negatively regulates phase II genes through their electrophile responsive elements. **IUBMB Life**, v.62, n.3, p.237-246, 2011.

LI, C. J. et al. Potent inhibition of tumor survival *in vivo* by β -lapachone plus taxol: combining drugs imposes different artificial checkpoints. **PNAS**, v.96, n.23, p.13369-13374, 1999.

LI, H. et al. Cleavage of BID by caspase 8 mediates the mitochondrial damage in the Fas pathway of apoptosis. **Cell**, v.94, n.4, p.491-501, 1998.

LI, J. et al. Plumbagin Enhances TRAIL-mediated Apoptosis through Up-regulation of Death Receptor in Human Melanoma A375 Cells. **Journal of Huazhong University Science and Technology**, v.30, n.4, p.458-463, 2010.

LI, L. S.; BEY, E. A; et al. Modulating endogenous NQO1 levels identifies key regulatory mechanisms of action of β -lapachone for pancreatic cancer therapy. **Clinical Cancer Research**, v.17, n.2, p.275-285, 2011

LI, W.; NIE, S. et al. Enhancement of cyclophosphamide-induced antitumor effect by a novel polysaccharide from *Ganoderma atrum* in sarcoma 180-bearing mice. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v.59, n.8, p.3707-3716, 2011.

LIU, T. et al. Study on synergic and decreasing toxic effects of mineral water and Chinese herbal compound preparation on cisplatin. **China Journal of Chinese Materia Medica**, v.36, n.10, p.1358-1361, 2011.

LONGLEY, D. B.; HARKIN, D. P.; JOHNSTON, P. G. 5-Fluorouracil: Mechanisms of Action and Clinical Strategies. *Nature reviews. Cancer*, v.3, n.5, p.330-338, 2003.

LOOR, G. et al. Menadione triggers cell death through ROS-dependent mechanisms involving PARP activation without requiring apoptosis. **Free Radical Biology & Medicine**, v.49, n.12, p.1925-1936, 2010.

LOS, M. et al. Anticancer drugs of tomorrow: apoptotic pathways as targets for drug design. **Drug Discovery Today**, v.8, n.2, p.67-77, 2003.

LOVELL, D. P.; THOMAS, G.; DUBOW, R. Issues related to the experimental design and subsequent statistical analysis of *in vivo* and *in vitro* comet studies. **Teratogenesis, carcinogenesis and mutagenesis**, v.19, n.2, p.109-119, 1999.

LOWRY, O. H. et al. Protein measurement with the Folin phenol reagent. **The Journal of Biological Chemistry**, v.193, n.1, p.265-275, 1951.

LUTZKY, J.; ASTOR, M. B.; TAUB, R. N. Role of glutathione and dependent enzymes in anthracycline-resistant HL60/AR cells. **Cancer Research**, v.49, p.4120-4125, 1989.

MADARI, H.; PANDA, D.; WILSON, L. Dicoumarol: a unique microtubule stabilizing natural product that is synergistic with taxol. **Cancer Research**, v.63, p.1214-1220, 2003.

MALINS, D. C. et al. Antioxidant-induced changes in oxidized DNA. **PNAS**, v.99, n.9, p. 5937-5941, 2002.

MARINHO-FILHO, J. D. B. **Contribuição das espécies reativas de oxigênio na atividade anti-leucêmica da cordiaquinona J.** 2009. 109p. Dissertação (Mestrado em Farmacologia)-Universidade Federal do Ceará, Fortaleza, 2009.

MARINHO-FILHO, J. D. B. et al. Oxidative stress induction by (+) -cordiaquinone J triggers both mitochondria-dependent apoptosis and necrosis in leukemia cells. **Chemico-Biological Interactions**, v.183, p. 369-379, 2010.

MAS, V. M. et al. Implication of Radical Oxygen Species in Ceramide Generation , c-Jun N-Terminal Kinase Activation and Apoptosis Induced by Daunorubicin. **Molecular Pharmacology**, v.874, p.867-874, 1999.

MASON, R. P. Calcium channel blockers, apoptosis and cancer: is there a biologic relationship? **Journal of the American College of Cardiology**, v.34, n.7, p.1857-1866, 1999.

MASSAOKA, M. H. et al. Jacaranone induces apoptosis in melanoma cells via ROS-mediated downregulation of Akt and p38 MAPK activation and displays antitumor activity in vivo. **PloS ONE**, v.7, n.6, p. e38698, 2012.

MATÉS, J. M.; SÁNCHEZ-JIMÉNEZ, F. M. Role of reactive oxygen species in apoptosis: implications for cancer therapy. **The International Journal of Biochemistry & Cell Biology**, v.32, n.2, p.157-170, 2000.

MAYS, J. B.; BENSON, A M. Inhibition of mouse glutathione transferases and glutathione peroxidase II by dicumarol and other ligands. **Biochemical Pharmacology**, v.44, n.5, p.921-925, 1992.

MCDONNELL, T. J.; MEYN, R. E.; ROBERTSON, L. E. Implications of apoptotic cell death regulation in cancer therapy. **Seminars in Cancer Biology**, v.6, n.1, p.53-60, 1995.

MEHMET, H. Caspases find a new place to hide. **Nature**, v.403, n.6765, p.29-30, 2000.

