



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

**ESTUDO DO MECANISMO DE CITOTOXICIDADE DA ONCOCALIXONA-A EM
LEUCEMIA PROMIELOCÍTICA HUMANA – LINHAGEM HL-60**

ALINE BORBA SBARDELOTTO

FORTALEZA - CE

2013

**ESTUDO DO MECANISMO DE CITOTOXICIDADE DA ONCOCALIXONA-A
EM LEUCEMIA PROMIELOCÍTICA HUMANA – LINHAGEM HL-60**

Dissertação 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 Mestre em Farmacologia.

Orientadora: Profa. Dra. Claudia do Ó Pessoa

FORTALEZA - CE

2013

**ESTUDO DO MECANISMO DE CITOTOXICIDADE DA ONCOCALIXONA-A
EM LEUCEMIA PROMIELOCÍTICA HUMANA – LINHAGEM HL-60**

Dissertação submetida à coordenação do programa de Pós-graduação em Farmacologia como parte dos requisitos necessários para a obtenção do título de mestre em Farmacologia outorgado pela Universidade Federal do Ceará. A citação de qualquer trecho deste trabalho é permitida, desde que seja feita em conformidade com as normas da ética científica. Aprovada em 29/04/2013

BANCA EXAMINADORA

Profa. Dra. Cláudia do Ó Pessoa

(Orientadora) Universidade Federal do Ceará

Prof. Dr. Paulo Michel Pinheiro Ferreira (Co-Orientador)

Universidade Federal do Piauí

Profa. Dra. Ana Paula Ribeiro Rodrigues

Universidade Estadual do Ceará

Dr. Marcos Roberto Lourenzoni

Fundação Oswaldo Cruz - Ceará

Dedico ao meu amigo, Bruno Barros Bukvic (em memória), quem me inspirou a iniciar este trabalho;

aos meus pais, Gentil e Suely, que me permitiram concluir este trabalho.

AGRADECIMENTOS

Este trabalho foi realizado graças ao auxílio das seguintes instituições:

- 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.

Agradeço à Deus, por me mandar ao Ceará, permitir que acordasse todos os dias com saúde e conhecesse tantas pessoas maravilhosas...

À **Dra. Cláudia do Ó Pessoa**, pelo exemplo de orientadora, professora e gestora, pela coragem com que enfrenta os desafios e nos inspira a querer sempre mais. Agradeço a confiança e oportunidade de começar e continuar como sua orientanda; a amizade, incentivo, ajuda, por contribuir na minha formação acadêmica e pessoal.

À **Dr. Manoel Odorico de Moraes**, pela chance de fazer parte do LOE, por criar oportunidades e acreditar no potencial das pessoas; por todas as contribuições à pesquisa do laboratório.

À **Dra. Leticia Veras Costa-Lotuf** pelas aulas, apoio ao estudo e estímulo de buscar e aperfeiçoar à pesquisa.

Ao **Dr. Paulo Michel Ferreira**, pela paciência e bom humor em me co-orientar, mesmo quando parecia que não daria certo... Agradeço o exemplo de esforço e dedicação ao trabalho, aos alunos, aos projetos, aos artigos e ao calor de Picos!

Ao **Dr. Bruno Cavalcanti** e **Dr. Washington Soares**, que sem hesitar, me disponibilizaram os resultados e ajudaram a continuar o projeto, que de uma forma paradoxal me estimularam a conhecer os caminhos da fé e da ciência, do trabalho e da pesquisa, do estudo constante e intenso para um dia eu chegar onde estão.

À **Dr. Otília Deusdênia Loiola Pessoa**, pela extração e fornecimento do composto estudado e dúvidas esclarecidas. Bem como ao **Dr. Vagnaldo Fechine**, pela paciência no ensino da angiogênese e cultivo dos ovos.

Aos **professores do Departamento** de Fisiologia e Farmacologia, com quem tanto aprendi e discuti Filosofia, Imunologia, Tóxicologia, Patentes, Óxido Nítrico...

Aos amigos que construí e, agora, fazem parte de mim... **Gabriella**, a todas refeições lights e esportes praticados, por me ensinar a rezar o terço e permitir que encontremos conforto espiritual nos momentos de dor; por me acompanhar em tudo:

banhos de mar, confissões, festas, Brasília, Rio. **Patrícia Marçal**, por fazer parte da sua família linda e compartilhar de tanta energia positiva, auto-astral; me ensinar os valores da riqueza, do bom marido, da mulher moderna, da ciência nacional. **Paula Abreu**, aos momentos de reflexão sobre os dramas da profissão, sobre o empenho nos estudos e na arte de ser mais observadora e paciente, por encontrar os melhores restaurantes da cidade, as serras e cachoeiras do Ceará. **Bruno Soares**, pela gentileza e humildade de estar sempre disposto a ajudar, por ensinar a ressignificância das adversidades, por ser uma ótima companhia para calzones e estudos. **Assuero**, por lembrar que o mundo gira e estamos em constante modificação, por querer sempre mais e mais longe, com disposição para aprender e viver. **Danielle Foschette**, corajosa, sincera, exemplo de superação e de que o militarismo pode nos ensinar alguma coisa. **Diogo**, por me apresentar o mundo dos receptores e compartilhar as mesmas indagações. **Igor**, pela perseverança e persistência, e mostrar o que o Baiano tem! **Delano** e **Ana Jérсия**, por todas as aulas de boas práticas laboratoriais e metodológicas, e paciência de ensinar tudo de novo! **Danilo Rocha**, pelo exemplo de Dr. Pai. **Paula Jimenez**, por encontrar meu “brilho”. **Adriana Carvalho**, pelos batuques, sambas, alegrias. **Felipe Rocha**, pela ótima companhia. **Arinice, Eveline, Daisy, Cecília, Kristina Mousinho, Aline Martins, Hemerson Yuri, prof. Hidenburgo, Prof. Diego Veras, Milena, Elthon, Daniel Pascoalino, Sabrina, Synara**, agradeço a todos os momentos que passamos juntos, às aventuras dentro e fora do laboratório, experimentos compartilhados, tristeza, alegria, caranguejos pacientemente comidos, copa do mundo e ano novos comemorados, enfim, inesquecíveis...

Às funcionárias mais simpáticas, **Silvana França, Erivanda França, Eveline, Adelânia Roque, Sheila Prado, Rogéria, Gracinha**, que me ajudaram na falta de mãe.

À **Áura** e **Márcia** pela prontidão e disponibilidade.

À minha **família, tia Fátima e Vivi**, pelo apoio, “paitrocínio”, passagens à Brasília, visitas em Fortaleza, amor incondicional, refeições prontas, pães de queijo, telefonemas, e crença de que sou capaz. Especial à minha irmã linda que tanto amo e quero bem.

Ao **Henrique** por apoiar todos os meus passos e ser o melhor companheiro da vida!

A todos os amigos e familiares que me visitam e levaram energia suficiente para matar a saudade. E finalmente, aos amigos do projeto Rodon, Biologia, Turma B, aos Bombeiros Delta e do 22º GBM, que me aturaram todos os dias, reclamando de como gostaria voltar para Fortaleza.

“Não é o mais forte que sobrevive, nem o mais inteligente, mas o que melhor se adapta às mudanças”

Charles Darwin

RESUMO

ESTUDO DO MECANISMO DE CITOTOXICIDADE DA ONCOCALIXONA-A EM LEUCEMIA PROMIELOCÍTICA HUMANA – LINHAGEM HL-60

Auxemma oncoalyx Taub pertence a família das Boraginaceae, é conhecida como “pau branco” e frequentemente encontrada no estado do Ceará. A casca da árvore é um adstringente e popularmente utilizado no tratamento de feridas. Oncocalixona A (Onco-A), uma quinona isolada do extrato etílico da *A. oncoalyx*, possui uma série de propriedades farmacológicas, tais como: analgésica, anti-inflamatória, antioxidante, citotóxica e antitumoral. O presente estudo foi realizado para avaliar os efeitos citotóxicos da Onco-A na linhagem tumoral promielocítica, HL-60. O potencial citotóxico foi avaliado pelo teste colorimétrico de análise indireta, MTT, depois de 24 horas de exposição das células HL-60 às concentrações crescentes (8, 16,5 e 33 μM) da Onco-A. Após o tratamento, os procedimentos experimentais realizados para identificar os mecanismos de ação *in vitro* (no citômetro de fluxo) foram de viabilidade celular, externalização da fosfatidilserina, fragmentação do DNA intercucleossomal, identificação da via apoptótica, geração de espécie reativa de oxigênio; os experimentos de análise morfológica foram com azul de tripan, May-Grunwald-Giemsa, e laranja de acridina/ brometo de etídio; a integridade do DNA pelo teste cometa e também avaliado a interação da Onco-A com enzima topoisomerase. Resultados: de acordo com o teste do MTT, Onco-A apresentou significativa citotoxicidade nas linhagem HL-60 (IC_{50} 11 μM). As análises dos experimentos demonstraram que as células tratadas com a menor concentração de Onco-A tiveram redução no volume celular, formação de corpos apoptóticos, condensação da cromatina, externalização de fosfatidilserina, redução da viabilidade celular e fragmentação do DNA. Onco-A causou despolarização mitocondrial, ativou caspase iniciadoras -9 e -8, e as efetoras -3 e -7, clivou a proteína Poli ADP-Ribose polimerase – via intrínseca e extrínseca. Apesar de nossos resultados demonstrarem que nenhuma das doses foi capaz de gerar espécies reativas de oxigênio, depois de pré-tratadas por 1 hora com N-Acetilcisteína, a citotoxicidade da Onco-A foi alterada, apresentando aumento na integridade da membrana, diminuição na fragmentação do DNA, parada na fase do ciclo celular G2/M e baixo nível de dano no DNA. Embora a Onco-A não interaja com as enzimas topoisomerasas, os dados apresentados sugerem que seu alvo, como aceptor de Michael, pode ser a molécula de DNA. Esses resultados sugerem que a apoptose é uma importante forma de morte celular causada pela Onco-A, e reforça que o composto pode ser um protótipo para o tratamento do câncer. **Palavras-chave:** Oncocalixona, atividade citotóxica, apoptose, DNA.

ABSTRACT**STUDY OF CYTOTOXICITY MECHANISM OF ONCOCALYXONA A AGAINST HUMAN PROMYELOCYTIC LEUKEMIA CELL – LINE HL-60**

Auxemma oncocalyx Taub. belongs to the Boraginaceae family. It is known as “pau branco” and is frequently found in the State of Ceará. The skin of that tree is an astringent and is commonly used as a medicine for wounds. Oncocalyxone A (Onco-A) is a quinone isolated from the ethanolic extract of *A. oncocalyx*, it has exhibited a series of pharmacological properties, such as analgesic, anti-inflammatory, antioxidant, cytotoxic and antitumor properties. The present study tried to provide a basic set of data on the cytotoxic effects of Onco-A against human promyelocytic leukemia cell line HL-60. The cytotoxic potential of Onco-A was evaluated by the MTT assay, colorimetric analysis, after 24 hours exposure in HL-60 cells with increasing concentrations (8, 16,5 e 33 μM). After the cells were exposure, there were performed experiments to identify the mechanisms of action in vitro (flow cytometry) by the cellular viability, phosphatidyl externalization, internucleosomal DNA fragmentation, identifying apoptotic pathway; the experiments to morphological analysis were made with tripan blue, May-Grunwald-Giemsa, and acridine orange/ethidium bromide; DNA integrity's test by cometa assay; and the avaliation of interection of enzyme topoisomerase with Onco-A. Results: according to MTT test results, Onco-A showed a significant cytotoxic activity against HL-60 cells (IC_{50} 11 μM). In addition, morphological analysis of cells treated with lower concentration of Onco – A demonstrated that there were reduction in cell's volume, formation of apoptotic bodies, chromatin condensation, phosphatidylserine externalization, also reduction of cell viability and DNA fragmentation. The Onco-A caused mitochondrial depolarization, activated caspase starters -9 and -8, and the effectors -3 and -7, cleaved Poly ADP-Ribose polymerase – intrinsic and extrinsic pathways. Although our results had shown that none of the doses was able to generate Reactive Oxygen Species, after pre-treated for 1 hour with N-acetylcysteine, the cytotoxicity of Onco-A was changed, an increase in membrane integrity, decreased DNA fragmentation, drag on the G2/M cell cycle phase and low levels of DNA damage. Besides the Onco-A does not interact with the enzyme topoisomerase, the data suggest that their target as Michael acceptor, can be the DNA. These results suggest that apoptosis is one of the major forms of cell's death caused by Onco-A, and reinforces the compound may be a prototype for cancer therapy.

Key-word: Oncocalyxona, cytotoxic activity, apoptosis, DNA.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Agentes anticâncer derivados de plantas usados na medicina tradicional. Fonte: Cragg e Newman (2013). S: composto sintético sem origem de produto natural; S/NM: composto sintético mostrando inibição competitiva a substrato de produto natural; S*: composto sintético com produto natural farmacóforo; S*/NM: composto sintético com produto natural farmacóforo mostrando inibição competitiva a substrato de produto natural; N: produto natural não modificado; NB: produtos naturais botânicos; ND: moléculas modificadas.....	21
Figura 2. Classificação de quinonas de acordo com o sistema aromático. Fonte: Da Silva, 2007.....	23
Figura 3. Publicação de artigos científicos das atividades biológicas das benzoquinonas ao longo dos anos	24
Figura 4. Publicação de artigos científicos das atividades biológicas das benzoquinonas em diferentes países	25
Figura 5. Relação de patentes com benzoquinonas e sua bioatividade.....	25
Figura 6. Marcos do câncer. Fonte: Hanahan e Weinberg (2011), com algumas adaptações	27
Figura 7. Redução de quinonas (Q) via 1 e 2 elétrons, gerando semiquinonas (Q-) e hidroquinonas (QH ₂). Fonte: Moura (2008) e Ross et al. (2000), com algumas adaptações...	28
Figura 8. Esquema de metabolização da 1,4 benzoquinona pela citocromo (P450 2E1), quinona oxidoreductase (NQO1), mieloperoxidase (MPO). Fonte: Lindsey et al. (2004), com algumas adaptações	29
Figura 9. Relaxamento de DNA causado por topoisomerase I. Fonte: Pommier et al. (2010)	31
Figura 10. Representação do ciclo celular e detecção pelo citômetro do fluxo. Fonte: < http://www.flow-cytometry.us >.....	32
Figura 11. Características morfológicas da apoptose e necrose. Fonte: Grivicich et al. (2007), com algumas adaptações.....	34
Figura 12. Mecanismo de apoptose: via do receptor de morte (extrínseca) e via mitocôndrial (intrínseca). Fonte: Huerta et al., 2007, com algumas adaptações.	35
Figura 13. Estrutura química da Oncocalixona-A.....	36
Figura 14. Padrão de escores determinados pelo tamanho e intensidade da cauda do DNA após eletroforese para o ensaio cometa.....	53
Figura 15. Viabilidade de células leucêmicas da linhagem HL-60 após 24 h de tratamento com a Oncocalixona A (8, 16,5 e 33 µM) (Onco-A). A - Teste de azul de tripan; B – Marcação com iodeto de propídeo e avaliação por citometria de fluxo. O controle negativo foi tratado apenas com o veículo utilizado para a diluição da substância (DMSO	

0,1 %). O quimioterápico doxorrubicina (0,6 μM) foi usado como controle positivo (Dox). Os valores correspondem à média \pm D.P.M. de experimentos independentes (n = 3). * $p < 0,05$ comparado ao controle por ANOVA seguido por *Dunnet* 56

Figura 16. Morfologia de células leucêmicas da linhagem HL-60 após 24h de tratamento com Oncocalixona A (8, 16,5 e 33 μM) (Onco-A) e análise por citometria de fluxo com iodeto de propídeo. O controle negativo foi tratado apenas com o veículo utilizado para a diluição da substância (DMSO 0,1 %). O quimioterápico doxorrubicina (0,6 μM) foi usado como controle positivo (Dox). Os valores correspondem à média \pm D.P.M. de experimentos independentes (n = 3). * $p < 0,05$ comparado ao controle por ANOVA seguido por *Dunnet*. Gráficos obtidos pelo *Guava Expresses Plus Software* e analisados no programa *FlowJo_V10* 57

Figura 17. Viabilidade de células leucêmicas da linhagem HL-60 após 24h de tratamento com Oncocalixona A (8, 16,5 e 33 μM) (Onco-A) coradas com Brometo de etídeo/Laranja de acridina determinado por microscopia de fluorescência. O controle negativo (C) foi tratado apenas com o veículo utilizado para a diluição da substância (DMSO 0,1 %). O quimioterápico doxorrubicina (0,6 μM) foi usado como controle positivo (Dox). Os valores correspondem à média \pm D.P.M. de experimentos independentes (n = 3). * $p < 0,05$ comparado com o grupo controle negativo por ANOVA seguido por *Dunnett*. 58

Figura 18. Morfologia de células leucêmicas da linhagem HL-60 após 24h de tratamento com Oncocalixona A (8, 16,5 e 33 μM) (Onco-A) coradas com May-Grünwald-Giemsa e visualizadas por microscopia óptica. O controle negativo foi tratado apenas com o veículo utilizado para a diluição da substância (DMSO 0,1 %). O quimioterápico doxorrubicina (0,6 μM) foi usado como controle positivo (Dox). Os valores correspondem à média \pm D.P.M. de experimentos independentes (n = 3). Aspectos morfológicos observados: () redução do volume, () desintegração da membrana plasmáticas, () restos celulares 59

Figura 19. Externalização de fosfatidilserina em células leucêmicas da linhagem HL-60 após 24h de tratamento com Oncocalixona A (8, 16,5 e 33 μM) (Onco-A) marcadas com 7-Amino-Actinomicina-D (7-AAD e pela fluoresceína (FITC) conjugada a anexina V. O controle negativo (C) foi tratado apenas com o veículo utilizado para a diluição da substância (DMSO 0,1 %). O quimioterápico doxorrubicina (0,6 μM) foi usado como controle positivo (Dox). Os valores correspondem à média \pm S.E.M. de experimentos independentes (n = 3). * $p < 0,05$ comparado com o grupo controle negativo por ANOVA seguido por *Dunnett* 60

Figura 20. Despolarização mitocondrial em células leucêmicas da linhagem HL-60 após 24h de tratamento com Oncocalixona A (8, 16,5 e 33 μM) (Onco-A) marcadas com rodamina 123. O controle negativo (C) foi tratado apenas com o veículo utilizado para a diluição da substância (DMSO 0,1 %). O quimioterápico doxorrubicina (0,6 μM) foi usado como controle positivo (Dox). Os valores correspondem à média \pm D.P.M. de experimentos independentes (n = 3). * $p < 0,05$ comparado com o grupo controle negativo por ANOVA seguido por *Dunnett* 61

Figura 21. Ativação das caspases-9 (A) e caspase-8 (B) em células leucêmicas da linhagem HL-60 após 24h de tratamento com Oncocalixona A (8, 16,5 e 33 μM) (Onco-A) e avaliada por citometria de fluxo (iodeto de propídeo e FAM) e por *Western blotting* (16,5 μM). O

controle negativo (C) foi tratado apenas com o veículo utilizado para a diluição da substância (DMSO 0,1 %). O quimioterápico doxorrubicina (0,6 μM) foi usado como controle positivo (Dox). Os valores correspondem à média \pm D.P.M. de experimentos independentes (n = 3). *p<0,05 comparado com o grupo controle negativo por ANOVA seguido por Dunnett. β -actina foi usada como padrão eletroforético 62

Figura 22. Efeito Ativação das caspases-3 e -7 em células leucêmicas da linhagem HL-60 após 24h de tratamento com Oncocalixona A (8, 16,5 e 33 μM) (Onco-A) e avaliada por citometria de fluxo (iodeto de propídeo e FLICATM). O controle negativo (C) foi tratado apenas com o veículo utilizado para a diluição da substância (DMSO 0,1 %). O quimioterápico doxorrubicina (0,6 μM) foi usado como controle positivo (Dox). Os valores correspondem à média \pm D.P.M. de experimentos independentes (n = 3). *p<0,05 comparado com o grupo controle negativo por ANOVA seguido por Dunnett. β - actina usada como padrão eletroforético..... 62

Figura 23. Expressão de PARP (poli ADP-ribose polimerase) íntegro e clivado em células leucêmicas da linhagem HL-60 após 24h de tratamento com Oncocalixona A (16,5 μM) por *Western blotting*. O controle negativo (C) foi tratado apenas com o veículo utilizado para a diluição da substância (DMSO 0,1 %). O quimioterápico doxorrubicina (0,6 μM) foi usado como controle positivo (Dox). β - actina foi usada como padrão eletroforético..... 63

Figura 24. Padrão de escore da cauda do DNA de células leucêmicas da linhagem HL-60 após 24h de tratamento com Oncocalixona A (8, 16,5 e 33 μM) (Onco-A) determinado pelo Ensaio do Cometa, visualizado com brometo de etídeo e avaliado por microscopia de fluorescência em luz ultravioleta, levando em consideração a classe de dano ao DNA (0, 1, 2, 3 e 4). O controle negativo (C) foi tratado apenas com o veículo utilizado para a diluição da substância (DMSO 0,1 %). O quimioterápico doxorrubicina (0,6 μM) foi usado como controle positivo (Dox). Os valores correspondem à média \pm D.P.M. de experimentos independentes (n = 3). *p<0,05 comparado com o grupo controle negativo por ANOVA seguido por Dunnett..... 64

Figura 25. Viabilidade de células leucêmicas da linhagem HL-60 pré-tratadas por 1 h com N-acetilcisteína (NAC, 4 mM), incubadas por 24 h com Oncocalixona A (8, 16,5 e 33 μM) (Onco-A), marcadas com iodeto de propídeo e avaliadas por citometria de fluxo. O controle negativo foi tratado apenas com o veículo utilizado para a diluição da substância (DMSO 0,1 %). O quimioterápico doxorrubicina (0,6 μM) foi usado como controle positivo (Dox). Os valores correspondem à média \pm D.P.M. de experimentos independentes (n = 3). * p<0.05 comparado ao controle por ANOVA seguido por *Dunnet* 65

Figura 26. Ciclo celular de células leucêmicas da linhagem HL-60 pré-tratadas por 1 h com N-acetilcisteína (NAC, 4 mM), incubadas por 24 h com Oncocalixona A (8, 16,5 e 33 μM) (Onco-A), marcadas com iodeto de propídeo e avaliadas por citometria de fluxo. O controle negativo foi tratado apenas com o veículo utilizado para a diluição da substância (DMSO 0,1 %). O quimioterápico doxorrubicina (0,6 μM) foi usado como controle positivo (Dox). Os valores correspondem à média \pm D.P.M. de experimentos independentes (n = 3). * p<0.05 comparado ao controle por ANOVA seguido por *Dunnet*. Os dados analisados e apresentados pelo programa *ModFit LT 3.1 software (Verity software house)*. Legenda: Sub-

G1, 1° pico : G1, 2° pico :G2, S	66
Figura 27. Fases Sub-G1 (A) e G2/M (B) do ciclo celular de células leucêmicas da linhagem HL-60 pré-tratadas por 1 h com N-acetilcisteína (NAC, 4 mM), incubadas por 24 h com Oncocalixona A (8, 16,5 e 33 µM) (Onco-A), marcadas com iodeto de propídeo e avaliadas por citometria de fluxo. O controle negativo foi tratado apenas com o veículo utilizado para a diluição da substância (DMSO 0,1 %). O quimioterápico doxorrubicina (0,6 µM) foi usado como controle positivo (Dox). Os valores correspondem à média ± D.P.M. de experimentos independentes (n = 3). * p<0.05 comparado ao controle por ANOVA seguido por <i>Dunnet</i> . Os dados analisados pelo programa <i>ModFit LT 3.1 software (Verity software house)</i>	67
Figura 28. Índice Índice de Dano (ID) ao DNA determinado através do Ensaio do Cometa alcalino em células leucêmicas da linhagem HL-60 pré-tratadas por 1 h com N-acetilcisteína (NAC, 4 mM), incubadas por 24 h com Oncocalixona A (8, 16,5 e 33 µM) (Onco-A), visualizadas com brometo de etídeo e avaliadas microscopia de fluorescência em luz ultravioleta. O controle negativo foi tratado apenas com o veículo utilizado para a diluição da substância (DMSO 0,1 %). O quimioterápico doxorrubicina (0,6 µM) foi usado como controle positivo (Dox). Os valores correspondem à média ± D.P.M. de experimentos independentes (n = 3). * p<0.05 comparado ao controle por ANOVA seguido por <i>Dunnet</i> . Os escores foram obtidos pela multiplicação do número de células de cada classe (0, 1, 2, 3 e 4) pelo classe de dano, variando de 0 (sem danos) a 400 (dano máximo).....	68
Figura 29. Padrão de escore da cauda do DNA de células leucêmicas da linhagem HL-60 pré-tratadas por 1 h com N-acetilcisteína (NAC, 4 mM), incubadas por 24 h com Oncocalixona A (8, 16,5 e 33 µM) (Onco-A) determinado pelo Ensaio do Cometa alcalino, visualizado com brometo de etídeo e avaliado por microscopia de fluorescência em luz ultravioleta, levando em consideração a classe de dano ao DNA (0, 1, 2, 3 e 4). O controle negativo (C) foi tratado apenas com o veículo utilizado para a diluição da substância (DMSO 0,1 %). O quimioterápico doxorrubicina (0,6 µM) foi usado como controle positivo (Dox). Os valores correspondem à média ± D.P.M. de experimentos independentes (n = 3). *p<0,05 comparado com o grupo controle negativo por ANOVA seguido por <i>Dunnett</i>	69
Figura 30. Efeito Geração de espécies reativos do oxigênio (EROs) em células leucêmicas da linhagem HL-60 após 1 e 3 h de tratamento com Oncocalixona A (8, 16,5 e 33 µM) (Onco-A), visualizada com diacetato 2'7'-diclorohidrofluoresceína (H ₂ -DCF-DA) e avaliado por citometria de fluxo. O controle negativo foi tratado apenas com o veículo utilizado para a diluição da substância (DMSO 0,1 %). O quimioterápico doxorrubicina (0,6 µM) foi usado como controle positivo (Dox). Os valores correspondem à média ± D.P.M. de experimentos independentes (n = 3). * p<0.05 comparado ao controle por ANOVA seguido por <i>Dunnet</i>	69
Figura 31. Análise dos efeitos da Oncocalixona A sobre as enzimas Topoisomerases I e II nas concentrações de 0,1, 1, 10 e 100 µM. Como controles positivos foram usados Camptotecina (CPT) e MJ-III-65 e VP-16 (inibidores da Topoisomerases I e II, respectivamente)	70

LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Atividade citotóxica *in vitro* da Oncocalixona frente a linhagens tumorais e cultura primária de células mononucleares de sangue periférico pelo ensaio MTT..... 55

Tabela 2. Conteúdo de DNA nuclear de células leucêmicas da linhagem HL-60 após 24 h de incubação com Oncocalixona A (8, 16,5 e 33 μM) (Onco-A) quantificado por citometria de fluxo após marcação com iodeto de propídeo. O controle negativo (C) foi tratado apenas com o veículo utilizado para a diluição da substância (DMSO 0,1 %). O quimioterápico doxorrubicina (0,6 μM) foi usado como controle positivo (Dox) 64

LISTA DE SÍMBOLOS E ABREVIATURAS

®	Marca registrada
ANOVA	Analysys of Variance
BE/LA	Brometo de Etídio/ Laranja de acridina
CE₅₀	Concentração média capaz de provocar 50% do efeito máximo
CPT	Camptotecina
CMSP	Células mononucleares do sangue periférico
DCF	Diclorofluoresceína
DL₅₀	Dose Letal média capaz de matar 50% de população
DNA	Ácido desoxirribonucleico
DMSO	Dimetilsulfóxido
DOX	Doxorrubicina
EDTA	Ethylenediamine tetraacetic acid
E.P.M.	Erro Padrão da Média
EROs	Espécies reativas de oxigênio
FLICA	Fluorescent Labeled Inhibitor of Caspases
FSC	Forware SCatter
IC₅₀	Concentração Inibitória Média
ID	Índice de dano
IP	Iodeto de Propídio
H₂-DCF-DA	Diacetato 2'7'-diclorohidrofluoresceína
MTT	3-(4,5-dimetil-2-tiazol)-2,5-difenil-brometo de tetrazolium
NAC	N-acetilcisteína
PARP	Poli ADP-Ribose Polimerase
PBS	Phosphate Buffer Solution
PMM	Permeabilização da Membrana Mitocôndrial
PS	Fosfatidiserina
Q	Quadrante
RPMI	Roswell Parrk Memorial Institute Medium
SCGE	Single-cell gel electrophoresis
SSC	Side Scatter
TBS	Tris Buffer Solution
Top	Topoisomerase

VP-16

Etoposido

 $\Delta\psi_m$

Potencial da membrana mitocondrial interna

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO.....	19
	1.1 Plantas Mediciais para o Tratamento do Câncer.....	19
	1.2 Quinonas com Potencial Anticâncer.....	22
	1.3 Vias de apoptose como alvo terapêutico das quinonas.....	26
	1.3.1 Bioedução.....	27
	1.3.2 Agentes interagem com DNA.....	29
	1.4 Ciclo celular.....	31
	1.5 Apoptose.....	32
	1.6 Oncocalixona: Quinona com Potencial Quimioterápico.....	36
2	OBJETIVOS.....	38
	2.1 Geral.....	38
	2.2 Específicos.....	38
3	MATERIAIS E MÉTODOS.....	39
	3.1 Materiais utilizados.....	39
	Equipamentos.....	39
	Soluções e reagentes.....	39
	Programas.....	41
	3.2 Modelos Biológicos.....	41
	3.2.1 Obtenção das linhagens tumorais e cultivo.....	41
	3.2.2 Obtenção das células mononucleares do sangue periférico.....	41
	3.2.3 Obtenção de eritrócitos.....	41
	3.2.4 Isolamento da Oncocalixona A.....	42
	3.3 MÉTODOS.....	42
	3.3.1 Estudo de Citotoxicidade.....	42
	3.3.2 Estudo da atividade hemolítica em eritrócitos humanos no tratamento com Onco-A.....	43
	3.3.3 Estudos de Mecanismo de Ação <i>in vitro</i>	44
	3.3.3.1 Determinação da viabilidade celular em HL-60 no tratamento com Onco-A.....	45

3.3.3.2	Análise morfológica da HL-60 no tratamento com Onco-A.....	45
3.3.3.3	Análise morfológica por brometo de etídio/laranja de acridina.....	46
3.3.3.4	Estudos dos efeitos da Onco-a sobre a externalização da fosfatidilserina em células HL-60.....	47
3.3.3.5	Ativação de Caspases.....	47
3.3.3.6	Potencial Transmembrânico da Mitocôndria.....	48
3.3.3.7	Estudo da Progressão do Ciclo Celular.....	49
3.3.3.8	Determinação da geração de espécies reativas de oxigênio intracelular no tratamento com Onco-A em HL-60.....	50
3.3.4	Estudo proteômico da via apoptótica no tratamento com Onco-A em HL- 60.....	50
3.3.5	Avaliação do potencial genotóxico em células leucêmicas.....	52
3.3.6	Avaliação da Onco-A sobre as enzimas topoisomerase I e II.....	54
4	RESULTADOS.....	55
4.1	Atividade citotóxica e hemolítica da Oncocalixona A.....	55
4.2	Redução da viabilidade celular.....	55
4.3	Alterações morfológicas das células HL-60 no tratamento com Onco-A.....	57
4.4	Externalização da fosfatidilserina.....	60
4.5	Alteração do Potencial Mitocondrial ($\Delta\psi_m$) e Ativação de Caspases.....	60
4.6	Parada do Ciclo Celular em G0/G1 e Fragmentação de DNA.....	63
4.7	Genotoxicidade.....	64
4.8	Proteção da N-acetilcisteína contra danos celulares.....	65
4.8.1	Manutenção da Integridade de Membrana.....	65
4.8.2	Proteção contra Fragmentação de DNA e Alterações no Ciclo Celular.....	65
4.8.3	Ação Protetora contra Danos Genotóxicos.....	68
4.9	Avaliação da geração de espécies reativas de oxigênio intracelulares.....	69
4.10	Avaliação da Onco-A sobre as enzimas topoisomerase I e II.....	71
5	DISCUSSÃO.....	71
6	CONCLUSÃO.....	85
7	REFERÊNCIAS.....	86

1 INTRODUÇÃO

1.1 PLANTAS MEDICIAIS PARA O TRATAMENTO DO CÂNCER

Ao longo dos tempos, a natureza serviu como instrumento para as necessidades dos humanos, conforto e tratamento de um largo espectro de doenças (CRAGG et al., 2009). Na medicina egípcia, por exemplo, o registro conhecido "Papiro de Ebers", 1500 a.C., documenta mais de 700 drogas, principalmente de origem vegetal (BORCHARDT, 2002). O primeiro registro da Medicina Chinesa, cerca de 1100 a.C., de Er Shi Wu Bing Fang, contém 52 receitas (HUANG, 1999). A documentação dos indianos no sistema Ayurveda, de 1000 a.C., tem mais de 500 drogas (KAPOOR, 2000).

No antigo mundo ocidental, os gregos e romanos também fizeram contribuições substanciais para o desenvolvimento racional do uso de plantas medicinais (BORCHARDT, 2002). A preservação de grande parte da experiência greco-romana durante Idade Média pode ser atribuída aos árabes, que expandiram e incluíram o uso de seus próprios recursos junto com o conhecimento dos chineses e indianos (CRAGG et al., 2009). Permitiram o surgimento da indústria farmacêutica e com desenvolvimento de novas tecnologias, o progresso da medicina (JONES, 1996).

Desta maneira, a maioria dos medicamentos de origem natural elaborados, a partir de práticas terapêuticas, tinha sua atividade baseada nos processos de separação e purificação de produtos extraídos de plantas e/ou animais (MENEZES, 2005). Com o passar do tempo, esses medicamentos foram substituídos por produtos químicos sintéticos, exigindo crescente conhecimento científico o qual causou aumento dos gastos em pesquisa, favorecendo a melhoria dos medicamentos naturais e descoberta de novas drogas com eficientes propriedades farmacológicas (SOUZA, 2006).

A modernização nas etapas do desenvolvimento de novos medicamentos passou a envolver atividades de extração, purificação, síntese química, procedimentos de fermentação e o processo farmacêutico propriamente dito, com equipamentos e tecnologia de ponta (CAPANEMA, 2010). Por conseguinte, a tecnologia investida a partir do crescimento do mercado de fitoterápicos, estimado em cerca de US\$ 22 bilhões (3,7% do mercado global) acompanha o setor farmacêutico, sendo considerado um dos mais lucrativos no mundo (IMS, 2011). Desta maneira, são grandes os investimentos em biotecnologia e na busca de matérias primas, principalmente, os farmoquímicos (CAPANEMA, 2010).

O uso de fitoterápicos vem aumentando em todo o mundo como uma forma

adicional para tratar e prevenir doenças, especialmente, as doenças crônicas, tais como disfunções cardiovasculares, neurodegenerativas e câncer (FERREIRA et al., 2008; WHO, 2011). Embora exista um grande interesse por técnicas de síntese, semelhante à química combinatória, a prospecção de produtos naturais continua sendo uma fonte de novos fármacos, uma vez que cerca de 60% das novas entidades químicas (*New Chemical Entities* – NCE), registradas no período de 1981 a 2008, foram derivados de produtos naturais (BEATTIE, 2005; CRAGG et al., 2013).

Neste contexto, os produtos naturais continuam sendo a principal fonte de quimioterápicos antineoplásicos (CRAGG et al., 2013). De acordo com a **Figura 1**, 6% destes foram produtos naturais não modificados (N); poucos produtos naturais botânicos (NB); 28% foram moléculas modificadas (ND), 36% sintéticos (S) sem nenhuma base em produtos naturais); 5% foram compostos sintéticos com um farmacóforo produto natural (S*); 11% moléculas sintéticas com um farmacóforo produto natural com inibição competitiva (S*/NM) e 14% (S/NM) são representados por compostos sintéticos que mostram a inibição competitiva do substrato produto natural (NM). Assim, 36% das 1073 moléculas podem ser classificadas como verdadeiramente sintéticas, isto é, isentas de inspiração natural em sua origem.

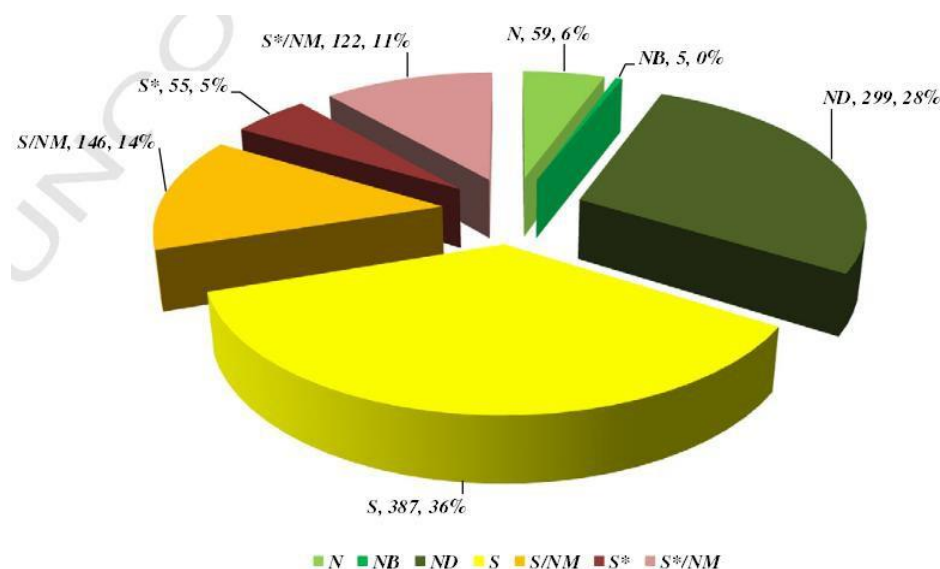
De acordo com os próprios autores, considerando as categorias de doenças para as pequenas moléculas 1073, 69% de anti-infecciosos (n= 195), que abrange anti-bacteriana,- fúngicos, parasitárias e -virais, são de origem natural ou inspirado (N; ND; S * S; * / NM;. S / NM). Na área de tratamento do câncer (n= 172), 75% estão nestas categorias, com a figura sendo 59% se a categoria S/ NM é excluído.

O câncer é definido como um conjunto de quase 200 tipos de enfermidades complexas, de caráter mutacional, proliferativo, de crescimento celular aberrante e descontrolado, em que células animais, de diferentes tipos presentes em um mesmo microambiente, invadem os tecidos e órgãos adjacentes, podendo espalhar-se (metástase) para regiões distantes do organismo (THOMPSON, 2002; KUMAR et al., 2004; INCA, 2013). Segundo a Organização Mundial de Saúde, o impacto global do câncer mais que dobrou nos últimos anos e o contínuo crescimento populacional, bem como seu envelhecimento, afetam de forma significativa os casos da doença, estimando-se 84 milhões de mortes entre 2005 e 2015 (WHO, 2011).

A quimioterapia, por sua vez, é um dos tipos de tratamento do câncer que envolve a utilização de fármacos de baixo peso molecular para destruir células tumorais ou pelo menos limitar a sua proliferação (NUSSBAUMER et al., 2011). Por ser tratar de uma

terapia sistêmica, a quimioterapia antineoplásica gera reações desagradáveis, como náuseas, vômitos, diarreia, queda de pêlos e ulcerações, efeitos que afetam a aparência física do paciente e geram sérios problemas emocionais (SOUZA & SANTO, 2008).

Figura 1. Agentes anticâncer derivados de plantas usados na medicina tradicional. Fonte: Cragg e Newman (2013). S: composto sintético sem origem de produto natural; S/NM: composto sintético mostrando inibição competitiva a substrato de produto natural; S*: composto sintético com produto natural farmacóforo; S*/NM: composto sintético com produto natural farmacóforo mostrando inibição competitiva a substrato de produto natural; N: produto natural não modificado; NB: produtos naturais botânicos; ND: moléculas modificadas.



O uso da quimioterapia começou na década de 1940, com moléculas do tipo nitrogênio mostarda, extremamente poderosos agentes alquilantes e antimetabólitos. Desde então, o sucesso inicial destes tratamentos impulsionou o desenvolvimento de antitumorais (SHEWACH e KUCHTA, 2009). Os quimioterápicos anticâncer podem ser classificados, de acordo com o seu mecanismo de ação, em agentes que interagem com DNA, antimetabólitos, agentes antitubulina, terapia alvo dirigida, terapia hormonal, anticorpos monoclonais e outros agentes biológicos (THURSTON, 2007).

Das drogas antitumorais derivadas de plantas em uso clínico, alguns dos mais conhecidos são os chamados alcalóides da vinca, vinblastina e vincristina, isoladas da vinca de Madagascar, *Catharanthus roseus* (ROUSSI, 2012). Estes compostos promovem a despolimerização da tubulina e interrompem o ciclo celular na mitose (OKOUNEVA et al., 2003). São utilizados na clínica associada a dois agentes clinicamente ativos, etoposídeo e teniposídeo, que são derivados semi-sintéticos da epipodofilotoxina, e também atuam no ciclo celular (LEE e XIAO, 2012).

O paclitaxel está presente nas folhas de diferentes espécies de *Taxus sp.*

(KINGSTON, 2011). Segundo Schiff e Horwitz (1980), a sua descoberta foi um marco importante no processo de desenvolvimento de fármacos, pois é a única classe de antineoplásicos hidrofóbicos que exibem citotoxicidade e atuam na montagem da tubulina em microtúbulos. O composto foi aprovado para uso clínico contra o câncer de ovário em 1992 e de mama em 1994. Desde então, tornou-se uma droga de sucesso, com vendas anuais de mais de 1 bilhão de dólares (NEWMAN & CRAGG, 2013). O sucesso do paclitaxel gerou estudos extensos sobre a síntese de análogos, sendo o docetaxel (Taxotere®) o primeiro a ser desenvolvido. A formulação ligada à albumina como paclitaxel Abraxane® oferece algumas vantagens significativas em comparação com a formula original de Cremophor (GREEN et al., 2006), e uma formulação de nanopartículas de polímeros reticulados com paclitaxel contido nas microesferas foi aprovado na Índia em 2007 (BURMAN et al., 2000). Em 2010, o terceiro taxano Cabazitaxel (Jevtana®) foi aprovado nos EUA (KINGSTON e NEWMAN, 2011; NEWMAN e CRAGG, 2013).

Outras adições recentes ao arsenal de agentes quimioterápicos derivados de plantas são os três agentes clinicamente ativos topotecano, irinotecano (CPT-11) e belotecano, os quais são semisintéticos derivados da campotecina isolada a partir da árvore chinesa *Camptotheca acuminata* (Wall et al., 1966). A campotecina inibe seletivamente a enzima topoisomerase I, envolvida no relaxamento do DNA, mas saiu do mercado por causa da severa toxicidade na bexiga (NEWMAN e CRAGG, 2013).

Dentre os fármacos com propriedades anticâncer estão as quinonas, uma das maiores classes de agentes antitumorais com fortes candidatos para uso clínico (ASCHE, 2005).

1.2 QUINONAS COM POTENCIAL ANTICÂNCER

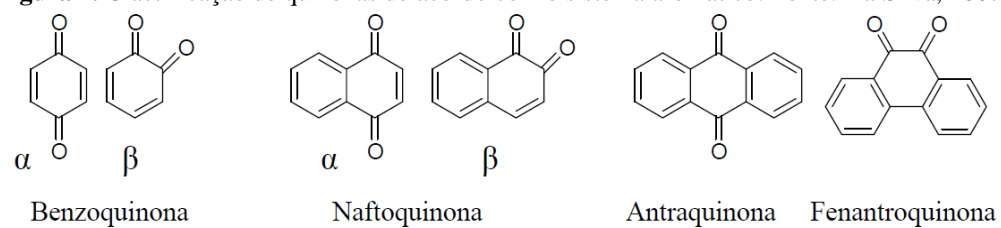
Quinonas são compostos cujo esqueleto molecular é formado por um sistema de anéis α , β -bisdienônico, conferindo-lhes a capacidade de participar reversivelmente em processos de oxirredução (MALTA, 2000). Essa característica é muito importante para os processos biológicos, pois garantem tanto propriedades terapêuticas quanto toxicológicas (BAYEN et al., 2007).

As quinonas são amplamente distribuídas na natureza, encontradas em bactérias, plantas, fungos, artrópodes (THOMSON, 1997) e por muitos anos chamou a atenção

humana por suas cores e para o uso como corantes e medicamentos (BAYEN et al., 2007). Ao longo da história, os diferentes pigmentos isolados, identificados e utilizados no preparo de drogas, permitiram que descobertas de propriedades antibióticas e antitumorais de várias quinonas naturais despertassem o interesse para explorar seu uso farmacêutico (FURUSAKI et al., 1972).

O enorme interesse na química da quinona foi observado a partir de meados do século XIX (ABRAHAM et al., 2011). As quinonas desempenham papel central em funções biológicas, pois são agentes de transferência de elétrons e participam da fosforilação oxidativa na cadeia transportadora de elétrons presentes na respiração celular e fotossíntese (ABRAHAM et al., 2011). São eletrófilos oxidantes, e suas atividades são influenciadas de acordo com sua estrutura química, principalmente, os efeitos do núcleo e dos substituintes (MONKS e JONES, 2002). Desta forma, são classificadas conforme o sistema aromático presente em suas estruturas químicas, como as benzoquinonas, naftoquinonas, antraquinonas e fenantroquinonas, relacionadas ao benzeno, naftaleno, antraceno e fenantreno, respectivamente (**Figura 2**) (da SILVA, 2007).

Figura 2. Classificação de quinonas de acordo com o sistema aromático. Fonte: Da Silva, 2007.

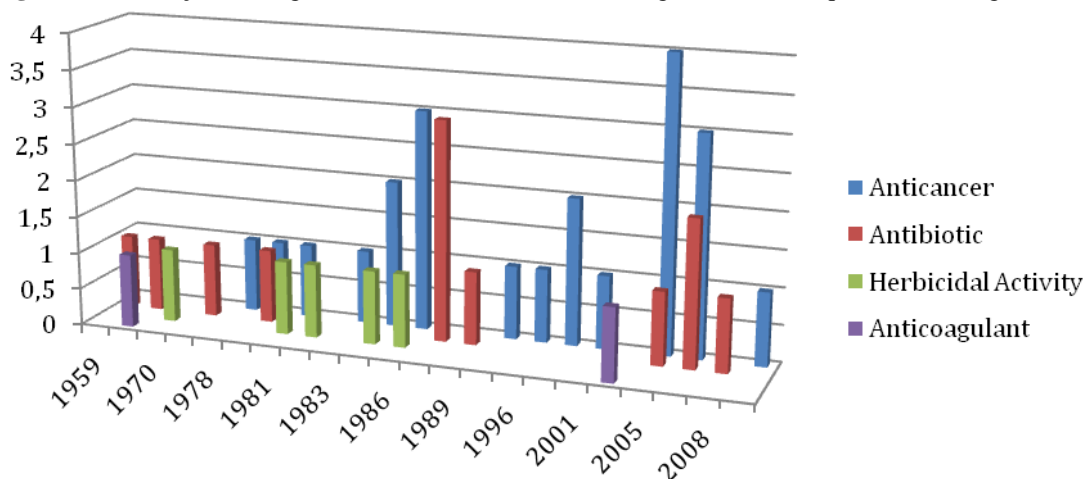


A quinona mais comum, a benzoquinona, foi sintetizada pela primeira vez no final de 1830, no laboratório de Liebig, como resultado da oxidação de ácido quínico com dióxido de manganês e ácido sulfúrico (FIESER e FIESER, 1965). De acordo com O'Brien (1991), em 1950 as quinonas foram estudadas como antibióticos pigmentados produzidos por fungos; em 1958 foi isolado o antibiótico mitomicina C, que destacou-se pela atividade anti-tumoral; em 1963 foi isolado a antraquinona glicosídica, conhecida por daunorrubicina, com atividade antileucêmica; em 1969 a doxorrubicina (Dox) foi isolado e verificou ser mais eficaz que a daunorrubicina contra tumores sólidos humanos, incluindo os de mama, pulmão, ovário, cabeça e pescoço, endométrio, bexiga e próstata. Em 1954, as aziridinilbenzoquinonas foram as primeiras drogas antineoplásicas sintetizadas para atravessar a barreira hematoencefálica.

Essa cronologia dos fatos relacionada à bioatividade das benzoquinonas é ilustrada na **Figura 3**. É possível verificar que os primeiros trabalhos publicados com as

benzoquinonas descreviam sua atividade anticoagulante e antibiótica. Quase vinte anos depois, surgiram as pesquisas sobre câncer. Desde então, a execução de trabalhos sobre esse tema tem aumentado paulatinamente, observando-se que os trabalhos sobre câncer persistem ao longo dos anos.

Figura 3. Publicação de artigos científicos das atividades biológicas das benzoquinonas ao longo dos anos.



Fonte: Espacenet

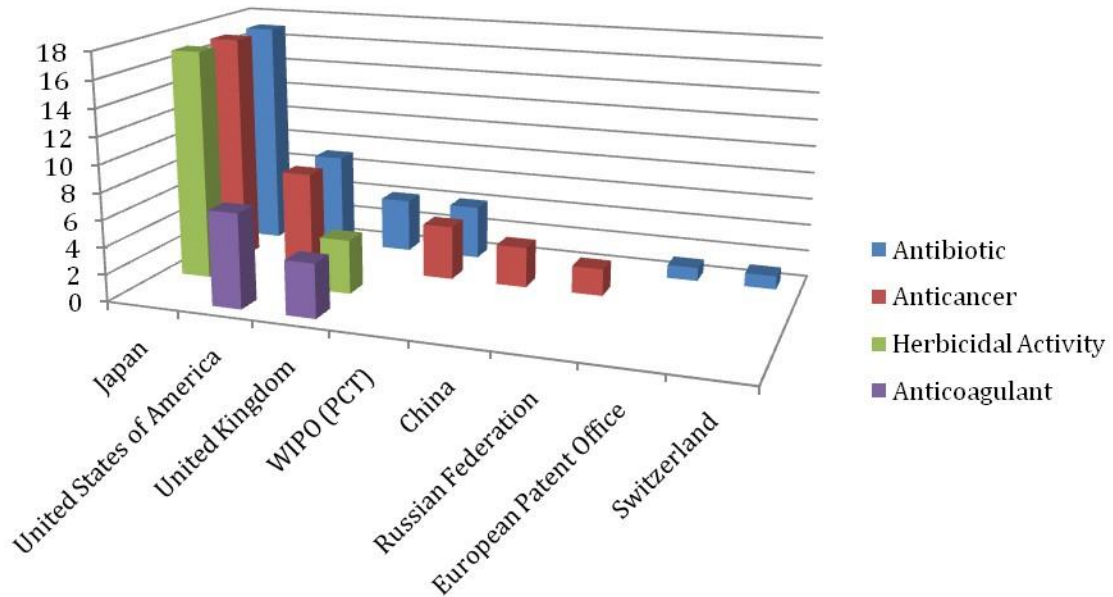
Outras quinonas com atividade neoplásica merecem destaque, como a carbazilquinone, que teve os ensaios clínicos derivados no Japão e produziu remissões em pacientes com linfoma maligno e leucemias crônicas, mas tem baixa atividade contra tumores sólidos (POWIS, 1987). A Diaziquona foi sintetizada e estudada no Instituto Nacional do Câncer dos Estados Unidos da América (EUA) e possui atividade contra os tumores cerebrais, melanoma, leucemia e câncer de pulmão (MARAL et al., 1985). O lapachol é comercializado para utilização como coadjuvante no tratamento de certos tipos de câncer (ARAÚJO et al., 2002) e as menadionas induzem quebras de fitas de DNA, aberrações citogenéticas e mutagênese (KIRKLAND e MARZIN, 2003).

Desta maneira, relacionando a produção bibliográfica com o país de origem, o Japão apresenta o maior número de produção literária sobre as benzoquinonas (**Figura 4**). O segundo país a publicar sobre assunto é o Estados Unidos, seguido do Reino Unido, China e Rússia. Assim, o crescimento gradual nas publicações sobre tal classe de quinonas em países com alto padrão de inovação tecnológica pode indicar que são compostos promissores para a indústria farmacêutica oncológica.

As benzoquinonas são uma importante classe de compostos, que servem como grupo-chave na síntese de compostos biologicamente ativos (ABRAHAM et al., 2011). A **Figura 5** ilustra os diferentes tipos de patentes das benzoquinonas. É possível observar que a maioria pertence a trabalhos com câncer, seguido pela ação antibiótica, atividade

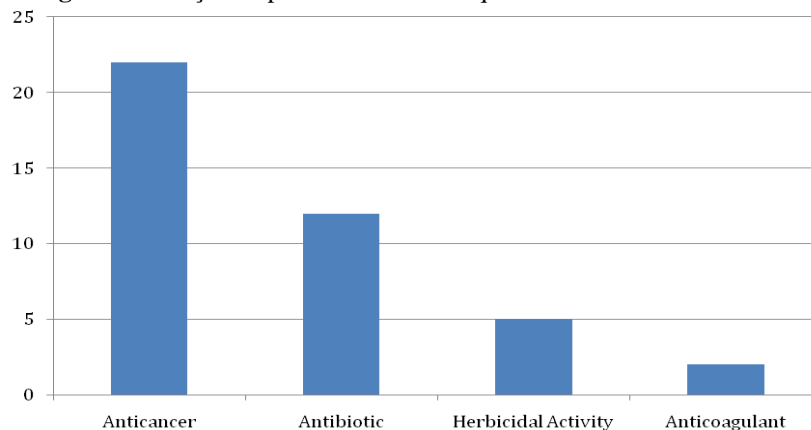
herbicida e anticoagulante. Muitos derivados químicos com 1,4- benzoquinona, como uma subunidade básica para aplicações farmacológicas, tem aplicações em antibióticos (KOYAMA, 2006), antitumorais (LEYVA et al., 2000), antimaláricos (SILVA et al., 2009), anticoagulantes (DOWD et al, 1995) e herbicidas (GONZALEZ- IBARRA et al., 2005).

Figura 4. Publicação de artigos científicos das atividades biológicas das benzoquinonas em diferentes países.



Fonte: Espacenet

Figura 5. Relação de patentes com benzoquinonas e sua bioatividade.



Fonte: Espacenet

As quinonas precisam ser reduzidas para se tornarem mais estáveis e exercerem sua função de compostos biologicamente ativos. As células têm enzimas responsáveis pelo metabolismo redutor das quinonas, gerando uma semiquinona instável, outra reativa e espécies reativas de oxigênio (EROs); mas isso depende do número de redutases, que realizam a redução de um a dois elétrons (ROSS et al., 2000; SILVA et al., 2003;

CAVALCANTI, 2010). Apesar das células tumorais apresentarem deficiência em vários mecanismos que protejam contra o estresse oxidativo, as células normais também podem apresentar deficiência na proteção contra as EROs e ser suscetível a quinona. Desta maneira, as quinonas, utilizadas como medicamento, podem causar reações tóxicas. Portanto, é importante desenvolver terapias que reduzam a toxicidade dos medicamentos para melhorar a qualidade de vida do paciente (O'BRIEN, 1991; HANSEN e MILLER, 1997).

Dentre as benzoquinonas, os antibióticos antracíclicos são os mais utilizados (ASCHE, 2005). Estes possuem um anel de tetraciclina com um açúcar, a daunosamina, unido por ligação glicosídica; nos anéis adjacentes possuem quinona e hidroquinona, que permite funcionar como aceitador e doador de elétrons (ARCAMONE et al., 1980). Adriamicina (Doxorrubicina) é um importante medicamento utilizado nos protocolos de quimioterapia, mesmo induzindo cardiotoxicidade (SAVATIER et al., 2012). Acredita-se que sua ação esteja relacionada com a ligação e inibição de síntese do DNA, ligação à membrana e interação com a topoisomerase II, formando complexos passíveis de clivagem (ISMAEL et al., 2008).

Neste contexto, a base dos fármacos utilizados na quimioterapia consiste em substâncias que interferem na divisão celular (SOUZA et al., 2007). Os quimioterápicos, costumeiramente, objetivam a indução da apoptose nas células, e esse tipo de morte celular tem tido uma intensa investigação a respeito dos seus mecanismos moleculares e de sua aplicação no tratamento do câncer (NICHOLSON, 2000).

1.3 VIAS DE APOPTOSE COMO ALVO TERAPÊUTICO DAS QUINONAS

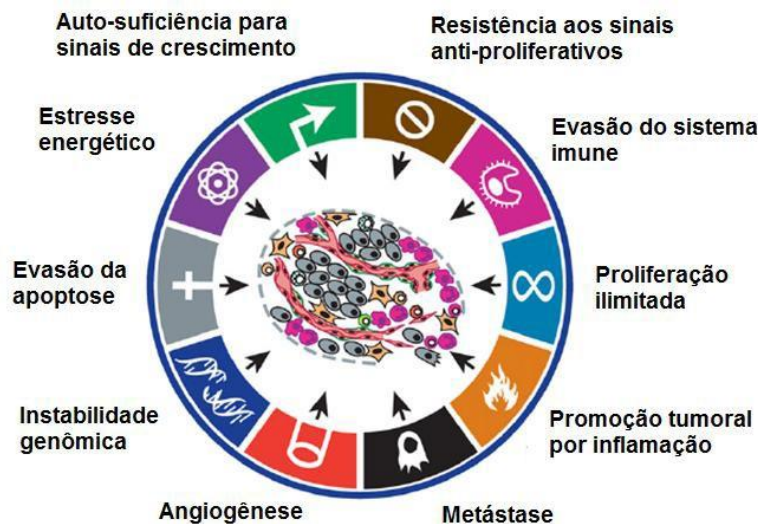
A instabilidade genômica de células cancerosas e o estado inflamatório são os principais mecanismos adquiridos ao longo da progressão tumoral (**Figura 6**) que possibilitam as seguintes características: sinalização aberrante, auto-suficiência para sinais de crescimento, indução de angiogênese, invasão e metástase, evasão da apoptose, resistência aos sinais anti-proliferativos, reprogramação do metabolismo energético e resistência à destruição pelo sistema imunológico à morte (HANAHAN e WEINBERG, 2011).

A resistência à morte e evasão da apoptose, particularidade das células cancerígenas, são um dos alvos nos tratamentos contra o câncer; pois a morte celular programada é um processo essencial para a manutenção e eliminação de tais células defeituosas (GRIVICICH

et al., 2007). A morte celular, desta maneira, pode ser classificada como apoptose, necrose, autofagia ou associada com a mitose. O tipo de morte depende das propriedades morfológicas, critérios enzimáticos (nucleases, ou de classes distintas de proteases, tais como caspases, catepsinas e transglutaminases), aspectos funcionais (programada ou acidental, fisiológica ou patológica) ou através de características imunológicas (imunogênica ou não imunogênica) (MELINO et al., 2001).

Segundo Silva et al., 2003, os estudos farmacológicos das quinonas mostram variadas biodinamicidades, destacando-se o estresse oxidativo que provocam, ao induzirem a formação espécies bioativas derivadas do oxigênio e a inibição do complexo das topoisomerasas, ações que provoca o desencadeamento da apoptose celular. A interferência das quinonas na apoptose impulsiona na delineação de estratégias para o combate de neoplasias.

Figura 6. Marcos do câncer.



Fonte: Hanahan e Weinberg (2011), com algumas adaptações.

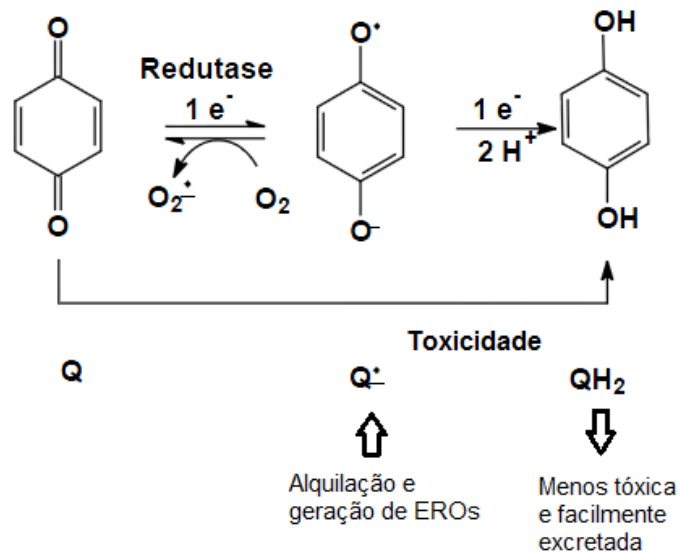
1.3.1 BIOREDUÇÃO

A redução de um elétron é catalisada por redutases como a NADPH-citocromo P450 redutase, citocromo b5 redutase, xantina oxidoreductase e ubiquinona oxidoreductase (CAVALCANTI, 2010). Nesta reação de um elétron, o substrato quinona é reduzido a uma semiquinona instável e reativa ($Q^{\cdot-}$) e transfere elétron para o oxigênio, gerando um superóxido ($O_2^{\cdot-}$). O superóxido pode ser convertido em peróxido de hidrogênio (H_2O_2) através da enzima superóxido dismutase (SOD). O radical ($O_2^{\cdot-}$), por catálise com metais de transição (reação de Fenton) ou por reação com H_2O_2 (reação de Harber-Weiss), pode gerar o radical hidroxila (OH^{\cdot}) no interior da célula, e junto com os outros radicais, ser responsável pelo estresse oxidativo (SILVA et al., 2003).

A redução via dois elétrons catalisada pela NAD(P)H/ dihidronicotinamida ribosídeo (NR): quinona oxidoredutase (NQO) produz hidroquinonas relativamente mais estáveis, prevenindo a formação de semiquinonas intermediárias e de EROs (NIOI; HAYES, 2004). NQO1 é uma dois-elétron redutase caracterizada pela sua capacidade de utilizar NADH e NADPH como cofactor de redução. A NQO1 reduz quinonas para hidroquinonas numa reação de dois passos (**Figura 7**), onde nem todas as hidroquinonas são estáveis e, em alguns casos, pode produzir um produto mais ativo (ROSS et al., 2000).

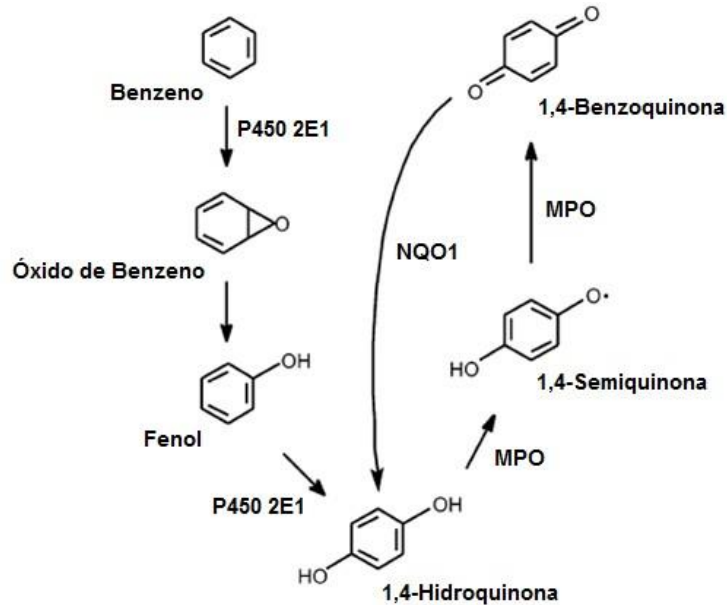
Hidroquinonas podem sofrer auto-oxidação e formar novas semiquinonas, e gerar espécies reativas de oxigênio (CADENAS, 1995). Além de causar estresse oxidativo, através deste mecanismo, a redução do radical quinona podem produzir um composto que é capaz de alquilar sítios nucleófilos por “alquilação biorredutiva”, processo responsável por formar a base para investigar NQO1 como agentes antitumorais (SARTORELLI, 1988). Assim, a redução catalizada por NQOs tem um papel pró e antioxidante (detoxificação) (CAVALCANTI, 2010).

Figura 7. Redução de quinonas (Q) via 1 e 2 elétrons, gerando semiquinonas (Q⁻) e hidroquinonas (QH₂). Fonte: Moura (2008) e Ross et al. (2000), com algumas adaptações.



O metabolismo do benzeno e da 1,4-benzoquinona é mostrado na **Figura 8**. O benzeno é metabolizado no fígado pelo citocromo P450 2E1 para o óxido de benzeno (LINDSEY et al., 2004). Uma proporção deste composto é então convertido para fenol por um rearranjo não enzimático. O fenol é posteriormente metabolizado para 1,4-hidroquinona pelo citocromo P450 2E1. A 1,4-hidroquinona, em última análise, é convertida por mieloperoxidases na medula óssea para a semiquinona 1,4-benzoquinona, a qual é transformada de volta para 1,4-hidroquinona por hidroquinona-NAD (P) H: quinona oxidoredutase 1 (NQO1).

Figura 8. Esquema de metabolização da 1,4 benzoquinona pela citocromo (P450 2E1), quinona oxidoreductase (NQO1), mieloperoxidase (MPO). Fonte: Lindsey et al. (2004), com algumas adaptações.



1.3.2 AGENTES INTERAGEM COM DNA

As quinonas reduzidas apresentam citotoxicidade e causam morte celular por produzir EROs e/ou por interagir diretamente com o DNA como agentes alquilantes, intercalantes, *cross-linking*, inibidores de topoisomerase ou de outras enzimas essenciais para duplicação do DNA e biossíntese de nucleotídeos, e fragmentando as bases nitrogenadas (SALUSTIANO et al., 2010). Os danos celulares mais importantes associados à produção de EROs são os induzidos sobre o DNA (nuclear e mitocondrial), sobre as membranas mitocondriais, que podem resultar na perda das reservas de ATP, sobre fosfolipídios de membrana (peroxidação lipídica), e inativação de proteínas (PELICANO et al., 2004).

Devido às baixas concentrações de enzimas antioxidantes (SOD, glutathiona peroxidase, glutathiona redutase e catalase) e aos baixos níveis de vitaminas antioxidantes (C e E) (BEEVI et al., 2007), as células cancerosas estão submetidas a níveis mais altos de estresse oxidativo em relação às células não tumorais (PERVAIZ e CLEMENT, 2004). Além do mais, a excessiva atividade mitocondrial da célula tumoral, cujo requerimento elevado de ATP correlaciona-se com a elevada atividade metabólica, persiste na geração de EROs (PELICANO et al., 2004). No entanto, o elevado e persistente estresse oxidativo (superprodução de EROs) causado pelas quinonas e outras drogas antitumorais por intermédio da produção de radicais livres, além de outros mecanismos complementares, tornam a célula cancerosa mais suscetível à morte celular (KONG et al., 2000).

Alterações mínimas no balanço entre as enzimas responsáveis pela integridade do DNA são suficientes para induzir a apoptose. Ressalta-se as antraciclinas – doxorubicina, daunomicina, aclarubicina, idarubicina – que atuam diretamente no DNA por intercalação entre nucleotídeos por meio de interações de Van der Waals e iônicas (MOLONEY et al., 2001). Deste modo, a intercalação interfere nas funções normais do DNA, bloqueando as polimerases e interferindo na síntese de proteínas.

Os agentes que funcionam como *cross-linking* ao DNA, ligam-se covalentemente aos nucleotídeos e provocam uma lesão que envolve ambos filamentos (na porção intra e inter) do DNA, impedindo a replicação e transcrição (HLAVIN et al., 2010). Compostos que causam quebra do DNA em sítios específicos também ganharam importância no estudo dos quimioterápicos. Assim como as substâncias que interferem nas enzimas topoisomerases.

As topoisomerases são responsáveis por se ligarem às fitas de DNA e induzirem clivagem para reduzir a tensão no DNA, em virtude dos processos biológicos de replicação, transcrição, recombinação e segregação cromossômica no ciclo celular (OSHEROFF et al., 1991). O genoma humano codifica seis topoisomerases, e são classificados como tipo a) Tipo I: cliva uma fita de DNA de cada vez (IA: Top 3 α e Top3 β ; IB: Top I e top 1mit); b) Tipo II: cliva ambas fitas de DNA (IIA: Top 2 α e Top 2 β) (WANG, 2009).

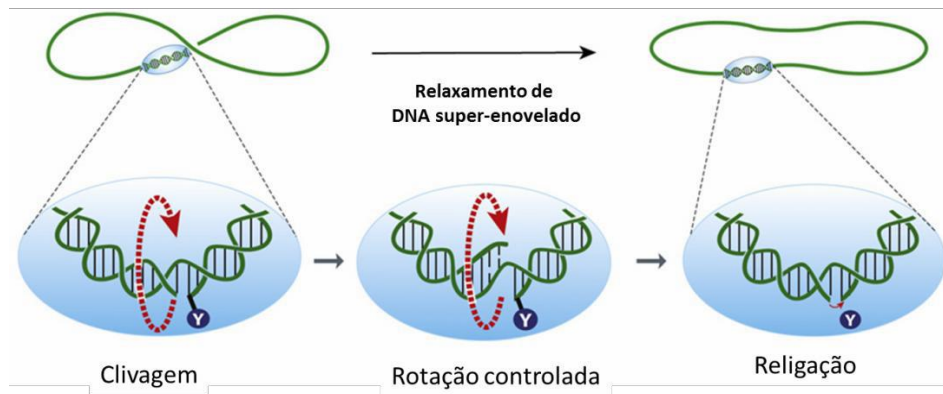
A **Figura 9** ilustra o relaxamento do DNA mediado pela Top I por rotação controlada. Em contraste com enzimas de tipo IA ou II, a presente reação não requer um cofactor de energia ou de metal divalente, pois Top I tende a se ligar ao DNA na supertorção, conforme mostra a figura, e clivar por transesterificação, rodando por rotação controlada (KOSTER et al., 2005). Os inibidores das topoisomerases podem ser divididas em: estabilizadoras do complexo topoisomerase-DNA e inibidoras catalíticas da topoisomerase (BASSI e PALITTI, 2000).

A Dox aumenta a formação do complexo de quebra da Top II (FORTUNE e OSHEROFF, 2000). Dox em baixas concentrações é capaz de inibir a atividade catalítica da Top II sem reter complexos de clivagem, uma reação igualmente observada para os intercalantes de DNA, que alteram a estrutura do DNA, impedindo assim a ligação de Top II com DNA (POMMIER et al., 2010).