MEIJER, L. Le cycle de division cellulaire et sa régulation Interphase Cycle. **Oncologie**, v. 5, p. 311-326, 2003.

MEISTER, A. Glutathione deficiency produced by inhibition of its synthesis, and its reversal; applications in research and therapy. **Pharmacology & Therapeutics**, v.51, n.2, p.155-194, 1991.

MELINO, G. et al. p73 Induces apoptosis via PUMA transactivation and Bax mitochondrial translocation. **The Journal of Biological Chemistry**, v.279, n.9, p.8076-8083, 2004.

MELINO, G.; DE LAURENZI, V.; VOUSDEN, K. H. p73: Friend or foe in tumorigenesis. **Nature reviews. Cancer**, v.2, n.8, p.605-615, 2002.

MIAO, X. et al. In vitro metabolism of beta-lapachone (ARQ 501) in mammalian hepatocytes and cultured human cells. **Rapid Communications in Mass Spectrometry**, v.23, p.12-22, 2009.

MIZUTANI, H. et al. Mechanism of Apoptosis Induced by a New Topoisomerase Inhibitor through the Generation of Hydrogen Peroxide. **The Journal of Biological Chemistry**, v.277, n.34, p.30684-30689, 2002.

MIZUTANI, H.; TADA-OIKAWA, S.; HIRAKU, Y. Mechanism of apoptosis induced by doxorubicin through the generation of hydrogen peroxide. **Life Sciences**, v.76, p.1439-1453, 2005.

MIZUTANI, Y. et al. Lipoxygenase inhibitors induce death receptor 5/TRAIL-R2 expression and sensitize malignant tumor cells to TRAIL-induced apoptosis. **Cancer Science**, v.98, n.9, p. 1417-1423, 2007.

MODI, M. et al. Co-administration of zinc and n-acetylcysteine prevents arsenic-induced tissue oxidative stress in male rats. **Journal of trace elements in medicine and biology: organ of the Society for Minerals and Trace Elements (GMS)**, v.20, n.3, p.197-204, 2006.

MOLFETTA, F. A et al. A structure-activity relationship study of quinone compounds with trypanocidal activity. **European Journal of Medicinal Chemistry**, v.40, n.4, p.329-38, 2005.

MONKS, T. J.; JONES, D. C. The metabolism and toxicity of quinones, quinonimines, quinone methides, and quinone-thioethers. **Current drug metabolism**, v.3, n.4, p.425-438, 2002.

MONKS, T. J.; LAU, S. S. The pharmacology and toxicology of polyphenolic-glutathione conjugates. **Annual Review of Pharmacology and Toxicology**, v.38, n.1, p.229-255, 1998.

MONTENEGRO, R. C. et al. Cytotoxic activity of naphthoquinones with special emphasis on juglone and its 5-O-methyl derivative. **Chemico-Biological Interactions**, v.184, n.3, p.439-48, 2010.

MOSMANN, T. Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: application to proliferation and cytotoxicity assays. **Journal of Immunological Methods**, v.65, n.1-2, p.55-63, 1983.

MOURA ROCHA, N. F. et al. Gastroprotection of (-)-alpha-bisabolol on acute gastric mucosal lesions in mice: the possible involved pharmacological mechanisms. **Fundamental & Clinical Pharmacology**, v.24, n.1, p.63-71, 2010.

MUKHERJEE, B. et al. DNA-PK phosphorylates histone H2AX during apoptotic DNA fragmentation in mammalian cells. **DNA repair**, v.5, n.5, p.575-590, 2006.

NATIONAL CANCER INSTITUTE. Disponível em:

<<http://www.cancer.gov/cancertopics/druginfo/fda-pertuzumab>>. Acesso em: 21 set. 2012b.

NATIONAL CANCER INSTITUTE. Disponível em:

<<http://www.cancer.gov/researchandfunding/priorities/global-research-activities>>. Acesso em: 3 out. 2012a.

NAUJOKAT, C. et al. Cell cycle- and activation-dependent regulation of cyclosporin A-induced T cell apoptosis. **Biochemical and Biophysical Research Communications**, v.310, n.2, p.347-354, 2003.

NEILAN, T. G. et al. Disruption of nitric oxide synthase 3 protects against the cardiac injury, dysfunction, and mortality induced by doxorubicin. **Circulation**, v.116, n.5, p.506-514, 2007.

NEWMAN, D. J.; CRAGG, G. M. Natural products as sources of new drugs over the last 25 years. **Journal of Natural Products**, v.70, n.3, p.461-77, 2007.

NEWMAN, D. J.; CRAGG, G. M. Natural products as sources of new drugs over the 30 years from 1981 to 2010. **Journal of Natural Products**, v.75, n.3, p.311-335, 2012.

NEWMAN, D. J.; CRAGG, G. M.; SNADER, K. M. Natural products as sources of new drugs over the period 1981-2002. **Journal of Natural Products**, v.66, n.7, p.1022-1037, 2003.

NIANG, M. et al. Biochemical and pharmacological effects of mitoxantrone and acetyl-L-carnitine in mice with a solid form of Ehrlich tumour. **Chemotherapy**, v.57, n.1, p.35-42, 2011.