Normalmente, essas topoisomerases ligam-se ao DNA por uma supertorção ou dobra topológica e permitem o funcionamento normal da transcrição, reparação,

replicação e estruturação do cromossomo (SILVA et al., 2003). Assim, as células se dividem seguindo uma série de etapas não superpostas bem definidas (G1, S, G2 e M), com a síntese de DNA e a mitose ocorrendo durante as fases S e M, sendo separadas por intervalos denominados G1 e G2, com acúmulo contínuo de RNAm e proteínas (MADDIKA et al., 2007). Qualquer dano ao DNA e/ou o mau funcionamento de outras organelas ou estruturas importantes pode levar à parada do ciclo celular e ativação da cascata apoptótica, levando à morte celular (SIEGEL, 2006).

Figura 9. Relaxamento de DNA causado por topoisomerase I. Fonte: Pommier et al. (2010).

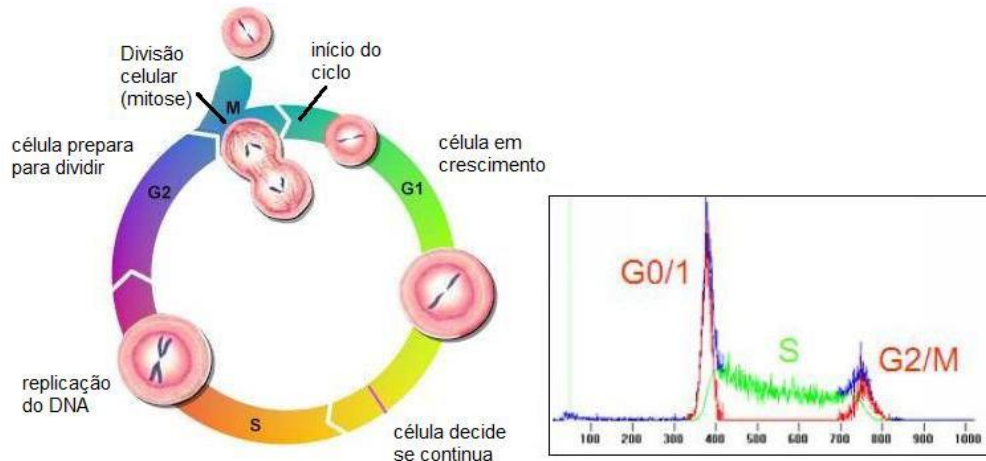


1.4 CICLO CELULAR

A divisão celular é caracterizada pela fase de crescimento celular G₁, pela duplicação genômica S, pelo crescimento celular G₂ e pela mitose M. As células que não se encontram replicando (fase estacionária G₀) apresentam um conteúdo diploide de DNA (2n). Durante a fase S, o material genético aumenta para 4n, e na fase seguinte, G₂, ocorre além da síntese de componentes para a mitose, como a produção do fuso mitótico e em M há formação das duas células filhas cada uma com um conteúdo 2n de DNA. (**Figura 10**).

Cada fase do ciclo celular contém pontos de verificação ou ponto de checagem que permitem pausar a progressão no ciclo celular e ativar mecanismos de reparo. Após a passagem por esses pontos, as células seguem irreversivelmente para a fase seguinte (PARK; LEE, 2003). As células cancerosas, no entanto, permanecem indefinidamente no ciclo celular, e além de ter os pontos de checagem ignorados, apresentam instabilidade genética adicional e vantagens proliferativas comparadas às células normais (DONNICI et al., 2005). Desta forma, os pontos de checagem do ciclo celular têm sido considerados importantes alvos da quimioterapia do câncer tanto pela indução de apoptose mediada pela ativação de pontos de checagem, quanto pela exploração da maior sensibilidade por ocasião da perda funcional dos pontos de checagem (WALTON et al., 2010).

Figura 10. Representação do ciclo celular e detecção pelo citômetro do fluxo.



Fonte: <<http://www.flow-cytometry.us>>.

As células cancerosas desregulam a liberação de sinais que controlam o ciclo celular e adquirem capacidade de manter a sinalização proliferativa de várias formas: a) produzem ligantes para fatores de crescimento, que através da expressão de receptores cognatos, resulta em uma estimulação proliferativa autócrina; b) estimulam as células normais a suprir as células cancerosas com fatores de crescimento (BHOWMICK et al., 2004; CHENG et al., 2008)

Muitos agentes quimioterapêuticos exercem seus efeitos citotóxicos através da indução de apoptose pela ativação indireta de pontos de checagem (CAVALCANTI, 2010). Inclusive, a diferente composição dos agentes antitumorais que atuam nesses pontos, a mudança no tempo de exposição e a concentração dos agente são fatores capazes de alterar as vias de parada do ciclo (SAVATIER et al., 2012). Doxorrubicina em altas concentrações permite a entrada rápida da molécula, atingindo primeiro o núcleo e, em seguida, as mitocôndrias, onde EROs são gerados. Em algumas horas há a formação de aductos entre Dox-DNA e bloqueio da fase G2/M. Para doses intermédias, a entrada é lenta e várias horas são necessárias para impedir a proliferação das células. Neste último caso, Dox não atinge as mitocôndrias, favorecendo a poliploidia. Por fim, a morte celular é adiada e avançado processo apoptótico aparece sete dias após o tratamento (SAVATIER et al., 2012).

1.5 APOPTOSE

As estratégias para célula maligna contornar o processo apoptótico incluem a) a perda da função do gene supressor tumoral P53, que atua como um sensor de dano

ao DNA e desencadeador de morte; b) elevação da expressão de reguladores protéicos anti-apoptóticos; c) aumento da expressão de sinais de sobrevivência e proliferação; d) redução de fatores pro- apoptóticos; e) interrupção da via ligante induzida de morte celular (HANAHAN; WEINBERG, 2011). As células cancerosas são submetidas à apoptose, no entanto, durante tumorigênese ou terapia anticâncer, desencadeada em resposta ao estresse fisiológico, desequilíbrios de cascatas intracitoplasmáticas de sinalização e por danos causados ao DNA (LOWE et al., 2004).

Apoptose é um processo ativo, dependente de energia, induzido por estímulos intracelulares ou extracelulares em que a célula sofre uma morte celular programada (HUERTA et al., 2007). Capaz de expressar mudanças morfológicas, bioquímicas e arquiteturais que incluem o encolhimento da membrana, formação de bolhas, perda de aderência, condensação nuclear, fragmentação do DNA, formação de poros mitocondriais, externalização de fosfatidilserina, ativação das caspases e clivagem da PARP (TAYLOR et al., 2008). Durante a apoptose as células também exibem rearranjos na rede do citoesqueleto em que microtúbulos, microfilamentos e seus associados (actina, a gelsolina, a miosina, a tubulina e fodrina) são afetados pela ação proteolítica mediada por caspases (GERNER et al., 2000).

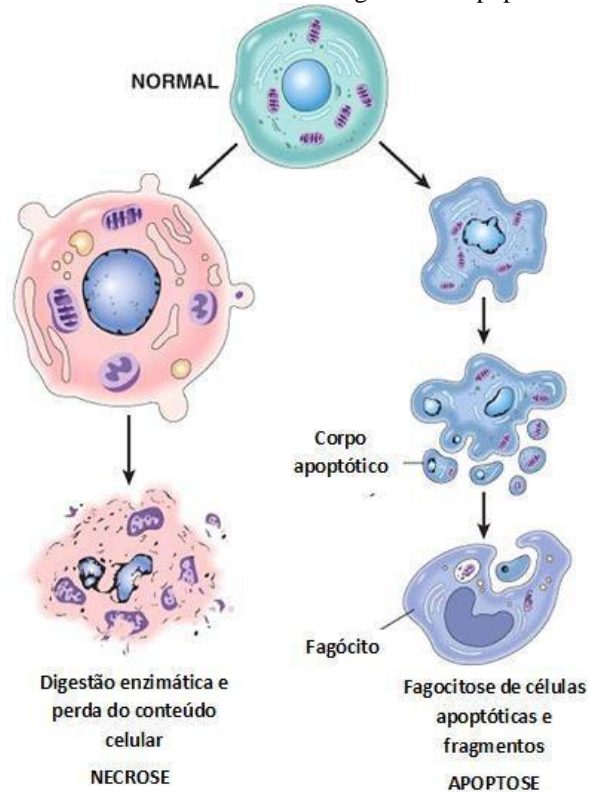
PARP-1 é uma enzima nuclear envolvida nos processos de reparação do DNA, transcrição, replicação, estabilidade genômica, e morte de células (D'AMOURS et al., 1999; AME et al, 2004). Agentes de alquilação que causam danos ao DNA conduz à ativação de PARP-1 e síntese de PAR- (ETHIER et al, 2007); e sua ativação está envolvida na regulação no processo de autofagia citoprotetora (MUNOZ-GAMEZ, 2009).

A necrose, por sua vez, é caracterizada por um aumento de volume celular e mitocondrial, resultando em rompimento da membrana celular (SCHREK et al., 1980), liberando substâncias pro-inflamatórias para o microambiente tumoral, onde as células do sistema imunológico são recrutadas e passam a favorecer a angiogênese, invasão e proliferação celular (HANAHAN; WEINBERG, 2011). A **Figura 11** ilustra as diferenças morfológicas entre os dois tipos de morte celular.

De acordo com Danial e Korsmeyer, 2004, a maquinaria apoptótica é formada por componentes reguladores e efetores. Os reguladores estão divididos em dois circuitos principais, um recebendo e processando os sinais induzidos extracelularmente e integrando uma variedade de sinais de origem intracelular. A morte celular por apoptose induzida pela via extrínseca (via do receptor de morte), iniciada pela ativação da

caspase-8 iniciadora, envolve ligação de ligantes aos receptores de morte, resultando um importante papel na homeostase tecidual. A morte celular por apoptose induzida pela via intrínseca (via dependente da mitocôndria) é ativada na resposta a agravos intracelulares, pela caspase-9 iniciadora. O resultado da ativação de uma ou de outra via resultará no acionamento das caspases efetoras 3, 6 e 7, que darão início à clivagem de substratos celulares relacionados a apoptose (ADAMS e CORY, 2007).

Figura 11. Características morfológicas da apoptose e necrose.



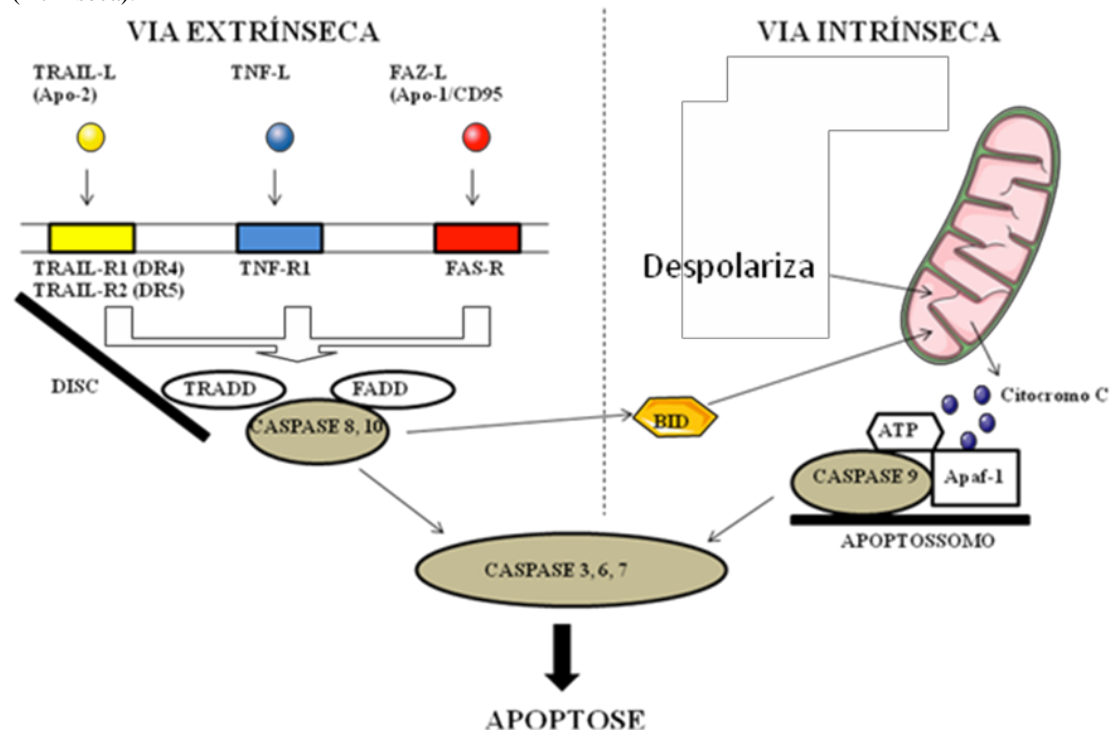
Fonte: Grivicich et al. (2007), com algumas adaptações.

Os ligantes específicos da via extrínseca são receptores tetraméricos dos tipos Fas, TNFr1, DR4 e DR5, pertencentes à família dos Receptores do Fator de Necrose Tumoral contendo domínios de morte (Death Domain - DD). Ao entrar em contato com ligante, os receptores sofrem mudança conformacional, permitindo que seu domínio DD fique disponível para interação com os DDs do prodomínio de caspases iniciadoras 8 e 10. O resultado dessa interação é a formação do receptor de sinal complexo DISC (sinalização complexa indutora de morte) que leva à agregação de procaspases-8 e -10, que ativadas, acionam a caspase-3 (GREEN et al., 2006). Esta via é controlada negativamente pelas proteínas anti-apoptóticas e c-FLIP e XIAP que inibem a ativação de caspase-8 e caspase-3, respectivamente (SCOTT et. al., 2009) (**Figura 12**).

Os estímulos intrínsecos de morte, EROs, compostos genotóxicos e mobilização

de Ca^{2+} ativam direta ou indiretamente a via mitocondrial através da indução de liberação de citocromo c a partir da mitocôndria e formação do apoptossomo, composto por Apaf-1 e caspase-9. A Caspase-9 é ativada no apoptossomo e, por sua vez, ativa a procaspase-3. Esta via de morte é controlada por proteínas pro-apoptóticas (Bax, Bak, Bid e Smac / Diablo) e anti-apoptóticas (Bcl-2, Bcl-xL, Bcl-w, Mcl-1 e XIAP). Caspase-8 também pode induzir a clivagem do Bid, que induz a translocação de Bax e/ou Bak para a membrana mitocondrial e amplifica a via de apoptose mitocondrial (LI-WEBER, 2013) (**Figura 12**).

Figura 12. Mecanismo de apoptose: via do receptor de morte (extrínseca) e via mitocondrial (intrínseca).



Fonte: Huerta et al., 2007, com algumas adaptações.

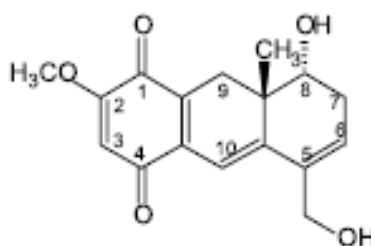
A apoptose desencadeada transmite sinais liberados pelas caspases reguladoras e efetoras que são contrabalançados por proteínas pró e anti-apoptóticas, membros da família Bcl-2. As proteínas Bcl-2, juntamente as Bcl-xL, Bcl-w, Mcl-1, A1, são inibidores da apoptose, suprimindo as proteínas pró- apoptóticas (Bax e Bak); Bak é incorporada na membrana mitocondrial externa. Quando aliviado a inibição pelos antiapoptóticos, Bax e Bak perturbam a integridade da membrana mitocondrial externa e causam a liberação de proteínas de sinalização pró-apoptóticos (ADAMS e CORY, 2007).

1.6 ONCOCALIXONA: QUINONA COM POTENCIAL QUIMIOTERÁPICO

O estudo realizado por Moraes et al., 1997 com 72 plantas brasileiras, objetivando avaliar a potencialidade de compostos naturais com propriedades antitumorais *in vivo*, identificou que alguns extratos inibiram o crescimento tumoral, entre estes, extratos obtidos da *Auxemma oncocalyx* TAUB. Esta planta medicinal popularmente conhecida como “pau-branco”, “pau-branco-preto”, ou “louro-branco”, pertencente à família Boraginaceae, é encontrada na caatinga cearense na coroa de rios, riachos e pés-de-serra (LORENZI, 1998).

Possui propriedades medicinais na sua casca, utilizada pela população interiorana, para cortes e feridas como cicatrizante; sua madeira é resistente ao ataque de fungos e insetos; e seus ramos usados como forragem para o gado (LORENZI, 1998). Os primeiros estudos químicos com essa planta foram obtidos de extratos que a partir da fração etanólica isolaram um β sistosterol, seu glicosídeo, sete quinonas e duas antronas hexahidrogenadas (PESSOA, 2000). Ao avaliar os efeitos antiproliferativos *in vitro*, Pessoa et al. (2000) descobriram 4 fitoquímicos potencialmente citotóxicos com valores de CI_{50} (concentração inibitória média) menores que 10 $\mu\text{g/mL}$. Destes fitoquímicos, apenas as oncocalixonas A e C, ambas 1,4-antracenedionas originadas de *A. oncocalyx*. Dentre as quinonas, identificou-se a oncocalixona A (*rel*-8 α -hidroxi-5-hidroxi-2-metoxi-8 α,β -metil-7, 8, 8a, 9-tetrahidro-1,4-antracenediona), **Figura 13**, que apresentou maior potencial citotóxico (LEVYA et al., 2000; PESSOA et al., 2000).

Figura 13. Estrutura química da Oncocalixona-A.



Fonte: COSTA et al., 2012

Assim, os produtos naturais têm sido, ao longo dos tempos, uma importante fonte para o desenvolvimento de novos fármacos (FERREIRA et al., 2009, 2010, 2011; NEWMAN; CRAGG, 2013). Nesse contexto, as quinonas representam uma ampla e variada família de metabólitos secundários (MONKS et al., 1992; BARREIRO et al., 1996; MARTÍNEZ; BENITO, 2005) com promissoras propriedades anticâncer (PARDEE et al., 2002; ASCHE, 2005; HUANG et al., 2010), analgésica e antiinflamatória (LINO et al., FERREIRA et al., 2004), antiplaquetária (FERREIRA et al., 1999), antimetabólica

(COSTA-LOTUFO et al., 2002) e genotóxica (PESSOA et al., 2003). A molécula *rel*-8 α -hidroxi-5-hidroximetil-2-metoxi-8 α,β -metil-7, 8, 8a, 9-tetraidro-1,4-antracenediona – Oncocalixona A – apresenta potencial citotóxico (LEVYA et al., 2000; PESSOA et al., 2000), embora a sua atividade citotóxica permaneça obscura em muitos dos aspectos bioquímicos e moleculares, assim como das quinonas em geral (ASCHE, 2005). Portanto, este trabalho teve como objetivo estudar o mecanismo citotóxico da Onco-A usando células leucêmicas da linhagem HL-60 como modelo experimental.

2 OBJETIVOS

2.1 GERAL

Determinar o mecanismo citotóxico da Oncocalixona A (Onco-A) em células leucêmicas da linhagem HL-60.

2.2 ESPECÍFICOS

- Avaliar a atividade citotóxica da Onco-A em células mononucleadas isoladas de sangue periférico humano e em eritrócitos usando o ensaio do MTT e hemólise, respectivamente;
- Analisar alterações bioquímicas e morfológicas das células leucêmicas tratadas com Onco-A por métodos de microscopia ótica e citometria de fluxo (viabilidade celular, integridade de membrana, conteúdo de DNA nuclear, externalização da fosfatidilserina, geração de espécies reativas de oxigênio e ativação de caspases);
- Avaliar o potencial genotóxico da Onco-A usando o ensaio do Cometa;
- Estudar a interação da Onco-A com enzimas da classe das topoisomerasas.

3 MATERIAIS E MÉTODOS

3.1 MATERIAIS UTILIZADOS

As especificações dos equipamentos e das soluções utilizadas, com respectivos fabricantes e descrições, estão detalhadas abaixo:

EQUIPAMENTOS

Agitador de placa (MLW Modelo Thys2);
Balança analítica (GEHAKA AG200);
Banho-Maria (MOD. 105 DI DELLTA);
Centrífuga Excelsa Baby (I FANEN Modelo 206);
Centrífuga de placas Eppendorf (Centrifuge 5403);
Centrífuga de lâminas (Shandon Southern Cytospin);
Citômetro de fluxo (Guava EasyCyte Mini);
Cuba de eletroforese horizontal (BioRad);
Espectrofotômetro de placas (DTX 880, Beckman Coulter);
Estufa de secagem e esterilização (FANEM, MOD. 315SE);
Fluxo laminar (VECO);
HTS (High Throuput Screening, BIOMECK 3000, Beckman Coulter);
Incubadora de células (CO2 Water-Jacket Incubator, NUAIRE TS Autoflow);
Microscópio de fluorescência (Olympus Modelo BX41);
Microscópio óptico (Metrimpex Hungary/PZO-Labimex Modelo Studar lab);
Microscópio óptico de inversão (Nikon Diaphot);
pHmetro (Micronal B474).

SOLUÇÕES E REAGENTES

Ácido acético P.A. (MERCK);
Ácido clorídrico 0,1 N (VETEC);
Agarose de baixo ponto de fusão (Invitrogen);
Agarose de ponto de fusão normal (Invitrogen);
Álcool etílico P.A. (VETEC);
Azul de tripan 10% (Sigma);
Balsamo do Canadá;
Brometo de 3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5difeniltetrazolio (SIGMA);

Brometo de etídeo (SIGMA); DMSO (VETEC);
Doxorrubicina (ZODIAC);
EDTA (PROQUÍMICOS);
Fitohemaglutinina (CULTILAB);
Formaldeído (VETEC);
Hidróxido de Sódio (VETEC);
Histopaque Ficoll-Hypaque (Sigma);
Iodeto de propídeo (SIGMA);
Kit DC Protein Assay (BioRad Laboratories);
Laranja de acridina (FLUKA);
May-Grunwald (Sigma);
Meio de cultura celular RPMI 1640 (CULTILAB);
Metanol P.A. (MERCK);
N-acetil-L-cisteína (SIGMA);
NaOH 10M (VETEC);
Penicilina-estreptomicina (CULTILAB);
Peróxido de Hidrogênio (VETEC);
Rodamina 123 (SIGMA);
RIPA Lysi Buffer (Santa Cruz);
Solução de Azul de Tripan a 4% em água destilada (SIGMA);
Solução de Giemsa a 5% em tampão fosfato (PBS) (SIGMA);
Solução de KCl 0,075 M em água destilada (LABSYNTH);
Solução de Triton X-100 a 1% (Vetec);
Solução salina 0,9% (LABSYNTH);
Solução tampão fosfato pH 6,8 (NaHPO₄.7H₂O + NaHPO₄.H₂O, LABSYNTH);
Soro fetal bovino (CULTILAB);
Tripsina 0,25% (CULTILAB);
Tris (PROQUÍMICOS);
Xilol.

PROGRAMAS

Guava Express Plus;
ModFit LT 3.3;

Vantage Point;

Prisma 5.0 *GraphPad Software*;

Axio Vision Release 4.8 (06-

2009); FlowJo_V10.

3.2 MODELOS BIOLÓGICOS

3.2.1 OBTENÇÃO DAS LINHAGENS TUMORAIS E CULTIVO

As linhagens tumorais utilizadas são de origem humana e foram cedidas pelo Instituto Nacional do Câncer (*Bethesda, MD*, Estados Unidos). Para tanto, as células de leucemia promielocítica (HL-60), carcinoma de ovário (OVCAR-8), glioblastoma (SF-295) e carcinoma de colón (HCT-116) foram manuseadas em ambiente estéril e mantidas a 37°C e 5% de CO₂, com meio RPMI-1640 suplementado com 10% de soro fetal bovino e 1% de antibióticos (100U/mL de penicilina e 100µg/mL de estreptomicina). As linhagens aderidas (OVCAR-8, SF-295, HCT-116) foram acrescidas de tripsina (0,25%) antes de cada manutenção e contagem.

3.2.2 OBTENÇÃO DAS CÉLULAS MONONUCLEARES DO SANGUE PERIFÉRICO

As células mononucleares do sangue periférico (CMSP) foram obtidas a partir de sangue periférico de voluntários humanos saudáveis, não fumantes, com idade entre 18 e 35 anos e que não estavam em nenhum tipo de tratamento farmacológico nos últimos 15 dias antes da coleta (RIBEIRO et al., 2003) em frascos heparinizados. Após a coleta, 3mL de sangue foram diluídos em 5mL de PBS, depositados sobre 2mL de Histopaque (Ficoll-Hypaque) e centrifugadas (1500rpm por 30min) para separação por gradiente de densidade. A solução foi separada em três camadas visíveis – uma superior contendo soro, uma intermediária com CMSP e Histopaque e uma inferior com hemácias. A região intermediária foi removida, lavada duas vezes com PBS (1000rpm por 20min) e ressuspensa em meio de cultura RPMI- 1640, suplementado com 20% de soro fetal bovino, 1% de antibióticos e fitohemaglutinina (2 a 4%).

3.2.3 OBTENÇÃO DE ERITRÓCITOS

As hemácias foram obtidas a partir de sangue periférico de voluntários humanos saudáveis em frascos heparinizados. Após a coleta, 5mL de sangue foram diluídos em 1:30 de solução salina (NaCl 0,85% + CaCl₂ 10 mM) e lavados 3 vezes na mesma solução após a centrifugação (1500rpm por 5 min) para obtenção de uma suspensão de eritrócitos a 2%. Todos os protocolos seguiram os padrões nacionais (Resolução 196/96 do

Conselho Nacional de Saúde) e internacionais (Declaração de Helsinque de 1975) de pesquisa com seres humanos.

3.2.4 ISOLAMENTO DA ONCOCALIXONA A

A Oncocalixona A (*rel-8 α -hydroxy-5-hydroxymethyl- 2-methoxy-8 α,β -methyl-7,8,8a,9-tetrahydro-1,4-anthracenedione*) foi isolada por cromatografia do cerne do caule da *Auxemma oncocalyx* coletada em junho de 2005 em Petencoste, Ceará (COSTA et al., 2012). A planta foi identificada pelo prof. Edson P. Nunes e depositada no Herbário Prisco Bezerra na Escola de Agronomia do Ceará, na Universidade Federal do Ceará (No. 18459).

A preparação do extrato, o método de isolamento e caracterização química foram descritas por Pessoa et al. (1993, 1995). Em resumo, quinonas terpenoídicas isoladas do extrato etanólico por cromatografia gravitacional e gel de sílica foram identificadas por espectrometria de massa, infravermelho, ressonância magnética nuclear de hidrogênio e carbono 13. Dentre os compostos, o sólido amorfo de coloração vinho, responsável pela cor escura do cerne do caule da *Auxemma oncocalyx*, identificada como *para*-benzoquinona foi denominada de oncocalixona A (Onco A). A profa. Dra. Otília Deusdênia Loiola Pessoa do Departamento de Química Orgânica e Inorgânica da Universidade Federal do Ceará cedeu 30 mg do composto para a investigação farmacológica.

3.3 MÉTODOS

3.3.1 ESTUDO DE CITOTOXICIDADE

O potencial antiproliferativo foi avaliado pelo ensaio colorimétrico denominado MTT, que consiste na conversão do sal 3-(4,5-dimetil-2-tiazol)-2,5-difenil-brometo de tetrazolio (MTT), hidrossolúvel e de cor amarela, em cristais de formazan, de cor azul escura e não solúveis em água (MOSMANN, 1983). A enzima succinato desidrogenase, ativa nas mitocôndrias de células metabolicamente viáveis, é responsável pela conversão deste sal em formazan. Destarte, o teste de MTT é utilizado para análise indireta da viabilidade celular nos estudos de citotoxicidade (BERRIDGE, 1996).

PROCEDIMENTO EXPERIMENTAL

As células da linhagem HL-60 foram distribuídas em multiplacas de 96 cavidades numa densidade de $0,3 \times 10^6$ células/mL, enquanto as células aderidas OVCAR-8, SF-295, HCT-116 e CMSP foram plaqueadas nas concentrações de $0,5 \times 10^6$, $0,1 \times 10^6$, $0,7 \times 10^5$ e 4×10^5 células/mL, respectivamente. A Onco-A, previamente dissolvida em DMSO, foi incubada por 24 h (HL-60), 48 h (CMSP) e 72 h (CMSP, OVCAR-8, SF-295, HCT-116) (0,3 - 16,5 μ M). A doxorubicina (Dox) foi utilizada como controle positivo (0,01 - 8,6 μ M). Após um período de incubação de 69 h, as placas foram retiradas e centrifugadas a 1500 rpm/15 min. O sobrenadante foi aspirado e foram adicionados 200 μ L de solução de MTT 10 % em RPMI 1640, sendo a placa colocada na estufa a 5 % de CO₂ por 3 h. Em seguida, as placas foram novamente centrifugadas, o sobrenadante foi aspirado e o precipitado foi ressuspensionado em 150 μ L de DMSO e agitado por 10 min até completa dissolução dos cristais de sal de formazan. Por fim, as placas foram lidas em espectrofotômetro (DTX 880, Beckman Coulter) a um comprimento de onda de 595 nm para quantificar o sal reduzido nas células metabolicamente viáveis.

ANÁLISE DOS DADOS

A substância foi testada em diluição seriada e em duplicata. Os valores de CI₅₀ (concentração inibitória média capaz de provocar 50 % do efeito máximo) e seus respectivos intervalos de confiança (IC 95 %) foram calculados a partir de regressão (Prisma versão 5.0, *GraphPad Software*).

3.3.2 ESTUDO DA ATIVIDADE HEMOLÍTICA EM ERITRÓCITOS HUMANOS NO TRATAMENTO COM ONCO-A

O estudo da atividade hemolítica permite avaliar o potencial do composto em causar danos diretos à membrana plasmática da célula (BERLINCK et al., 1996).

PROCEDIMENTO EXPERIMENTAL

Os ensaios foram realizados em multiplacas com 96 cavidades, onde cada poço da 1ª coluna recebeu 100 μ L da solução salina (NaCl 0,85% + CaCl₂ 10mM); na 2ª coluna os poços foram acrescidos de 90 μ L solução salina e 10 μ L de DMSO 10%; na 3ª coluna adicionou-se 60 μ L de solução salina e 40 μ L Triton X-100 0,5% (controle positivo); da 4ª até 11ª coluna, os poços receberam 100 μ L da solução salina. A 12ª coluna recebeu 180 μ L de solução salina e 20 μ L de Onco-A. A diluição seriada foi feita da 12ª a 4ª coluna, retirando 100 μ L da solução do poço anterior e transferindo para o

seguinte, de modo que as concentrações foram sempre diluídas pela metade, (1,3 a 330 μM) Em seguida, 100 L da suspensão de eritrócitos foram adicionadas em todos os poços. As placas permaneceram sob agitação constante por 4h à temperatura ambiente. Após esse período, as placas foram centrifugadas (1500 rpm por 10min.) e o sobrenadante transferido para outra placa para a leitura da absorbância da hemoglobina no espectrofotômetro de placas (DTX 880, Beckman Coulter) a 540 nm.

ANÁLISE DOS DADOS

A substância foi testada em diluição seriada e em duplicata. O valor de CE_{50} (concentração média capaz de provocar 50% do efeito máximo) e seu respectivo intervalo de confiança (IC 95 %) foi calculado a partir de regressão não-linear (Prisma versão 5.0, *GraphPad Software*).

3.3.3 ESTUDOS DE MECANISMO DE AÇÃO *IN VITRO*

Os estudos de mecanismo de ação foram realizados na linhagem HL-60, como modelo experimental (COSTA et al., 2008; FERREIRA et al., 2010). As células HL-60 foram distribuídas em placas de 24 poços e incubadas com Onco-A (8, 16,5 e 33 μM) durante 24 h. Dox (0,5 μM) foi usada como controle positivo em todos os experimentos e o veículo (DMSO 0,1%) usado para dissolver a substância, como controle negativo. Outro tipo de tratamento também realizado na HL-60 foi a incubação com N-acetil-L-cisteína (5 mM) por 1 h. Depois de lavadas com meio RPMI, Onco-A (8, 16,5 e 33 μM) foi adicionada por um período de 24 h. As concentrações utilizadas foram estimadas a partir dos valores de CI_{50} encontrados pelo método do MTT para esta mesma linhagem celular para o período de 24 h de exposição.

Para aqueles experimentos realizados por citometria de fluxo (*Guava EasyCyte Mine*®, *Guava Express Plus software*), um total de cinco mil eventos foram contabilizados em cada experimento e os debris celulares foram omitidos das análises. A citometria de fluxo (*EasyCyte, Guava Technologies*®) é capaz de comparar populações de células quanto às características de tamanho e de granulosidade (relativo a organelas, vacúolos, etc) usando um laser de argônio (488nm). A partir desta ferramenta, pode-se delimitar a região (através de um *gate*) que compreende a população de células normais realizando a contagem da população de interesse.

3.3.3.1 DETERMINAÇÃO DA VIABILIDADE CELULAR EM HL-60 NO TRATAMENTO COM ONCO-A

A viabilidade celular foi avaliada por dois experimentos: teste de exclusão pelo Azul de Tripán e análise da integridade da membrana plasmática com iodeto de propídeo por citometria de fluxo. Ambos experimentos consistem em diferenciar e quantificar as células viáveis das não viáveis através da permeabilidade da membrana. Assim como o Azul do Tripán, o iodeto de propídeo (IP) é hidrofílico e possui a capacidade de ligar-se ao DNA das células cuja membrana esteja rompida.

PROCEDIMENTO EXPERIMENTAL

Um segundo tipo de tratamento também foi realizado com as células leucêmicas. Realizou-se a incubação com N-acetil-L-cisteína (5mM) por 1 h e, depois de lavadas com meio RPMI, Onco-A foi adicionada (8, 16,5 e 33 μ M) por 24 h. Após os tratamentos, as células foram centrifugadas (1500rpm por 5 min), o sobrenadante descartado e resuspendidas em 20 μ L de PBS. Foram retirados 90 μ L da suspensão de células e adicionados a 10 μ L do azul de tripan 0,4%. As células viáveis e não viáveis foram diferenciadas e contadas na câmara de Neubauer pelo microscópio óptico. Para análise no citômetro de fluxo, 50 μ L de células foram diluídas em 100 μ L de iodeto de propídeo (50 μ g/mL em PBS) e incubadas no escuro por 5 min à temperatura ambiente.

ANÁLISE DOS DADOS

Os dados foram expressos como média \pm D.P.M. de experimentos independentes (n = 3). Para verificação da ocorrência de diferenças significativas entre os diferentes grupos, os dados foram comparados por análise de variância (ANOVA), seguida por Teste de Dunnet com nível de significância de 5% (p < 0,05) (Prisma versão 5.0, *GraphPad Software*).

3.3.3.2 ANÁLISE MORFOLÓGICA DA HL-60 NO TRATAMENTO COM ONCO-

A ANÁLISE MORFOLÓGICA POR MAY-GRUNWALD-GIEMSA

A análise da morfologia celular, para avaliar sua integridade nuclear e citoplasmática, foi realizada pela coloração de May-Grunwald-Giemsa, que consiste em uma mistura de corantes com características neutras, dependentes do pH da solução (SIGMA, procedimento n°GS-10). Essa coloração possui azul de metileno (corante básico), eosina (corante ácido), responsáveis por deixar o núcleo em diversos tons de

púrpura, e o citoplasma nos de azul a cor-de-rosa claro.

PROCEDIMENTO EXPERIMENTAL

Após o tratamento, 50 µL da suspensão de células foram adicionadas à centrífuga de lâmina (cytospin). Depois de aderidas às lâminas, a fixação foi feita com metanol durante 1 min e a coloração por May-Grunwald por 10 s, seguida pelo Giemsa, 10 s. Depois de secas, as lâminas foram fixadas e montadas com bálsamo do Canadá.

ANÁLISE DOS DADOS

As características morfológicas de cada tratamento foram comparadas ao controle negativo. O registro das alterações celulares foi feito por fotografia em microscopia óptica utilizando o programa *Axio Vision Release 4.8* (06-2009) e por meio da criação de gráficos no programa *FlowJo_V10*.

3.3.3.3 ANÁLISE MORFOLÓGICA POR BROMETO DE ETÍDIO/LARANJA DE ACRIDINA

A análise da morfologia celular para diferenciar células viáveis das que estão em processo de apoptose e necrose foi realizada pela coloração com Brometo de Etídio/Laranja de Acridina (BE/LA). Este método consiste em identificar a fluorescência emitida pelas células de acordo com estado de sua membrana (MCGAHON et al., 1995).

PROCEDIMENTO EXPERIMENTAL

Após o tratamento, acrescentou-se 1 µL da solução de BE/LA (1:1) e uma alíquota foi retirada análise no microscópio de fluorescência.

ANÁLISE DOS DADOS

Para a quantificação percentual de cada evento celular (viáveis, necróticas e apoptóticas), foram contadas 300 células de cada amostra e montadas em lâminas que foram fotografadas para o registro visual de possíveis alterações. Os dados foram expressos como média ± D.P.M. de experimentos independentes (n = 3). Para verificação da ocorrência de diferenças significativas entre os diferentes grupos, os dados foram comparados por análise de variância (ANOVA), seguida por Teste de Dunnet com nível de significância de 5% ($p < 0,05$) (Prisma versão 5.0, *GraphPad Software*).

3.3.3.4 ESTUDOS DOS EFEITOS DA ONCO-A SOBRE A EXTERNALIZAÇÃO DA FOSFATIDILSERINA EM CÉLULAS HL-60

O estudo sobre a externalização da fosfatidilserina (PS), um fosfolípido exposto durante a fragmentação da membrana, foi realizado no citômetro de fluxo a partir da fluorescência emitida pelo 7-Amino-Actinomicina-D (7-AAD e pela fluoresceína (FITC) conjugada a anexina V. Este experimento se baseia na afinidade existente entre a Anexina V, uma proteína cálcio-dependente, que se liga à PS externalizada na célula em apoptose (KRYSKO et al., 2008).

PROCEDIMENTO EXPERIMENTAL

Após o tratamento, 100 µL da suspensão celular foi transferida para um tubo eppendorf, adicionada 100 µL do reagente contendo anexina V-FITC e 7-AAD, incubada na ausência de luz à temperatura ambiente por 20 min. As células em apoptose inicial são marcadas exclusivamente pela anexina V, cuja detecção se dá pela alta fluorescência amarela (583 nm) emitida com a ligação covalente da anexina V conjugada com ficoeritrina com a PS. A contra coloração para detecção de células em apoptose tardia e necrose é realizada com 7- AAD, reagente hidrofílico, capaz de se ligar ao DNA das células que tiverem danos na membrana plasmática emitindo, então, alta fluorescência vermelha quando excitado pelo laser de argônio (680 nm).

ANÁLISE DOS DADOS

Os dados foram expressos como média ± D.P.M. de experimentos independentes (n = 3). Para verificação da ocorrência de diferenças significativas entre os diferentes grupos, os dados foram comparados por análise de variância (ANOVA), seguida por Teste de Dunnet com nível de significância de 5% ($p < 0,05$) (Prisma versão 5.0, *GraphPad Software*).

3.3.3.5 ATIVAÇÃO DE CASPASES

Este estudo consistiu em quantificar caspases ativadas após 24 h de tratamento com a Onco-A. A avaliação das caspases foi determinada no citômetro de fluxo a partir da fluorescência emitida pelo iodeto de propídio e FAM (para as caspases -8, -9) e FLICA (para as caspases -3 e -7), um inibidor de caspases que se liga covalentemente ao sítio catalítico da caspase ativada e atravessa facilmente a membrana plasmática. Desta forma,

células com a coloração negativa para FLICATM e IP são consideradas viáveis, células FLICATM (+) e IP (-) são apoptóticas iniciais, células FLICATM (+) e IP (+) são apoptóticas tardias e FLICATM (-) e IP (+) são células necróticas.

PROCEDIMENTO EXPERIMENTAL

Para a detecção das caspases, após o tratamento 90 µL da suspensão celular foi transferida para um tubo eppendorf, acrescidas de 10 µL de FLICA 10X. Em seguida, as células foram incubadas por 1 h a 37 °C, 5 % de CO₂, homogeneizadas a cada 20 min. Depois de retiradas da estufa, foi acrescida 80 µL de tampão de lavagem e centrifugadas a 2000 rpm por 5 min. Depois de descartado o sobrenadante, o precipitado foi ressuspensionado em uma solução de IP (1:200 Tampão de lavagem 1x) e analisado no citômetro de fluxo.

ANÁLISE DOS DADOS

Os dados foram expressos como média ± D.P.M. de experimentos independentes (n = 3). Para verificação da ocorrência de diferenças significativas entre os diferentes grupos, os dados foram comparados por análise de variância (ANOVA), seguida por Teste de Dunnet com nível de significância de 5% (p < 0,05) (Prisma versão 5.0, *GraphPad Software*).

3.3.3.6 POTENCIAL TRANSMEMBRÂNICO DA MITOCÔNDRIA

A mitocôndria está envolvida na ativação da apoptose. A membrana externa da mitocôndria se rompe, formando poros que liberam citocromo c, o qual contribui para o desdobramento de rotas apoptóticas. Através destes poros forma-se um efluxo de íons H⁺, induzindo uma alteração do potencial transmembrânico mitocondrial (CURY-BOAVENTURA et al., 2004).

PROCEDIMENTO EXPERIMENTAL

Para avaliação do potencial transmembrânico, após o tratamento, 50 µL da suspensão celular foi transferida para um tubo eppendorf, acrescidas de 200µL de solução de rodamina 123 (1 µg/mL em PBS), foi incubada por 15 minutos a 37°C na ausência de luz. Em seguida, as células foram centrifugadas a 2000 rpm por 5 min, o sobrenadante descartado e o precipitado foi ressuspensionado em 100 µL PBS, incubados por 30 minutos

na ausência de luz, para análise no citômetro de fluxo (MILITÃO et al., 2006).

ANÁLISE DOS DADOS

Os dados foram expressos como média \pm D.P.M. de experimentos independentes ($n = 3$). Para verificação da ocorrência de diferenças significativas entre os diferentes grupos, os dados foram comparados por análise de variância (ANOVA), seguida por Teste de Dunnet com nível de significância de 5% ($p < 0,05$) (Prisma versão 5.0, *GraphPad Software*).

3.3.3.7 ESTUDO DA PROGRESSÃO DO CICLO CELULAR

O estudo do ciclo celular foi avaliado pela fluorescência emitida por iodeto de propídeo através do citômetro de fluxo. Esta análise consiste na capacidade que o iodeto de propídeo tem de intercalar ao DNA exposto com a fragmentação da membrana plasmática, e emitir fluorescência para que o software quantifique o material genético inerente a cada fase do crescimento celular (CIBAS, 1995). Destarte, a reação que ocorre na célula provoca mudanças na sua morfologia e estrutura, captadas pelo desvio do feixe de luz emitido pelo citômetro, que acoplado ao programa avalia as características celulares (SHAPIRO, 2003).

PROCEDIMENTO EXPERIMENTAL

Antes do tratamento com Onco-A, foi feito um segundo tipo de ensaio para elucidar a atividade farmacológica da Onco-A com NAC sobre o ciclo celular. Para tanto, as células HL- 60 foram pré-tratadas com NAC (4 mM) por 1 h, lavadas com RPMI e incubadas com Onco- A por 24 h para posterior avaliação no citômetro. Após os tratamentos, uma alíquota de 50 μ L de suspensão de células foram incubadas com 50 μ L da solução de lise (0,1% de citrato de sódio, 0,1 % de triton X-100 e 2 μ g/mL IP) na ausência de luz e a 37°C por 30 min para análise no citômetro de fluxo (MILITÃO et al., 2006; FERREIRA et al., 2010).

ANÁLISE DOS DADOS

Os dados foram analisados com o programa *ModFit LT 3.1 software* (*Verity software house*) para o cálculo do percentual de células nas fases G₀/G₁, S, G₂/M e DNA subdiploide (fragmentado). Os dados foram expressos como média \pm D.P.M. de experimentos independentes ($n = 3$). Para verificação da ocorrência de diferenças

significativas entre os diferentes grupos, os dados foram comparados por análise de variância (ANOVA), seguida por Teste de Dunnet com nível de significância de 5% ($p < 0,05$) (Prisma versão 5.0, *GraphPad Software*).

3.3.3.8 DETERMINAÇÃO DA GERAÇÃO DE ESPÉCIES REATIVAS DE OXIGÊNIO INTRACELULAR NO TRATAMENTO COM ONCO-A EM HL-60

As espécies reativas de oxigênio (EROs) geradas intracelularmente foram avaliadas por citometria de fluxo a partir da fluorescência emitida pelo diclorofluoresceína (DCF), que é formado somente na presença de EROS e diacetato 2'7'-diclorohidrofluoresceína (H₂-DCF-DA). Este experimento consiste em incubar as células tratadas com H₂-DCF-DA, um composto fotossensível facilmente hidrolisado por esterases intracelulares, capaz de gerar um composto altamente fluorescente (DCF) quando oxidado. A intensidade de fluorescência do DCF é proporcional à quantidade de EROs formadas intracelularmente (LEBEL et al., 1992).

PROCEDIMENTO EXPERIMENTAL

As células HL-60 foram distribuídas em placas de 6 poços e incubadas com Onco-A (8 e 16,5 μM) por 1 e 3 h. Peróxido de hidrogênio (100 μM) foi utilizado como controle positivo e o veículo (DMSO 0,1%) usado para dissolver as substâncias como controle negativo. Para avaliação de EROs após o tratamento, as células foram incubadas com 20 μM de H₂-DCF-DA por 30 minutos na ausência de luz a 37°C. Em seguida, as células foram centrifugadas duas vezes (1500rpm por 5 min) e ressuspensas em tampão PBS e analisadas por citometria de fluxo.

ANÁLISE DOS DADOS

Os dados foram expressos como média \pm D.P.M. de experimentos independentes ($n = 3$). Para verificação da ocorrência de diferenças significativas entre os diferentes grupos, os dados foram comparados por análise de variância (ANOVA), seguida por Teste de Dunnet com nível de significância de 5% ($p < 0,05$) (Prisma versão 5.0, *GraphPad Software*).

3.3.4 ESTUDO PROTEÔMICO DA VIA APOPTÓTICA NO TRATAMENTO COM ONCO-A EM HL-60

O estudo das proteínas da via apoptótica no tratamento com Onco-A em HL-60

foi realizado por imunoblotting, um tipo de ensaio que consiste na interação antígeno-anticorpo e proteínas são separadas por eletroforese de acordo com o seu tamanho, transferidas para uma membrana de nitrocelulose e detectadas de modo colorimétrico (TOWBIN; STAEHELIN; GORDON, 1979). A fim de detectar as proteínas envolvidas na via de sinalização celular, utilizou-se o anticorpo para caspase 8, caspase 9, beta actina e PARP.

PROCEDIMENTO EXPERIMENTAL

As células HL-60 foram distribuídas em placas de 6 poços e incubadas com Onco-A por 24 h na concentração de 16,5 μ M. As células foram centrifugadas para retirar o meio remanescente, lavadas com PBS, o sobrenadante foi descartado e ao pellet foi acrescido solução RIPA (1 mL para cada 10^7 células), deixando no gelo por 1 h e 30 min e sonicando a cada 20 min. Depois, a amostra centrifugada a 1300 rpm por 10 min. a 4°C e o sobrenadante foi armazenado a -20°C para uso posterior.

O extrato de proteínas foi quantificado pelo kit *DC Protein Assay (BioRad Laboratories)* em placa de 96 poços usando uma curva de BSA (*Bovine Serum Albumin*), onde o RIPA foi utilizado como branco experimental. Como descrito pelo fabricante, 5 μ L de cada amostra foi adicionada a 25 μ L do reagente A' (20 μ L do reagente S para 1 mL do reagente A) e 200 μ L do reagente B. Depois de incubadas por 10 min sob agitação, as amostras foram lidas a 620 nm. A concentração foi obtida pela regressão linear da curva obtida do gráfico de absorbância vs. quantidade de proteínas. Em seguida, as amostras coradas com tampão *Blue Juice 5X* foram aplicadas no gel de resolução de poliacrilamida descontínuo 12,5% (Tris-HCL 1,5 M, pH 8,8) e gel de concentração de poliacrilamida 5% (Tris-HCL 0,5M, pH 6,8) usando um sistema de eletroforese vertical (*Biorad*). A corrida eletroforética foi realizada em 100V e amperagem livre por 2 h. Depois de separadas, as proteínas foram transferidas para membrana de PVDF pelo modo de imersão à voltagem livre e 400 mA por 1h e 30 min a 4°C.

Depois de transferida, a membrana foi bloqueada por 1 h com leite desnatado em 3%, incubada com anticorpo primário diluído em BSA 5% sob agitação constante a 4°C e incubada com anticorpo secundário diluído em leite desnatado 5% por 2 h sob agitação. No intervalo entre cada uma das incubações, as membranas foram lavadas com TBS-Tween 0,05%, por 10 min., repetido três vezes e uma vez em TBS. A última lavagem foi seguida pelo tampão de revelação até à indicação colorimétrica desejada e, logo

depois, lavada em água destilada.

Os anticorpos primários utilizados foram: Caspase-8, caspase-8 clivada, caspase-9, caspase-9 clivada, PARP, PARP clivado (Asp214) e β -actina (*Cell Signaling Technology*). Os anticorpos secundários utilizados foram: anti-mouse IGg para caspase-8, caspase-8 clivada e β -actina. Para os demais, foram usados anti-rabbit IGg.

ANÁLISE DOS DADOS

As imagens das membranas foram registradas pelo captador de imagem *ImageQuant 300 (GE Healthcare)*.

3.3.5 AVALIAÇÃO DO POTENCIAL GENOTÓXICO EM CÉLULAS LEUCÊMICAS

O potencial genotóxico foi avaliado pela fluorescência emitida pelo brometo de etídio visualizada em microscópio de fluorescência, após o tratamento com a Onco-A e corrida eletroforética pelo teste de cometa, também conhecido com *Single-Cell Gel Electrophoresis (SCGE)* (SINGH et al., 1988). Esta análise consiste na capacidade de detectar quebras simples e duplas em moléculas de DNA induzidas por compostos com potencial genotóxico, tais como agentes alquilantes, intercalantes e oxidantes (FAIRBAIRN et al., 1995; ANDERSON et al., 1994; SILVA et al., 2003).

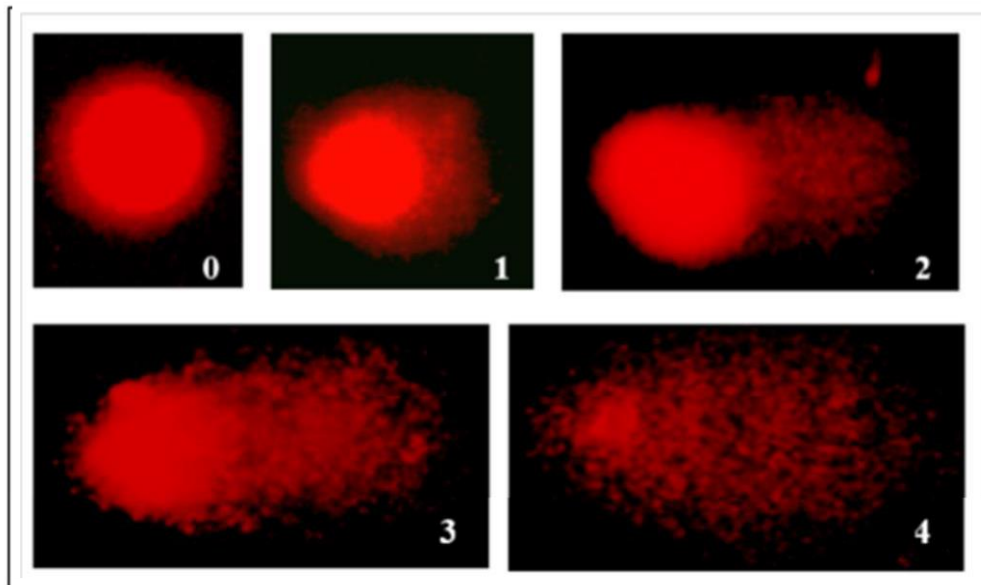
PROCEDIMENTO EXPERIMENTAL

Além do grupo de células HL-60 incubadas com Onco-A por 24 h (8, 16,5 e 33 μ M), outro grupo também foi tratado previamente com NAC (4 mM) por 1 h, lavadas com RPMI e então, incubadas com Onco-A por 24 h. Após os tratamentos, uma alíquota de 50 μ L de suspensão de células tratada e foram dissolvidos em agarose de baixo ponto de fusão (1,5%) a 37°C e imediatamente espalhada sobre uma lâmina pré-tratada com agarose a ponto de fusão normal (0,5%). Em seguida, as lâminas foram cobertas com lamínulas para uniformizar a distribuição do material na lâmina e mantidas a 4°C para solidificação da agarose.

Após a solidificação da agarose, a lamínula foi retirada e as lâminas imersas em uma solução de lise (5 M NaCl, 100 mL EDTA, 10mM Tris, 1% N-Lauroyl sarcosine, 1% Triton X-100, 10% DMSO, pH 10,0) a 4°C por 1 h. Em seguida, elas foram imersas na solução de neutralização (0,4 M Tris, pH 7,5) por 15 min. Posteriormente, as lâminas foram dispostas na cuba de eletroforese, preenchida com solução alcalina (1 mM Na₂EDTA, 300 mM NaOH, pH > 13,0) a 4°C. As lâminas permaneceram em repouso por

20 min para permitir o relaxamento do DNA e a conversão de sítios álcali-lábeis em quebra de fitas simples e duplas. Após a eletroforese em ambiente de baixa luminosidade a 25 V e 300 mA (0,5 V/cm), as lâminas foram novamente neutralizadas por 5 min e fixadas em etanol a 100%.

Figura 14. Padrão de escores determinados pelo tamanho e intensidade da cauda do DNA após eletroforese para o ensaio cometa.



Fonte: CAVALCANTI, 2010.

Para análise, as lâminas foram coradas com 50 μL de solução de brometo de etídio (20 $\mu\text{g/mL}$) e analisadas em microscópio de fluorescência. A análise foi realizada de acordo com o padrão de escores previamente determinados pelo tamanho e intensidade da cauda do cometa (**Figura 14**), sendo indicado o escore atribuído a cada cometa de acordo com o dano ao DNA: 0 = sem danos ao DNA, portanto, sem cauda (< 5 %); 1 = baixo nível de danos, com a cauda menor que o diâmetro da cabeça (5-20 %); 2 = médio nível de danos, com a cauda representando 1-2 vezes o diâmetro da cabeça (20-40 %); 3 = alto nível de danos, com a cauda representando mais de 2 vezes o diâmetro da cabeça (40-95 %); 4 = dano total (> 95 %) (HARTMANN & SPEIT, 1997).

ANÁLISE DOS DADOS

Foram contados 50 cometas/lâmina e classificados dentre as cinco categorias (0, 1, 2, 3 e 4) que representam a percentagem de DNA na cauda do cometa, indicando o grau de dano sofrido pela célula. O índice de dano (ID) foi obtido pela seguinte fórmula: ID =

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

Os dados foram expressos como média \pm E.P.M. de experimentos independentes ($n = 3$). Para verificação da ocorrência de diferenças significativas entre os diferentes grupos, os dados foram comparados por análise de variância (ANOVA), seguida por Teste de Dunnet com nível de significância de 5% ($p < 0,05$) (Prisma versão 5.0, *GraphPad Software*).

3.3.6 AVALIAÇÃO DA ONCO-A SOBRE AS ENZIMAS TOPOISOMERASE I E II.

O ensaio de relaxamento do DNA foi avaliado pela fluorescência emitida por brometo de etídio após o tratamento com a Onco-A e enzimas topoisomerase I e II (Top I e Top II – *Drug Screening Kit, TopoGEN, Inc., Columbus, USA*), que promovem o relaxamento de DNA super-enovelado, o qual apresenta padrão de corrida eletroforética diferenciado. Esta análise consiste na capacidade de detectar o potencial inibitório do composto sobre a atividade catalítica dessas enzimas.

PROCEDIMENTO EXPERIMENTAL

O experimento foi realizado no laboratório de Farmacologia Molecular chefiado pelo Prof. Dr. Yves Pommier do Instituto Nacional do Câncer (Bethesda, Estados Unidos). Um microlitro (250 ng) de DNA plasmidial superhelicoidizado (pRYG, uma derivação do pU 19) foi incubado com Top I e II (4 U) a 37 °C por 30 min no tampão de relaxamento (Tampão Tris-HCl 10 mM, pH 7,9, EDTA 1 mM, NaCl 0,15 M, BSA 0,1 %, espermidina, 0,1 mM e glicerol 5 %) na presença de 0,1; 1,0; 10 e 100 μ M da Onco-A para um volume final de 20 μ L. Camptotecina (CPT; 1 μ M) e Etoposídeo (VP-16; 100 μ M) foram usados como controle positivo para Top I e II, respectivamente. A reação foi interrompida pela adição de 2 μ L de SDS 10 % (para facilitar o bloqueio da enzima no complexo de clivagem) e 50 μ g/mL de proteinase K (para digerir ligações protéicas). Em seguida, as amostras foram misturadas ao tampão de amostra contendo o corante azul de bromofenol (0,25%). As amostras foram, então, aplicadas no gel de agarose 1% e a corrida eletroforética foi realizada a 80 V por 120 min à temperatura ambiente.

ANÁLISE DOS DADOS

A revelação do gel foi feita com brometo de etídio e, imediatamente, registradas sob luz ultravioleta pelo captador de imagem *ImageQuant 300 (GE Healthcare)*. Em seguida, realizou-se uma análise qualitativa quanto ao padrão de corrida eletroforética das amostras tratadas quando comparadas aos controles positivo e negativo.

4 RESULTADOS

4.1 ATIVIDADE CITOTÓXICA E HEMOLÍTICA DA ONCOCALIXONA A

O potencial antiproliferativo da Onco-A foi avaliado pelo método colorimétrico de MTT, obtendo-se os valores de CI_{50} de $3,38 \pm 0,87 \mu\text{g/mL}$ em células HL-60 após 24 h e de $2,05 \pm 0,92 \mu\text{g/mL}$ em CMSP após 72h de incubação (**Tabela 1**). Os estudos de atividade hemolítica foram feitos usando suspensão de eritrócitos de humanos a 2 %. A Onco-A revelou CE_{50} de $191,1 \pm 0,03 \mu\text{g/mL}$, valor esse bem inferior à capacidade citotóxica revelada pelo MTT, sugerindo que a atividade citotóxica não seja causada por danos à membrana celular.

Tabela 1. Atividade citotóxica *in vitro* da Oncocalixona frente a linhagens tumorais e cultura primária de células mononucleares de sangue periférico pelo ensaio MTT.

Linhagem	CI_{50}^*	
	$\mu\text{g/mL}$	μM
OVCAR-8	>5	>16,5
SF-295	>5	>16,5
HCT-116	>5	>16,5
HL-60*	$3,38 \pm 0,87$	11,18
CMSP	$2,05 \pm 0,92$	6,78

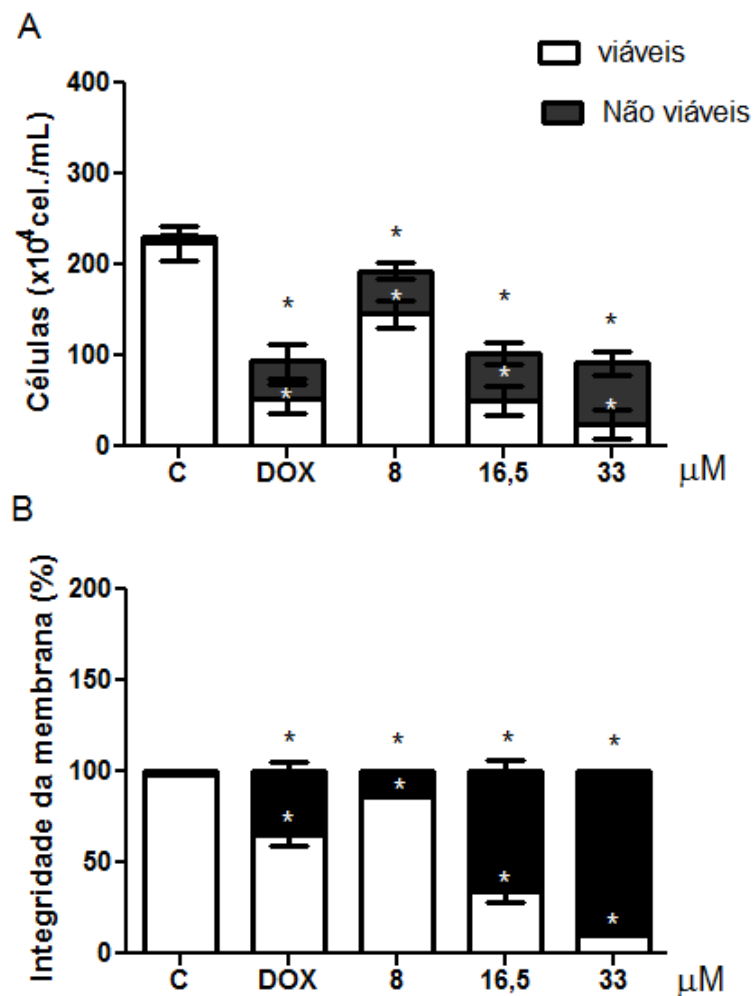
Os valores (n=3) correspondem à $CI_{50} \pm$ desvio padrão da média obtidos por regressão não-linear para as linhagens tumorais humanas carcinoma de cólon (HCT-116), de ovário (OVCAR-8), glioblastoma (SF-295) e células mononucleares de sangue periférico (CMSP) isoladas a partir de voluntários humanos saudáveis após 72h de incubação. *As células leucêmicas (HL-60) foram incubadas por 24h.

4.2 REDUÇÃO DA VIABILIDADE CELULAR

A viabilidade celular foi analisada pelo teste de azul de tripan e por marcação com IP após 24 h de tratamento para avaliar o número de células sobreviventes ao tratamento com Onco-A e a porcentagem de células remanescentes com a membrana íntegra, respectivamente. A **Figura 15A** demonstrou que a Onco-A causou redução dose-dependente na viabilidade celular (145 ± 15 ; $50 \pm 16,5$ e $24,5 \pm 15 \times 10^4$ cells/mL) e

aumento do número de células não viáveis ($47,5 \pm 8$; $52,3 \pm 12$ e $67 \pm 13 \times 10^4$ cells/mL para as concentrações de 8, 16,5 e 33 μM , respectivamente) quando comparadas com o controle negativo ($223 \pm 19,0$ e $5,77 \pm 4 \times 10^4$ cells/mL) ($p < 0,05$).

Figura 15. Viabilidade de células leucêmicas da linhagem HL-60 após 24 h de tratamento com a Oncocalixona A (8, 16,5 e 33 μM) (Onco-A). A - Teste de azul de tripan; B - Marcação com iodeto de propídeo e avaliação por citometria de fluxo. O controle negativo foi tratado apenas com o veículo utilizado para a diluição da substância (DMSO 0,1 %). O quimioterápico doxorubicina (0,6 μM) foi usado como controle positivo (Dox). Os valores correspondem à média \pm D.P.M. de experimentos independentes ($n = 3$). * $p < 0,05$ comparado ao controle por ANOVA seguido por *Dunnet*.

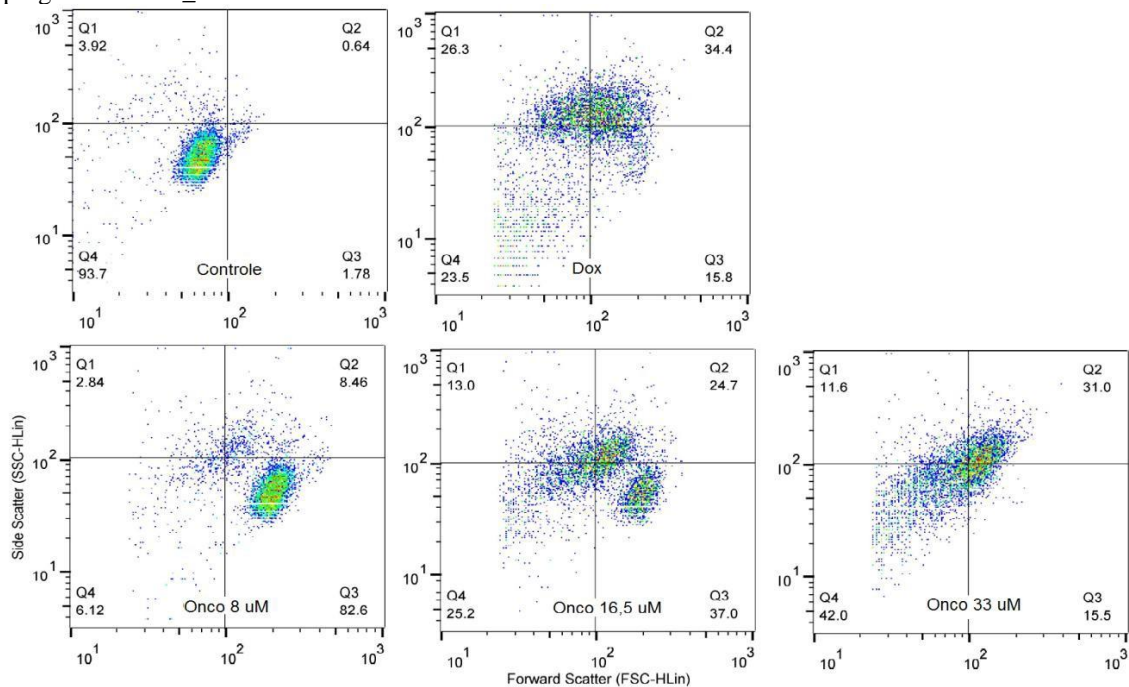


A integridade da membrana celular foi avaliada por exclusão do iodeto de propídeo (**Figura 15B**). De forma semelhante ao observado com a avaliação com azul de tripan, todas as concentrações testadas causaram redução da integridade da membrana plasmática ($86,3 \pm 0,5$; $34,1 \pm 6$ e $10,6 \pm 0,3\%$, para as concentrações de 8, 16,5 e 33 μM , respectivamente) quando comparadas ao controle negativo ($97,88 \pm 0,2\%$) ($p < 0,05$). Células tratadas com o controle positivo Dox (0,5 μM) apresentaram redução para $34,95 \pm 5\%$ de viáveis ($p < 0,05$).

4.3 ALTERAÇÕES MORFOLÓGICAS DAS CÉLULAS HL-60 NO TRATAMENTO COM ONCO-A

Aspectos morfológicos de células HL-60 após 24 h de tratamento com Onco-A foram analisados usando diferentes metodologias: citometria de fluxo (iodeto de propídio), May-Grünwald-Giemsa e coloração diferencial com brometo de etídio/laranja de acridina. A **Figura 16** representa a análise da integridade da membrana determinada por marcação com iodeto de propídeo. Nestes gráficos, o eixo X (FSC, *Forward Scatter*) representa o volume celular e o eixo Y (SSC, *Side Scatter*), a granulosidade, respectivamente. É possível observar que na concentração de 8 μM há aumento do percentual de células mais volumosas [Quadrante 3 (Q3): 82,6%] quando comparada ao controle negativo (Q3: 1,78%); mas não foi capaz de aumentar a granulosidade (Q1: 2,84%) como a dose de 33 μM (Q1: 11,6%). As concentrações de 8 μM (8,46%), 16,5 μM (24,7%) e 33 μM (31%) causaram aumento progressivo na porcentagem de células que apresentam maior volume e granulosidade (Q3). A maior concentração da Onco (33 μM) apresentou valores semelhantes às aquelas tratadas com a Dox (Q2: 34,4%).

Figura 16. Morfologia de células leucêmicas da linhagem HL-60 após 24h de tratamento com Oncocalixona A (8, 16,5 e 33 μM) (Onco-A) e análise por citometria de fluxo com iodeto de propídeo. O controle negativo foi tratado apenas com o veículo utilizado para a diluição da substância (DMSO 0,1 %). O quimioterápico doxorubicina (0,6 μM) foi usado como controle positivo (Dox). Os valores correspondem à média \pm D.P.M. de experimentos independentes (n = 3). * p<0.05 comparado ao controle por ANOVA seguido por *Dunnet*. Gráficos obtidos pelo *Guava Expresses Plus Software* e analisados no programa *FlowJo_V10*.



A análise morfológica avaliada por coloração diferencial (BE/LA) por microscopia de fluorescência (**Figura 17**) revelou redução no número de células viáveis ($208,3 \pm 6,2$

e 92 ± 10) e aumento de células apoptóticas ($88,6 \pm 7$ e $246,7 \pm 3,5$) nas concentrações de 16,5 e 33 μ M em relação ao controle negativo ($280 \pm 7,2$ e $20,6 \pm 7$), respectivamente ($p < 0,05$). A concentração de 33 μ M causou aumento significativo de células necróticas ($20,6 \pm 6$) em comparação ao controle ($13,8 \pm 5$).

As mudanças morfológicas também foram visualizadas por coloração pelo método de May-Grünwald-Giemsa (**Figura 18**). As células do grupo controle negativo exibiram o padrão de células viáveis e pleomórficas, com membrana íntegra, nítida visualização das delimitações da membrana plasmática e núcleo (**Figura 18A**). Após 24h de incubação com Onco-A na dose de 8 μ M (**Figura 18C**), as células apresentaram, presença de vacúolos celulares e alterações da membrana plasmática sugestivas de corpos apoptóticos. Verificou-se, na concentração de 16,5 μ M, um aumento da expressão de características apoptóticas como redução do volume celular, condensação da cromatina, formação de *blebbings* em associação com achados de desintegração da membrana plasmática e restos celulares (**Figura 18D**). Na maior concentração testada (33 μ M, **Figura 18E**), obsevou-se um padrão de alterações morfológicas característico de necrose, como eosinofilia, condensação da cromatina (picnose) e ruptura da membrana (**Figura 18B**). A Dox (0,6 μ M) reduziu o volume das células, provocou fragmentação nuclear e condensação da cromatina e desintegração da membrana.