NICOLETTI, I. et al. A rapid and simple method for measuring thymocyte apoptosis by propidium iodide staining and flow cytometry. **Journal of Immunological Methods**, v.139, n.2, p.271-279, 1991.

NOVAK, R. F.; KHARASCH, E. D. Mitoxantrone: propensity for free radical formation and lipid peroxidation--implications for cardiotoxicity. **Investigational New Drugs**, v.3, n.2, p. 95-99, 1985.

NOWAK, R.; TARASIUK, J. Anthraquinone antitumour agents, doxorubicin, pirarubicin and benzoperimidine BP1, trigger caspase-3/caspase-8-dependent apoptosis of leukaemia sensitive HL60 and resistant HL60/VINC and HL60/DOX cells. **Anti-Cancer Drugs**, v.23, n.4, p.380-392, 2012.

OBRADOR, E. et al. Gamma-Glutamyl transpeptidase overexpression increases metastatic growth of B16 melanoma cells in the mouse liver. **Hepatology**, v.35, n.1, p.74-81, 2002.

OLIVE, P. L. Cell proliferation as a requirement for development of the contact effect in Chinese hamster V79 spheroids. **Radiation Research**, v.117, n.1, p.79-92, 1989.

OLIVEIRA, A. B. et al. A normatização dos fitoterápicos no brasil. **Visão Acadêmica**, v.7, n.2, p.1-13, 2007.

OLIVEIRA, J. S. et al. In vivo growth inhibition of sarcoma 180 by latex proteins from *Calotropis procera*. **Naunyn-Schmiedeberg's Archives of Pharmacology**, v.382, n.2, p.139-149, 2010.

ORMROD, D.; SPENCER, C. M. Topotecan: a review of its efficacy in small cell lung **Cancer Drugs**, v.58, n.3, p.533-51, 1999.

ORRENIUS, S. Mitochondrial regulation of apoptotic cell death. **Toxicology Letters**, v.149, n.1-3, p.19-23, 2004.

ORTEGA, A. et al. Tumoricidal activity of endothelium-derived NO and the survival of metastatic cells with high GSH and Bcl-2 levels. **Nitric Oxide: Biology and Chemistry/Official Journal of The Nitric Oxide Society**, v.19, n. 2, p. 107-14, set. 2008.

ORTEGA, A. L.; MENA, S.; ESTRELA, J. M. Glutathione in Cancer Cell Death. **Cancers**, v.3, n.1, p.1285-1310, 2011.

ORTEGA, Á. L.; MENA, S.; ESTRELA, J. M. Oxidative and Nitrosative Stress in the Metastatic Microenvironment. **Cancers**, v.2, n.2, p.274-304, 2010.

OSTLING, O.; JOHANSON, K. J. Microelectrophoretic study of radiation-induced DNA damages in individual mammalian cells. **Biochemical and Biophysical Research Communications**, v.123, n.1, p.291-298, 1984.

OUGH, M. et al. Efficacy of β -Lapachone in Pancreatic Cancer Treatment exploiting the novel, therapeutic target NQO1. **Cancer Biology & Therapy**, v.4, n.1, p.95-102, 2005.

PABLA, N. et al. ATR-Chk2 signaling in p53 activation and DNA damage response during cisplatin-induced apoptosis. **The Journal of Biological Chemistry**, v.283, n.10, p. 6572-6583, 2008.

PACKER, L.; KRAEMER, K.; RIMBACH, G. Molecular aspects of lipoic acid in the prevention of diabetes complications. **Nutrition**, v.17, n.10, p.888-895, 2001.

PACKER, L.; TRITSCHLER, H. J.; WESSEL, K. Neuroprotection by the metabolic antioxidant alpha-lipoic acid. **Free Radical Biology & Medicine**, v.22, n.1-2, p.359-78, 1997.

PACKER, L.; WITT, E. H.; TRITSCHLER, H. J. Alpha-lipoic acid as a biological antioxidant. **Free Radical Biology & Medicine**, v.19, n.2, p.227-250, 1995.

PAULINO, R. C. et al. Diferentes substratos na propagação por estaquia de cordia globosa e cordia leucocephala. **Revista Verde de Agroecologia e Desenvolvimento Sustentável Grupo Verde De Agricultura Alternativa**, v.64, p.274-278, 2011.

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

PICCART-GEBHART, M. J. et al. Trastuzumab after Adjuvant Chemotherapy in HER2-Positive Breast Cancer. **The New England Journal of Medicine**, v.353, n.16, p.1659-1672, 2005.

PITHON-CURI, T. C. et al. Glutamine delays spontaneous apoptosis in neutrophils. **American Journal of Physiology. Cell Physiology**, v.284, n.6, p.1355-1361, 2003.

PODHORECKA, M.; SKLADANOWSKI, A.; BOZKO, P. H2AX Phosphorylation: Its Role in DNA Damage Response and Cancer Therapy. **Journal of Nucleic Acids**, p.1-9, 2011.

POONDRU, S. et al. Lack of in vitro-in vivo correlation of a novel investigational anticancer agent, SH 30. **Investigational New Drugs**, v.20, n.1, p. 23-33, 2002.

POWOLNY, A. A.; SINGH, S. V. Plumbagin-induced Apoptosis in Human Prostate Cancer Cells is Associated with Modulation of Cellular Redox Status and Generation of Reactive Oxygen Species. **Pharmaceutical Research**, v.25, n.9, p.2171-2180, 2008.

RAFFRAY, M.; COHEN, G. M. Apoptosis and necrosis in toxicology: a continuum or distinct modes of cell death? **Pharmacology & therapeutics**, v.75, n.3, p.153-77, 1997.

RAJ, L. et al. Selective killing of cancer cells by a small molecule targeting the stress response to ROS. **Nature**, v.475, n.7355, p.231-234, 2011.

RAMANATHAN, M. Flow cytometry application in pharmacodynamics and drug delivery. **Pharmaceutical Research**, v.14, n.9, p.1106-1114, 1997.

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

RICCI, M. S.; ZONG, W. Chemotherapeutic Approaches for Targeting Cell Death Pathways. **The Oncologist**, v.11, p.342-357, 2006.

RIDNOUR, L. A et al. The biphasic nature of nitric oxide responses in tumor biology. **Antioxidants & Redox Signaling**, v.8, n.7-8, p.1329-37, 2006.

RIHOVA, B. Clinical experience with anthracycline antibiotics-HPMA copolymer-human immunoglobulin conjugates. **Advanced Drug Delivery Reviews**, v.61, n.13, p.1149-58, 2009.

ROCCO, J. W. et al. P63 Mediates Survival in Squamous Cell Carcinoma By Suppression of P73-Dependent Apoptosis. **Cancer Cell**, v.9, n.1, p.45-56, 2006.

RODRIGUEZ, C. E. et al. An examination of quinone toxicity using the yeast *Saccharomyces cerevisiae* model system. **Toxicology**, v.201, n.1, p.185-196, 2004.

ROOS, W. P.; KAINA, B. DNA damage-induced apoptosis: From specific DNA lesions to the DNA damage response and apoptosis. **Cancer Letters**. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22261329>>. Acesso em: 17 jan. 2012

ROSA, D. D. et al. Molecular-targeted therapies: lessons from years of clinical development. **Cancer Treatment Reviews**, v.34, n.1, p.61-80, 2008.

ROSS, D. et al. NAD(P)H:quinone oxidoreductase 1 (NQO1): chemoprotection, bioactivation, gene regulation and genetic polymorphisms. **Chemico Biological Interactions**, v.129, n.1, 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 Radical Biology & Medicine**, v.45, n.8, p.1167-1177, 2008.

ROY, S. S.; HAJNÓCZKY, G. Calcium, mitochondria and apoptosis studied by fluorescence measurements. **Methods**, v.46, n.3, p.213-223, 2008.

RUDIN, C. M. et al. Inhibition of Glutathione Synthesis Reverses Bcl-2-mediated Cisplatin. **Cancer Research**, v.63, p.312-318, 2003.

RUH, J.; SCHMIDT, E.; VOGEL, F. Effect of N-acetylcysteine on microcirculation of mucosa in rat ileum in a model of intestinal inflammation. **Digestive Diseases and Sciences**, v.48, n.5, p. 882-889, 2003.

RUSSO, A. et al. Alteration of bleomycin cytotoxicity by glutathione depletion or elevation. **International Journal of Radiation Oncology, Biology, Physics**, v.10, n.9, p.1675-1678, 1984.

SALGALLER, M. L.; LODGE, P. A. Use of cellular and cytokine adjuvants in the immunotherapy of cancer. **Journal of Surgical Oncology**, v.68, n.2, p.122-138, 1998.

SCHABEL, F. Quantitative evaluation of anticancer agent activity in experimental animals. **Pharmacology & Therapeutics**, v.1, p.411-435, 1977.

SEATON, T. A.; COOPER, J. M.; SCHAPIRA, A. H. Cyclosporin inhibition of apoptosis induced by mitochondrial complex I toxins. **Brain Research**, v.809, n.1, p. 12-17, 1998.

SENDEROWICZ, A. M.; SAUSVILLE, E. A. Preclinical and Clinical Development of Cyclin-Dependent Kinase Modulators. **Journal of the National Cancer Institute**, v.92, n.5, p.376-387, 2000.

SESHADRI, P.; RAJARAM, A.; RAJARAM, R. Plumbagin and juglone induce caspase-3-dependent apoptosis involving the mitochondria through ROS generation in human peripheral blood lymphocytes. **Free Radical Biology & Medicine**, v.51, n.11, p.2090-2107, 2011.

SHAPIRO, H. M. **Practical Flow Cytometry**. New York : Ed Wiley-Liss, 1995

SIEGEL, D.; YAN, C.; ROSS, D. NAD(P)H:quinone oxidoreductase 1 (NQO1) in the sensitivity and resistance to antitumor quinones. **Biochemical Pharmacology**, v.83, n.8, p. 1033-1040, 2012.

SILBER, R. et al. Glutathione depletion in chronic lymphocytic leukemia B lymphocytes. **Blood**, v.80, n.8, p.2038-2043, 1992.

SILVA, M. N. DA; FERREIRA, V. F.; SOUZA, M. C. B. V. DE. Um panorama atual da química e da farmacologia de naftoquinonas, com ênfase na β -lapachona e derivados; **Química Nova**, v.26, n.3, p.407-416, 2003.