Figura 17. Viabilidade de células leucêmicas da linhagem HL-60 após 24h de tratamento com Oncocalixona A (8, 16,5 e 33 μ M) (Onco-A) coradas com Brometo de etídeo/Laranja de acridina determinado por microscopia de fluorescência. O controle negativo (C) foi tratado apenas com o veículo utilizado para a diluição da substância (DMSO 0,1 %). O quimioterápico doxorubicina (0,6 μ M) foi usado como controle positivo (Dox). Os valores correspondem à média \pm D.P.M. de experimentos independentes ($n = 3$). * $p < 0,05$ comparado com o grupo controle negativo por ANOVA seguido por Dunnett.

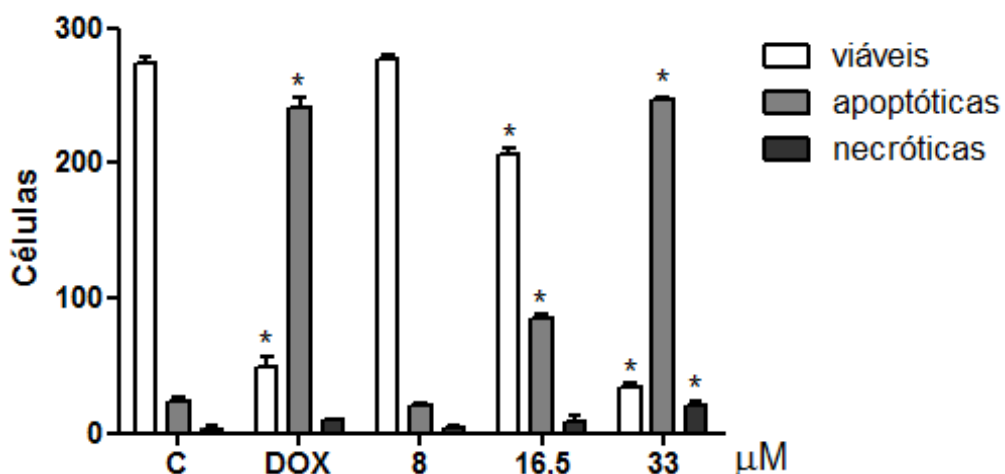
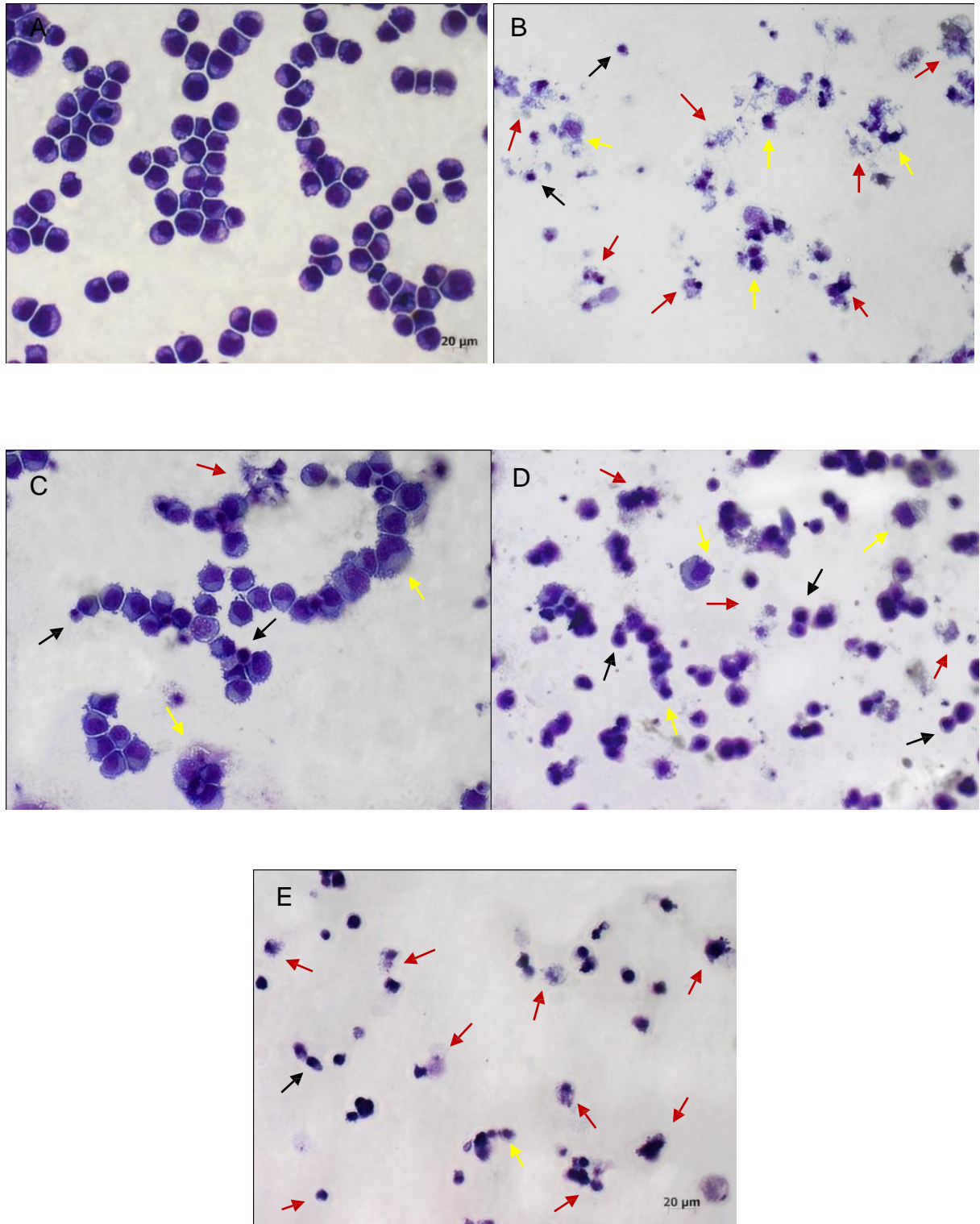


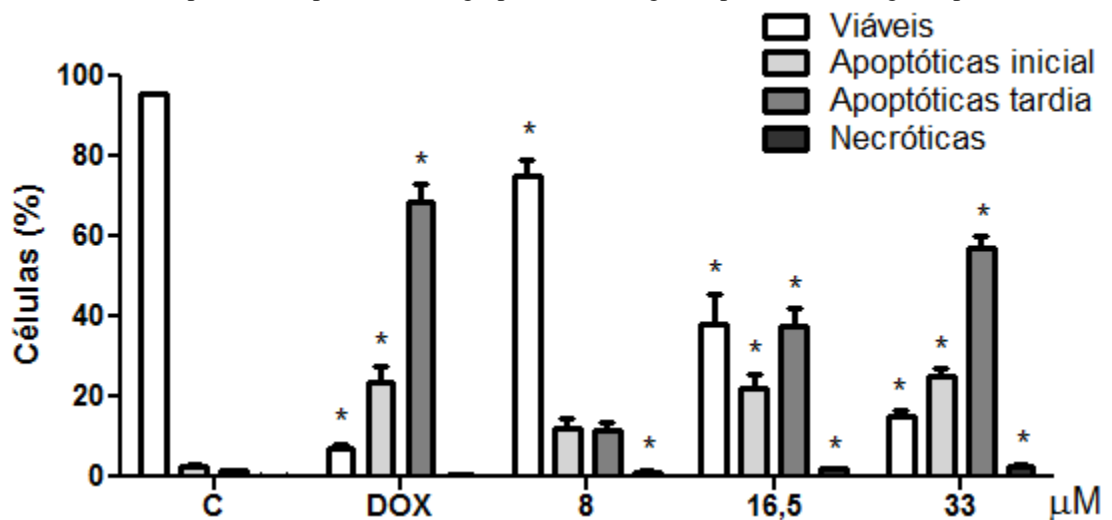
Figura 18. Morfologia de células leucêmicas da linhagem HL-60 após 24h de tratamento com Oncocalixona A (8, 16,5 e 33 μM) (Onco-A) coradas com May-Grünwald-Giemsa e visualizadas por microscopia óptica. O controle negativo foi tratado apenas com o veículo utilizado para a diluição da substância (DMSO 0,1 %). O quimioterápico doxorubicina (0,6 μM) foi usado como controle positivo (Dox). Os valores correspondem à média \pm D.P.M. de experimentos independentes (n = 3). Aspectos morfológicos observados: (→) redução do volume, (↘) desintegração da membrana plasmática, (↪) restos celulares. A) Células sem tratamento, B) DOX, C) 8 μM de Onco-A, D) 16,5 μM de Onco-A, E) 33 μM de Onco-A.



4.4 EXTERNALIZAÇÃO DA FOSFATIDILSERINA

Desde que os resultados apresentados nos estudos de morfologia indicaram um padrão a morte celular sugestivo de apoptose, decidiu-se investigar o perfil da externalização de fosfatidilserina em células da linhagem HL-60 tratadas com Onco-A após 24 h de exposição (**Figura 19**). Assim, a avaliação por citometria de fluxo identificou diminuição de células viáveis ($83,5 \pm 1,6$; $54,5 \pm 2,8$ e $15,3 \pm 3,6\%$) e aumento de células em apoptose inicial ($9,6 \pm 3,1$; $15,8 \pm 1,4$ e $22,07 \pm 2,0\%$), de células em apoptose tardia ($11,7 \pm 4,6$; $37,4 \pm 11,3$ e $56,8 \pm 7,0\%$) e necróticas ($1,2 \pm 0,4$; $2,0 \pm 0,1$ e $2,7 \pm 0,8\%$) nas concentrações de 8, 16,5 e 33 μM quando comparadas ao controle negativo ($95,5 \pm 0,6$; $2,7 \pm 0,4$ e $0,28 \pm 0,08\%$), respectivamente ($p < 0,05$). Semelhantemente, o controle positivo Dox aumentou o número de células apoptóticas e reduziu a quantidade de células viáveis ($p < 0,05$).

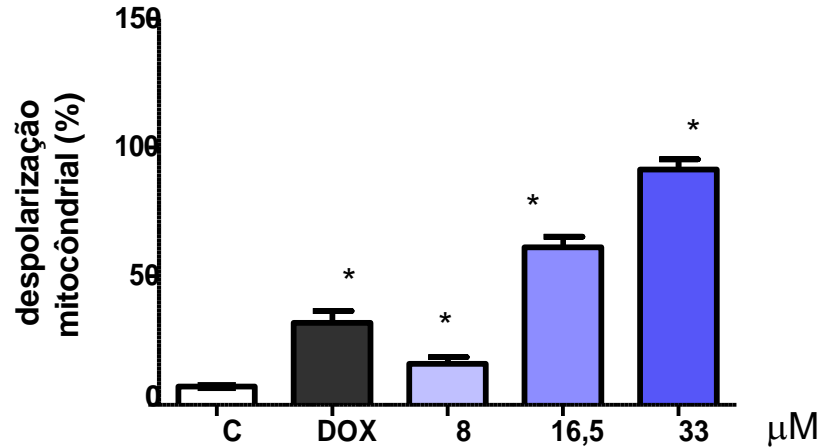
Figura 19. Externalização de fosfatidilserina em células leucêmicas da linhagem HL-60 após 24h de tratamento com Oncocalixona A (8, 16,5 e 33 μM) (Onco-A) marcadas com 7-Amino-Actinomicina-D (7-AAD e pela fluoresceína (FITC) conjugada a anexina V. O controle negativo (C) foi tratado apenas com o veículo utilizado para a diluição da substância (DMSO 0,1 %). O quimioterápico doxorubicina (0,6 μM) foi usado como controle positivo (Dox). Os valores correspondem à média \pm S.E.M. de experimentos independentes ($n = 3$). * $p < 0,05$ comparado com o grupo controle negativo por ANOVA seguido por Dunnett.



4.5 ALTERAÇÃO DO POTENCIAL MITOCONDRIAL ($\Delta\Psi\text{M}$) E ATIVAÇÃO DE CASPASES

Para investigar qual via apoptótica seria ativada, avaliou-se o potencial mitocondrial e a ativação de caspases após 24h de incubação com Onco-A. Como descrito na **Figura 20**, todas as concentrações causaram despolarização mitocondrial (8 μM : $16 \pm 2,6\%$; 16,5 μM : $61,2 \pm 4\%$ e 33 μM : $91,4 \pm 3,9\%$, respectivamente) quando comparadas ao controle negativo ($7,1 \pm 0,6\%$) assim como a Dox ($32 \pm 4,6\%$) ($p < 0,05$).

Figura 20. Despolarização mitocondrial em células leucêmicas da linhagem HL-60 após 24h de tratamento com Oncocalixona A (8, 16,5 e 33 μ M) (Onco-A) marcadas com rodamina 123. O controle negativo (C) foi tratado apenas com o veículo utilizado para a diluição da substância (DMSO 0,1 %). O quimioterápico doxorrubicina (0,6 μ M) foi usado como controle positivo (Dox). Os valores correspondem à média \pm D.P.M. de experimentos independentes (n = 3). * p <0,05 comparado com o grupo controle negativo por ANOVA seguido por Dunnett.



Uma vez que a despolarização mitocondrial sugere uma possível ativação da via intrínseca da apoptose, avaliou-se a ativação de caspases (iniciadoras, caspases-8 e -9 e efetoras, caspases-3 e -7) em células HL-60 após 24 h de exposição à Onco-A. Como mostrado nas **Figura 21A e B**, ambas as caspases-8 e -9 foram ativadas, observando-se aumento de células apoptóticas e necróticas em todas as concentrações testadas, com exceção da concentração de 8 μ M da caspase-9 ($5,6 \pm 1,3$ e $2,1 \pm 0,5\%$), a qual não apresentou alterações significativas em relação ao controle negativo ($3,4 \pm 0,5$ e $1,2 \pm 0,5\%$), respectivamente. Portanto, a avaliação da caspase-8 nas concentrações de 8 ($31,0 \pm 3,7$ e $5,6 \pm 1,3\%$), 16,5 ($29,5 \pm 4,5$ e $27,1 \pm 4,5\%$) e 33 μ M ($21,3 \pm 2,5$ e $26,8 \pm 2,3\%$) detectou aumento do percentual de células em apoptose inicial e tardia em relação ao controle negativo ($1,9 \pm 0,15$ e $0,5 \pm 0,2\%$), respectivamente (p <0,05). Quanto a caspase-9, detectou-se aumento de células em apoptose inicial ($21,8 \pm 1,7$ e $25,6 \pm 5,2\%$) e tardia ($37,1 \pm 3,7$ e $48,1 \pm 3,2\%$) (16,5 e 33 μ M, respectivamente) (p <0,05). Dox também aumentou significativamente o percentual de células em apoptose inicial ($45,2 \pm 8,0$ e $31,0 \pm 3,7\%$) e tardia ($17,1 \pm 4,0$ e $5,6 \pm 1,3\%$) em ambas as caspases iniciadoras estudadas (caspase-8 e -9, respectivamente) (p <0,05).

O outro passo avaliado na cascata de eventos foi a ativação das caspases-3 e -7. Como demonstrado na **Figura 22** e semelhante ao encontrado com as caspases-8 e -9, a Onco-A aumentou a quantidade de células apoptóticas iniciais ($14 \pm 2,7$; $22,7 \pm 5,8$ e $11 \pm 4,0\%$) e tardias ($12,3 \pm 3,0$; $31,6 \pm 2,5$ e $21,6 \pm 6\%$) em todas as concentrações testadas (8, 16,5 e 33 μ M) (caspases-3 e -7, respectivamente) quando comparadas com o controle negativo ($1,5 \pm 0,16\%$) (p <0,05). O controle positivo Dox também aumentou o

percentual de células em apoptose inicial ($48,6 \pm 5,3\%$) e tardia ($6,3 \pm 1,3\%$) após 24 h de incubação ($p < 0,05$).

Figura 21. Ativação das caspases-9 (A) e caspase-8 (B) em células leucêmicas da linhagem HL-60 após 24h de tratamento com Oncocalixona A (8, 16,5 e 33 μM) (Onco-A) e avaliada por citometria de fluxo (iodeto de propídeo e FAM) e por *Western blotting* (16,5 μM). O controle negativo (C) foi tratado apenas com o veículo utilizado para a diluição da substância (DMSO 0,1 %). O quimioterápico doxorubicina (0,6 μM) foi usado como controle positivo (Dox). Os valores correspondem à média \pm D.P.M. de experimentos independentes ($n = 3$). * $p < 0,05$ comparado com o grupo controle negativo por ANOVA seguido por Dunnett. β - actina foi usada como padrão eletroforético.

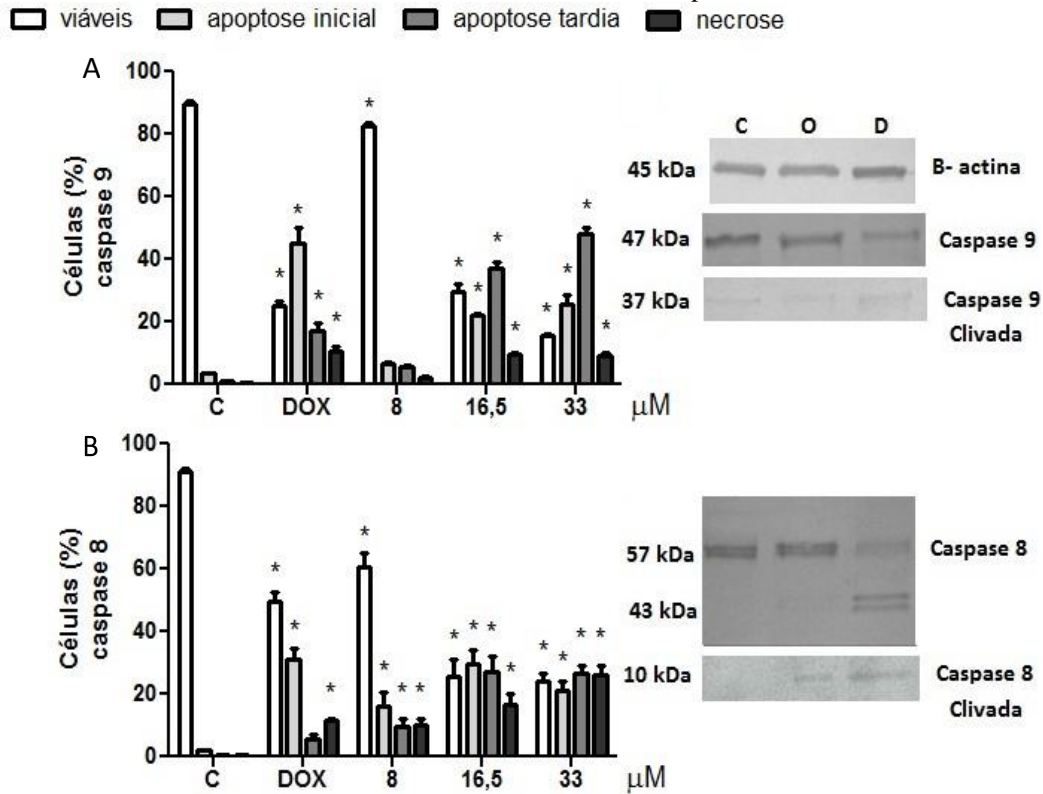
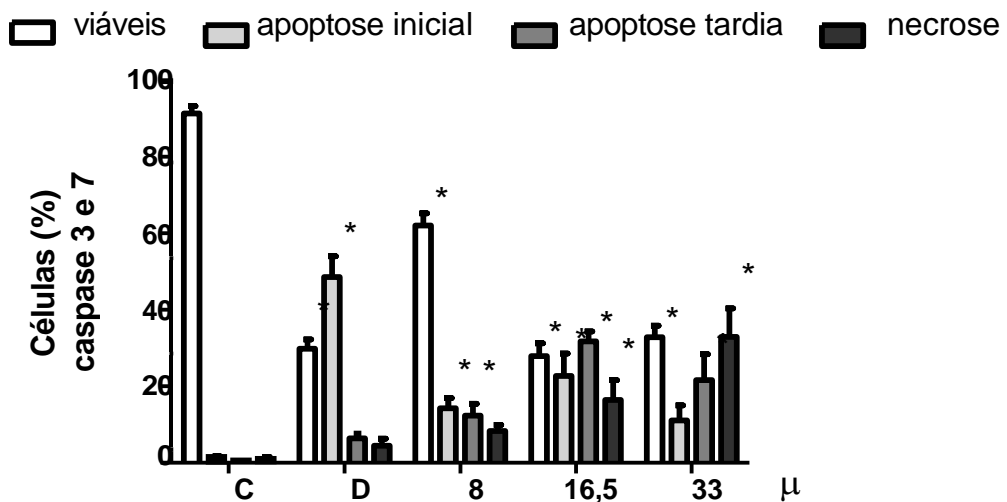
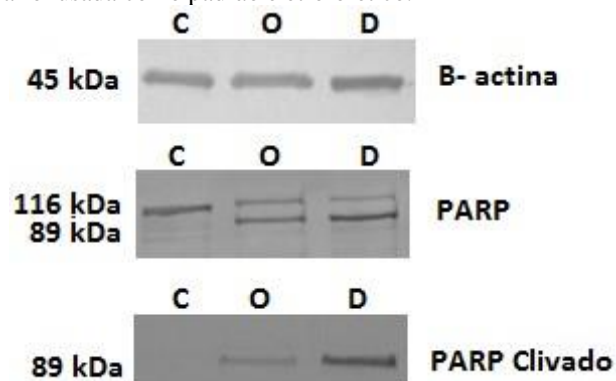


Figura 22. Efeito Ativação das caspases-3 e -7 em células leucêmicas da linhagem HL-60 após 24h de tratamento com Oncocalixona A (8, 16,5 e 33 μM) (Onco-A) e avaliada por citometria de fluxo (iodeto de propídeo e FLICATM). O controle negativo (C) foi tratado apenas com o veículo utilizado para a diluição da substância (DMSO 0,1 %). O quimioterápico doxorubicina (0,6 μM) foi usado como controle positivo (Dox). Os valores correspondem à média \pm D.P.M. de experimentos independentes ($n = 3$). * $p < 0,05$ comparado com o grupo controle negativo por ANOVA seguido por Dunnett. β - actina usada como padrão eletroforético.



Sabendo-se que a caspase -3 tem como função clivar uma série de proteínas intracelulares, tais como PARP (poli ADP-ribose polimerase), enzimas de reparo de DNA e laminina nuclear (CHANG; YANG, 2000), o último passo do estudo das vias de morte celular foi a análise proteômica de PARP, corroborando que a dose de 16,5 μM foi capaz de clivar a proteína na fração de 89 kDa e ativá-la como o controle positivo, doxorubicina (**Figura 23**). A **Figura 21A** apresenta a análise qualitativa da caspase 9, comparado ao controle do experimento β -actina, que demonstra ter a porção constitutiva mais expressa e clivada em menor proporção. Da mesma forma, a **Figura 21B** apresenta a membrana exposta ao anticorpo da caspase 8, a expressão da caspase constitutiva e clivada está mais aparente na Doxorubicina, no entanto, a porção de 10 kDa no tratamento com Onco-A também foi expressa.

Figura 23. Expressão de PARP (poli ADP-ribose polimerase) íntegro e clivado em células leucêmicas da linhagem HL-60 após 24h de tratamento com Oncocalixona A (16,5 μM) por *Western blotting*. O controle negativo (C) foi tratado apenas com o veículo utilizado para a diluição da substância (DMSO 0,1 %). O quimioterápico doxorubicina (0,6 μM) foi usado como controle positivo (Dox). β - actina foi usada como padrão eletroforético.



4.6 PARADA DO CICLO CELULAR EM G₀/G₁ E FRAGMENTAÇÃO DE DNA

O estudo das fases do ciclo celular foi realizado por citometria de fluxo após 24 h de incubação com a Onco-A. Todas as concentrações testadas (8, 16,5 e 33 μM) foram capazes de aumentar expressivamente a quantidade de DNA sub-G₁ após 24 h de tratamento ($25,98 \pm 2,44$; $56,73 \pm 1,48$ e $64,27 \pm 1,48\%$, respectivamente) ($p < 0,05$, **Tabela 2**). Além de provocar fragmentação de DNA, o tratamento com Onco-A induziu uma redução no percentual de células na fase G₂/M do ciclo celular nas concentrações de 16,5 μM ($6,81 \pm 2,54\%$) e 33 μM ($2,88 \pm 3,62\%$) quando comparadas ao controle negativo ($14,62 \pm 0,18\%$) ($p < 0,05$). Enquanto isso, a Dox aumentou a quantidade de células com DNA subdiploide ($94,16 \pm 0,96\%$) e reduziu o número de células em G₀/G₁ ($31,65 \pm$

6,14%) e em G₂/M (1,94 ± 4,75 %) (p<0,05).

Tabela 2. Conteúdo de DNA nuclear de células leucêmicas da linhagem HL-60 após 24 h de incubação com Oncocalixona A (8, 16,5 e 33 µM) (Onco-A) quantificado por citometria de fluxo após marcação com iodeto de propídeo. O controle negativo (C) foi tratado apenas com o veículo utilizado para a diluição da substância (DMSO 0,1 %). O quimioterápico doxorrubicina (0,6 µM) foi usado como controle positivo (Dox).

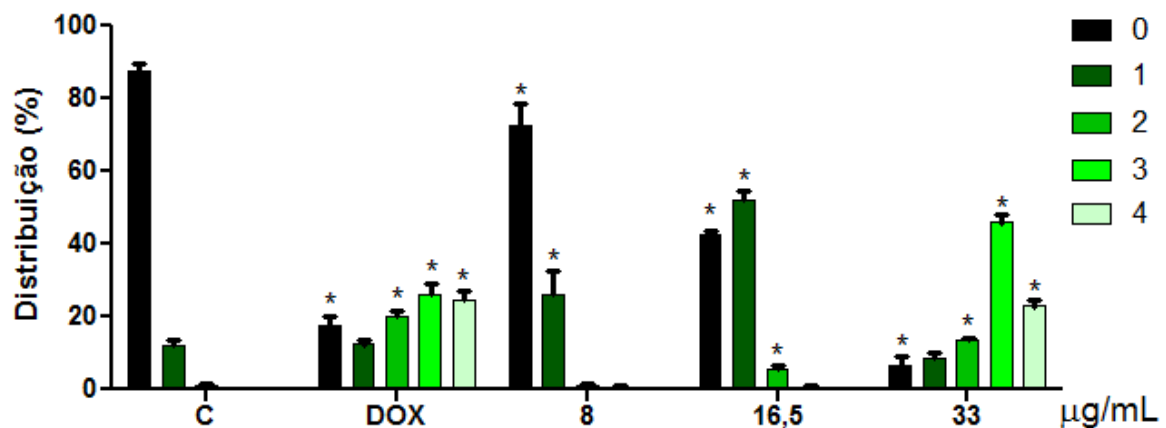
Substância	Concentração (µM)	DNA %			
		Sub-G ₁	G ₀ /G ₁	S	G ₂ /M
C	-	20,45 ± 2,59	43,70 ± 0,27	49,11 ± 1,24	14,62 ± 0,18
Dox	0,5	94,16 ± 0,96*	31,65 ± 6,14*	46,48 ± 1,38	1,94 ± 4,75*
	8	25,98 ± 2,44*	37,98 ± 2,00	48,87 ± 1,48	10,78 ± 2,58
Onco-A	16,5	56,73 ± 1,48*	39,23 ± 1,18	51,09 ± 0,18	6,81 ± 2,54*
	33	64,27 ± 1,48*	39,41 ± 2,04	52,86 ± 1,00	2,88 ± 3,62*

Os valores correspondem à média ± D.P.M. de experimentos independentes (n = 3). *p<0,05 comparado com o grupo controle negativo por ANOVA seguido por Dunnett.

4.7 GENOTOXICIDADE

A **Figura 24** representa de maneira mais detalhada o padrão de escores determinado pelo tamanho e intensidade da cauda do cometa após tratamento com a Onco-A, levando em consideração seu tamanho e intensidade (classe de dano). Por conseguinte, a Onco-A possui potencial genotóxico de forma concentração dependente, uma vez que todas concentrações estudadas (8, 16,5 e 33 µM) causaram quebras simples e/ou duplas do DNA, porém danos mais extensos (classes 3 e 4) foram observados apenas na concentração de 33 µM, a qual apresentou um padrão semelhante ao controle positivo Dox.

Figura 24. Padrão de escore da cauda do DNA de células leucêmicas da linhagem HL-60 após 24h de tratamento com Oncocalixona A (8, 16,5 e 33 µM) (Onco-A) determinado pelo Ensaio do Cometa, visualizado com brometo de etídeo e avaliado por microscopia de fluorescência em luz ultravioleta, levando em consideração a classe de dano ao DNA (0, 1, 2, 3 e 4). O controle negativo (C) foi tratado apenas com o veículo utilizado para a diluição da substância (DMSO 0,1 %). O quimioterápico doxorrubicina (0,6 µM) foi usado como controle positivo (Dox). Os valores correspondem à média ± D.P.M. de experimentos independentes (n = 3). *p<0,05 comparado com o grupo controle negativo por ANOVA seguido por Dunnett.

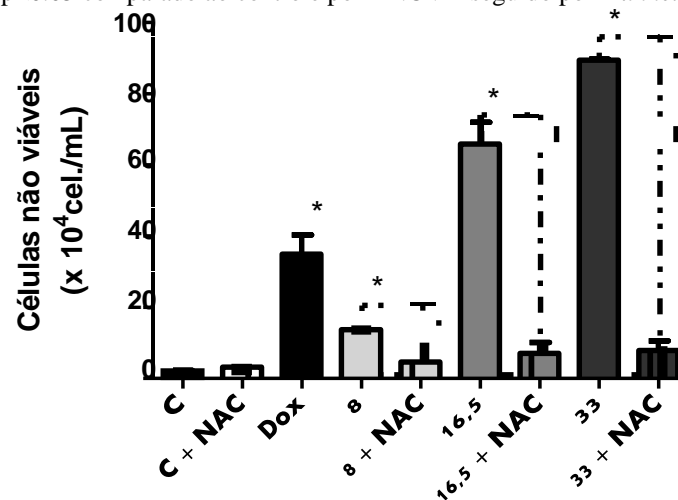


4.8 PROTEÇÃO DA N-ACETILCISTEÍNA CONTRA DANOS CELULARES

4.8.1 MANUTENÇÃO DA INTEGRIDADE DE MEMBRANA





Uma vez confirmada o comportamento da Oncocalixona-A como acceptor de Michael (COSTA et al., 2012), o mecanismo descrito acima sugere que o composto carbonílico α,β insaturado seja reativo a grupos tiol cistenil, como NAC, glutathiona ou DNA (SANTOS, 2007). Desta forma, a integridade da membrana celular foi analisada em células pré-tratadas por 1 h com NAC, lavadas e depois incubadas por 24 h com Onco-A. Interessantemente, a integridade da membrana plasmática das células manteve-se inalterada independente da concentração testada (8 μM : $95,36 \pm 3,6\%$); (16,5 μM : $93 \pm 3,1\%$) e (33 μM : $92,1 \pm 2,6\%$) e semelhante ao controle negativo sem NAC ($97,8 \pm 0,2\%$) e com NAC ($96,8 \pm 0,1\%$) (Figura 25).

Figura 25. Viabilidade de células leucêmicas da linhagem HL-60 pré-tratadas por 1 h com N- acetilcisteína (NAC, 4 mM), incubadas por 24 h com Oncocalixona A (8, 16,5 e 33 μM) (Onco-A), marcadas com iodeto de propídeo e avaliadas por citometria de fluxo. O controle negativo foi tratado apenas com o veículo utilizado para a diluição da substância (DMSO 0,1 %). O quimioterápico doxorubicina (0,6 μM) foi usado como controle positivo (Dox). Os valores correspondem à média \pm D.P.M. de experimentos independentes (n = 3). * $p < 0.05$ comparado ao controle por ANOVA seguido por *Dunnet*.



4.8.2 PROTEÇÃO CONTRA FRAGMENTAÇÃO DE DNA E ALTERAÇÕES NO CICLO CELULAR

O pré-tratamento com NAC por 1 h antes do tratamento com Onco-A foi capaz de alterar a ação citotóxica da Onco-A sobre as células leucêmicas. Detectou-se uma tendência da reversão dos danos citotóxicos da Onco-A nas células pré-tratadas com NAC, como representado nas Figura 26 e Figura 27.

Figura 26. Ciclo celular de células leucêmicas da linhagem HL-60 pré-tratadas por 1 h com N- acetilcisteína (NAC, 4 mM), incubadas por 24 h com Oncocalixona A (8, 16,5 e 33 μ M) (Onco-A), marcadas com iodeto de propídeo e avaliadas por citometria de fluxo. O controle negativo foi tratado apenas com o veículo utilizado para a diluição da substância (DMSO 0,1 %). O quimioterápico doxorubicina (0,6 μ M) foi usado como controle positivo (Dox). Os valores correspondem à média \pm D.P.M. de experimentos independentes (n = 3). * p<0.05 comparado ao controle por ANOVA seguido por *Dunnet*. Os dados analisados e apresentados pelo programa *ModFit LT 3.1 software* (Verity software house). Legenda:  Sub-G1, 1° pico : G1, 2° pico : G2,  S.