SINGH, N. P. et al. A simple technique for quantitation of low levels of DNA damage in individual cells. **Experimental Cell Research**, v.175, n.1, p.184-91, 1988.

SINHA, S. et al. Plumbagin inhibits tumorigenesis and angiogenesis of ovarian cancer cells in vivo. **International Journal of Cancer**, p.1-12, 2012.

SKULACHEV, V. P. Role of uncoupled and non-coupled oxidations in maintenance of safely low levels of oxygen and its one-electron reductants. **Quarterly reviews of biophysics**, v.29, n.2, p.169-202, 1996.

SLAMON, D. J. et al. Use of chemotherapy plus a monoclonal antibody against her2 for metastatic breast cancer that overexpresses her2. **The New England Journal of Medicine**, v.344, n.11, p.783-792, 2001.

SLAMON, D.; PEGRAM, M. Rationale for trastuzumab (Herceptin) in adjuvant breast cancer trials. **Seminars in Oncology**, v.28, n.1, p.13-19, 2001.

SOUZA, M. V. N.; GONÇALVES, R. S. B.; PINHEIRO, A. C.; FERREIRA, M. L. . L.; C., C. H. DA. Produtos Naturais em Fase Avançada de Testes Clínicos no Tratamento contra o Câncer. Natural Products in Advance Clinical Trials Applied to Cancer. **Revista Fitos**, v.3, p.25-42, 2007.

SRIVASTAVA, V. et al. Plant-based anticancer molecules: a chemical and biological profile of some important leads. **Bioorganic & Medicinal Chemistry**, v.13, n.21, p.5892-5908, 2005.

STAMPS, A. C. et al. Analysis of proviral integration in human mammary epithelial cell lines immortalized by retroviral infection with a temperature-sensitive SV40 T-antigen construct. **International Journal of Cancer**, v.57, n.6, p.865-874, 1994.

STOLZENBERG-SOLOMON, R. Z. et al. Vitamin E intake, α -tocopherol status, and pancreatic cancer in a cohort of male smokers. **The American Journal of Clinical Nutrition**, v.89, p.584-591, 2009.

STORY, M.; KODYM, R. Signal transduction during apoptosis; implications for cancer therapy. **Frontiers in Bioscience: A Journal and Virtual Library**, v.3, p.365-375, 1998.

SUGIURA, K.; STOCK, C. C. STUDIES I N A TUMOR SPECTRUM. Comparison of the Action of Methylbis(2-chloroethyl)amine and 3-Bis(2-chloroethyl) aminomethyl-4-methoxymethyl-5- hydroxy- 6-methylpyridine on the Growth of a Variety of Mouse and Rat Tumors. **Cancer**, v.5, n.2, p.382-402, 1952.

TAN, A. R. Phase I Clinical and Pharmacokinetic Study of Flavopiridol Administered as a Daily 1-Hour Infusion in Patients With Advanced Neoplasms. **Journal of Clinical Oncology**, v.20, n.19, p.4074-4082, 2002.

TAN, A. S.; BERRIDGE, M. V. Evidence for NAD(P)H:quinone oxidoreductase 1 (NQO1)-mediated quinone-dependent redox cycling via plasma membrane electron transport: A sensitive cellular assay for NQO1. **Free Radical Biology & Medicine**, v.48, n.3, p.421-429, 2010.

TAN, X.; 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, n.12, p.2287-2292, 1999.

TAPER, H. S. Altered deoxyribonuclease activity in cancer cells and its role in non toxic adjuvant cancer therapy with mixed vitamins C and K3. **Anticancer Research**, v.28, n.5, p. 2727-2732, 2008.

TARODA, N. **Taxonomic studies on Brazilian species of Cordia L. (Boraginaceae)**. Thesis (Doutorado). -- University of Saint Andrews, Endburgh, 1984.

TARODA, N.; GIBBS, P. Studies on the genus Cordia L. (Boraginaceae) in Brazil. 2. An outline taxonomic revision of subgenus Myxa Taroda. **The Journal of the Hattori Botanical Laboratory**, v. 14, p. 31-52, 1987.

TARODA, N.; GIBBS, P. E. Studies on the genus Cordia L. (Boraginaceae) in Brazil. **Revista Brasileira de Botânica**, v.9, p.31-40, 1986.

TERADA, H. Uncouplers of oxidative phosphorylation. **Environmental Health Perspectives**, v.87, p.213-218, 1990.

TOLEDO, A. C. O. et al. Fitoterápicos: uma abordagem farmacotécnica. **Revista Lecta, Bragança Paulista**, v.21, n.1, p.7-13, 2003.

TOWBIN, H.; STAEBELIN, T.; GORDON, J. Electrophoretic transfer of proteins from polyacrylamide gels to nitrocellulose sheets: procedure and some applications. **PNAS**, v.76, n.9, p.4350-4354, 1979.

TRABER, M. G.; ATKINSON, J. Vitamin E, antioxidant and nothing more. **Free Radical Biology & Medicine**, v.43, n.1, p. 4-15, 2007.

TRACHOOTHAM, D. et al. Selective killing of oncogenically transformed cells through a ROS-mediated mechanism by beta-phenylethyl isothiocyanate. **Cancer Cell**, v.10, p.241-252, 2006.

TRACHOOTHAM, D.; ALEXANDRE, J.; HUANG, P. Targeting cancer cells by ROS-mediated mechanisms: a radical therapeutic approach? **Nature Reviews. Drug Discovery**, v.8, n.7, p.579-591, 2009.

TRAN, T. P. et al. Mitochondria-derived superoxide links to tourniquet-induced apoptosis in mouse skeletal muscle. **Plos One**, v.7, n.8, p.1-9, 2012.

TULP, M.; BOHLIN, L. Unconventional natural sources for future drug discovery. **Drug Discovery Today**, v.9, n.10, p.450-458, 2004.

TURRENS, J. F. Mitochondrial formation of reactive oxygen species. **The Journal of Physiology**, v.552, n.2, p.335-344, 2003.

URIBESALGO, I.; BENITAH, S. A.; CROCE, L. D. From oncogene to tumor suppressor The dual role of Myc in leukemia. **Cell Cycle**, v.11, n.9, p.1757-1764, 2012.

URIST, M. et al. p73 induction after DNA damage is regulated by checkpoint kinases Chk1 and Chk2. **Genes & Development**, v.18, p.3041-3054, 2004.

VERA, J. C. et al. Human HL-60 myeloid leukemia cells transport dehydroascorbic acid via the glucose transporters and accumulate reduced ascorbic acid. **Blood**, v.84, n.5, p.1628-1634, 1994.

VERMA, R. P. Anti-cancer activities of 1,4-naphthoquinones: a QSAR study. **Anti-Cancer Agents in Medicinal Chemistry**, v.6, n.5, p.489-499, 2006.

VERMEULEN, K.; VAN BOCKSTAELE, D. R.; BERNEMAN, Z. N. The cell cycle: a review of regulation, deregulation and therapeutic targets in cancer. **Cell Proliferation**, v.36, n.3, p.131-149, 2003.

VERRAX, J. et al. In Situ Modulation of Oxidative Stress : A Novel and Efficient Strategy to Kill Cancer Cells. **Current Medicinal Chemistry**, v.16, n.15, p.1821-1830, 2009.

VERRAX, J. et al. Redox-Active Quinones and Ascorbate: An Innovative Cancer Therapy That Exploits the Vulnerability of Cancer Cells to Oxidative Stress. **Anti-Cancer Agents in Medicinal Chemistry**, v.11, p. 213-221, 2011.

WANG, C. C. C. et al. Plumbagin induces cell cycle arrest and apoptosis through reactive oxygen species / c-Jun N-terminal kinase pathways in human melanoma A375 . S2 cells. **Cancer Letters**, v.259, p.82-98, 2008.

WANG, H. et al. Complex H2AX phosphorylation patterns by multiple kinases including ATM and DNA-PK in human cells exposed to ionizing radiation and treated with kinase inhibitors. **Journal of Cellular Physiology**, v.202, n.2, p.492-502, 2005.

WANG, W.; GUO, Q. L. et al. The anticancer activities of wogonin in murine sarcoma S180 both in vitro and in vivo. **Biological & Pharmaceutical Bulletin**, v.29, n.6, p.1132-1137, 2006.

WANG, X.; THOMAS, B. et al. Mechanism of arylating quinone toxicity involving Michael adduct formation and induction of endoplasmic reticulum stress. **PNAS**, v.103, n.10, p. 3604-3609, 2006.

WARD, I. M.; CHEN, J. Histone H2AX is phosphorylated in an ATR-dependent manner in response to replicational stress. **The Journal of Biological Chemistry**, v.276, n.51, p.47759-47762, 2001.

WARD, I. M.; MINN, K.; CHEN, J. UV-induced ataxia-telangiectasia-mutated and Rad3-related (ATR) activation requires replication stress. **The Journal of Biological Chemistry**, v.279, n.11, p.9677-9980, 2004.

WEINBERG, R. A. **A biologia do Câncer**. São Paulo: Ed. Artmed, 2008.

WEISS, D. J. Drug-associated blood cell dyscrasias. **Compendium (Yardley, PA)**, v.34, n.6, p.1-8, 2012.

WHO. **World Health Organization**. Disponível em:

<<http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs297/en/>>. Acesso em: 21 set. 2012.

WILSON, D. F.; MERZ, R. Inhibition of mitochondrial respiration by uncouplers of oxidative phosphorylation. II. The site of inhibition of succinate oxidation by the uncouplers. **Archives of Biochemistry and Biophysics**, v.129, n.1, p.79-85, 1969.

WOODS, J. A. et al. Measurement of menadione-mediated DNA damage in human lymphocytes using the comet assay. **Free Radical Research**, v.26, n.2, p.113-124, 1997.

WU, H.-Q. et al. The molecular mechanisms involved in the cytotoxicity of alkannin derivatives. **European Journal of Medicinal Chemistry**, v.40, n.12, p.1341-1345, 2005.

XU, X.; PERSSON, H. L.; RICHARDSON, D. R. Molecular Pharmacology of the Interaction of Anthracyclines with Iron. **Molecular Pharmacology**, v.68, n. 2, p.261-271, 2005.