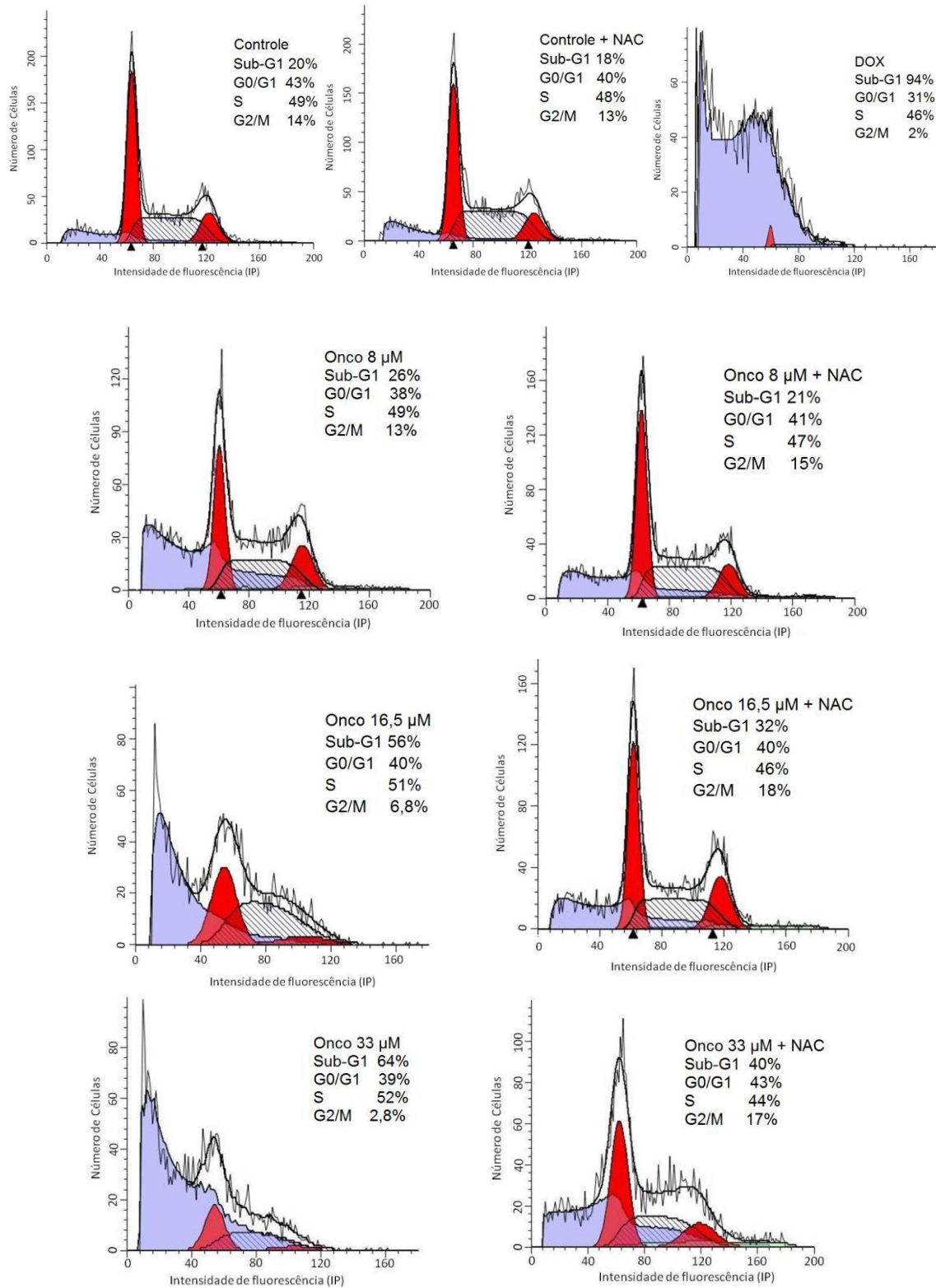
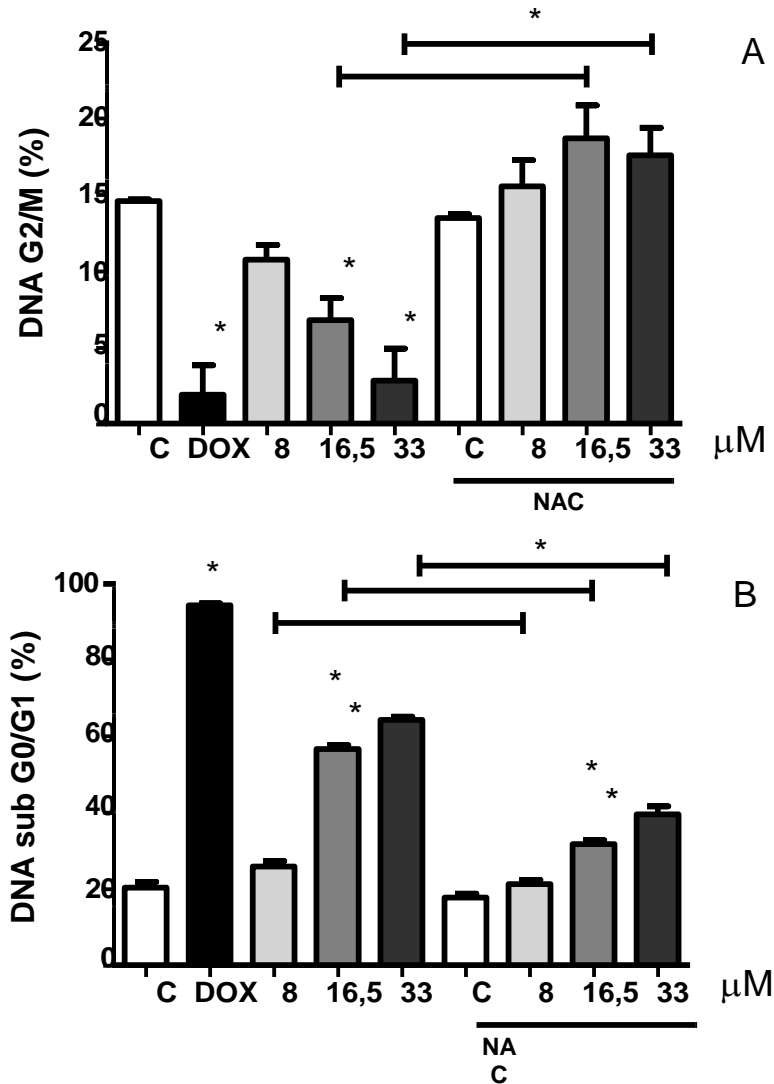


Figura 27. Fases Sub-G1 (A) e G₂/M (B) do ciclo celular de células leucêmicas da linhagem HL-60 pré-tratadas por 1 h com N-acetilcisteína (NAC, 4 mM), incubadas por 24 h com Oncocalixona A (8, 16,5 e 33 μM) (Onco-A), marcadas com iodeto de propídeo e avaliadas por citometria de fluxo. O controle negativo foi tratado apenas com o veículo utilizado para a diluição da substância (DMSO 0,1 %). O quimioterápico doxorubicina (0,6 μM) foi usado como controle positivo (Dox). Os valores correspondem à média ± D.P.M. de experimentos independentes (n = 3). * p<0,05 comparado ao controle por ANOVA seguido por *Dunnet*. Os dados analisados pelo programa *ModFit LT 3.1 software* (Verity software house).



As células HL-60 tratadas com Onco-A 16,5 μM e 33 μM apresentaram um percentual de $18,71 \pm 3,07$ e $17,61 \pm 2,55\%$ na fase G₂/M, enquanto os grupos sem pré-tratamento com NAC apresentaram uma redução desses valores para essa fase ($6,81 \pm 2,54$ e $2,88 \pm 3,62\%$, respectivamente) (p<0,05). De forma similar, houve redução de DNA subdiploide nas células pré-tratadas com NAC ($21,0 \pm 1,5$; $32,0 \pm 1,4$ e $40,0 \pm 3,0\%$) quando comparadas aos efeitos da Onco-A (8, 16,5 μM e 33 μM) na ausência de pré-tratamento ($25,98 \pm 2,44$; $56,73 \pm 1,48$ e $64,27 \pm 1,48\%$, respectivamente) (p<0,05).

4.8.3 AÇÃO PROTETORA CONTRA DANOS GENOTÓXICOS

Os estudos de genotoxicidade usando o Ensaio do Cometa revelaram que a Onco-A induziu quebras nas moléculas do DNA das células leucêmicas com índices de dano (ID) de $64,50 \pm 2,64$ e $263,8 \pm 9,0$ nas concentrações de $16,5 \mu\text{M}$ e $33 \mu\text{M}$, respectivamente, quando comparadas com o controle negativo ($13,5 \pm 5,8$) ($p < 0,05$) (**Figura 28**). Interessantemente, o pré-tratamento com NAC reduziu significativamente a genotoxicidade da Onco-A nas duas maiores concentrações testadas ($8 \mu\text{M}$: $11,5 \pm 3,7$ e $16,5 \mu\text{M}$: $19,75 \pm 5,73$) a valores próximos ao controle negativo. Essa proteção das células contra o dano genotóxico da Onco-A está refletido na **Figura 29**, que demonstra reversão da classe de dano pela Onco-A, quando as células foram pré-tratadas com NAC e evidenciando danos semelhantes ao controle negativo (células tratadas com DMSO e NAC apenas).

Figura 28. Índice de Dano (ID) ao DNA determinado através do Ensaio do Cometa alcalino em células leucêmicas da linhagem HL-60 pré-tratadas por 1 h com N-acetilcisteína (NAC, 4 mM), incubadas por 24 h com Oncocalixona A (8, 16,5 e 33 μM) (Onco-A), visualizadas com brometo de etídeo e avaliadas microscopia de fluorescência em luz ultravioleta. O controle negativo foi tratado apenas com o veículo utilizado para a diluição da substância (DMSO 0,1 %). O quimioterápico doxorubicina (0,6 μM) foi usado como controle positivo (Dox). Os valores correspondem à média \pm D.P.M. de experimentos independentes ($n = 3$). * $p < 0,05$ comparado ao controle por ANOVA seguido por *Dunnett*. Os escores foram obtidos pela multiplicação do número de células de cada classe (0, 1, 2, 3 e 4) pelo classe de dano, variando de 0 (sem danos) a 400 (dano máximo).

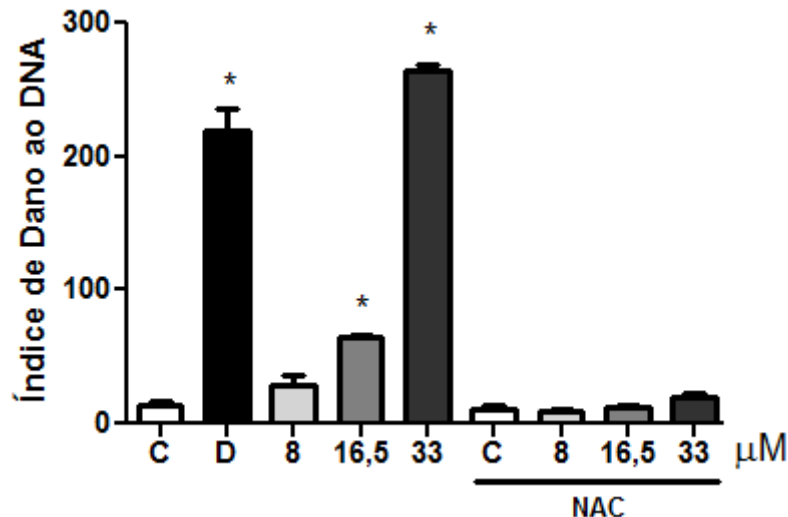
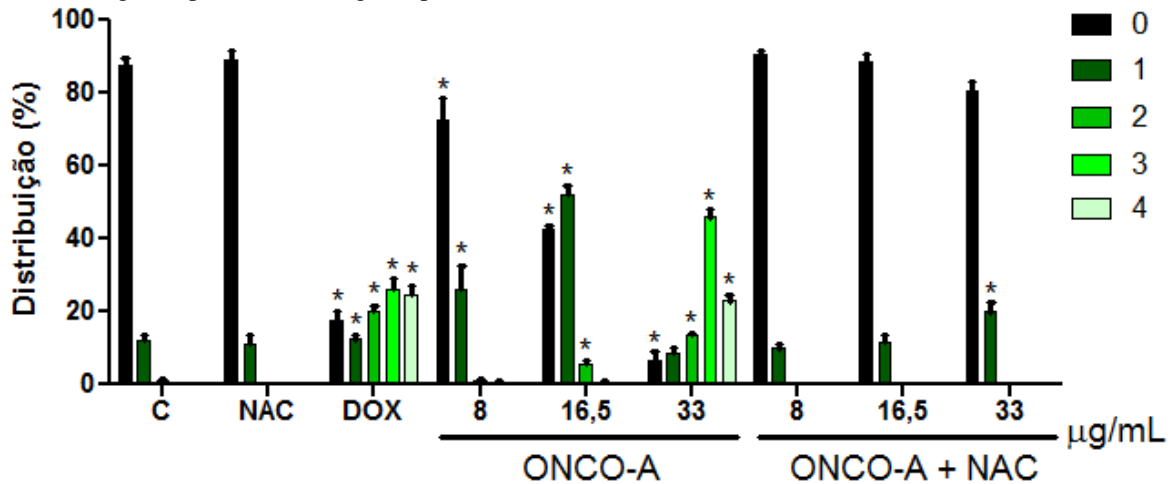


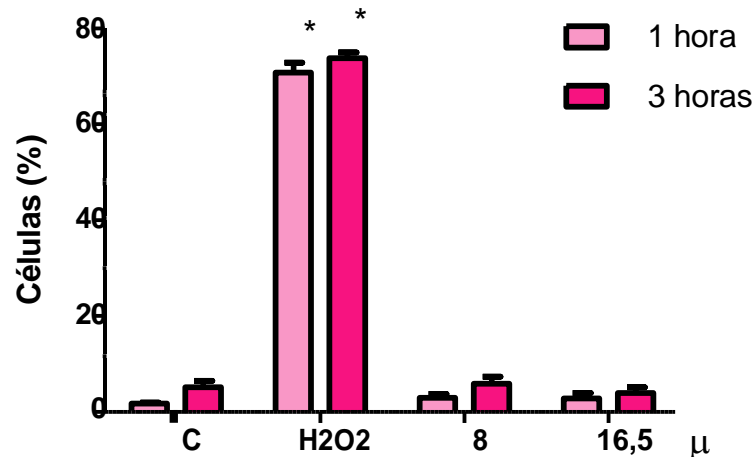
Figura 29. Padrão de escore da cauda do DNA de células leucêmicas da linhagem HL-60 pré-tratadas por 1 h com N-acetilcisteína (NAC, 4 mM), incubadas por 24 h com Oncocalixona A (8, 16,5 e 33 μ M) (Onco-A) determinado pelo Ensaio do Cometa alcalino, visualizado com brometo de etídeo e avaliado por microscopia de fluorescência em luz ultravioleta, levando em consideração a classe de dano ao DNA (0, 1, 2, 3 e 4). O controle negativo (C) foi tratado apenas com o veículo utilizado para a diluição da substância (DMSO 0,1 %). O quimioterápico doxorrubicina (0,6 μ M) foi usado como controle positivo (Dox). Os valores correspondem à média \pm D.P.M. de experimentos independentes (n = 3). * p <0,05 comparado com o grupo controle negativo por ANOVA seguido por Dunnett.



4.9 AVALIAÇÃO DA GERAÇÃO DE ESPÉCIES REATIVAS DE OXIGÊNIO INTRACELULARES

A fim de verificar se o desencadeamento da via intrínseca da apoptose está relacionada com a geração de EROs, investigou-se os níveis de EROs após 1 e 3 h de incubação com a Onco-A. De acordo com o disposto na **Figura 30** nenhuma das concentrações testadas foi capaz de gerar EROs. Por outro lado, o controle positivo peróxido de hidrogênio aumentou o percentual de células geradoras de EROs após 1 e 3 h de incubação (p <0,05).

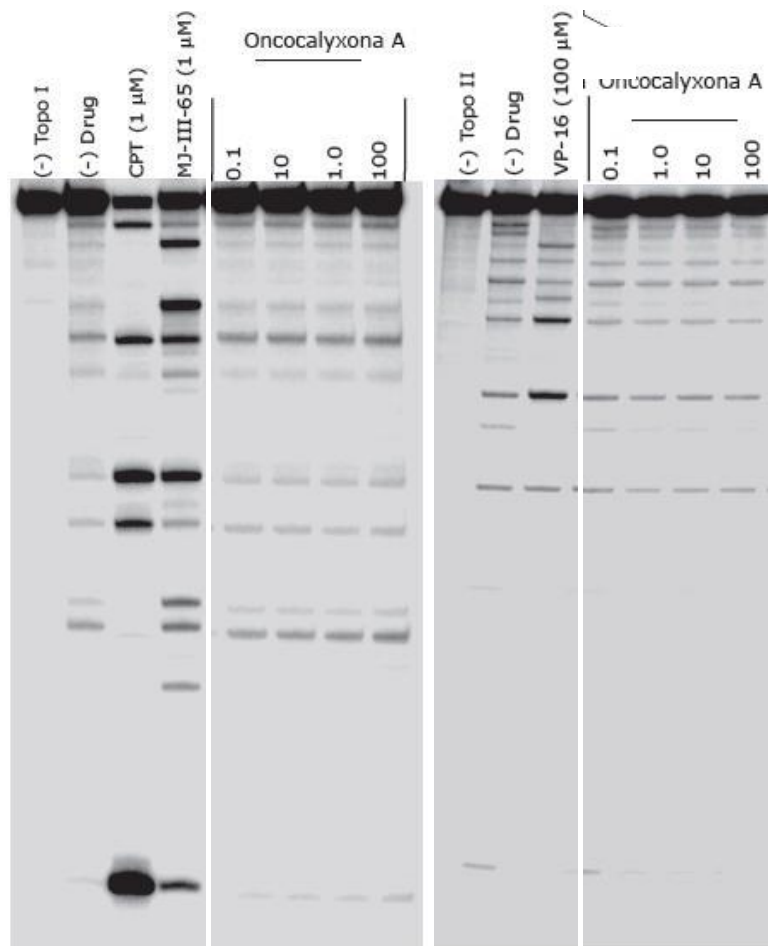
Figura 30. Efeito Geração de espécies reativos do oxigênio (EROs) em células leucêmicas da linhagem HL-60 após 1 e 3 h de tratamento com Oncocalixona A (8, 16,5 e 33 μ M) (Onco-A), visualizada com diacetato 2'7'-diclorohidrofluoresceína (H₂-DCF-DA) e avaliado por citometria de fluxo. O controle negativo foi tratado apenas com o veículo utilizado para a diluição da substância (DMSO 0,1 %). O quimioterápico doxorrubicina (0,6 μ M) foi usado como controle positivo (Dox). Os valores correspondem à média \pm D.P.M. de experimentos independentes (n = 3). * p <0.05 comparado ao controle por ANOVA seguido por *Dunnett*.



4.10 AVALIAÇÃO DA ONCO-A SOBRE AS ENZIMAS TOPOISOMERASE I E II

Embora seja perceptível a ação da Onco-A sobre o DNA, essa atividade farmacológica não parece estar envolvida com a ação inibitória das enzimas Top I e II, como visualizado na **Figura 31** sobre o ensaio de relaxamento de DNA. Nenhuma das concentrações testada da Onco-A foi capaz de produzir o mesmo efeito que os controles positivos utilizados (CPT e MJ-III-65, inibidores da Top I; VP-16, inibidor da Top II), como visualizado nas bandas do gel.

Figura 31. Análise dos efeitos da Oncocalixona A sobre as enzimas Topoisomerases I e II nas concentrações de 0,1, 1, 10 e 100 μM . Como controles positivos foram usados Camptotecina (CPT) e MJ-III-65 e VP-16 (inibidores da Topoisomerases I e II, respectivamente).



5 DISCUSSÃO

A maneira mais rápida, sensível e fácil de triagem dos novos agentes antitumorais é a determinação da citotoxicidade em modelos celulares *in vitro* (CRAGG; NEWMAN, 2000). O teste MTT é apropriado para estimar essa citotoxicidade contra células cancerosas (BERRIDGE, 1996) e tem sua classificação baseada de acordo com os valores de CI_{50} : alta ($IC_{50} < 2 \mu M$), moderada ($2\mu M < IC_{50} < 10 \mu M$), ou inativa ($IC_{50} > 10 \mu M$) (PÉREZ-SACAU et al., 2007). Os principais mecanismos de citotoxicidade das benzoquinonas estão relacionados ao stress oxidativo, intercalação e alquilação de nucleófilos celulares (BOLTON et al., 2000). Os danos celulares podem ocorrer através das espécies reativas de oxigênio (EROs), formadas das reações de redução pelas enzimas redutases, que agem com o DNA, lipídios e proteínas – telomerase, proteína de choque 90 (MONKS et al., 1992). E pela intercalação direta da quinona ao DNA e alquilação à proteínas essenciais e ácidos nucleicos (BRUNMARK; CADENAS, 1989; ASCHE, 2005).

O valor classificado como pouco moderado da IC_{50} da Onco-A, após 24h de incubação em células da linhagem HL-60, foi semelhante ao apresentado por Leyva et al. (2000) na mesma linhagem após 72 h ($3,0 \pm 1,7 \mu g/mL$) ($p > 0,05$), sugerindo, assim, que os efeitos da Onco-A não sejam tempo-dependentes. Essa citotoxicidade não mostrou seletividade contra células leucêmicas, uma vez que apresentou valor similar ao da IC_{50} da Onco-A em CMSP humano ($p > 0,05$). A ação tóxica contra células normais é uma determinação importante, já que o balanço entre os efeitos terapêuticos e toxicológicos de um composto químico é um parâmetro chave quando se pretende verificar a sua aplicabilidade farmacológica (ANAZETTI et al., 2003).

Previamente, a Onco-A mostrou citotoxicidade até 5 vezes maior contra as linhagens leucêmicas, CEM ($1,2 \pm 0,5 \mu g/mL$) do que contra linhagens de tumores sólidos U373MG ($18,0 \pm 3,2 \mu g/mL$), SW837 ($14,0 \pm 3,2 \mu g/mL$), MCF-7 ($15,0 \pm 8,7 \mu g/mL$), HCT-8 ($17,0 \pm 2,0 \mu g/mL$), SW-1573 ($5,8 \pm 1,1 \mu g/mL$), SW-1573-S1 ($6,0 \pm 2,0 \mu g/mL$), SW-1573-2R160 ($14,0 \pm 6,0 \mu g/mL$) (as duas últimas são linhagens multirresistentes) (LEVYA et al., 2000). Embora a Onco-A seja considerada um substrato pobre para a glicoproteína P e outras proteínas relacionadas à multirresistência, uma possibilidade para a sua atividade é a expressão da NQO1 pela linhagem (PESSOA, 2000; CAVALCANTI, 2010).

A enzima NQO1 é superexpressa em diversos tumores quando comparada aos

tecidos normais, dentre eles mama (MCF-7, NQO1+) (ALLEN; KOLESAR, 2002), pulmão (A549, NQO1+) e cólon (HCT-116, NQO1+) (TANG et al., 2013). Ainda, é uma enzima que pode ser explorada como um alvo intracelular (CHENNA et al., 2001). A linhagem HL-60, todavia, apresenta polimorfismo para o gene que codifica a enzima NQO1, reduzindo ou abolindo a atividade redutase dessa enzima (PAN et al, 2002). Talvez exista alguma correlação entre os níveis de expressão de NQO1 e a citotoxicidade exercida pela Onco-A, uma vez que essa benzoquinona interferiu sobre a proliferação de células NQO1⁻.

Apesar das células HL-60 serem deficientes na expressão de NQO1, superexpressam algumas enzimas da família P₄₅₀ (KAWAI et al., 2003). A relação entre a estrutura molecular do composto quinona ametrantrona e a enzima P₄₅₀ é apresentada por Kostrzewa-Nowak et al. (2012). Este trabalho demonstra que há o aumento significativo da atividade da ametrantrona, uma estrutura de quinona não modificada após sua conversão redutora pela P₄₅₀ frente a HL-60 e às linhagens tumorais multidrogas resistentes (HL-60/VINC e HL-60/DOX superexpressam P₄₅₀). Por outro lado, compostos quinona modificados (benzoperimidina – BP1, antrapiridona – CO1 e pirazolopirimidoacridine – PPAC2) não apresentaram nenhum efeito contra as linhagens testadas. Semelhante à ametrantrona, pode-se sugerir que a Onco-A seja reduzida por enzimas citocromais da família P₄₅₀.

Outra característica importante para avaliar um fármaco em potencial é sua capacidade hemolítica (SANTOS et al., 2010). A Onco-A revelou uma CE₅₀ de 191,1 µg/mL; como esse valor é inferior à capacidade analisada pelo MTT, é possível inferir que a atividade citotóxica não seja causada por danos à membrana celular, nem esteja relacionada ao extravasamento de moléculas (BHAKDI, BERNHEIMER, SEKIYA).

O valor da hemólise encontrado no presente estudo revelou ser 25 vezes maior que o potencial citotóxico antileucêmico. Mesmo sem apresentar os parâmetros cinéticos do estudo de hemólise, acredita-se que a Onco-A não esteja agindo diretamente sobre a membrana plasmática celular, portanto que seus efeitos antiproliferativos estejam associados a mecanismos mais específicos (CAVALCANTI, 2010).

De fato, algumas quinonas têm capacidade citolítica. Verificou-se que qualquer modificação no esqueleto das quinonas sesquiterpenóides e de seus derivados semissintéticos têm variação sobre a atividade biológica, sugerindo-se que seus efeitos citotóxicos poderiam ser o resultado de danos causados à membrana celular. Os

compostos que apresentam a mesma porção quinonóide, diferindo apenas com a posição de uma ligação dupla, não têm diferença significativa entre as suas atividades. O anel da quinona do sesquiterpenoide parece ser essencial para promover a citotoxicidade, atividade hemolítica em membrana de eritrócitos, atividade antimetabólica em ovos de ouriço-do-mar e contra células de carcinoma de Ehrlich (LEVYA et al., 2000; COSTA-LOTUFO et al., 2002; PROKOFEVA et al., 2004).

Testes *in vivo* com a fração clorofórmica de *A. Oncocalyx*, contendo 80% da Oncocalixoa-A, revelaram uma DL₅₀ de 498 mg/kg de peso corpóreo (PESSOA, 2000). Este valor é considerado moderadamente tóxico, de acordo com as categorias de toxicidade estabelecidas por Hodge e Sterner (1944). No entanto, Oncocalixona A (20 mg/kg) inibiu 50% do crescimento tumoral dos animais com Carcinoma de Erlich, (28 mg/kg) inibiu 42% do crescimento tumoral dos animais com linhagem L1210, da mesma forma que extrato hidroalcoólico de *A. oncocalyx* na dose de 300 mg/kg promoveu a redução do crescimento tumoral em 46% (MORAES et al., 1997; PESSOA, 2000).

ANÁLISE DA VIABILIDADE CELULAR EM HL-60

Os efeitos antiproliferativos estão costumeiramente associados à redução da viabilidade celular. Desta maneira, com o intuito de corroborar com o ensaio de MTT, foram analisadas as células com membrana íntegra, capazes de expulsar o azul de tripan e serem marcadas com IP. No teste azul de tripan, as células viáveis possuem a membrana intacta e conseguem bombear o corante para fora da célula; enquanto as células mortas, que possuem a membrana lesada, permitem a coloração das mesmas (LOUIS; SIEGEL, 2011). Após a ligação ao DNA, o Iodeto de Propídio emite alta fluorescência quando excitado pelo laser de argônio (488 nm), enquanto as células com membrana íntegra emitem baixa fluorescência. Além de avaliar a viabilidade celular e caracterizar o tipo de morte, este experimento, também identifica aspectos morfológicos, como tamanho e granulosidade (MACKLIS; MADISON, 1990). Todas as concentrações analisadas apresentaram redução significativa ($p < 0,05$) na viabilidade celular de maneira dose-dependente.

A partir da análise de Azul de Tripan e dos parâmetros FSC e SSC, no citômetro, foi possível detectar mudanças morfológicas nas células de acordo com o aumento das concentrações de Onco-A. Neste trabalho foi utilizado coloração diferencial com corantes intercalantes de DNA – metodologia apropriada nos estudos iniciais de indução de morte celular – para verificar se estas alterações estavam relacionadas com

características apoptóticas (LEITE et al., 1999; GASIOROWSKI et al., 2001; SAVITSKIY et al., 2003). Ademais, a linhagem leucêmica HL-60 representa um modelo muito utilizado nas análises sobre indução de morte celular, proliferação e progressão do ciclo (MILITÃO et al., 2006).

Nos estudos da integridade da membrana (**Figura 15**), tamanho celular (**Figura 16**) e viabilidade (**Figura 17**) observou-se que as células apoptóticas na dose de 8 μM encontravam-se nas fases iniciais do processo de morte, pois 86,33% das células com membranas íntegras, demonstraram aumento no volume celular, sem interferir na granulosidade. A evolução do processo, uma vez ativado, foi observado através do aumento de células em apoptose – na dose de 16,5 μM , com apenas 34,11% com membranas íntegras – aumento persistente do volume e granulosidade celular. Os indícios de ativação da via necrótica, na dose de 33 μM , ressaltam a toxicidade nessa concentração, já que reduziu para 10% de células viáveis, bem como de volume e aumentou a granulosidade celular.

Alterações morfológicas, como condensação do núcleo e formação de corpos apoptóticos, foram encontrados em estudos com quinonas e tais dados foram associados à morte celular por apoptose (MARINHO-FILHO et al., 2010; MONTENEGRO et al., 2010).

A análise da morfologia de células HL-60 tratadas com Onco-A, usando microscopia óptica, e coradas com May Grünwald Giemsa, ilustrou os resultados anteriores e o mesmo descrito por Marinho-Filho et al., 2010, no tratamento de Cordiaquinona J em HL-60. Depois de 24h de incubação, células do controle negativo exibiram morfologia típica de células suspensas com vacuolização. A condensação da cromatina e a fragmentação nuclear e celular foram observadas na presença da doxorubicina a 0,5 μM , características de apoptose. Por outro lado, as concentrações de 16,5 e 33 μM , induziram mudanças típicas de apoptose, incluindo redução do volume celular, de membrana íntegra, núcleo picnótico e cromatólise, sendo mais pronunciadas na maior concentração.

As células viáveis, que apresentam a membrana intacta, passam a emitir fluorescência verde, pela Laranja de Acridina (LA), que atravessa membranas e intercala-se ao DNA. As células em apoptose – possuem a membrana íntegra e condensação da cromatina – apresentam manchas verdes no núcleo e podem se diferenciar pela presença de corpos apoptóticos. As células em necrose ou com a membrana desintegrada apresentam o núcleo corado de vermelho, fluorescência emitida

pelo Brometo de Etídio (BE), que só consegue intercalar o DNA se a membrana estiver danificada. (KUMAR et al., 2004).

Desta maneira, a redução da viabilidade celular após o tratamento pode ser explicada pelo aumento de células apoptóticas. A identificação da morte celular por apoptose, por conseguinte, constitui um alvo potencial para uso terapêutico e importante para o estudo dos mecanismos de resistência aos tratamentos existentes (NICHOLSON, 2000; DEBATIN, 2004; GRIVICIVH, 2007). A fim de confirmar a identificação da morte por apoptose, foi verificada a externalização da fosfatidilserina, exposta na superfície externa da membrana celular durante as primeiras fases do processo apoptótico (FADOK et al., 1992; KOOPMAN et al., 1994; MARTIN et al., 1995).

A externalização de PS é, frequentemente, um dos primeiros eventos a ocorrer quando a célula entra em apoptose (VERMES et al., 1995). Após 24 horas de exposição à Oncocalixona-A, foi observado células HL-60 com fosfatidilserina externalizada conjugada com anexina V, como pode ser visto no tratamento das HL-60 com naftoquinonas (MONTENEGRO et al., 2010), cordiaquinonas (MARINHO-FILHO et al., 2010) e benzoquinonas nas células MCF-7 e H5-6 (BAIGI et al., 2008). Esses resultados reforçam, assim, que a apoptose é a morte celular predominante na ação citotóxica em HL-60.

ESTUDO DA VIA APOPTÓTICA ATIVADA NO TRATAMENTO COM ONCO-A EM HL-60

Depois de verificado os parâmetros da citotoxicidade da Onco-A quanto à morfologia nas linhagens cancerígenas e CMSP, e o tipo de morte celular, foram realizados outros ensaios para identificação da via apoptótica ativada. As duas vias distintas de sinalização molecular, via intrínseca ou mitocondrial e a via extrínseca ou via do receptor de morte, são iniciadas pelas caspase -9 e - 8, respectivamente, e ambas promovem a clivagem das caspases efetoras -3 e -7, responsáveis pela execução do processo apoptótico (DANIEL, et al., 2001; MEHMET, 2002). A via intrínseca envolve a participação da mitocôndria no início do processo apoptótico (ASHE; BERRY, 2003). Desta forma, para que ocorra a ativação da caspase -9, é preciso que a permeabilidade da membrana, avaliada pela rodamina 123 – um corante fluorescente nucleofílico sequestrado para dentro de mitocôndrias com o potencial da membrana mitocondrial interna ($\Delta\psi_m$) viável – esteja alterada (MARCHETTI et al, 1996). Portanto, células viáveis emitem alta fluorescência verde, devido à maior quantidade de rodamina 123 ligada às cargas positivas internas, enquanto as mitocôndrias despolarizadas emitem menor

fluorescência. Durante a apoptose, ocorre redistribuição das mitocôndrias nas células, com redução na condensação mitocondrial e no aumento da densidade da matriz mitocondrial (DESAGHER; MARTINOU, 2000).

O aumento da permeabilização da membrana mitocondrial (PMM) é considerado um ponto irreversível na cascata de eventos, o qual leva à desregulação em seu funcionamento, resultando em um colapso do potencial transmembrânico ($\Delta\psi_m$) e no extravasamento para o citosol de proteínas solúveis como, por exemplo, o citocromo c e o fator indutor de apoptose (GALLUZZI et al., 2010). A PMM pode ser controlada através da atividade de uma família de proteínas chamadas ciclofilina que regula a abertura de poros na membrana mitocondrial e por membros da família de proteínas Bcl-2 (VAN LOO et al., 2002).

A Oncocalixona-A nas diferentes concentrações induziu uma relação dose-dependente da despolarização mitocondrial das células HL-60 após as 24 horas de incubação. Também foram capazes de ativar caspases iniciadoras -8 e -9 e as efetoras -3 e -7. Apesar da relação entre as duas vias não ter sido estudada, não se sabe a natureza, tampouco a sequência da sua ativação (Gabriella Vieral, 2011), é possível inferir que a via extrínica seja primeiro acionada, pois na menor concentração foi verificada a ativação da caspase 8, diferente dos valores encontrados na caspase 9.

As caspases efetoras, uma vez ativadas, são as responsáveis por desencadear as mudanças morfológicas durante o processo apoptótico (CHOWDHURY et al., 2008). Desta maneira, a ativação das caspases-3 e -7, que compõem um dos pontos de conexão entre a via mitocondrial e via dos receptores de morte, contribuem para o início do processo irreversível de apoptose (ROY; NICHOLSON, 2000).

A morte celular via apoptose é precedida pela clivagem da cromatina em regiões de ligação entre os nucleossomos por endonucleases específicas, resultando em uma extensiva fragmentação do DNA em subunidades oligonucleossômicas (NICOLETTI et al., 1991). Segundo Cavalcanti (2010), a correlação entre a despolarização mitocondrial e a fragmentação de DNA indica que a redução do $\Delta\psi_m$ é um evento obrigatório e irreversível para a morte celular de HL-60 induzida pelos compostos nor- β -lapachônicos. Desta forma, a investigação da fragmentação internucleossomal do DNA da HL-60 por Onco-A sugere que sua indução está relacionada à alteração no $\Delta\psi_m$, ativação da cascata apoptótica e clivagem do PARP.

Foi demonstrado que Onco-A é capaz de clivar PARP. No estudo de E'Thier et

al. (2012), a síntese de ativação PARP-1 e PAR afeta o estado energético das células, o que inibe a via de sinalização mTORC1 e, possivelmente, modula o complexo mTORC2, fornecendo novas evidências de que a morte celular por necrose é orquestrada pelo equilíbrio entre várias vias de sinalização e que PARP-1 e PAR participam nestes eventos. Inclusive, esta pesquisa também demonstra que o antioxidante N-acetil-L-cisteína (NAC) também pode anular todos os eventos de sinalização causados pela exposição MNNG, sugerindo que a produção de EROs esteja envolvida na ativação de PARP-1 e na modulação da sinalização por mTOR. Vanni et al. (1998) também demonstraram que os danos causados pela β -lapachona aos cromossomos de células do ovário de hamster chinês (CHO) e há uma interação com a enzima poli(ADPribose)polimerase (PARP). Gupta et al. (2002) revelaram que a considerável atividade aneoplásica da β -lapachona (IC50: 4-8 μ M) em células de mieloma múltipla por apoptose está relacionada com a clivagem das enzimas PARP e Caspase-3.

AVALIAÇÃO DO EFEITO DA ONCO-A SOBRE O CONTEÚDO DE DNA NUCLEAR NAS CÉLULAS HL-60

A ativação de endonucleases está associada ao processo de apoptose e resulta na extensa clivagem do DNA (VERMES et al., 2000). As diferentes fases do ciclo celular podem ser determinadas no citômetro de fluxo a partir do conteúdo de DNA que elas apresentam (DONNICI et al., 2005). A análise da fragmentação do DNA durante o ciclo celular, tabela 2, demonstra que todas as concentrações de Onco-A apresentam aumento significativo de DNA/sub-G1 (DNA fragmentado ou condensado). Ainda, diminuiu a concentração de DNA em fase G2/M, tal como ocorreu com o controle positivo, nas doses de 16,5 e 33 μ M de Onco-A.