YAJIMA, A. et al. Synthesis and absolute configuration of cordiaquinone K, antifungal and larvicidal meroterpenoid isolated from the Panamanian plant, *Cordia curassavica*. **Tetrahedron Letters**, v.44, n.36, p.6915-6918, 2003.

YAO, K. S. et al. Evidence for altered regulation of gamma-glutamylcysteine synthetase gene expression among cisplatin-sensitive and cisplatin-resistant human ovarian cancer cell lines. **Cancer Research**, v.55, n.19, p.4367-4374, 1995.

ZAFARULLAH, M. et al. Molecular mechanisms of N-acetylcysteine actions. **Cellular and Molecular Life Sciences**, v.60, p. 6-20, 2003.

ZHANG, G. et al. Syntheses and Biological Activities of 3'-Azido Disaccharide Analogues of Daunorubicin against. **Journal of Medicinal Chemistry**, v.49, p.1792-1799, 2006.

ZHANG, M. et al. BAPTA blocks DNA fragmentation and chromatin condensation downstream of caspase-3 and DFF activation in HT-induced apoptosis in HL-60 cells. **Apoptosis**, v.6, n.4, p.2001.

ZHANG, Y.-W. et al. Genotoxic stress targets human Chk1 for degradation by the ubiquitin-proteasome pathway. **Molecular Cell**, v.19, n.5, p. 607-618, 2005.

ZHU, W.-H.; LOH, T. Roles of calcium in the regulation of apoptosis in he-60 promyelocytic leukemia cells. **Science**, v.57, n.23, p.2091-2099, 1995.

ZHU, Y. et al. Targeting DNA repair pathways: a novel approach to reduce cancer therapeutic resistance. **Cancer Treatment Reviews**, v.35, n.7, p.590-596, 2009.

ZITVOGEL, L. et al. Immunological aspects of cancer chemotherapy. **Nature Reviews/ Immunology**, v.8, n.1, p.59-73, 2008.

ZOPPOLI, G. et al. Coordinated regulation of mitochondrial topoisomerase IB with mitochondrial nuclear encoded genes and MYC. **Nucleic Acids Research**, v.39, n.15, p.6620-6632, 2011.

ANEXO A
SOLUÇÕES E KITS

Cultura de Células

PBS (Phosphate Buffer Solution; pH 7,2)

NaCl	0,15M
Na ₂ HPO ₄	10mM
KH ₂ PO ₄	2mM

Constituição do meio de cultura RPMI 1640 (Gibco)

Sais inorgânicos:

Ca(NO ₃) ₂ .4H ₂ O	100,00	MgSO ₄ .7H ₂ O	100,00	NaHCO ₃	2.000,00
KCl	400,00	NaCl	6.000,00	Na ₂ HPO ₄	800,00

Aminoácidos:

L-arginina.HCl	200,00	L-hidroxiprolina	15,00	L-prolina	20,00
L-asparigina.H ₂ O	50,00	L-isoleucina	20,00	L-tirosina	28,00
L-ácido aspártico	20,00	L-leucina	50,00	L-serina	30,00
L-cistina	50,00	L-lisina.HCl	40,00	L-valina	20,00
L-ácidoglutâmico	20,00	L-metionina	15,00	L-treonina	20,00
L-glutamina	300,00	L-fenilalanina	15,00	L-triptofano	5,00
L-histidina.HCl.H ₂ O	10,00				

Vitaminas:

biotina	0,200	ácido p-aminobenzóico	1,000	ácido fólico	1,000
pantotenato de cálcio	0,250	piridoxina.HCl	1,000	inositol	35,000
cloreto de colina	3,000	riboflavina	0,200	nicotinamida	1,000
tiamina.HCl	1,000	vitaminaB12	0,005		

Outros componentes:

glicose	2.000,00	glutathione	1,00	vermelho de fenol	5,00
---------	----------	-------------	------	-------------------	------

Estudos por Citometria de FluxoSolução PI-ciclo

Iodeto de propídeo (Sigma)	50mg/mL em PBS
Citrato de sódio	0,2%
Triton X-100	0,1%

Solução de Rodamina 123

Solução estoque:

Rodamina 123 (Sigma)	1mg/mL em EtOH
----------------------------	----------------

Solução de uso:

“Solução estoque”	1:1000 em PBS
-------------------------	---------------

Composição do reagente Guava® Caspase 8 FAM Kit (Guava Technologies)

Caspase 8 FAM

7-AAD

Composição do reagente Guava® Caspase 9 FAM Kit (Guava Technologies)

Caspase 9 FAM

7-AAD

Estudos EletroquímicosTampão acetate pH 4,5

AcONa (nuclear).....	1M
AcOH (Vetec).....	1M
H ₂ O milliQ.....	qsp 100mL

Teste do CometaTampão de lise (pH 10,0)

Tris (PlusOne)	100mM
EDTA	25mM
NaCl	5M
N-lauroil sarcosina	1%

Triton X-100 1%

DMSO 10%

Tampão de corrida alcalino (pH 8,5)

Tris (PlusOne)..... 100mM

Acetato de sódio 300mM

Western Blot

Solução de acrilamida/bisacrilamida 30.8%

Acrilamida (PlusOne) 30% em dH₂O

Bisacrilamida (PlusOne) 0,8% em dH₂O

Tampão de corrida (pH 8,3)

Tris (PlusOne) 25mM

Glicina (PlusOne) 0,192M

SDS (Fisher Scientific) 0,1%

Tampão de transferência

Tris (PlusOne) 25mM

Glicina (PlusOne) 0,192M

MeOH 20%

Tampão de revelação (pH 9,5)

Tris (PlusOne) 50mM

MgCl₂ 5mM

NaCl 0,15M

Composição do tampão de lise RIPA *Lysis Buffer* (Santa Cruz Biotechnology)

Nonidet P-40 1% em TBS

Deoxicolado de sódio 0,5%

SDS 0,1%

Azida sódica 0,004%

Composição do tampão de amostra *Blue Juice* (10X; Invitrogen)

Tris-HCl (pH 7,5) 10mM

EDTA 10mM

Sacarose 65%

Azul de bromofenol 0,3%

Componentes do kit para dosagem de proteínas *DC Protein Assay* (Bio-Rad Laboratories)

Reagent A Solução alcalina de tartarato de Cu

Reagent B Reagente de Folin

Reagent S

In vivo (Sarcoma -180)

PBS (Phosphate Buffer Solution; pH 7,2)

NaCl 0,15M

Na₂HPO₄ 10mM

Composição da solução de Ringer com Lactato (Laboratórios biosintética[®])

Cloreto de sódio..... 0,6g

Cloreto de Potássio..... 0,03g

Cloreto de cálcio 2H₂O..... 0,02g

Lactato de sódio..... 0,03g

Solução Salina (Vetec)..... 0,9%

Sulfato de gentamicina (Sigma)..... 5mg/mL

Hematoxilina de Harris (Doles)..... 0,1%

Solução de Eosina

Eosina (Vetec) 0,5%

EtOH 80% em dH₂O

Ácido acético glacial 0,5%

ANEXO B
EQUIPAMENTOS

Agitador de placa, MLW Modelo Thys 2®

Agitador de tubo, Donner AD 8850®

Banho-maria, DELTA Modelo 105Di®

Bomba à vácuo, EXIMPUMP®

Citoentrífuga, CT-2000 CIENTEC®

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®

Contador automático de células sanguíneas Coulter Counter T-530®

Deonizador de água Milli-Q, Milipore®

Espectrofotômetro de placa DTX-880, Beckman Coulter®

Estantes de ventilação, ALESCO®

Fluxo laminar, VECO®

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

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

Beckman Coulter®

Microondas, Panasonic®

Microscópio óptico, Metrimpex Hungary/PZO-Labimex Modelo Studar lab®

Microscópio óptico de inversão, Nikon Diaphot®

Micrótomo, SLEE Mainz®

Mini Protean® tetra cell, Biorad®

Mini Trans-Blot® Electrophoretic Transfer Cell, Biorad®

pHmetro, Micronal B474®

Pipetas automáticas, Gilson®

PowerPac™ HC High-Current Power Supply, Biorad®

Sistema de Eletroforese Horizontal mini Submarine, Amersham Biosciences®

Sistema de Fotodocumentação, ImageQuant 300 Imager GE Healthcare®

ANEXO C
MATERIAL BIOLÓGICO

Células mononucleares de sangue periférico humano isoladas de voluntários sadios;

Camundongos albinos Swiss *Mus musculus*;

Células Tumorais Sarcoma-180, mantidas em camundongos Swiss *Mus musculus*;

Linhagens celulares mantidas em cultura (**Tabela 1**).

ANEXO D**APROVAÇÃO COMITÊ DE ÉTICA ANIMAL**

Universidade Federal do Ceará
Comissão de Ética em Pesquisa Animal – CEPA
Rua: Coronel Nunes de Melo, 1127 Rodolfo Teófilo
Cep: 60430-970 Fortaleza-CE
Tel: (85) 3366-8331 Fax (85) 3366-8333

DECLARAÇÃO

Declaramos que o protocolo para uso de animais em experimentação nº35/10, sobre o projeto intitulado: **“POTENCIAL ANTICÂNCER DA CORDIAQUINONA J MOLÉCULA NATURAL, ISOLADA DAS RAÍZES DE *Cordia Leucocephala* MORIC; ESTUDOS DE MECANISMO DE AÇÃO, EFICÁCIA E TOXICIDADE.** De responsabilidade da Professora Dra. Letícia Vera Costa Lotufo e está de acordo com os Princípios Éticos na Experimentação Animal adotados pelo Colégio Brasileiro de Experimentação Animal (COBEA).

Declaramos ainda que o referido projeto foi aprovado pela Comissão de Ética em Pesquisa Animal CEPA em reunião realizada em 09 de setembro de 2010.

Assinatura manuscrita em tinta preta, aparentemente de Letícia Vera Costa Lotufo.

Fortaleza, 7 de outubro de 2010.

Assinatura manuscrita em tinta preta, aparentemente de Nylane Maria Nunes de Alencar.

Profa. Dra. Nylane Maria Nunes de Alencar
Coordenadora da Comissão de Ética em Pesquisa Animal - CEPA