De acordo com Jianyong et al., 2010, e Kamal et al., 2010, o aumento significativo na fase sub-G1 está relacionado à morte celular por apoptose, confirmando que os resultados do ciclo celular da Onco-A referem-se à morte apoptótica. Prudhomme, 2006, afirma que a inibição do ponto de verificação G2 tem sido proposta como uma estratégia para aumentar a sensibilidade das células tumorais às terapias de dano ao DNA, sugerindo que a Onco-A seja um possível fármaco para tratamento do câncer.

Existem dois pontos de verificação que bloqueiam a progressão do ciclo: a transição entre G1-S e G2-M, e na passagem da fase S. O ponto de verificação G1 é completamente dependente de ativação p53, mas a maioria das células cancerígenas, a via de p53 é inativada, deixando G2 como o principal ponto de verificação. Portanto, a

resistência das células tumorais para a radio e quimioterapia depende da integridade da barreira G2 (SANCAR et al., 2004).

Os inibidores do ponto de verificação em G2 podem forçar as células presas a esta fase por danos de DNA a entrarem em mitose. Desta maneira, vários inibidores que atuam na fase G2 podem induzir à morte de células cancerígenas por radiação ionizante e por agentes quimioterápicos que causam danos no DNA, particularmente em células sem p53, como HL-60 (WOLF; ROTTER, 1985; PRUDHOMME, 2006,). Os inibidores do ponto de verificação em G2 fosforilam a proteína-alvo pela inibição de quinases e fosfatases. O estudo de Sturgeon, et al. (2008) identificou uma série de compostos de extrato de plantas que possuem um reativo sítio aceptor de Michael e que funcionam como potentes anuladores da fase G2.

A 1,4-benzoquinona promove aumento na proporção de células HL-60 na fase S. A inibição do acúmulo de células pela adição de catalase, sugere que os efeitos observados foram mediados por EROs, particularmente H₂O₂, gerado no tratamento da quinona. O aumento na proporção de células na fase S promovido por benzoquinona também foi inibida pela adição de PD98059, um inibidor químico específico da sinalização MEK/ERK, sugerindo a participação desta via em no recrutamento de benzoquinona-tratadas células HL-60 para o Fase S do ciclo celular. A ativação desta via também ajuda explicar os efeitos leucogênicos associado a exposição deste metabólito (RUIZ-RAMOS et al., 2005).

PROTEÇÃO DA N-ACETILCISTEÍNA CONTRA DANOS CELULARES

N-acetil-L-cisteína (NAC) é frequentemente empregada como uma fonte de grupo sulfidrílico para células, um precursor acetilado de glutathiona reduzido (GSH) (ZHANG et al, 2010). NAC também pode interagir diretamente com EROs e espécies reativas de nitrogênio, uma vez que é um eliminador de radicais livres de oxigênio (ZAFARULLAH et al., 2003). Estudos em animais e humanos com NAC sugerem que é uma ferramenta segura e eficaz para o tratamento de doenças consideradas mediadas pelos danos oxidante dos radicais livres, ainda, tem sido utilizada terapeuticamente em vários distúrbios relacionados com estresse oxidativo (COTGREAVE, 1997).

Para determinar se EROs estão envolvidas com a morte celular induzida por compostos quinonóide, Rubio et al., 2011, pré-tratou as células epiteliais de pulmão humano (Beas-2B) com 1-bromoheptano (BH), agente depletor de glutathiona (KHAN e BRIEN, 1991) e N-acetil-L-cisteína (NAC), agente restaurador dos níveis intracelulares de

glutaciona, já que glutaciona protege contra a morte celular, induzida por stress oxidativo através da interação com HO e H₂O₂ (PARK et al, 2000; ZANDWIJ, 1995). O estudo demonstrou que a exposição à hidroquinona (HQ) e benzoquinona (BQ) provocou um esgotamento rápido de glutaciona reduzida (GSH), provavelmente pela produção de EROs ou conjugação direta com os compostos (LUO et al., 2008; SMITH, 1999; TRUSH et al., 1996); levando à ativação do Nrf2, um fator de transcrição nuclear que regula a resposta ao antioxidante; ativação e indução de duas importantes enzimas envolvidas na síntese de GSH: GCLM e GSS (BISWAS; RAHMAN, 2009).

Da mesma forma que estudo de Rubio et al. (2011), outros grupos examinaram o envolvimento dos efeitos do antioxidante NAC na morte apoptótica, pois atua reduzindo os níveis de EROs *in vivo* e *in vitro* (ARUOMA et al., 1989). A depleção de glutaciona pode causar morte celular, devido à peroxidação lipídica e declínio nos níveis de tiol-proteínas (FERRARI et al., 1995); por outro lado a peroxidação lipídica das membranas mitocondriais por ser evitada pela NAC através da manutenção dos grupos tiol (SH) (BANACLOCHA et al., 1997), no metabolismo mitocondrial influenciando a fosforilação oxidativa (MIQUEL et al., 1995).

Neste contexto, o pré-tratamento com NAC foi capaz de proteger o material genético e impedir a ação citotóxica da Onco-A. O mecanismo citotóxico da Onco-A apresentou atividade na fragmentação de DNA – característica clássica do processo apoptótico (NICHOLSON,1999). No tratamento com Onco-A, a fragmentação do DNA, no entanto, não está associada à produção de espécie reativas de oxigênio, comum às quinonas. Estes resultados se assemelham com as demais pesquisas na ação protetora do NAC, mas diferem na presença de EROS, que não aconteceu no tratamento com Onco-A. Como no estudo com compostos de β- lapachona- 1,2,3-triasoles nas linhagens HL-60, MDA, HCT-8 e SF-295, onde NAC reduziu a apoptose e genotoxicidade dos compostos frente as células, sugerindo que a apoptose induzida pela quinonas é associada à produção de EROs (DA SILVA et al, 2001).

Desta maneira, Rubio et al., 2011, sugere a existência de um mecanismo de auto- regulação para desintoxicação dos compostos de HQ/BQ, responsáveis por montar uma série de eventos: a exposição à HQ e BQ → produção de EROs → esgotamento de GSH e geração de estresse oxidativo → Nrf2 ativação → indução da expressão do gene → desintoxicação de HQ e BQ e reparação de danos oxidativos. Propõe que as hidroquinonas e benzoquinonas são aceptores da reação de Michael (BOLTON et al., 2000), reagem com os grupos SH, permitem a translocação nuclear de Nrf2 e a subsequente ativação da via.

Por outro lado, Zhang et al. 2011, demonstraram que a citoproteção conferida pelo NAC no tratamento das células HK-2, causada por TGHQ, não foi consequência do aumento dos níveis de GSH; embora o NAC seja frequentemente utilizado como um precursor da glutatona. O objetivo deste estudo era determinar se o anti-oxidante NAC poderia proteger as células epiteliais dos túbulos renais proximais humanos (HK-2) contra a toxicidade induzida pelo metabolito de hidroquinona, TGHQ. NAC quase inibiu completamente a morte celular induzida por TGHQ, diminuiu o potencial da membrana mitocondrial, bem como a produção de EROs. Todavia, NAC conferiu proteção mesmo quando a síntese de GSH foi inibida, inibiu a fosforilação induzida por TGHQ em p38 e JNK, e ativou sozinho a fosforilação de ERK, quinase regulada por sinal extracelular (envolvida no controle de crescimento celular e mitogênese). Sugerindo que NAC exerce seu efeito protetor: a) em parte pela eliminação diretamente EROs e, b) em parte pela ativação direta da via ERK1/2.

De acordo com Nakayachi et al, 2004, a indução da fragmentação internucleossomal do DNA em leucemia promielocítica HL-60, mostrada em gel de agarose, é dependente da estrutura do composto carbonílico α,β insaturado. Nesse estudo é sugerido que a reação do composto carbonílico α,β insaturado, característicos de aceptores de Michael, com proteína tióis pode estar relacionada com o mecanismo citotóxico, já que sua atividade citotóxica é significativamente reduzida pela N-acetilcisteína. Desta forma, a **Figura 26** mostra o efeito protetor de NAC na linhagem HL-60 e ciclo celular. Apesar do presente estudo não ter realizado análise quantitativa de GSH nem de óxido nítrico (NO) – a fluoriceína utilizada na análise de EROs, H₂-DCF-DA, tem 2% de afinidade ao NO (SETSUKINAI et al., 2003) – podemos sugerir que a estrutura do composto carbonílico α,β insaturado da Onco-A esteja envolvida com sua citotoxicidade.

DETERMINAÇÃO DA GERAÇÃO DE ESPÉCIES REATIVAS DE OXIGÊNIO INTRACELULAR NO TRATAMENTO COM ONCO-A EM HL-60

O mais importante mecanismo citotóxico de compostos quinóides envolvem bio-redução das drogas, seguida pela geração de espécies reativas de oxigênio (EROs) (HILLARD et al., 2008; KOCEVA-CHYLA et al., 2006; CHOI et al., 2007) e o dano ao DNA é considerado a mais séria modificação induzida pela EROs (POULSEN et al., 2005). A superprodução de EROs pode exaurir as defesas antioxidantes (enzimáticas ou não) e tornar a célula cancerosa mais susceptível à morte celular (KONG et al., 2000).

Desta maneira, para confirmar se os danos causados ao DNA estavam relacionados às EROs bem como o desencadeamento da via intrínseca da apoptose: pelo dano ao DNA mitocondrial (FRUEHAUF & MEYSKENS, 2007); pela ativação das caspases -9 e -3 (GOTTLIEB, 2001); e pelo aumento do colapso do $\Delta\psi_m$ (GREEN; KROEMER, 2004), foi analisado a geração de EROs no tratamento com Onco-A.

Surpreendentemente, a Oncocalixona em nenhuma concentração foi capaz de aumentar a produção de EROs, permanecendo em níveis semelhantes ao controle. Os dados apresentados acima contrariam a maioria dos efeitos descritos pelo grupo químico a qual pertence a Onco-A, uma 1,4- benzoquinona, considerada um dos mais potentes metabólitos capazes de induzir a formação de EROs (Wiemels & Smith, 1999). Portanto, o principal alvo para investigação do mecanismo de citotoxicidade da Onco-A seriam as espécies reativas de oxigênio, mas os resultados negativos sugeriram o DNA como o principal alvo para os agentes antitumorais quinóides, pertencente ao grupo de intercalantes e de alquilação (ACHE, 2005).

O mecanismo de hematotoxicidade do benzeno ainda não está esclarecido, incluindo leucomogênese, no entanto, muitos estudos têm sugerido que dano oxidativo está envolvido na citotoxicidade e carcinogênese do benzeno e seus metabólitos (SMITH et al., 1989; STOYANOVSKY et al., 1995). Modelos celulares, como leucemia promielocítica aguda, HL- 60, têm mostrado o aumento dose-dependente da formação de EROs induzida no tratamento com benzeno e seus metabólitos, incluindo, a 1,4- benzoquinona – o mais potente metabólito do benzeno indutor de EROs. Por sua vez, o efeito da superóxido dismutase sugere que o peróxido de hidrogênio e radicais de hidrogênio estão envolvidos na leucomogênese (SHEN et al., 1996; WIEMELS; SMITH, 1999). Como a Onco-A não induziu hematotoxicidade, talvez esse mecanismo não esteja envolvida com a presença de EROs.

Por outro lado, os resultados apresentados pelo grupo da profa. Dra. Marília O. F. Goulart (UFAL), Costa et al. (2012), confirmam a geração de radical livre da Onco-A no acoplamento hiperfino da espectroscopia de ressonância de spin eletrônica: a eletrólise da Onco-A foi semelhante a de quinonas, que na ausência de electrófilos tem as hidroquinonas instáveis convertidos de volta. O trabalho apresenta a hidroquinona acetilado e o radical ânion correspondente a Oncocalixona-A. Segundo o trabalho citado, a Onco-A apresentou comportamento típico de quinona: a) um par de ondas catódicas, relacionado com a formação do ânion-radical (a semiquinona da oncocalyxone A); b) um

par de ondas anódica, relacionado ao processo de transferência de elétrons na reação química. A presença da primeira e da segunda onda estão relacionadas à formação de um radical ânion e outro diânion, que configura respectivamente semi e hidroquinona (MARINHO-FILHO, 2012). No entanto, a segunda onda apresentou um pico mais amplo e mal definido, como previamente observado em outros α -metoxi-para-benzoquinonas, devido a possíveis rearranjos estruturais ou proporcionais a reações não elucidados no presente caso (COSTA et al, 2012).

GENOTOXICIDADE

A morte celular por apoptose é precedida pela fragmentação do DNA em subunidades oligonucleossômicas, resultado da clivagem da cromatina por endonucleases específicas (NICOLETTI et al., 1991). A confirmação de vias apoptóticas de morte celular por despolarização mitocondrial, externalização de fosfatidilserina, fragmentação do DNA e ativação das caspases iniciadoras e efetoras instigaram a investigação do potencial genotóxico da Oncocalixona-A por meio do ensaio do Cometa. Este ensaio detecta quebras simples e duplas em moléculas de DNA induzidas por agentes alquilantes, intercalantes e oxidantes (CAVALCANTI et al., 2006).

A análise no teste de cometa demonstrou que a Onco-A é capaz de causar quebras simples e duplas nas fitas de DNA. O pré-tratamento com NAC, por sua vez, impediu a quebra das fitas do DNA induzidos pela Onco-A. Este surpreendente padrão de ação protetora do NAC na ausência de EROs, nos permite cogitar algumas possibilidade quanto à ação da Onco-A, como agente intercalante. No estudo elaborado por Costa et al. (2012), foi observado que a interação da Onco-A com ácido poliadenílico (poli-A) é mais intensa do que com uma única base. Essa análise ressaltou a interação entre oncocaxiloxona A e os nucleotídios, mesmo na presença de fragmentos de fostato-açúcar.

Costa et al. (2012) avaliaram também a voltametria diferencial de pulso pela intensidade de oxidação entre o biossensor de DNA de fita simples (ssDNA) e a concentração diferencial de Onco-A. A intensidade da corrente do pico de oxidação de guanossina diminuiu na amplitude, enquanto o pico do potencial de oxidação com adenosina manteve-se constante com a corrente de oncocaxiloxona A. O comportamento eletroquímico observado com a base isolada Guanina, corroborou a correlação com DNA de fita simples, mostrando a intensidade de interação entre guanina e Onco-A. A fim de estudar a influência da porção de açúcar- fosfato do nucleotídio na oxidação da base,

também foi realizada a análise com poliG e poliA. A interação entre Onco-A e poli-A foi mais intenso, mostrando mudanças nos potenciais anódicos de pico.

De fato, a Onco-A consiste em um complexo de anel aromático, planar, policíclico, elemento característico de agentes intercalares de DNA, cujo grupo de hidroxila no C-8 ou C- 11 pode estar envolvido na atividade de ligação com DNA, através da ligação de hidrogênio, pois acetilação reduziu sua bioatividade (Pessoa et al., 2004). A cloração do C-6 pode causar mudanças da carga negativa parcial, alterar as pontes de hidrogênio do grupo hidroxila do C- 11 e competir interações com a ribose (Pessoa et al., 2004). No entanto, ainda não podemos afirmar o tipo de interação e mecanismo que a Onco-A desencadeia na HL-60, como outras quinonas já descritas na literatura.

A mitomicina C, por exemplo, é metabolicamente ativada para provocar a formação de aductos no DNA e *cross-linking*, sendo eficaz contra vários tipos histológicos de tumores, incluindo mama, cólon, pulmão, cabeça e pescoço (SU et al., 2006). A alquilação (transferência do grupo metil ou etil de bases de DNA) ocorre em qualquer um dos sulcos maiores ou menores, o 3,6-substituído 2,5-bis(1-aziridinil)-1,4-benzoquinona, por exemplo, alquila DNA de modo a formar ligações cruzadas intercadeia (LUSTHOF et al., 1989).

Compostos que causam quebra do DNA em sítios específicos foram identificados no estudo dos quimioterápicos, como 1,2-naftoquinona ligada a semicarbazona/isonicotinilhidrazona/ tiossemicarbazona, que passam a ter propriedades catalíticas e clivagem do DNA (ANITHA et al., 2012). Outro alvo muito importante dentre os agentes que interagem com DNA estão os inibidores da topoisomerase, como β -lapachona, elipticina e derivados das quinonas saintopina e eleuterina (KRISHNAN e BASTOW, 2000).

AVALIAÇÃO DA ONCO-A SOBRE AS ENZIMAS TOPOISOMERASES I E II

As enzimas topoisomerase I e II são responsáveis por reduzir a tensão no DNA nos processos biológicos de replicação, transcrição, recombinação e segregação cromossômica no ciclo celular (OSHEROFF et al., 1991). A interação das drogas anticâncer com o sítio catalítico dessas enzimas configura dano no DNA e causam a morte celular, caracterizando os efeitos citotóxicos destes compostos (D'ARPA; LIU, 1989).

Os inibidores utilizados nesse experimento são controles já estabelecidos na pesquisa com topoisomerase. A campotecina (CPT) é uma droga que estabiliza o complexo de clivagem da Top I (Top1cc), causando dano ao DNA em dois processos: replicação e

transcrição. O MJ-III-65 é um derivado idenoisoquinoline da CPT, que também bloqueia reversivelmente a Top I, mas em regiões diferentes do DNA (ANTONY et al., 2005). De acordo com Pommier et al., 2010, a colisão dos complexos da DNA e RNA polimerase interrompe a arquitetura da Top1cc.

Já a inibição da atividade catalítica topoisomerase II sem interceptação do complexo de clivagem é observado por compostos que intercalam o DNA, cujas concentrações são suficientes para alterar a estrutura do DNA; evitando assim a ligação da Top II com a fita ou a formação de complexo de clivagem da Top II (Top2cc) (POMMIER et al., 1984; TEWEY et al., 1984). O VP-16, antraciclina, e outros atuam inibindo religação da Top2cc ao DNA. Normalmente, tratamento com CPT e VP-16 é simultâneo, porque os inibidores da Top I e Top II são necessários para interromper a replicação e transcrição (BERTRAND et al., 1992). VP-16 provavelmente antagoniza a CPT inibindo a replicação e CPT suprime os efeitos da VP-16 pela inibição da transcrição (POMMIER et al., 2010).

No nosso estudo, a Onco-A não apresentou nenhum efeito ao DNA plasmidial superhelicoidizado semelhante a CPT, MJ-III-65 e VP-16. Logo, é possível afirmar que não atua nas enzimas do tipo topoisomerasas, diferentemente da 1,4-benzoquinona, que induz quebra na região específica do DNA, mediada pela topoisomerase II α (LINDSEY et al., 2004).

6 CONCLUSÃO

A Oncocalixona-A apresentou citotoxicidade contra células leucêmicas HL-60 e induziu alterações bioquímica e morfológicas sugestivas de apoptose, reforçando que o composto seja uma potente molécula precursora para a terapia do câncer. O mecanismo citotóxico foi avaliado através da análise da viabilidade celular, integridade de membrana, conteúdo de DNA nuclear, externalização da fosfatidilserina, ativação de caspases da via extrínseca da apoptose, sem que ocorra a geração de espécies reativas de oxigênio. Também foi identificada sua atividade citotóxica da Onco-A em células mononucleadas isoladas de sangue periférico humano e em eritrócitos usando o ensaio do MTT e hemólise e seu potencial genotóxico usando o ensaio do Cometa. A Onco-A não interage com enzimas do tipo topoisomerases, mas acredita-se que seu alvo, como acceptor de Michael, seja o DNA.

7 REFERÊNCIAS

ABRAHAM, I.; JOSHI, R.; PARDASANI, P.; PARDASANI, R.T. Recent Advances in 1,4-Benzoquinone Chemistry. **J. Braz. Chem. Soc.**, v. 22, n. 3, p. 385-421, 2011.

ADAMS, J.M.; CORY, S. The Bcl-2 apoptotic switch in cancer development and therapy. **Oncogene**, v. 26, p. 1324-1337, 2007.

ALLEN, P.G.; KOLESAR, J.M. NAD(P)H: Quinone oxidoreductase enhances proliferation inhibition by 4-hydroxytamoxifen. **Anticancer research**, v. 22, n. 3, p. 1475-1480, 2002.

AME, J.C.; SPENLEHAUER, C.; MURCIA, G. The PARP superfamily. **Bioessays**, v. 26, p. 882-893, 2004.

AMSLINGER, S; The tunable functionality of alpha, beta-unsaturated carbonyl compounds enables their differential application in biological systems. **ChemMedChem**; v. 5(3):351-6. 2010.

ANAZETTI, M.C.; MELO, P.S.; DURAN, N.; HAUN, M. Comparative cytotoxicity of dimethylamide-crotonin in the promyelocytic leukemia cell line (HL-60) and human peripheral blood mononuclear cells. **Toxicology**, v.188, p.261-274, 2003.

ANTONY, S.; KOHLHAGEN, G.; AGAMA, K.; JAYARAMAN, M.; CAO, S.; DURRANI, F.A.; RUSTUM, Y.M.; CUSHMAN, M.; POMMIER, Y. Cellular Topoisomerase I Inhibition and Antiproliferative Activity by MJ-III-65 (NSC 706744), an Indenoisoquinoline Topoisomerase I Poison. **Molecular Pharmacology**, v. 67, p. 523-530, 2005.

ANITHA, P.; MANIKANDAN, R.; ENDO, A.; HASHIMOTO, T.; VISWANATHAMURTHI, P. Ruthenium(II) complexes containing quinone based ligands: Synthesis, characterization, catalytic applications and DNA interaction. **Spectrochimica Acta Part A: Molecular and Biomolecular Spectroscopy**, v. 99, p. 174-180, 2012.

ARAÚJO, E. L.; ALENCAR, J. R. B.; ROLIM NETO, P. J. Lapachol: segurança e eficácia na terapêutica. **Rev. Bras. Farmacogn.**, v. 12, supl. 1, p. 57-59, 2002.

ARCAMONE, F.; CASSINELLI, G.; CASAZZA, A.M. New antitumor drugs from plants. **J.Ethnopharmacol.**, v. 2, n. 2, p. 149-160, 1990.

ARUOMA, O.I.; HALLIWELL, B.; HOEY, B.M.; BUTLER, J. The antioxidant action of N-acetylcysteine: its reaction with hydrogen peroxide, hydroxyl radical, superoxide, and hypochlorous acid. **Free radical Biology & Medicine**, v. 6, p. 593-597, 1989.

ASCHE, C. Antitumour quinones. **Mini Rev. Med. Chem.**, v. 5, p. 449-467, 2005.

ASHE, P.C.; BERRY, M.D. Apoptotic signaling cascades. *Prog Neuropsychopharmacol. Biol. Psychiatry*, v. 27, p. 199-214, 2003.

BAEHRECKE EH. Autophagy: dual roles in life and death? *Nat Rev Mol Cell Biol.* v. 6, p.505-510, 2005.

BAE, Y.S.; KANG, S.W.; SEO, M.S.; BAINES, I.C.; TEKLE, E.; CHOCK, P.B.; RHEE, S.G. Epidermal growth factor (EGF)-induced generation of hydrogen peroxide. Role in EGF receptor-mediated tyrosine phosphorylation. *J Biol Chem.* v. 272, p. 217-221, 1997.

BAILLY C. Ready for a comeback of natural products in oncology. *Biochem Pharmacol.* v. 77, n. 9, p. 1447-57, 2009.

BANACLOCHA, M.M. Therapeutic potential of n-acetylcysteine in age-related mitochondrial neurodegenerative diseases. *Medical Hypotheses*, v. 56, p. 472-477, 2001.

BASSI, L.; PALITTI, F. Anti-topoisomerase drugs as potent inducers of chromosomal aberrations. *Genetics And Molecular Biology*, v. 23, n. 4, p. 1065-1069, 2000.

BAYEN, S.; BAROOAH, N.; SHARMA, R. J.; SEN, T. K.; KARMAKAR, A.; BARUAH, J. B.; Synthesis, structure and electrochemical properties of 2,5 bis(alkyl/aryl amino)1,4-benzoquinones and 2-aryl amino-1,4 naphthoquinones. *Dyes and Pigments*, v. 75, n. 3, p. 770-775, 2007.

BEATTIE, A.J. New Products and Industries from Biodiversity. In: HASSAN, R., SCHOLLES, R. and ASH, N. Ecosystems and Human Well-being: **Current State and Trends**, v. 1, 2005.

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

BERLINCK, R.G.S.; OGAWA, C.A.; ALMEIDA, A.M.P.; ANDRADE, M.A.S.; MALPEZZI, E.L.A.; COSTA, L.V.; HAJDU, E.M.; FREITAS, J.C. Chemical and pharmacological characterization of halitoxin from *Amphimedon viridis* (PORIFERA) from the southeastern brazilian coast. *Comp. Biochem. Physiol.*, v. 115C, p. 155-163, 1996.

BERTRAM, J.S. The molecular biology of cancer. **Molecular Aspects of Medicine**, v.21, p. 167-223, 2001.

BERTRAND, R.; O'CONNOR, P.; KERRIGAN, D.; POMMIER, Y. Sequential administration of camptothecin and etoposide circumvents the antagonistic cytotoxicity of simultaneous drug administration in slowly growing human colon carcinoma HT-29 cells. *Eur. J. Cancer*, v. 28A, p. 743-748, 1992.

BERTUZZI, A.; D'AGNANO, I.; GANDOLFI, A.; GRAZIANO, A.; STARACE, G.;UBEZIO, P. Study of propidium iodide binding to DNA in intact cells by flow cytometry. *Cell Biophys*, v. 17, n.3, p. 257-267, 1990.

BERRIDGE, M. The biochemical and cellular basis of cell proliferation assays that

use tetrazolium salts. **Biochemical**, v. 4, p. 14-19, 1996.

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

BHOWMICK, N.A.; NEILSON, E.G.; MOSES, H.L. Stromal fibroblasts in cancer initiation and progression. **Nature**, v. 432, p. 332-337, 2004.

BIRNIE, G.D. The HL60 cell line: A model system for studying human myeloid cell differentiation. **Br. J. Cancer**, v. 58, n. 1, p. 41-45, 1988.

BOLTON, J.L.; TRUSH, M.A.; PENNING, T.M.; DRYHURST, G.; MONKS, T.J. Role of quinones in toxicology. *Chem. Res. Toxicol.*, v. 13, p. 135-160, 2000.

BORCHARDT, J. K. The Beginnings of Drug Therapy: Ancient Mesopotamian Medicine. **Drug News Perspect.** v. 15, n. 3, p. 187-192, 2002.

BORNER C. The Bcl-2 protein family: sensors and checkpoints for life-or-death decisions. **Mol Immunol.** v. 39, p. 615-647, 2003.

BRUNMARK, A.; CADENAS, E. Redox and addition chemistry of quinoid compounds and its biological implications. **Free. Rad. Biol. Med.**, v. 7, p. 435-477, 1989.

BURMAN, A.C.; MUKHERJEE, R.; KHATTAR, D.; KUMAR, M.; BALA, H.; SHRIVASTAVA, R.K. Formulations of paclitaxel entrapped into nanoparticles of polymeric micelles, in: **Patent EP 1216042**, 2000.

CADENAS, E. Antioxidant and prooxidant functions of DT-diaphorase in quinone metabolism, **Biochem. Pharmacol.**, v. 49, p. 127 - 140, 1995.

CAVALCANTI, B.C. **Avaliação In Vitro do Potencial Citotóxico de Derivados Arilaminados Nor-β-Lapachônicos: Estudos de Mecanismo de Ação.** 123 f. Tese (Doutorado) Faculdade de Medicina, Universidade Federal do Ceará, Fortaleza, 2010.

CAPANEMA, L.X.L.; PALMEIRA FILHO, P.L. A Indústria Farmacêutica Nacional: Desafios Rumo à Inserção Global. 2009. In: ALÉM, Ana Cláudia; GIAMBIAGI, Fabio. O BNDES em um Brasil em transição. Rio de Janeiro: BNDES, 2010. Disponível em:

<http://www.bndes.gov.br/SiteBNDES/export/sites/default/bndes_pt/Galerias/Arquivos/conhecimento/livro_brasil_em_transicao/brasil_em_transicao_completo.pdf>. Acesso em 02 de Janeiro de 2012.

CHANG, H. Y.; YANG, X. Proteases for Cell Suicide: Functions and Regulation of Caspases. **microbiology and molecular biology reviews**, v. 64, n. 4, p. 821-846, 2000.

CHENG, N.; CHYTIL, A.; SHYR, Y.; JOLY, A.; MOSES, H.L. Transforming growth factor-β signaling-deficient fibroblasts enhance hepatocyte growth factor signaling in mammary carcinoma cells to promote scattering and invasion. **Mol. Cancer Res.**, v. 6, p. 1521-1533, 2008.

CHENNA, P.H.; BENEDETTI-DOCTOROVICH, V.; BAGGIO, R.F.; GARLAND, M.T.; BURTON, G. Preparation and Cytotoxicity toward Cancer Cells of

Mono(arylrimino) Derivatives of β -Lapachone. **Journal of Medicinal Chemistry**, v. 44, n. 15, p. 2486-2489, 2001.

CHOI, E.K.; TERAJ, K.; JI, I.M.; KOOK, Y.H.; PARK, K.H.; OH, E.T.; GRIFFIN, R.J.; LIM, B.U.; KIM, J.S.; LEE, D.S.; Boothman, D.A.; Loren, M.; Song, C.W.; Park, H.J. Upregulation of NAD(P)H:Quinone Oxidoreductase By Radiation Potentiates the Effect of Bioreductive B-Lapachone on Cancer Cells. **Neoplasia**, v. 9, n.8, p. 634-642, 2007.

CHOWDHURY, I.; THARAKAN, B.; BHAT, G.K. Caspases – An update. **Comp. Biochem. Physiol. B. Biochem. Mol. Bio.** v. 151, n. 1, p.10-27, 2008.

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

CLARKE, P.G. Developmental cell death: morphological diversity and multiple mechanisms. **Anat Embryol**, v. 181, p. 195-213, 1990.

COSTA, C.O.; COSTA, E.O.; FERREIRA, F.R.; VIANA, L.S.; SILVA, L.V.; SANTOS SILVA, F.A.; ABREU, F.C.; FIGUEIREDO, I.M.; PINHO JR., W.; BENTO, E.S.; LEMOS, T.L.G.; PESSOA, O.D.L.; AGUILERA-VENEGAS, B.; NORAMBUENA, E.; OLEA-AZAR, C.; GOULART, M.O.F. Oncocalyxone A: Electrochemical, Spectroscopic Investigation and Studies of Its Interaction with DNA, Nucleobases and *N*-Acetylcysteine. **J. Braz. Chem. Soc.**, v. 23, n. 6, p. 1174-1185, 2012.

COSTA, P. M.; FERREIRA, P. M. P.; BOLZANI, V. S.; FURLAN, M.; SANTOS, V. A. F. F. M.; CORSINO, J.; MORAES, M. O.; COSTA-LOTUFO, L. V.; MONTENEGRO, R. C.; PESSOA, C. Antiproliferative activity of pristimerin isolated from *Maytenus ilicifolia* (Celastraceae) in human HL-60 cells. **Toxicol. in Vitro**, v. 22, p. 854-863, 2008.

COTGREAVE, I. A. N-acetylcysteine: pharmacological considerations and experimental and clinical applications. **Adv. Pharmacol.**, v. 38, p. 205-227, 1997.

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

CURY-BOAVENTURA, M. F., POMPÉIA, C., CURI, R. Comparative toxicity of oleic acid and linoleic acid on Jurkat cells. **Clin. Nutr.**, v. 23, p. 721-732, 2003.

D'AMOURS, D.; DESNOYERS, S.; D'SILVA, I.; POIRIER, G.G. Poly (ADP-ribosyl) ation reactions in the regulation of nuclear functions. **Biochem J**, v. 342, p. 249-268, 1999.

DANIAL, N.N.; KORSMEYER, S.J. Cell death: critical control points. **Cell.**, v. 116, p. 205- 219, 2004.

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

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

Federal Fluminense, Rio de Janeiro, 2007.

DA SILVA, E.N. JR.; CAVALCANTI, B.C.; GUIMARÃES, T.T.; PINTO, M.DO C.; CABRAL, I.O.; PESSOA, C.; COSTA-LOTUFO, L.V.; DE MORAES, M.O.; DE ANDRADE, C.K.; DOS SANTOS, M.R.; DE SIMONE, C.A.; GOULART, M.O.; PINTO, A.V. Synthesis and evaluation of quinonoid compounds against tumor cell lines. **Eur J Med Chem.**, v. 46, n. 1, p. 399-410, 2011.

DE FLORA, S.; IZZOTTI, A.; D'AGOSTIN, F.; CESARONE, C.F. Antioxidant activity and other mechanisms of thiols involved in chemoprevention of mutation and cancer. **The American Journal of Medicine**, v. 91, p. 122-130, 1991

DAVID, A.R.; ZIMMERMAN, M.R.; Cancer: an old disease, a new disease or something in between? **Nat Rev Cancer**. V. 10:728-733. 2010.

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

DONNICI, C.L., ALMEIDA, V.L., LEITÃO, A., REINA, L.C.B., MONTANARI, C.A., PAZ, M.T.L. Câncer e Agentes Antineoplásicos Ciclo- Celular Específicos e Ciclo- Celular Não Específicos que interagem com o DNA: Uma Introdução. **Quim. Nova**, v. 28, n. 1, p. 118- 129, 2005.

DOWD, P.; ZHENG, Z. B. On the mechanism of the anticlotting action of vitamin E quinine Proc. **Natl. Acad. Sci.**, v.92, 8171-8175. 1995.

ETHIER, C.; LABELLE, Y.; POIRIER, G.G. PARP-1-induced cell death through inhibition of the MEK/ERK pathway in MNNG-treated HeLa cells. **Apoptosis**, v. 12, p. 2037-2049, 2007.

ETHIER C.; TARDIF, M.; ARUL, L.; POIRIER, G.G. PARP-1 modulation of mTOR signaling in response to a DNA alkylating agent. **PLoS ONE**, v. 7, n. 10 , 2012.

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

FARIBAIRN, D.W.; OLIVE, P. L.; O'NEILL, K.L. The Comet Assay: a comprehensive review. **Mutation Research**, v. 339, p. 37 - 59, 1995.

FERRARI, G.; YAN, Y.I.; GREENE, L.A. N- acetylcysteine (D- and l- stereoisomers) prevent apoptotic death of neuronal cells. *The Journal of Neuroscience*, v. 15, p. 2857- 2866, 1995.

FERREIRA, P.M.P.; FARIAS, D.F.; OLIVEIRA, J.T.A.; CARVALHO, A.F.U. Moringa oleifera: Bioactive compounds and nutritional potential. **Revista de Nutrição**, v. 21, 2008.

FERREIRA, P. M. P.; CARVALHO, A. F. F. U.; FARIAS, D. F.; CARIOLANO, N. G.; MELO, V. M. M.; QUEIROZ, M. G. R.; MARTINS, A. M. C.; MACHADO-NETO, J. G. Larvicidal activity of the water extract of Moringa oleifera seeds against Aedes aegypti

and its toxicity upon laboratory animals. **Anais da Academia Brasileira de Ciências**, v.2, p.207- 216, 2009.

FERREIRA, P.M.P.; SANTOS, A.G.; TININIS, A.G.; COSTA, P.M.; CAVALHEIRO, A.J.; BOLZANI, V.S.; MORAES, M.O.; COSTA-LOTUFO, L.V.; MONTENEGRO, R.C.; PESSOA, C. Casearin X exhibits cytotoxic effects in leukemia cells triggered by apoptosis. **Chem Biol Interact**, v. 188, p. 497-504, 2010.

FERREIRA, P.M.P.; COSTA-LOTUFO, L.V.; MORAES, M.O.; BARROS, F.W.A.; MARTINS, A.M.A.; CAVALHEIRO, A.J.; BOLZANI, V.S.; SANTOS, A.G.; PESSOA, C. Folk uses and pharmacological properties of *Casearia sylvestris*: a medicinal review. **Anais da Academia Brasileira de Ciências**, v. 83, p. 1373-1384, 2011.

FIESER, L. F.; FIESER, M.; *Organic Chemistry*, 3rd ed., D. C. Heath & Comp.: Boston, 1956, In: ABRAHAM, I.; JOSHI, R.; PARDASANI,P.; PARDASANI, R.T. Recent Advances in 1,4-Benzoquinone Chemistry. **J. Braz. Chem. Soc.**, v. 22, n. 3, p. 385-421, 2011.

FRUEHAUF, J. P.; MEYSKENS, Jr., F. L.; Reactive Oxygen Species: A Breath of Life or Death?; **Clinical Cancer Research**, v. 13, p. 789, 2007.

FOLKMAN J, KALLURI R. Cancer without disease. **Nature**. v. 427, p. 787, 2004.

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

FURUSAKI, A.; MATSUI, M.; WATANABE, T.; OMURA, S.; NAKAGAWA, A.; HATA, T. **Isr. J. Chem.**, v. 10, p.173, 1972, In: ABRAHAM, I.; JOSHI, R.; PARDASANI,P.; PARDASANI, R.T. Recent Advances in 1,4-Benzoquinone Chemistry. **J. Braz. Chem. Soc.**, v. 22, n. 3, p. 385-421, 2011.

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

GERNER, C.; FROHWEI, U.; GOTZMANN, J.; BAYER, E.; GELBMANN, D.; BURSCH, W.; SCHULTE-HERMANN, R. The Fas-induced apoptosis analyzed by high throughput proteome analysis. **Journal Biological Chemistry**, v. 275 p. 39018–39026, 2000.

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

GREEN, M.R.; MANIKHAS, G.M.; ORLOV, S.; AFANASYEV, B.; MAKHSON, A.M.; BHAR, P.; HAWKINS, M.J. Abraxane, a novel cremophor-free, albumin-bound particle form of paclitaxel for the treatment of advanced non-small-cell lung cancer. **Ann. Oncol.**, v. 17, p. 1263-1268, 2006.

GONZALEZ-IBARRA, M.; FARFAN, N.; TREJO, C.; URIBE, S.; LOTINA-HENNSEN; B. Selective Herbicide Activity of 2,5-Di(benzylamine)-p-benzoquinone

against the Monocot Weed *Echinochloa crusgalli*. An in Vivo Analysis of Photosynthesis and Growth. **J. Agric. Food Chem.**, v. 53, n. 9, p. 3415–3420, 2005.

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

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

GUPTA, D.; PODAR, K.; TAI, Y.-T.; LIN, B.; HIDESHIMA, T.; AKIYAMA, M.; LEBLANC, R.; CATLEY, L.; MITSIADES, N.; MITSIADES, C.; CHAUHAN, D.; MUNSHI, N. C.; ANDERSON, K. C.; beta-lapachone, a novel plant product, overcomes drug resistance in human multiple myeloma cells. **Exp. Hematol.**, v. 30, n. 7, p. 711-720, 2002.

HANAHAN D, WEINBERG RA. The hallmarks of cancer. **Cell**; v. 100, p. 57-70, 2011.

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

HLAVIN, E.M.; SMEATON, M.B.; MILLER, P.S. Initiation of DNA Interstrand Cross-link Repair in Mammalian Cells. **Environmental and Molecular Mutagenesis**, v. 51, p. 604-624, 2010.

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

HARVEY AL. Natural products in drug discovery. **Drug Discov Today**. v. 19, p. 894-901, 2008.

HILLARD, E.A.; DE ABREU, F.C.; FERREIRA, D.C.M.; JAOUEN, G.; GOULART, M.O.F.; AMATORE, C. Electrochemical parameters and techniques in drug development, with an emphasis on quinones and related compounds. **Chem. Commun**, v. 23, p. 2612-2628, 2008.

HUANG, K. C.; WILLIAMS, W. M. **The Pharmacology of Chinese Herbs**, 2ª Edição; Flórida: CRC Press, 1999.

HUERTA, S.; GOULET, E.J.; HUERTA-YEPES, S.; LIVINGSTON, E.H. Screening and detection of apoptosis. **J. Surg. Res.**, v. 139, p. 143-156, 2007.

IMS – Institute For Healthcare Informatics. The Global Use of Medicines: Outlook Trough 2015. 2011. Disponível em: <http://www.imshealth.com/deployedfiles/ims/Global/Content/Insights/IMS%20Institute%20for%20Healthcare%20Informatics/Global_Use_of_Medicines_Report.pdf>. Acesso em: 24 de janeiro de 2012.

INSTITUTO NACIONAL DO CÂNCER (INCA). **Estimativa 2010 – Incidência de Câncer no Brasil**. Rio de Janeiro: INCA, 2010.

IRONS, R. D. Molecular models of benzene leukemogenesis. **J. Toxicol. Environ. Health A**, v. 61, p. 391-397, 2000.

ISMAEL, G.F.V; ROSA, D.D.; MANO, M.S.; AWADA, A. Novel cytotoxic drugs:

Old challenges, new solutions. **Cancer Treatment Reviews**, v. 34, p. 81-91, 2008.

JONES, F.A. Herbs- useful plants. Their role in history and today. European **Journal of Gastroenterology & Hepatology**, v. 8, p. 1227-1231, 1996.

KAPOOR, L. D. **Handbook of AyurVedic Medicinal Plants**: Volume 2 of Herbal Reference Library Series. Flórida: CRC Press, p. 416, 2000.

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

KHAN, S.; O'BRIEN, P.J. 1-bromoalkanes as new potent nontoxic glutathione depletors in isolated rat hepatocytes. **Biochem Biophys Res Commun**, v. 179, n. 1, p. 436-441, 1991.

KINGSTON, D.G.I. A natural love of natural products.. **J. Org. Chem.**, v. 73, 3975. 2008.

KINGSTON, D.G.I.; NEWMAN, D.J. Taxoids: Cancer-fighting compounds from nature. **Curr. Opin. Drug Discov. Dev.**, v.10, p. 130-144, 2007.

KINGSTON, D.G.I. Taxol and its analogs, in: CRAGG, G.M.; KINGSTON, D.G.I.; NEWMAN, D.J. (Eds.). **Anticancer agents from natural products**, 2nd ed. Flórida: Taylor and Francis, p. 123-175, 2011.

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

KIRSCHNING, A.; HARMROLFS, K.; KNOBLOCH, T. The chemistry and biology of the maytansinoid antitumor agents. **C. R. Chimie**, v. 11, p. 1523-1543, 2008.

KOCEVA-CHYLA, A.; WIECLAWSKA, B.; JÓZWIAK, Z.; BRYCZEWSKA, M. Combined effect of low-power laser irradiation and anthraquinone anticancer drug aclarubicin on survival of immortalized cells: Comparison with mitoxantrone. **Cell Biol. Int.**, v. 30, n.8, p. 645-652, 2006.

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

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

KOSTER, D.A.; CROQUETTE, V.; DEKKER, C.; SHUMAN, S.; DEKKER, N.H. Friction and torque govern the relaxation of DNA supercoils by eukaryotic topoisomerase IB. **Nature**, v. 434, p. 671-674, 2005.

KOSTRZEWA-NOWAK, D.; BIEG, B.; PAINE, M.J.; WOLF, C.R.; TARASIUK, J. Role of structural factors of antitumour anthraquinone derivatives and analogues in the ability to undergo bioreductive activation by NADPH cytochrome P450 reductase: implications for increasing the activity against sensitive and multidrug-resistant

leukaemia HL60 cells. **Anticancer Drugs**, v. 23, n.4, p. 393-405, 2012.

KOYAMA, J.; Anti-infective quinone derivatives of recent patents. **Recent Pat Antiinfect Drug Discovery**. v. 1, n. 1, p. 113-25, 2006.

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

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

KUMAR, V., ABBAS, A. K, FAUSTO, N., ROBBINS, S. L., COTRAN, R. S. **Pathology Basis of Disease**. China: WB Saunders, 2004.

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

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

LEE, K.H.; XIAO, Z. Podophyllotoxin and analogs, in: CRAGG, G.M.; KINGSTON, D.G.I.; NEWMAN, D.J. (Eds.) **Anticancer agents from natural products**, 2nd ed. Flórida: Taylor and Francis, p. 95–122, 2011.

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

LEYVA, A.; PESSSOA, C.; BOOGAERDT, F.; SOKAROSKI, R.; LEMOS, T.L.G.; WETMORE, L.A.; HURUTA, R.R.; MORAES, M.O.; **Anticancer Res.** v. 20, p. 1029, 2000.

LIN, T.S.; ANTONINI, I.; COSBY, L.A.; SARTORELLI, A.C. 2,3-Dimethyl-1,4-naphthoquinone derivatives as bioreductive alkylating agents with crosslinking potential. **Journal of Medicinal Chemical**, v.27, p. 813-815, 2001.

LINDSEY, R. H. JR.; BROMBERG, K. D.; FELIX, C. A.; OSHEROFF, N. 1,4-Benzoquinone Is a Topoisomerase II Poison. **Biochemistry**, v. 43, p. 7563-7574, 2004.

LI-WEBER, M. Targeting apoptosis pathways in cancer by Chinese medicine. **Cancer Letters**, v.332, p.304–312. 2013.

LOEFFLER, M.; KREMER, G. The mitochondrion in cell death control: certainties and incognita. **Exp Cellular Res.** v. 256, p. 19-26, 2000.

LORENZI, H. **Árvores Brasileiras**: Manual de identificação e cultivo de plantas arbóreas nativas do Brasil. São Paulo: Plantarum, 1998.

LOUIS, K.S.; SIEGEL, A.C. Cell Viability Analysis Using Trypan Blue: Manual and

Automated Methods. **Mammalian Cell Viability: Methods in Molecular Biology**, v. 740, p. 7-12, 2011.

LOWE, S.W.; CEPERO, E.; EVAN, G. Intrinsic tumour suppression. **Nature**, v. 432, p. 307- 315, 2004.

LUO, J.; SOLIMINI, L.; ELLEDGE, S.J. Principles of Cancer Therapy: Oncogene and Nononcogene Addiction. **Cell**, v.136, p. 823-837, 2009.

LUSTHOF, K.J.; MOL, N.J.; JANSSEN, L.H.M.; VERBOOM, W.; REINHOUDT, D.N.; DNA alkylation and formation of DNA interstrand cross-links by potential antitumour 2,5- bis(1-aziridinyl)-1,4-benzoquinones. **Chemico Biological Interactions**, v.70, n.3-4, p. 249– 262, 1989.

MARAL, J.; POISSON, M.; PERTUISET, B.F.; MASHALY, P.; WEILL, M.; JACQUILLAT, C.I.; GRILLO-LOPEZ, A.J. Phase II evaluation of diaziquone (CI-904, AZQ) in the treatment of human malignant glioma. **Journal of Neuro-Oncology**, v.3, n. 3, p. 245-249, 1985.

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

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

MACKLIS, J. D.; MADISON R. D. Progressive incorporation of propidium iodide in cultured mouse neurons correlates with declining electrophysiological status: a fluorescence scale of membrane integrity. **J. Neurosci. Methods**, v. 31, p. 43-46, 1990.

MADDIKA, S.; ANDE, S.R.; PANIGRAHI, S.; PARANJOTHY, T.; WEGLARCZYK, K.; ZUSE, A.; ESHRAGHI, M.; MANDA, K.D.; WIECHEC, E.; LOS, M. Cell survival, cell death and cell cycle pathways are interconnected: implications for cancer therapy. **Drug Resist. Updat.**, v. 10, p. 13-29, 2007.

MADATHIL, M. M.; KHDOUR, O.M.; JARUVANGSANTI, J.; HECHT, S.M. Synthesis and Biological Activities of N-(3-Carboxylpropyl)-5-amino- 2-hydroxy-3-tridecyl-1,4- benzoquinone and Analogues. **J. Nat. Prod.**, v. 75, p. 2209-2215, 2012.

MALTA, V.R.S. **Estudo cristalográfico de naftoquinonas e seus derivados e cálculos teóricos de propriedades relevantes na relação estrutura-atividade**. 2000. 258f. tese (Doutorado em Físico-Química)- Instituto de Química de São Carlos, Universidade de São Paulo, São Carlos, 2000.

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

MARINHO-FILHO, J.D.B.; BEZERRA, D.P.; ARAÚJO, A.J.; MONTENEGRO, R.C.; PESSOA, C.; DINIZ, J.C.; VIANA, F.A.; PESSOA, O.D.L.; SILVEIRA, E.R.; MORAES, M.O.; COSTA-LOTUFO, L.V. 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.

MARINHO FILHO, J.D.B. **Participação das vias ATM/ATR e C-MYC/GSH nos Efeitos Antitumorais da Cordiaquinona J induzidos pelo Estresse Oxidativo**. 2012. 78f. Tese (Doutorado em farmacologia) – Departamento de Farmacologia, Universidade Federal do Ceará, Fortaleza, 2012.

MARTELLI, A.M.; ZWEYER, M.; OCHS, R.L.; TAZZARI, P.L.; TABELLINI, G.; NARDUCCI, P.; BORTUL, R. Nuclear apoptotic changes: an overview. **J. Cell Biochem.** v. 82, n. 4, p. 634-46, 2001.

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

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

MELINO, G.; KNIGNT, R.A.; GREEN, D.R. Publications in cell death: the golden age. **Cell Death Differ.**, v. 8, p. 1-3, 2001.

MENEZES, R.F. História da Farmácia e dos Medicamentos. 2005. Disponível em: <http://www.farmacia.ufrj.br/consumo/leituras/lm_historiafarmaciamed.pdf>. Acesso em 25 de fevereiro de 2013.

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

MIQUEL, J.; FERRANDIZ, M.L.; DE JUAN, E.; SEVILA, I.; MARTINEZ, M. N-acetylcysteine protects against age-related decline of oxidative phosphorylation in liver mitochondria. **European Journal of Pharmacology**, v. 292, p. 333-335, 1995.

MUNOZ-GAMEZ, J.A.; RODRIGUEZ-VARGAS, J.M.; QUILES-PEREZ, R.; AGUILAR-QUESADA, R.; MARTIN-OLIVA, D. PARP-1 is involved in autophagy induced by DNA damage. **Autophagy**, v. 5, p. 61–74, 2009.

MOERMAN, D. E. **Medicinal Plants of Native America**. Michigan: University of Michigan, p. 910, v. 2, 1986.

MOLONEY, G.P.; KELLY, D.P.; MACK, P. Synthesis of Acridine-based DNA Bis-intercalating Agents. **Molecules**, v. 6, p. 230-243, 2001.

MONKS, T.J.; HANSLIK, R.P.; COHEN, G.M.; ROSS, D.; GRAHAM, D.G.

Quinone chemistry and toxicity. **Toxicol. Appl. Pharmacol.**, v. 112, p. 2–16, 1992.

MONKS, T.J.; JONES, D.C. The metabolism and toxicity of quinones, quinonimines, quinine methides, and quinone-thioethers. **Curr. Drug Metab.**, v. 3, p. 425-438, 2002.

MONTENEGRO, R.C.; ARAÚJO, A.J.; MOLINA, M.T.; MARINHO-FILHO, J.D.B.; ROCHA, D.D.; LOPÉZ-MONTERO, E.; GOULART, M.O.F.; BENTO, E.S.; ALVES, A.P.N.N.; PESSOA, C.; MORAES, M.O.; COSTA-LOTUFO, L.V. Cytotoxic activity of naphthoquinones with special emphasis on juglone and its 5-O-methyl derivative. **Chemico- Biological Interactions**, v. 184, p. 439–448, 2010.

MORAES, M.O.; FONTELES, M.C.; MORAES, M.E.A.; MACHADO, M.I.L.; MATOS, F.J.A. Screening for anticancer activity of plants from the Northeast of Brazil. **Fitoterapia**, v. 68, p.234-239, 1997.

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

NAGANE, M.; HUANG, H.-J.S.; CAVENEE, W.K. The potential of TRAIL for cancerchemotherapy. **Apoptosis**, v. 6, p.191-197, 2001.

NEWMAN, D. J.; CRAGG, G. M.; Natural Products as Sources of New Drugs over the Last 25 Years; **J. Nat. Prod.**, v. 70, p. 461-477, 2007.

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

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

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

O'BRIEN, P.J. Molecular Mechanisms of Quinone Cytotoxicity. **Chem.-Biol. Interactions**, v. 80, p. 1-41, 1991.

O'CONNOR R, CLYNES M, DOWLING P, O'DONOVAN N, O'DRISCOLL L. Drug resistance in cancer - searching for mechanisms, markers and therapeutic agents. **Expert Opin Drug Metab Toxicol.** v. 6, p.805-817, 2007.

ODA, T.; IWAOKA, J.; KOMATSU, N.; MURAMATSU, T. Involvement of N-Acetylcysteine-sensitive Pathways in Ricin-induced Apoptotic Cell Death in U937 Cells. **Biosci. Biotechnol. Biochem.**, v. 63, n. 2, p. 341-248, 1999.

OKOUNEVA, T., HILL, B.T., WILSON, L., JORDAN, M.A. The effects of vinflunine, vinorelbine, and vinblastine on centromere dynamics. **Molecular Cancer Therapeutics**, v. 2, n. 5, p. 427–436, 2003.

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

OSHEROFF, N.; ZECHIEDRICH, E.L., GALE, K.C. Catalytic function of DNA topoisomerase II. **Bioessays**, v. 13, n. 6, p. 269-273, 1991.

PANDOLFO, M. & PASTORE, A. The pathogenesis of Friedreich ataxia and the structure and function of frataxin. **J. Neurol.**, v. 256, p. 9-17, 2009.

PARK, A.S.; CHOI, K.S.; BANG, J.H.; HUH, K.; KIM, S.U. Cisplatin-induced apoptotic cell death in mouse hybrid neurons is blocked by antioxidants through suppression of cisplatin-mediated accumulation of p53 but not of Fas/Fas ligand. **J. Neurochem.**, v. 75, n. 3, p.946-53, 2000.

PARK, M.T.; LEE, S.J. Cell cycle and cancer. **J. Biochem. Mol. Biol.**, v. 36, p. 60-65, 2003.

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

PEREZ-SACAU E, D.; DIAZ-PENATE, R.G.; ESTEVEZ-BRAUN, A.; RAVELO, A.G.; GARCIA- CASTELLANO, J.M.; PARDO, L. Synthesis and pharmacophore modeling of naphthoquinone derivatives with cytotoxic activity in human promyelocytic leukemia HL- 60cell line. **J. Med. Chem.**, v. 50, p. 696-706, 2007.

PERVAIZ, S.; CLEMENT, M.V. Tumor intracellular redox status and drug resistanceserendipity or a casual relationship? **Curr. Pharm. Desing**, v. 10, p. 1969-1977, 2004.

PESSOA, O. D. L.; LEMOS, T. L. G.; SILVEIRA, E. R.; BRAZ-FILHO, R. **Nat. Prod. Lett.**, v. 2, p.145, 1993.

PESSOA, O. D. L.; LEMOS, T. L. G.; CARVALHO, M. G.; BRAZ-FILHO, R. Cordiachromes from *AUXEMMA ONCOCALYX*. **Phytochem**, v. 6, p. 1777-1786, 1995.

PESSOA, C. **Determinação do Mecanismo de Ação Citotóxica de Alguns Compostos Extraídos de Plantas do Nordeste Brasileiro**. 105f. Tese (Doutorado) Faculdade de Medicina, Universidade Federal do Ceará, Fortaleza, 2000.

PESSOA, C. et al. Antiproliferative effects of compounds derived from plants of Northeast Brasil. **Phytother. Res.**, v. 14, p. 187-191, 2000.

POMMIER, Y.; LEO, E.; ZHANG, H.; MARCHAND, C. DNA Topoisomerases and Their Poisoning by Anticancer and Antibacterial Drugs. **Chem Biol.**, v. 28, n. 17, p. 421-433, 2010.

POMMIER, Y.; SCHWARTZ, R.E.; KOHN, K.W.; ZWELLING, L.A. Formation and rejoining of deoxyribonucleic acid double-strand breaks induced in isolated cell nuclei by antineoplastic intercalating agents. **Biochemistry**, v. 23, p. 3194-3201, 1984.

POULSEN, H.E. Oxidative DNA modifications. **Exp. Toxicol. Pathol.**, v. 57, n. 1, p. 161-169, 2005.

POWIS, G. Metabolism and reactions of quinoid anticancer agents. **Pharmacol. Ther.**, v. 35, p. 57 – 162, 1987.

PROKOF'EVA, N.G.; UTKINA, N.K.; CHAIKINA, E.L.; MAKARCHENKO, A.E. Biological activities of marine sesquiterpenoid quinones: structure-activity relationships in cytotoxic and hemolytic assays. **Comp Biochem Physiol B Biochem Mol Biol.**, v. 139, n. 2, p. 169-173, 2004.

RAHIER, N.J.; THOMAS, C.J.; HECHT, S.M. Camptothecin and its analogs, in: in: CRAGG, G.M.; KINGSTON, D.G.I.; NEWMAN, D.J. (Eds.). **Anticancer agents from natural products**. Flórida: Taylor and Francis, p. 5–21. 2005.

RIBEIRO, L. R., SALVADORI, D. M. F. MARQUES, E. K. **Mutagênese Ambiental**. Canoas: Editora da ULBRA, 2003.

ROSS, D.; KEPA, J.K.; WINSKI, S.L.; BEALL, H.D.; ANWAR, A.; SIEGEL, D. NAD(P)H:quinone oxidoreductase 1 (NQO1): chemoprotection, bioactivation, gene regulation and genetic polymorphisms. **Chemico Biological Interactions**, v. 129, n.1-2, p. 77-97, 2000.

ROUSSI, F.; GUERITTE, F.; FAHY, J. The vinca alkaloids, in: CRAGG, G.M.; KINGSTON, D.G.I.; NEWMAN, D.J. (Eds.). **Anticancer agents from natural products**, 2nd ed. Flórida: Taylor and Francis, p. 177–198, 2011.

ROY, S.; NICHOLSON, D.W. Cross-talk in cell death signaling. **J. Exp. Med.**, v. 192, p. F21-F25, 2000.

RUBIO, V.; ZHANG, J.; VALVERDE, M.; ROJAS, E.; SHI, Z. Essential role of Nrf2 in protection against hydroquinone- and benzoquinone-induced cytotoxicity. **Toxicology in Vitro**, v. 25, n. 2, p. 521-529, 2011.

RUIZ-RAMOS, R.; CEBRIAN, M.E.; GARRIDO, E. Benzoquinone activates the ERK/MAPK signaling pathway via ROS production in HL-60 cells. **Toxicology**, v. 209, p. 279–287, 2005.

SALMON-CHEMIN, L.; BUISINE, E.; YARDLEY, V.; KOHLER, S.; DEBREU, M.A.; LANDRY, V.; SERGHERAERT, C.; CROFT, S.L.; KRAUTH-SIEGEL, R.L.; DAVIOUD-CHARVET, E. 2- and 3-substituted 1,4-naphthoquinone derivatives as subversive substrates of trypanothione reductase and lipoamide dehydrogenase from *Trypanosoma cruzi*: synthesis and correlation between redox cycling activities and in vitro cytotoxicity. **Journal of Medicinal Chemical**, v. 44, p.548-565, 2001.

SALUSTIANO, E.J.; NETTO, C.D.; FERNANDES, R.F.; DA SILVA, A.J.; BACELAR, T.S.; CASTRO, C.P.; BUARQUE, C.D.; MAIA, R.C.; RUMJANEK, V.M.; COSTA, P.R. Comparison of the cytotoxic effect of lapachol, alpha-lapachone and pentacyclic 1,4- naphthoquinones on human leukemic cells. **Invest New Drugs**, v. 28, n. 2, p. 139-44, 2010.

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

SANTOS, A. G.; FERREIRA, P. M. P.; VIEIRA-JÚNIOR, G. M.; PEREZ, C. C.; TININIS, A. G.; SILVA, G. H.; BOLZANI, V. S.; COSTA-LOTUFO, L. V.; PESSOA, C.; CAVALHEIRO, A. J. Casearin X, its degradation product and other clerodane diterpenes from leaves of *Casearia sylvestris*: evaluation of cytotoxicity against normal and tumour human cells. **Chemical Biodiversity**, v.7, p.205-215, 2010.

SANTOS, M.M.M.; MOREIRA, R.; **Mini Rev. Med. Chem**, v. 7, p. 1040, 2007.

SARTORELLI, A. C. Therapeutic attack of hypoxic cells of solid tumors: presidential address. **Cancer Res.**, v. 48, p. 775 – 778, 1988

SAVATIER, J.; RHARASS, T.; CANAL, C.; GBANKOTO, A.; VIGO, J.; SALMON, J.M.; RIBOU, A.C. Adriamycin dose and time effects on cell cycle, cell death, and reactive oxygen species generation in leukaemia cells. **Leukemia Research**, v. 36, p. 791– 798, 2012.

SAVITZ, D. A., & ANDREWS, K. W. Review of epidemiologic evidence on benzene and lymphatic and hematopoietic cancers. **Am. J. Ind. Med**, v. 31, p. 287-295, 1997.

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

SCHIFF, P.B.; HORWITZ, S.B. Taxol stabilizes microtubules in mouse fibroblast cells. **Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.**, v. 77, p. 1561–1565, 1980.

SCHREK, R.; CHANDRA, S.; MOLNAR, Z.; STEFANI, S. Two types of interphases death of lymphocytes exposed to temperatures of 37-45°C. **Radiat. Res.**, v. 82, p.162-170, 1980.

SCOTT, F.L.; STEC, B.; POP, C.; DOBACZEWSKA, M.K.; LEE, J.J.; MONOSOV, E.; ROBINSON, H.; SALVESEN, G.S.; SCHWARZENBACHER, R.; RIEDL, S.J. The Fas-FADD death domain complex structure unravels signaling by receptor clustering. **Nature**, v. 457, p. 1019-1022, 2009.

SETSUKINAI, K.; URANO, Y.; KAKINUMA, K.; MAJIMA, H.J.; NAGANO, T. Development of novel fluorescence probes that can reliably detect reactive oxygen species and distinguish specific species. **J Biol Chem**, v. 278, p. 3170-3175, 2003.

SHAPIRO, H.M. Practical flow cytometry. 4th Edition. New York: Alan R. Liss, Inc., 1985.

SHEN, Y., SHEN, H-M., SHI, C-Y., ONG, C-N. Benzene metabolites enhance reactive oxygen species generation in HL-60 human leukemia cells. **Hum. Exp. Toxicol.**, v. 15, p. 422–427, 1996.

SHEWACH, D.S.; KUCHTA, R.D. Introduction to cancer chemotherapeutics. **Chem. Rev.**, v. 109, p. 2859–2861, 2009.

SIEGEL, R.M. Caspases at the crossroads of immune-cell life and death. **Nat. Rev. Immunol.**, v.6, p. 308-317, 2006.

SILVA, A.J.M.; CHAQUIP, D.; NETTO, C.D.; PACIENZA-LIMA, W.; TORRES-

SANTOS, E.C.; ROSSI-BERGMANN, B.; MAUREL, S.; ALEXIS VALENTIN, A.; COSTA, P.R.R. Antitumoral, antileishmanial and antimalarial activity of pentacyclic 1,4-naphthoquinone derivatives, **Journal of the Brazilian Chemical Society**, v. 20, n. 1, p. 176-182, 2009.

SILVA, M.N.; FERREIRA, V.F.; SOUZA, M.C.B.V. Um Panorama Atual da Química e da Farmacologia de Naftoquinonas, com ênfase na β -lapachona e derivados. **Quim. Nova**, v. 26, n. 3, p. 407-416, 2003.

SMITH, M.T., YAGER, J.W., STEINMETZ, K.L., EASTMOND, D.A. Peroxidase-dependent metabolism of benzene's phenolic metabolites and its potencial role in benzene toxicity and carcinogenicity. **Environ. Health Perspect.**, v. 82, p. 23-29, 1989.

SigmaAldrich. Procedimento n° GS-10. Acesso em: fevereiro 2013. Disponível em :
<http://www.sigmaaldrich.com/etc/medialib/docs/Sigma/General_Information/1/insert_pt_gs10.Par.0001.File.tmp/insert_pt_gs10.pdf>

SINGH, N.P.; MACCOY, M.T.; TICE,R.R.; SCHNEIDER, E.L. A simple technique for quantification of low levels of DNA damage in individual cell. **Experimental Cell Research**, v. 175, p. 184 - 191,1988.

SOUZA, G.P.; CESTAS, L. C. Relatório setorial farmacêutico - Olhando o Futuro. **The cure – setor farmacêutico**, 2006.

SOUZA, M.V., PINHEIRO, A.C., FERREIRA, M.L., GONÇALVES, R.S.B., LIMA, C.H.C. Natural Products in Advance Clinical Trials Applied to Cancer. **Rev. Fitos**, v. 3, p. 25- 41, 2007.

SOUZA, M.G.G.; SANTO, F.H.E. Estudo com Familiares de Pessoas em Quimioterapia Antineoplásica. **Revista Brasileira de Cancerologia**, v. 54, n. 1, p. 31-41, 2008.

STOYANOVSKY, D.A., GOLDMAN, R., CLAYCAMP, G., KAGAN, V.E. Phenoxy radical-induced thiol-dependent generation of reactive oxygen species: implications for benzene toxicity. **Arch. Biochem. Biophys.**, v. 317, p. 315-323, 1995.

SU, S.; ADIKESAVAN, A.K.; JAISWAL, A.K. Si RNA inhibition of GRP58 associated with decrease in mitomycin C-induced DNA cross-linking and cytotoxicity. **Chemico-Biological Interactions**, v. 162, p. 81-87, 2006.

TAYLOR, R.C.; CULLEN, S.P.; MARTIN, S.J. Apoptosis: controlled demolition at the cellular level. **Nat Rev Mol Cell Biol.**, v. 9, n. 3, p. 231-241, 2008.

TEWEY, K.M.; CHEN, G.L.; NELSON, E.M.; LIU, L.F. Intercalative antitumor drugs interfere with the breakage-reunion reaction of mammalian DNA topoisomerase II. **J. Biol. Chem.**, v. 259, p. 9182-9187, 1984.

THOMSON, R. H. Naturally Occurring Quinones IV. **Recent Advances**, Blackie: London, 1997.

THOMPSON & THOMPSON. **Genética Médica**. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan

S.A., 2002. p. 274.

THURSTON, D.E. **Chemistry and Pharmacology of Anticancer Drugs**. Flórida: CRC Press, p. 290, 2007.

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

VAN ZANDWIJ, N. N-acetylcysteine for lung cancer prevention. **Chest**, v. 107, p. 1437- 1441. 1995.

VANNI, A.; FIORE, M.; DE SALVIA, R.; CUNDARI, E.; RICORDY, R.; CECCARELLI, R.; DEGRASSI, F. DNA damage and cytotoxicity induced by beta-lapachone: relation to poly(ADP-ribose) polymerase inhibition. **Mutat Res**, v. 401, n. 1-2, p. 55-63, 1998.

VERMES, I.; HAANEN, C.; STEFFENS-NAKKEN, H.; REUTELINGSPERGER, C. A novel assay for apoptosis. Flow cytometric detection of phosphatidylserine expression on early apoptotic cells using fluorescein labelled Annexin V. **J. Immunol. Methods**, v. 184, p.39-51, 1995.

VIEIRA, G.C. **Avaliação In Vitro do Potencial Citotóxico de Quatro Análogos de Benzotiazóis**. Dissertação (Mestrado) Faculdade de Medicina, Universidade Federal do Ceará, Fortaleza, 2011.

WALLACE, L. A. Major sources of benzene exposure. **Environ. Health Perspect.**, v. 82, p. 165-169, 1989.

WALTON, M.I.; EVE, P.D.; HAYES, A.; VALENTI, M.; DE HAVEN BRANDON, A.; BOXALL, K.J.; AHERNE, G.W.; ECCLES, S.A.; RAYNAUD, F.I.; WILLIAMS, D.H.; READER, J.C.; COLLINS, I.; GARRETT, M.D. The preclinical pharmacology and therapeutic activity of the novel CHK1 inhibitor SAR-020106. **Mol. Cancer Ther.**, v. 9, p. 89-100, 2010.

WIEMELS, J., SMITH, M.T. Enhancement of myeloid cell growth by benzene metabolites via the production of active oxygen species. **Free Radic. Res.** v. 30, p. 93–103, 1999

YANG, P.; EBBERT, J.O.; SUN, Z.; WEINSHILBOUM, R.M. Role of the Glutathione Metabolic Pathway in Lung Cancer Treatment and Prognosis: A Review. **Journal of Clinical Oncology**, v. 24, n. 11, p. 1761-1769, 2006.

ZHIYUAN TANG, Z.; WU, M.; LI, Y.; ZHENG, X.; LIU, H.; CHENG, X.; XU, L.; WANG, G.; HAO, H. Absolute quantification of NAD(P)H:quinone oxidoreductase 1 in human tumor cell lines and tissues by liquid chromatography–mass spectrometry/mass spectrometry using both isotopic and non-isotopic internal standards. **Analytica Chimica Acta**, v. 772, p. 59-67, 2013.

WANG, J.C. **Untangling the Double Helix: DNA Entanglement and the Action of the DNA Topoisomerases**. New York: Cold Spring Harbor Laboratory Press. 2009.

WIEMELS, J., SMITH, M.T. Enhancement of myeloid cell growth by benzene metabolites via the production of active oxygen species. **Free Radic. Res.**, v. 30, p. 93–103, 1999.

WHO – WORLD HEALTH ORGANIZATION. Preventing cancer: promoting a healthy diet and physical activity in childhood. 2011. Disponível em:

<<http://www.who.int/cancer/prevention/children/en/index.html>>. Acesso em: 20 jan 2012.

WOLF, D. & ROTTER, V. Major deletions in the gene encoding the p53 tumor antigen cause lack of p53 expression in HL-60 cells. *Proc. Natl. Acad. Sci.*, v. 82, p. 790-794, 1985.

ZAFARULLAH, M.; LI, W. Q.; SYLVESTER, J.; AHMAD, M. Molecular mechanisms of N-acetylcysteine actions. **Cell. Mol. Life Sci.**, v. 60, p. 6-20, 2003.

ZHANG, F.; LAU, S.S.; MONKS, T.J. The Cytoprotective Effect of N-acetyl-L-cysteine against ROS-Induced Cytotoxicity Is Independent of Its Ability to Enhance Glutathione Synthesis. **Toxicological Sciences**, v. 120, n. 1, p. 87-97, 2011.